

CONTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS Y RNAS DE ORIGEN PATERNO Y SU POSIBLE FUNCIÓN EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL DE MAMÍFEROS

B. Jose Manuel Mayorga-Torres¹, Judit Castillo¹, Meritxell Jodar^{1*}, Rafael Oliva^{1,2*}.

1. Grup de Biologia Molecular de la Reproducció i Desenvolupament, Dept. Ciències Biomèdiques, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica Casanova 143, 08036 Barcelona
2. Servei de Bioquímica i Genètica Molecular, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona.

*Autor de correspondència: Meritxell Jodar. meritxell.jodar@ub.edu Rafael Oliva. roliva@ub.edu

Resumen

Tradicionalmente, la contribución del espermatozoide al embrión se ha reducido al aporte del DNA paterno. Sin embargo, diferentes estudios han establecido que el espermatozoide proporciona al oocito un DNA con múltiples marcas epigenéticas, además de un conjunto de proteínas y RNAs que podrían ser de gran importancia para las primeras fases del desarrollo. Recientemente, nuestro grupo ha identificado el posible origen paterno de 108 proteínas presentes en el blastocisto humano, ya sea como proteínas del espermatozoide que se mantienen estables hasta la fase de blastocisto o bien como RNAs del espermatozoide que pueden ser traducidos por el embrión temprano. El objetivo de este estudio es analizar si este conjunto de proteínas del embrión humano con un posible origen paterno están conservadas en ratón. Mediante el análisis *in silico* de datos proteómicos y de RNA obtenidos por técnicas de alta resolución disponibles en la literatura y aplicando criterios estrictos de selección, se ha confirmado la conservación en ratón del posible origen paterno de algunas proteínas del embrión. Esto sugiere que ciertas proteínas y RNAs del espermatozoide podrían ser esenciales para el desarrollo embrionario temprano en mamíferos. Adicionalmente, los hallazgos obtenidos en este estudio podrían permitir la detección de posibles biomarcadores útiles en el diagnóstico y pronóstico de la fertilidad masculina.

Palabras claves: Desarrollo embrionario temprano, espermatozoide, blastocisto, RNA, proteínas.

Abstract

Traditionally, the contribution of the sperm to the embryo has been minimized to the delivery of the paternal DNA. However, different studies have established that spermatozoon provides to the oocyte a DNA with multiple epigenetic marks, in addition to a set of proteins and RNAs, which could be essential for early embryogenesis. Our group has recently identified 108 proteins in the human blastocyst, which might have a paternal origin. These embryo proteins would derive from either sperm proteins that remain stable until the blastocyst stage or sperm RNAs that could be translated in the early embryo. The objective of this study is to analyze the conservation of this set of human embryo proteins suggested as paternally-derived in other species such as mice. *In silico* analyses of proteomic and RNA high-throughput data obtained from the literature and selected under strict criteria have revealed the paternal origin of some of these human embryo proteins also in mouse. These results suggest that some sperm proteins and RNAs could be essential for pre-implantation mammalian embryo development. In addition, several possible biomarkers have emerged from our results to be further developed in order to improve the diagnosis of male fertility.

Key words: Early embryo development, sperm, blastocyst, RNA, proteins.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario previo a la implantación es un proceso complejo y altamente regulado que se inicia con la fusión de los dos gametos y finaliza con la formación del blastocisto (Fig. 1). Aunque el papel de la maquinaria celular materna, así como del propio genoma

del cigoto tras su activación está ampliamente establecido (Xue et al., 2013; Gao et al., 2017), el aporte del gameto masculino a la embriogénesis temprana no se ha revelado en su totalidad.

Tradicionalmente, la contribución del espermatozoide a la generación del nuevo individuo ha sido minimizada a la transmisión del material genético. Sin embar-

go, recientemente se ha observado no solo que este DNA está provisto de múltiples marcas epigenéticas, sino también que el gameto masculino aporta una compleja población de proteínas y de RNAs en el momento de la fertilización que podrían ser cruciales en las primeras fases del desarrollo embrionario (Castillo et al., 2018; Guo et al., 2017; Gao et al., 2017). Por ejemplo, el espermatozoide aporta al oocito el factor de activación de los oocitos y el centrosoma, ambos necesarios para los primeros pasos del desarrollo embrionario (Barroso et al., 2009). Además los estudios de Yuan et al., 2016 y Guo et al., 2017 han demostrado que embriones generados con espermatozoides con un perfil alterado de RNA son capaces de restablecer un correcto desarrollo embrionario después de la inyección de RNAs procedentes de espermatozoides normales.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha realizado un estudio *in silico* en el cual se han identificado proteínas del espermatozoide humano con impacto en la fertilización, desarrollo embrionario preimplantacional y la regulación de la expresión génica (Castillo et al., 2018). Además, con el fin de identificar proteínas del embrión preimplantacional que pudieran tener un origen paterno, se realizó un estudio integrativo de los datos proteómicos y transcriptómicos del espermatozoide, oocito, blastocisto humano y otras células relacionadas como las células del cúmulus y fluidos reproductivos. De esta forma, se identificaron 108 proteínas del blastocisto humano con un posible origen paterno, ya sean como proteínas del espermatozoide que se mantienen estables hasta el día 5 del desarrollo, previamente a la implantación (82 proteínas del blastocisto), o bien como RNAs del espermatozoide que podrían ser traducidos por el embrión temprano (28 proteínas del blasto-

cisto). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que ciertas proteínas y RNAs del espermatozoide podrían jugar un papel importante en el desarrollo embrionario preimplantacional (Castillo et al., 2018).

No obstante, debido a la dificultad asociada a la obtención de oocitos y embriones humanos para estudios experimentales, la descripción tanto proteómica como transcriptómica de estas células se encuentra limitada. Esto, conjuntamente a la gran variabilidad existente entre individuos en el modelo humano debida a por ejemplo, edad, variaciones genéticas individuales o factores de estilo de vida, hace necesaria la validación de estos resultados con técnicas complementarias. Una primera aproximación podría centrarse en el estudio de la conservación de estos resultados en otras especies de mamíferos. El ratón es uno de organismos modelos más utilizados para estudiar el desarrollo embrionario debido al grado de conservación evolutiva comparado con el humano (Perlman 2016). Sin embargo, para la extrapolación de los hallazgos en ratón al desarrollo de embriones humanos hay que tener en cuenta las diferencias particulares de cada especie, como por ejemplo el momento en que se activa el genoma del cigoto, el cual se produce con anterioridad en el ratón (Fig.1) (Rossant and Tam, 2017; Vassena et al. 2011). No obstante, el modelo murino nos ofrece la posibilidad de aplicar metodologías experimentales como la manipulación genética y/o transcripcional para elucidar la función de proteínas o RNAs del espermatozoide en el desarrollo de mamíferos.

El objetivo del presente estudio es analizar el grado de conservación en ratón del conjunto de proteínas del embrión humano que se han establecido como posiblemente derivadas del espermatozoide. Para ello, se ha

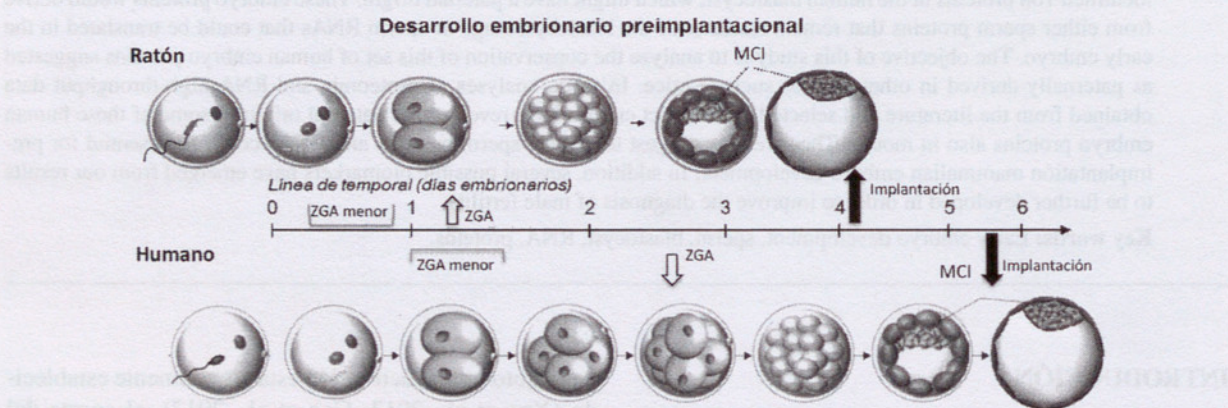


Figura 1. Desarrollo embrionario preimplantacional en ratón y humano. La principal diferencia entre el desarrollo embrionario preimplantacional de humano y ratón es el momento de la activación del genoma del cigoto (ZGA). En ratón, primero ocurre un ZGA menor durante los estadios de 1 y 2 células, seguido de la ZGA principal en el estadio de 2 células (Rossant and Tam, 2017). En humanos el proceso de activación del genoma embrionario se inicia más tarde durante los estadios de 2-4 células (ZGA menor) seguido de un ZGA principal que ocurre partir de la etapa de 6-8 células (Vassena et al., 2011).

analizado, a partir de datos disponibles en la literatura, los niveles de estas proteínas y sus correspondientes RNAs en espermatozoides, oocitos y diferentes estadios embrionarios previos a la implantación en el ratón. La identificación de proteínas específicas del embrión con un posible origen paterno en diferentes especies de mamíferos ayudará a discernir qué proteínas y RNAs del espermatozoide pueden ser importantes para el desarrollo embrionario temprano. Además, los hallazgos obtenidos con este estudio contribuirán a detectar proteínas candidatas a ser validadas como posibles biomarcadores que puedan ser desarrollados de cara al diagnóstico de la fertilidad masculina en futuros estudios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compilación de los perfiles proteómicos y transcriptómicos del espermatozoide, oocito y diferentes fases del desarrollo embrionario preimplantacional en ratón

Se realizó una búsqueda exhaustiva de estudios proteómicos de espermatozoides, oocitos, cigotos, embriones de 2 células y blastocistos de ratón (*Mus musculus*), utilizando la base de datos PubMed. Solo se seleccionaron artículos publicados en inglés y disponibles en línea hasta finales de enero de 2019. Además, con el fin de evitar la identificación de falsos positivos, se establecieron criterios de calidad estrictos para la selección de los datos proteómicos. De esta manera, únicamente se consideraron estudios basados en espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y en los cuales la identificación de proteínas se basara en al menos un péptido único por proteína y un *false discovery rate* (FDR) $\leq 1\%$ para cada péptido.

Para la generación del proteoma espermático de ratón se utilizaron los perfiles proteómicos de los artículos originales Guyonnet et al., 2012; Chauvin et al., 2012; Dorus et al., 2010; y Claydon et al., 2012. De la misma manera, para establecer el perfil proteómico del oocito, cigoto, embriones de 2 células y blastocistos, se incluyeron datos reportados en los estudios de Zhang et al., 2009; Wang et al., 2010; Wang et al., 2014; Pfeiffer et al., 2011; Gao et al., 2017; y An et al., 2017. Los datos transcriptómicos se obtuvieron a partir de la base de datos SpermBase para el espermatozoide (www.sperm-base.org), el estudio de Li et al., 2017 para el oocito y el estudio de Gao et al., 2017 para los diferentes estadios embrionarios.

Los datos de los perfiles proteómicos y transcriptómicos de los espermatozoides, oocitos y blastocistos humanos fueron obtenidos de la compilación realizada en el estudio de Castillo et al., 2018.

Análisis de las proteínas del embrión humano con un posible origen paterno en el modelo murino

El listado de 108 proteínas embrionarias con un posible origen paterno obtenido del estudio de Castillo et al., 2018 se comparó con los perfiles proteómicos y transcriptómicos de los gametos y embriones de ratón compilados en este estudio, para analizar su conservación. Todas aquellas proteínas que en ratón parecían ser de origen materno, ya fuera por su presencia en el proteoma de oocito o bien porque presentaban altos niveles de RNA (>25 FPKM), fueron desestimadas. También se descartaron aquellas proteínas que parecían tener origen embrionario por sus niveles altos de RNA (>25 FPKM) una vez activado el genoma del embrión (embrión de 2 células).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de obtener y verificar los datos proteómicos de los diferentes estudios incluidos en este estudio, y teniendo en cuenta los criterios de inclusión previamente descritos en la sección de materiales y métodos, se compilaron un número total de 2.984, 4.477, 6.121, 5.001 y 3.987 proteínas no redundantes para el espermatozoide, oocito, cigoto, embrión de 2 células y blastocisto de ratón, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre el número de proteínas identificadas en los espermatozoides, oocitos, y estadios celulares preimplantacionales para ratón y humano mediante el uso de espectrometría de masas.

	Ratón	Humano, Castillo et al., 2018
Tipo celular	Número de proteínas identificadas	Número de proteínas identificadas
Espermatozoide	2.984	6871
Oocito	4.477	1376
Zigoto	6,121	-
2 células	5,001	-
Blastocisto	3,987	1300

Al hacer la comparación entre el número de proteínas identificadas para cada uno de los estadios celulares, se observa una clara diferencia entre las dos especies. En primer lugar el número de proteínas identificadas en el espermatozoide humano es mucho más alto que en ratón (6871 en humano y 2984 en ratón). Esto puede ser debido a que los espermatozoides humanos son células que

se pueden obtener, purificar y fraccionar en grandes cantidades, lo que se ha permitido caracterizar su proteoma de forma casi completa, incluyendo aquellas proteínas menos abundantes (Amaral *et al.*, 2013). En ratón, el número de estudios proteómicos es mas reducido y son pocos los trabajos en los cuales se realiza una caracterización exhaustiva del proteoma espermático usando tecnología reciente.

De forma similar, la identificación de proteínas en el oocito y embrión en el modelo murino es mucho mayor que en el humano. Esta diferencia también podría responder a una cuestión técnica, dada la mayor facilidad de recolección de oocitos y embriones en ratón, permitiendo así una mejor caracterización proteica de estas células en el modelo animal.

Tabla 2. Perfil proteómico y transcriptómico de las proteínas embrionarias potencialmente aportadas por el espermatozoide identificadas en espermatozoides, oocitos, y estadios embrionarios preimplantacionales en el ratón. Datos de identificación de proteína (P) y/o su expresión a nivel de transcritos (R).

							
G1	CEP135	P	x			x	
		R	20.4193	3.29821	9.001328	0.64658	0.945607
	ZMYM2	P				x	x
		R	94.8156	8.31878	2.995598	8.99736	1.47571
	PANK4	P				x	x
		R	227.517	0	0.1986682	0	1.678449
	ERC1	P				x	
		R	108.088	0.611301	0.4413281	0.05452	0.422809
	DGCR8	P				x	
		R	73.5345	3.74823	4.626998	5.18775	5.411417
	NFX1	P				x	
		R	3424.35	9.85138	3.0207086	0	2.151136

De acuerdo con los datos proteómicos y transcriptómicos de los gametos y las diferentes fases del embrión de ratón, 6 de las 108 proteínas del blastocisto humano relacionadas a un posible origen paterno presentan un comportamiento similar en el modelo murino (Tabla 2). La conservación de estas proteínas embrionarias en ambas especies sugiere que son proteínas o RNAs del espermatozoide con una función relevante para el desarrollo embrionario en mamíferos.

El perfil proteómico y transcriptómico de estas proteínas permitió agruparlas en dos grupos. En primer lugar encontramos la proteína centrosomal 135 (CEP135), la cual ha sido identificada en el proteoma espermático del ratón y en el estadio embrionario de 2 células. Además, sus datos transcriptómicos muestran un nivel bajo de RNA en ambos gametos y en los diferentes estadios

embrionarios, lo que sugiere que CEP135 es aportada por el espermatozoide al embrión y se mantendría estable hasta el estadio embrionario de 2 células. Cabe resaltar la importancia de CEP135, la cual se ha reportado actúa como una proteína de andamiaje durante la biogénesis temprana del centriolo y su papel en el desarrollo embrionario ha sido ya descrito previamente (Ohta *et al.*, 2002).

En un segundo grupo encontramos las proteínas ZMYM2, PANK4, DGCR8, NFX1 y ERC1. Estas proteínas se han identificado en el estadio embrionario de dos células y/o blastocisto, pero no se han detectado en el ninguno de los dos proteomas de los gametos. No obstante, mientras sus correspondientes transcritos se encontraron de forma muy abundante en el espermatozoide, tanto en oocitos como en los diferentes estadios del embrión sus niveles eran bajos. Este perfil transcriptómico sugiere el origen paterno de estas proteínas presentes en alguno de los estadios embrionarios, a partir de RNAs aportados por el espermatozoide que podrían ser traducidos utilizando la maquinaria celular que ha proporcionado el oocito.

Cabe destacar que las proteínas ZMYM2 y PANK4 las cuales han sido encontradas en embriones de dos células y blastocisto, se encuentran asociadas en procesos de regulación de la transcripción relacionados con la remodelación de la cromatina y con procesos biosintéticos de coenzima A, respectivamente (Aguilar-Martínez *et al.*, 2015; Leonardi *et al.*, 2007). Además, las proteínas DGCR8, NFX1 y ERC1, que están presentes únicamente en el embrión de dos células, se han relacionado con procesos relevantes como la regulación la biogénesis de microRNAs (Kim *et al.*, 2016), la represión de la regulación transcripcional del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (Arlotta *et al.*, 2002) y la reparación del DNA (Chen *et al.*, 2014), respectivamente.

El posible origen paterno de otras proteínas del embrión no ha podido ser confirmado en su totalidad en este estudio por falta de datos disponibles. Por ejemplo, las proteínas BBX, CNBD2, DNAH17, EFCAB6, FHAD1 y FOLH1 no han sido identificadas en ninguno de los estadios de embrión murino hasta el momento, no obstante sus correspondientes RNAs se han encontrado elevados en el espermatozoide y en niveles relativamente bajos en oocitos y en los diferentes estadios del embrión de ratón. Ya que el perfil transcriptómico es similar al observado en humano, estamos planeando el uso de técnicas experimentales alternativas, como es la inmunodetección por Western blot, para poder establecer su presencia en algún estadio embrionario preimplantacional murino. Además, encontramos otras proteínas detectadas en el embrión que podrían tener un origen paterno, como la ARHGAP21 y la TSC2. Aunque hemos detectado unos niveles elevados de sus correspon-

dientes transcritos en el espermatozoide, no se ha establecido si también se encuentran en el oocito. Por tanto, para poder confirmar que son proteínas del embrión con un origen paterno, se debe evaluar la presencia de sus RNAs en el oocito mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR).

No obstante, todos estos resultados son derivados de estudios *in silico* y el origen paterno así como su posible función en el desarrollo embrionario ha de ser validado experimentalmente. Por tal motivo, nuestros planes futuros son, en primer lugar, validar experimentalmente el origen paterno de estas 6 proteínas embrionarias mediante Western Blot y RT-PCR tanto en humano como en ratón. Una vez verificado su presencia en espermatozoides y los diferentes estadios embrionarios y, descartando cualquier contribución proteómica-transcriptómica por parte del oocito, se planea realizar un estudio funcional del posible impacto de estos RNAs y proteínas del espermatozoide en el desarrollo embrionario preimplantacional. Esto se podría conseguir mediante estudios funcionales de *knock out* específicos de línea germinal o bien con el uso RNAs de interferencia dirigidos a aquellos RNAs de espermatozoide que podrían ser traducidos en el embrión.

Finalmente, la identificación de proteínas o RNAs del espermatozoide que pueden ser relevantes para el desarrollo embrionario temprano podría resultar en la identificación de candidatos a posibles biomarcadores potencialmente útiles para evaluar la infertilidad masculina, pudiendo así a ayudar a mejorar el diagnóstico y pronóstico de pacientes con problemas reproductivos en las clínicas de reproducción asistida.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio está subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad, fondos FEDER "una manera de hacer Europa" y Acción Estratégica en Salud a R.O. (PI13/00699, PI16/00346) y J.C. (CD17/00109). M.J. está subvencionada por la Generalitat de Catalunya (Pla Estratègic de Recerca i Innovació en Salut, PERIS 2016-2020, SLT002/16/00337) y el premio PROLAB 2017. B.J.M. está subvencionado por el programa de la Fundación para el Futuro de Colombia-. Colfuturo 2017.

REFERENCIAS

- AGUILAR-MARTINEZ, E., [et al.] (2015). «Screen for Multi-SUMO-binding Proteins Reveals a Multi-SIM-binding Mechanism for Recruitment of the Transcriptional Regulator ZMYM2 to Chromatin». *PNAS*, vol. 112, no 35, p.
- AMARAL, A., [et al.] (2013). «The Combined Human Sperm Proteome: Cellular Pathways and Implications for Basic and Clinical Science». *Human Reproduction Update*, vol. 20, no 1, p. 40-62
- AN, T., [et al.] (2017). «Comparative Analysis of Proteomes between Diabetic and Normal Human Sperm: Insights into the Effects of Diabetes on Male Reproduction Based on the Regulation of Mitochondria-Related Proteins». *Molecular Reproduction and Development*, vol. 85, no 1, p. 7-16.
- ARLOTTA P., [et al.] (2002). «Murine NFX.1: Isolation and Characterization of Its Messenger RNA, Mapping of Its Chromosomal Location and Assessment of Its Developmental Expression». *Immunology*, vol. 106, no 2, p. 173-181
- BARROSO, G., [et al.] (2009). «Developmental Sperm Contributions: Fertilization and Beyond». *Fertility and Sterility*, vol. 92, no 3, p. 835-848.
- CASTILLO, J., (2018). «The Contribution of Human Sperm Proteins to the Development and Epigenome of the Preimplantation Embryo». *Human Reproduction Update*, vol. 24, no 5, p. 535-555.
- CHAUVIN, T., [et al.] (2012). «A Systematic Analysis of a Deep Mouse Epididymal Sperm Proteome». *Biology of Reproduction*, vol. 87, no 6, p. 141, 1-8.
- CHEN, Y., [et al.] (2014). «Identification of Druggable Cancer Driver Genes Amplified across TCGA Datasets». *PloS One*, vol. 9, no 5, p. e98293.
- CLAYDON, A., [et al.] (2012). «Heterogenous Turnover of Sperm and Seminal Vesicle Proteins in the Mouse Revealed by Dynamic Metabolic Labeling». *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 11, no 6, p. M111.
- DORUS, S., [et al.] (2010). «Sperm Proteomics Reveals Intensified Selection on Mouse Sperm Membrane and Acrosome Genes». *Molecular Biology and Evolution*, vol. 27, no 6, p. 1235-1246.
- GAO, Y., [et al.] (2017). «Protein Expression Landscape of Mouse Embryos during Pre-Implantation Development». *Cell Reports*, vol. 21, no 13, p. 3957-3969.
- GUO, LEI, (2017). «Sperm-Carried RNAs Play Critical Roles in Mouse Embryonic Development». *Oncotarget*, vol. 8, no 40, p. 67394.
- GUYONNET, B., [et al.] (2012). «Isolation and Proteomic Characterization of the Mouse Sperm Acrosomal Matrix». *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 11, no 9, p. 758-774
- KIM, Y., [et al.] (2016). «Deficiency in DGCR8-Dependent Canonical MicroRNAs Causes Infertility Due to Multiple Abnormalities during Uterine Development in Mice». *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, p. 20242.
- LEONARDI, R [et al.] (2007). «Activation of Human Mitochondrial Pantothenate Kinase 2 by Palmitoylcar-

- nitine». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no 5, p. 1494-1499.
- LI, X., [et al.] (2017). «Dosage Compensation in the Process of Inactivation/Reactivation during Both Germ Cell Development and Early Embryogenesis in Mouse». *Scientific Reports*, vol. 7, no 1, p. 3729
- OHTA, T., [et al.] (2002). «Characterization of Cep135, a Novel Coiled-Coil Centrosomal Protein Involved in Microtubule Organization in Mammalian Cells». *The Journal of Cell Biology*, vol. 156, no 1, p. 87-100.
- PERLMAN, R., (2016). «Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective». *Evolution, Medicine, and Public Health* 2016, vol. 2016, no 1, p. 170-176.
- PFEIFFER, M., [et al.] (2011). «Proteomic Analysis of Mouse Oocytes Reveals 28 Candidate Factors of the 'Reprogrammome'». *Journal of Proteome Research*, vol. 10, no 5, p. 2140-2153.
- ROSSANT, J., Patrick P.L. (2017). «New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation». *Cell Stem Cell*, vol. 20, no 1, p. 18-28.
- VASSENA, R., [et al.] «Waves of Early Transcriptional Activation and Pluripotency Program Initiation during Human Preimplantation Development». *Development*, vol. 138, no 17, p. 3699-3709.
- WANG, B., [et al.] (2014). «Integral Proteomic Analysis of Blastocysts Reveals Key Molecular Machinery Governing Embryonic Diapause and Reactivation for Implantation in Mice». *Biology of Reproduction*, vol. 90, no 3, p. 52, 1-11.
- WANG, S., [et al.] (2010). «Proteome of Mouse Oocytes at Different Developmental Stages». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no 41, p. 17639-17644.
- XUE, Z., [et al.] (2013). «Genetic Programs in Human and Mouse Early Embryos Revealed by Single-Cell RNA Sequencing». *Nature*, vol. 500, no 7464, p. 593.
- YUAN, S., [et al.] (2016). «Sperm-Borne miRNAs and Endo-SiRNAs Are Important for Fertilization and Preimplantation Embryonic Development». *Development*, vol. 143, no 4, p. 635-647.
- ZHANG, P [et al.] (2009). «Proteomic-Based Identification of Maternal Proteins in Mature Mouse Oocytes». *BMC Genomics*, vol. 10, no 1, p. 348.