



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

**“Participación de las vesículas
extracelulares oviductales bovinas en la
regulación de la fisiología espermática”**

Tesinista: ***Amira Jasmine Adre***

Firma:.....

Directora: ***Dra. Anahí Franchi***

Firma:.....

2019



Centro de Biología Celular y Molecular
Instituto de Investigaciones Biológicas y
Tecnológicas



Participación de las vesículas extracelulares oviductales bovinas en la regulación de la fisiología espermática

Tribunal Examinador

Apellido y Nombre: Dr. Clop, Eduardo

Firma:.....

Apellido y Nombre: Dr. Guidobaldi, H. Alejandro

Firma:.....

Apellido y Nombre: Dra. Rivarola, Angélica

Firma:.....

Calificación:

Fecha:

Índice

Lista de abreviaturas	1
Resumen.....	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Consideraciones Éticas.....	11
Obtención del fluido oviductal y aislamiento de las VE	11
Preparación de extractos proteicos.....	12
Western Blotting de VE	13
Microscopía electrónica de transmisión	13
Análisis de la distribución de tamaño de las VE.....	13
Co-incubación de las VE con los espermatozoides	14
Análisis de la incorporación de las VE por los espermatozoides mediante citometría de flujo.....	14
Evaluación de la capacitación espermática	15
Fosforilación en residuos tirosina de proteínas espermáticas.....	16
Análisis estadístico.....	16
RESULTADOS	17
Identificación y caracterización de las VE del fluido oviductal bovino	17
Determinación de la interacción de las VE con espermatozoides bovinos	20
Evaluación del efecto de las VE sobre la capacitación espermática.....	21
DISCUSIÓN	24
BIBLIOGRAFÍA	29
AGRADECIMIENTOS	33

Lista de abreviaturas

AC: adenilato ciclasa

ASB: albúmina sérica bovina

CMV: cuerpos multivesiculares

DLS: dispersión de luz dinámica

ECL: quimioluminiscencia

MV: microvesículas

P: progesterona

PAGE-SDS: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

PKA: proteína quinasa A

PVDF: difluoruro de polivinilo

PY: proteínas fosforiladas en residuos tirosina

RA: reacción acrosómica

SDS: dodecilsulfato de sodio.

SFB: suero fetal bovino

TBS: solución amortiguadora de Tris.

VE: vesículas extracelulares

Participación de las vesículas extracelulares oviductales bovinas en la regulación de la fisiología espermática

Palabras clave: vesículas extracelulares, oviducto bovino, capacitación espermática

Resumen

Los espermatozoides de mamíferos eyaculados son incapaces de fertilizar un ovocito y deben pasar por varios cambios imprescindibles para adquirir esta competencia. El tracto reproductivo femenino constituye el entorno en el que los espermatozoides experimentan el proceso de capacitación, y así se preparan para la fertilización. Los mecanismos moleculares que gobiernan la capacitación y sus lugares exactos de ocurrencia *in vivo* aún no han sido completamente definidos, sin embargo, se conoce bien que este proceso está estrechamente regulado por componentes del tracto reproductivo femenino.

Por otro lado, recientemente se ha identificado un nuevo sistema de comunicación mediado por vesículas extracelulares (VE). Las VE están compuestas de una bicapa lipídica y moléculas de superficie que les permiten reconocer las células blanco. De esta manera, inducen la señalización a través de diferentes mecanismos y modulan el estado fisiológico de la célula receptora. Las VE se han identificado en diversos fluidos reproductivos, y en particular las VE aisladas de diferentes regiones del tracto femenino constituyen señales que pueden tener un papel clave en la regulación de la fisiología espermática. El presente trabajo tiene por objetivos caracterizar las VE de diferentes regiones del oviducto bovino y analizar su interacción y sus efectos fisiológicos sobre los espermatozoides. Mediante análisis por microscopía electrónica y dispersión dinámica de la luz se observó la presencia de vesículas de tamaños diversos, revelando la existencia de exosomas y microvesículas. También se verificó la presencia de las proteínas marcadoras CD81 y HSP70, presentes en las VE de ambas regiones. La interacción de las VE con los espermatozoides fue analizada por microscopía de fluorescencia y la cinética de incorporación de las mismas a las células mediante citometría de flujo. En ensayos funcionales con espermatozoides bovinos criopreservados, se observó que el agregado de VE al medio de incubación indujo un aumento en los niveles de fosforilación de proteínas en tirosina, así como un incremento en la proporción de células que experimentaron la reacción acrosómica inducida.

Los resultados de este trabajo contribuyen a entender el papel de las VE en la comunicación entre los espermatozoides y el tracto reproductivo femenino, aportando conocimientos en relación a la fisiología espermática que podrían ser extrapolados a las tecnologías de reproducción asistida para mejorar su eficiencia.

INTRODUCCIÓN

El pasaje de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino es un complejo sistema de selección para maximizar la probabilidad de que los espermatozoides de alta calidad alcancen al ovocito y una vez allí tengan la oportunidad de fecundarlo exitosamente. Después de la espermatogénesis, los espermatozoides morfológicamente diferenciados siguen siendo incapaces de fertilizar un ovocito y deben pasar por varios cambios imprescindibles para adquirir esta competencia. La primera etapa de maduración que experimentan se lleva a cabo durante su tránsito por el epidídimo, donde una serie de proteínas extracelulares se adhieren a la superficie de los espermatozoides (Robaire et al., 2006). Otros factores se asocian a la superficie durante la eyaculación, cuando las células espermáticas se mezclan con los fluidos de secreción de diversas glándulas sexuales accesorias. Este revestimiento extracelular no solo protege la integridad de la membrana de los espermatozoides sino que también inhibe una prematura "capacitación" (Austin, 1952), el segundo proceso de maduración a través del cual las células espermáticas adquieren la capacidad de experimentar la reacción acrosómica (exocitosis del acrosoma) y fertilizar al ovocito (Gadella et al., 2008).

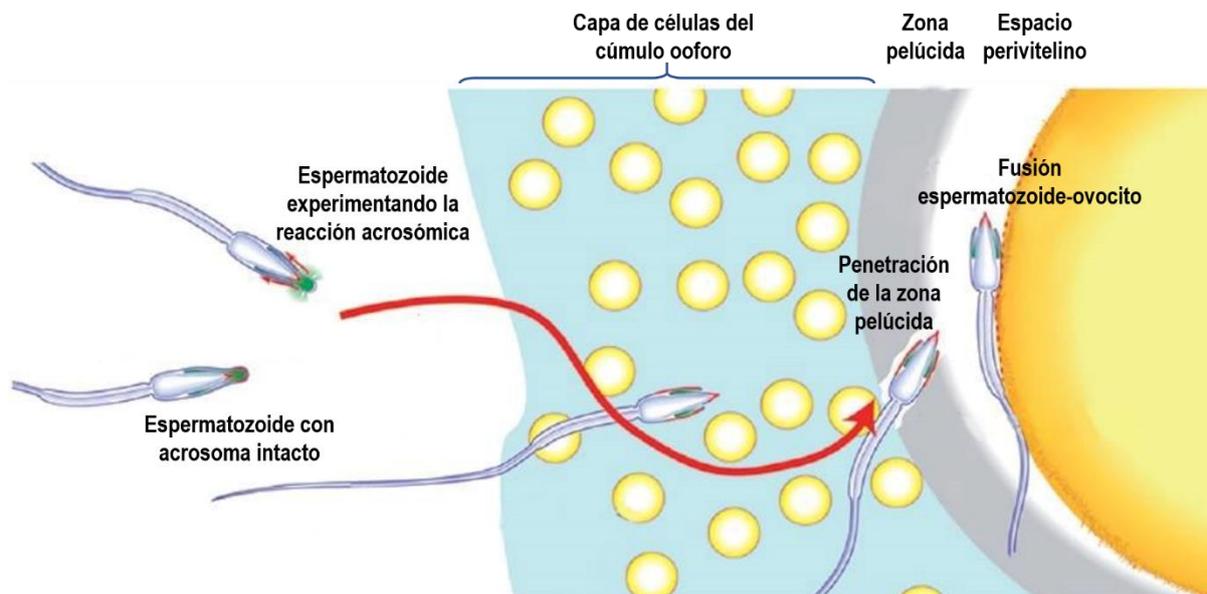


Figura 1. Eventos durante el proceso de fertilización. (a) Los espermatozoides migran al oviducto y llegan a las proximidades del ovocito, donde se induce una reacción acrosómica. (b) Los espermatozoides se unen y atraviesan la zona pelúcida. (c) Sólo los espermatozoides que han experimentado la reacción acrosómica pueden fusionarse con ovocito. (Modificada de Okabe 2013).

Los mecanismos moleculares que gobiernan la capacitación y sus lugares exactos de ocurrencia *in vivo* aún no han sido completamente definidos, sin embargo, se conoce bien que este proceso está estrechamente regulado por componentes del tracto reproductor femenino. Una vez que los espermatozoides se depositan en la vagina, para evitar el medio ácido y la respuesta inmune, se contactan rápidamente con el moco cervical y entran en el cuello uterino. Luego atraviesan la unión útero-tubárica para llegar al istmo oviductal (Figura 2), donde son retenidos y almacenados en reservorios espermáticos (Suarez and Pacey, 2006). La creciente complejidad de la mucosa en dirección al ovario les ofrece un mayor obstáculo para el avance hacia el ampulla, que es el sitio en el que tendrá lugar la fertilización. Una vez allí, finalmente alcanzan el *cúmulo ooforo* y la zona pelúcida para fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Durante este tránsito a través del tracto femenino, tienen lugar una serie de modificaciones progresivas de la membrana plasmática de los espermatozoides que producen la

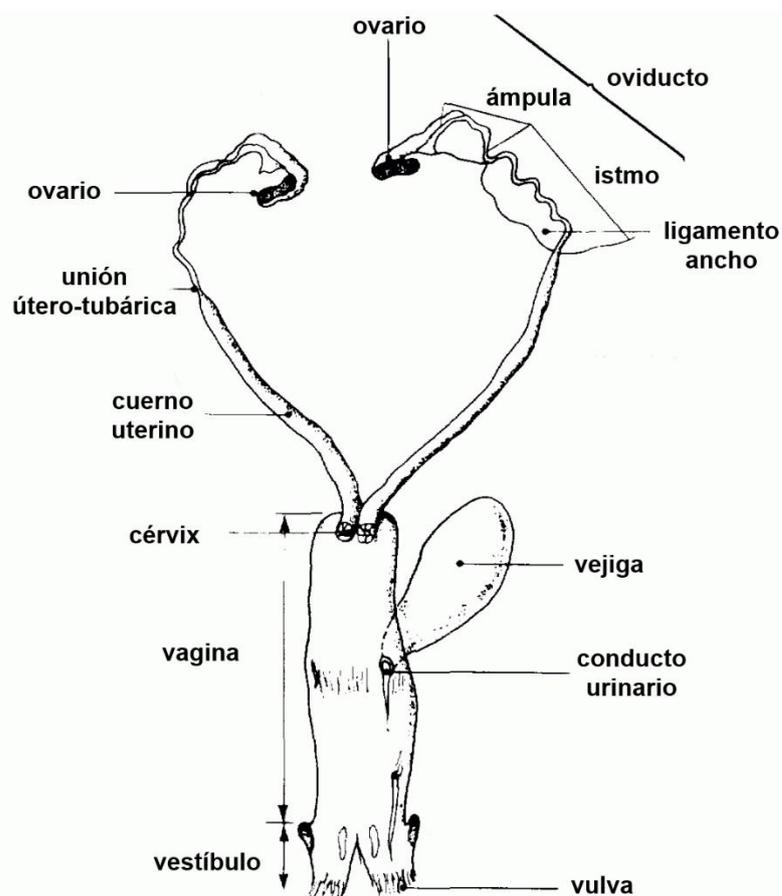


Figura 2. Tracto reproductor femenino bovino. Los espermatozoides se depositan en la vagina y luego entran en el cuello uterino. Después de atravesar la unión útero-tubárica llegan al oviducto, que puede dividirse anatómicamente en dos regiones: istmo y ampulla, siendo esta última el sitio en el cual tiene lugar el proceso de fertilización.

salida de colesterol (Leahy and Gadella, 2015), lo cual aumenta la permeabilidad al ion Ca^{2+} , que es requerido para los eventos posteriores (Breitbart, 2002).

De esta forma, la capacitación se caracteriza por una serie compleja de cambios estructurales (Puga Molina et al., 2018) y funcionales que comienzan con la remoción de factores estabilizantes adquiridos por los espermatozoides durante su residencia en el plasma seminal; continúan durante el tránsito por el tracto femenino, y se considera que concluyen cuando los espermatozoides son capaces de responder a moléculas inductoras de la reacción acrosómica (RA). Estudios *in vitro* han identificado a la albúmina sérica, el HCO_3^- y el Ca^{2+} como los componentes críticos del medio de cultivo para que la capacitación espermática tenga lugar (Kopf, 1999), siendo la incorporación de Ca^{2+} también necesaria para que ocurra la reacción acrosómica.

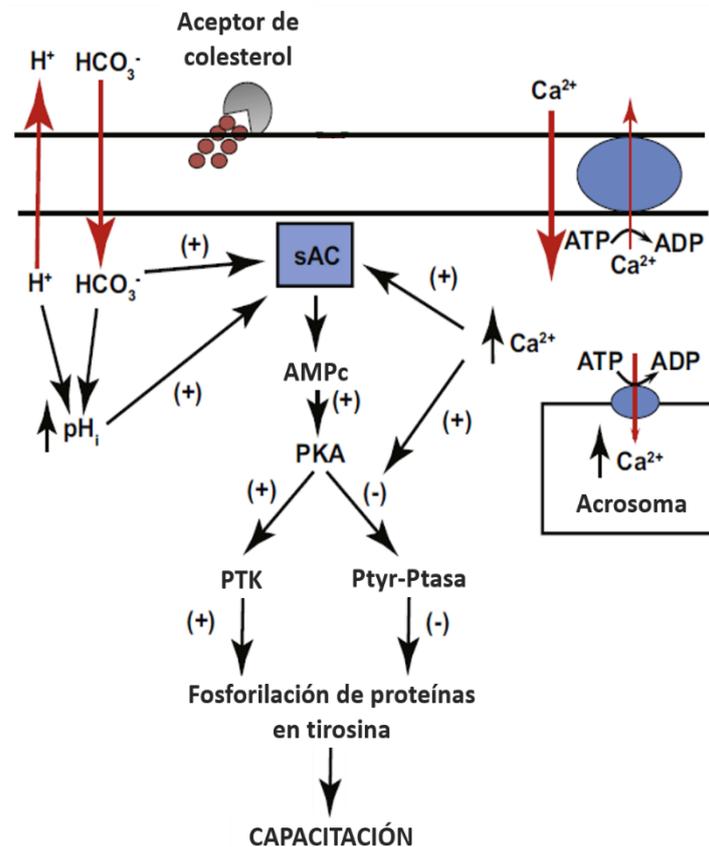


Figura 3. Modelo de eventos intracelulares durante la capacitación de espermatozoides bovinos. La albúmina presente en el medio de cultivo es capaz de unir colesterol de la membrana plasmática. Esto produce cambios que conducen a la incorporación de Ca^{2+} , que en un primer momento es absorbido por el acrosoma, y que luego conducirá a un aumento del Ca^{2+} intracelular. También tiene lugar un flujo neto de H^+ y una afluencia de HCO_3^- que producen un aumento del pH intracelular (pH_i). La adenilato ciclasa soluble (sAC) de espermatozoides es estimulada (por HCO_3^- , aumento del pH_i y del Ca^{2+}), y el AMPc resultante activa la proteína quinasa A (PKA). Así, se produce la activación de la proteína tirosina quinasa (PTK) y la inhibición de la proteína tirosina fosfatasa (Ptyr-Ptasa), lo cual conduce a un aumento neto en la fosforilación de proteínas en residuos tirosina. *Adaptada de (Parrish, 2014).*

Como evento inicial, la remoción de colesterol de la membrana plasmática promueve cambios en su arquitectura y composición, tales como alteración de la fluidez, agregación de partículas intramembrana y redistribución de proteínas. Por otro lado, el potencial de membrana de los espermatozoides se hace más negativo, lo que da lugar a la apertura de canales de calcio. Los iones de calcio y bicarbonato son críticos en la activación de la producción de AMPc y en la facilitación de los eventos de fusión de membranas que dan lugar a la reacción acrosómica (Figura 3). Otro de los eventos tempranos asociados a la capacitación es la fosforilación de proteínas en residuos tirosina (Osheroff et al., 1999).

Es importante destacar que el estado capacitado es alcanzado por los espermatozoides al cabo de cierto tiempo de incubación que, no sólo difiere para cada especie, sino también entre individuos de la misma especie (Yanagimachi, 1994). Asimismo, la composición del eyaculado en algunas especies es heterogénea con respecto a la edad celular, morfología y movilidad de los espermatozoides, de forma que no todos se capacitan sincrónicamente, sino que existen subpoblaciones con diferentes grados de capacitación (Cohen-Dayag et al., 1995, Giojalas et al., 2004).

Como consecuencia de la capacitación, los espermatozoides exhiben una serie de modificaciones relacionadas a la fertilidad: la hiperactivación del movimiento flagelar, la regulación de las vías de transducción de señales que permiten la respuesta quimiotáctica, la habilidad de responder a los estímulos que desencadenan la RA (tales como progesterona, zona pelúcida, lisofosfatidilcolina y ionóforos de calcio) y también para interactuar con el ovocito (Florman and Fissore, 2015). En relación a la capacitación *in vivo*, debido a que los espermatozoides son células terminalmente diferenciadas desprovistos de un aparato activo de transcripción y traducción (Yanagimachi, 1994), se propuso que este proceso era regulado por proteínas sintetizadas previo a la espermatogénesis. Sin embargo, publicaciones recientes sugieren que vesículas extracelulares (VE) de distintos orígenes también participarían en la modulación de la capacidad fertilizante espermática a través de la incorporación, en los espermatozoides, de nuevas proteínas funcionales mediante la fusión de vesículas liberadas por el epitelio del tracto reproductor masculino (Aalberts et al., 2014, Caballero et al., 2013, Park et al., 2011, Sullivan and Saez, 2013). Las VE son generadas activamente por las células y pueden ser capturadas por otras

células en las que inducen una respuesta. Esta interacción es mediada por diferentes mecanismos, que resultan en la transferencia de moléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos u otras) a la membrana o el citoplasma de la célula blanco, constituyendo así un nuevo mecanismo de señalización intercelular.

Las VE recientemente más estudiadas se clasifican en dos tipos (Figura 4) de acuerdo a su origen: los exosomas (30-100 nm), generados por exocitosis de endosomas multivesiculares; y las microvesículas (MV, 100-1.000 nm), producidas por brote directo desde la membrana plasmática (Raposo and Stoorvogel, 2013).

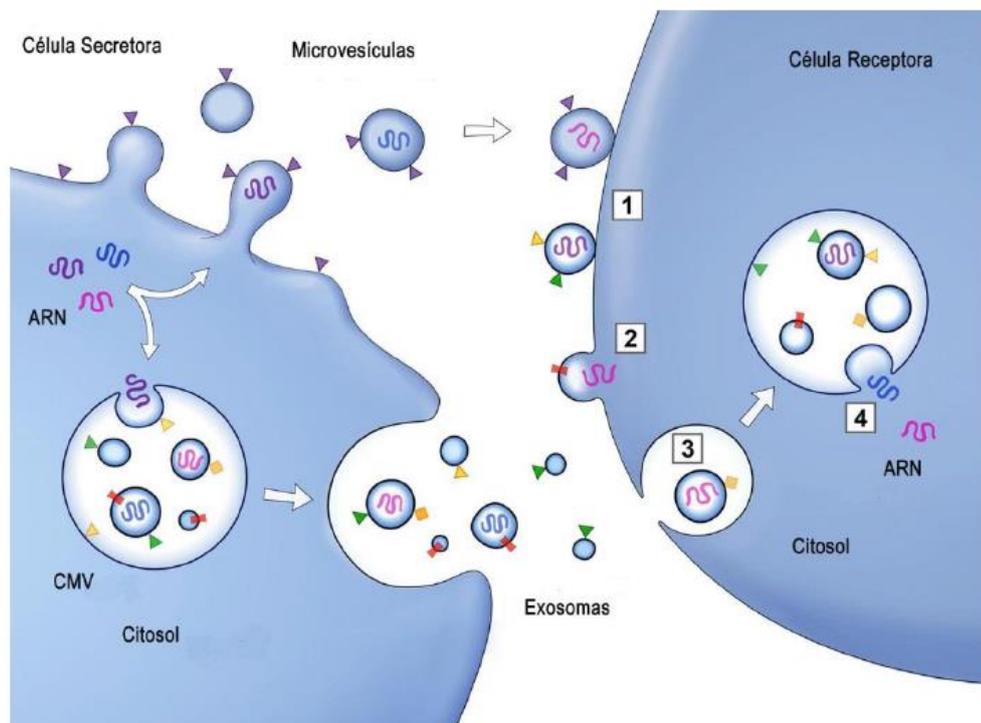


Figura 4. Representación de la transferencia de proteínas y ARN por VE. Proteínas asociadas a la membrana (triángulos), transmembrana (rectángulos) y los ARNs (símbolos curvos) se incorporan selectivamente en las vesículas intraluminales de cuerpos multivesiculares (CMV) o en microvesículas (MV) que brotan de la membrana plasmática. Los CMV se fusionan con la membrana plasmática para liberar los exosomas en el medio extracelular. MVs y exosomas pueden anclarse a la membrana plasmática de una célula diana (1). Las vesículas unidas pueden fundirse directamente con la membrana plasmática (2) o ser endocitadas (3). Las vesículas endocitadas pueden fusionarse con la membrana delimitadora de un compartimento endocítico (4). Ambas vías conducen a la liberación de proteínas y ARN en la membrana o citosol de la célula diana. La fusión y la endocitosis sólo se representan para vesículas exosómicas, pero las MV derivadas de la membrana plasmática pueden tener destinos similares. *Adaptada de Raposo and Stoorvogel 2013.*

Análisis proteómicos mostraron que los exosomas no contienen una combinación aleatoria de proteínas intracelulares, sino que tienen un pequeño número de familias de proteínas provenientes de la membrana plasmática, la vía

endocítica y el citoplasma, con cantidades muy limitadas de proteínas de otros compartimentos celulares (Thery et al., 2001), lo cual las diferencia claramente de las vesículas membranosas liberadas por células apoptóticas, que además son de mayor tamaño (1.000-5.000 nm).

La primera interacción funcional de VE con células del sistema reproductor se publicó demostrando la inducción de la movilidad espermática por prostasomas (vesículas almacenadoras de calcio secretadas por la próstata) (Stegmayr and Ronquist, 1982). Estudios más recientes observaron que los prostasomas, al fusionarse con los espermatozoides potencian el aumento intracelular de calcio, y posterior estimulación de la reacción acrosómica y la movilidad de los espermatozoides en respuesta a progesterona (Arienti et al., 2004, Palmerini et al., 2003, Park et al., 2011). Por otro lado, estudios en relación a epididimosomas (vesículas secretadas por las células principales del epidídimo) muestran que éstos son capaces de transferir proteínas específicas involucradas en la fertilización, a espermatozoides epididimarios *in vitro* (Caballero et al., 2013).

En cuanto a los procesos que tienen lugar en el tracto reproductor femenino, se ha sugerido que la eliminación de componentes del plasma seminal y la posterior interacción con las moléculas del tracto femenino son eventos necesarios para promover la capacitación (Hunter and Rodriguez-Martinez, 2004). Numerosos trabajos han estudiado la interacción de los espermatozoides con el epitelio oviductal (Suarez, 2007, Suarez, 2008) y estudios recientes reportaron la presencia de VE en el fluido vaginal (Fereshteh et al., 2018), uterino y oviductal, sugiriendo una serie de acciones fisiológicas (Al-Dossary et al., 2015, Burns et al., 2014, Ng et al., 2013). En línea con estos datos, resultados de nuestro laboratorio muestran que una breve co-incubación, es suficiente para que tenga lugar la transferencia de componentes desde VE secretadas por células epiteliales endometriales a los espermatozoides. Esta co-incubación además induce un aumento de la capacitación espermática (Franchi et al., 2016, Franchi et al., 2014).

Por otro lado, el oviducto es la región en donde culmina el proceso de adquisición de la capacidad fertilizante, por lo cual es posible pensar que la interacción de VE oviductales con los espermatozoides, podría tener impacto en la regulación de la fisiología espermática, así como en el proceso de interacción de gametas y posterior desarrollo embrionario. La presencia de exosomas

oviductales en un modelo murino fue reportada en un trabajo que demuestra la transferencia de PMCA4a, una proteína transmembrana reguladora de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular. Esta proteína es un componente de exosomas secretados por los fluidos oviductal y uterino, y es incorporada por los espermatozoides *in vitro* después de la incubación de los mismos con exosomas aislados a partir de dichos fluidos. Estos datos sugieren que PMCA4a participaría en la regulación de Ca^{2+} durante la capacitación espermática (Al-Dossary et al., 2013). Posteriormente, los mismos autores descubrieron que las integrinas ($\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$) presentes en VE oviductales se transfieren a los espermatozoides, y están involucradas en la fusión de los mismos al ovocito (Al-Dossary et al., 2015). En relación a la especie bovina, se demostró que VE del fluido folicular inducen la expansión del cúmulo ooforo, así como también un incremento en los niveles de expresión génica (Hung et al., 2015). Por otro lado, resultados recientes indican que las VE oviductales tienen efectos beneficiosos en la calidad y desarrollo de embriones bovinos producidos *in vitro*, sugiriendo una comunicación funcional entre el oviducto y el embrión durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Lopera-Vasquez et al., 2016, Lopera-Vasquez et al., 2017). Sin embargo, no hay estudios aún acerca de la interacción de estas VE con los espermatozoides bovinos. Por otro lado, los estudios que se desarrollen en esta especie permitirán contar con un modelo animal en el que es factible llevar a cabo experimentos de fertilización *in vitro*. Esto ampliaría el horizonte de investigación en relación a la posible participación de las VE en otros eventos del proceso de reproducción, tales como la interacción entre gametas, el desarrollo embrionario y la implantación embrionaria, entre otros.

De acuerdo a los antecedentes mencionados, planteamos como ***hipótesis que VE presentes en el fluido oviductal bovino interaccionan con los espermatozoides y regulan procesos asociados a la adquisición de su capacidad fertilizante.***

OBJETIVOS

- **General:**

Evaluar la participación de vesículas extracelulares del fluido oviductal bovino en la regulación de la fisiología espermática.

- **Específicos:**

- 1. Identificar y caracterizar las VE del fluido oviductal bovino**

Las vesículas extracelulares oviductales bovinas (VEOB) serán aisladas a partir de fluido oviductal bovino de la región del ampulla y del istmo oviductal. Las mismas serán sometidas a microscopía electrónica para su caracterización morfológica, y mediante Western blot se determinará la presencia de las proteínas marcadoras.

- 2. Determinar la interacción de las VEOB con espermatozoides bovinos**

Espermatozoides bovinos serán co-incubados con VEOB marcadas con una sonda lipofílica fluorescente y luego analizados por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

- 3. Evaluar el efecto de las VEOB sobre la capacitación espermática**

Los espermatozoides se incubarán en medio control o enriquecido con VEOB de las diferentes regiones. Los niveles de reacción acrosómica inducida y fosforilación de proteínas en tirosina serán evaluados por microscopía de fluorescencia y Western blot respectivamente, como indicadores de la capacitación espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones Éticas

Los oviductos fueron obtenidos durante la faena de animales en un matadero-frigorífico habilitado. El uso de gametas masculinas de bovino no requiere de la aprobación de un comité de ética ya que se utilizarán muestras de semen congelado obtenidas comercialmente a empresas habilitadas para tal fin.

Obtención del fluido oviductal y aislamiento de las VE

Los oviductos fueron retirados, disecados y trasladados al laboratorio en una conservadora a 4°C. Una vez en el laboratorio, fueron lavados con PBS para retirar la sangre de la posible ruptura de vasos sanguíneos. El ápula y el istmo fueron separados a través de la unión istmo-ampular, identificada donde el diámetro del oviducto exhibe una reducción marcada de tamaño. A cada región oviductal (istmo y ápula) se le infundieron 5 ml de PBS a 4 °C, y el fluido recuperado en un tubo fue sometido a sucesivas centrifugaciones de acuerdo al procedimientos descritos previamente (They et al., 2006). Brevemente, después de una primera centrifugación para eliminar las células epiteliales (10 min a 300 x g), el sobrenadante fue sometido a centrifugación a 2.000 x g por 10 min, 10.000 x g por 30 min y finalmente a 100.000 x g 70 min en una centrífuga de ultra alta velocidad Beckman Coulter Optima XL, previa filtración a través de filtros de 0,2 µm. Los sedimentos obtenidos por ultracentrifugación se lavaron con PBS y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

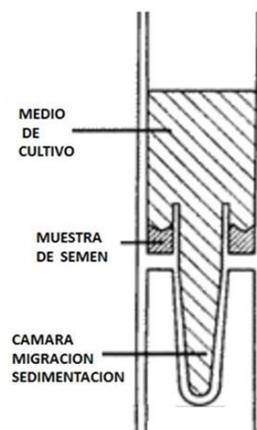
Obtención y preparación de los espermatozoides

Los espermatozoides de bovino se obtuvieron a partir de muestras de semen comercial congelado, provenientes de toros de probada fertilidad y se mantuvieron en nitrógeno líquido (-196°C) hasta el momento de su utilización. Las muestras contenidas en pajuelas se descongelaron durante 30 segundos a 38,5°C en un baño termostatzado. Luego, se cortó la pajuela por un extremo y se recuperó el semen descongelado en un tubo tipo eppendorf. Los espermatozoides se separaron del plasma seminal y del crio-protector mediante la técnica de migración sedimentación (Tea et al., 1984). La cámara de separación de espermatozoides (Fig. 5) se cargó con 0,8 ml de medio de cultivo iniciando la carga en el tubo interior; luego, se colocaron 200 µl de semen por fuera del tubo interior y se incubó durante 90 min en estufa gaseada con 5% de CO₂ y a 38,5°C.

De esta manera, los espermatozoides migran fuera del semen y se desplazan hacia el tubo interior. Luego del período de incubación, se descartó el medio de la cámara externa y se recuperó la suspensión espermática del tubo interior.

Figura 5. Cámara de separación de espermatozoides por migración-sedimentación.

La cámara está constituida por dos compartimientos donde se siembra el semen y donde se recuperan los espermatozoides, en la forma indicada en el esquema.



A continuación, se estimó la concentración de espermatozoides mediante conteo en una cámara Neubauer. Para ello, se preparó una dilución celular (1/10) en agua, con el fin de detener el movimiento de las células. Diez microlitros de la suspensión se colocaron en un compartimento de la cámara de Neubauer y se contaron los espermatozoides en toda la cuadrícula central de la misma en un microscopio de contraste de fase a 400x (Olympus CX41, Tokio, Japón). Multiplicando el valor del conteo por el factor de dilución de la muestra y por el factor corrector del volumen de la cámara (10^4), se obtuvo la concentración espermática en millones de células/ml. A continuación, se ajustó la concentración de trabajo a 2×10^6 espermatozoides/ml en el medio de cultivo correspondiente.

Todo el procedimiento se llevó a cabo en medio sp-TALP (Parrish et al., 1988) no capacitante, en el cual el bicarbonato de sodio es reemplazado por NaCl (para alcanzar una osmolaridad adecuada: 285 ± 30 mOsmol/kg), y cuya formulación final fue: NaCl 130 mM, KCl 3,1 mM, NaH_2PO_4 0,3 mM, lactato de sodio 21,6 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 0,4 mM, piruvato de sodio 1 mM, a pH 7,4, suplementado con HEPES 10 mM. El medio capacitante está suplementado con NaHCO_3 25 mM y albúmina sérica bovina (ASB) al 0,3% p/v, y contiene NaCl 90 mM.

Preparación de extractos proteicos

Las células epiteliales oviductales bovinas obtenidas en el sedimento de la primera centrifugación del fluido oviductal (como se describió más arriba) se usaron para la extracción de proteínas que fueron utilizadas como control positivo en los ensayos de Western Blot. La lisis se realizó con buffer RIPA suplementado

con inhibidores de proteasas por 30 min en hielo. Luego de una centrifugación a 12.000 x g por 30 min, el sobrenadante fue almacenado para la posterior cuantificación de la concentración de proteínas totales y ensayo de Western blot.

En el caso de las VE, las mismas fueron resuspendidas en buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y analizadas por Western blot.

La obtención de extractos de proteínas espermáticas se llevó a cabo de acuerdo a procedimientos descritos previamente (Suhaiman et al., 2010). Brevemente, una vez terminado el tiempo de incubación de las células, el medio se eliminó lavando los espermatozoides con PBS suplementado con ortovanadato de sodio de 2 mM. Los sedimentos fueron resuspendidos en buffer de muestra (2% SDS, 10% glicerol, 62,5 mM Tris-HCl) sin agentes reductores. Las muestras se calentaron dos veces a 95°C, durante 6 min cada una. Los extractos fueron centrifugados a 12.000 x g durante 10 minutos, y a los sobrenadantes se agregó azul de bromofenol y un volumen necesario de β -mercaptoetanol para obtener una concentración final del 5%. Las muestras fueron calentadas a 95°C por 5 min, y utilizadas inmediatamente o almacenadas a -80°C.

La concentración de proteínas de las muestras fue estimada según el método de Smith (Smith et al., 1985) usando ácido bicinconínico.

Western Blotting de VE

Se llevó a cabo de acuerdo a metodología estándar. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF, que se incubaron con anticuerpos contra las proteínas CD81 (B-11, sc-166029) o anti-HSP70 (W27, sc-24), seguido por los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Las bandas específicas fueron reveladas por quimioluminiscencia (ECL).

Microscopía electrónica de transmisión

Las VEOB fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y depositadas en grillas de formvar/carbon. Luego de lavarlas con PBS, las grillas fueron teñidas con acetato de uranilo al 2%, observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión (Leo 906E, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Análisis de la distribución de tamaño de las VE

Se llevó a cabo mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), que es una técnica no invasiva para medir el tamaño y distribución de tamaño de moléculas y partículas en la región submicrométrica. Se basa en que, la

incidencia de un haz de luz monocromático (tal como un láser) sobre una solución con partículas en movimiento browniano, produce un cambio en la longitud de onda de la luz entrante. Este cambio está relacionado con el tamaño de la partícula, lo que hace posible calcular el tamaño de la esfera y dar una descripción del movimiento de la partícula en el medio, midiendo el coeficiente de difusión de la partícula y utilizando la función de autocorrelación.

Utilizando esta técnica, la distribución de tamaños de las VE fue analizada en un equipo Nicomp 380 (Santa Barbara, CA, USA) equipado con un laser de 632,8 nm y una intensidad de 5 miliwatts. Se utilizaron 300 µl de muestra y las determinaciones se hicieron fijando un ancho de canal ("channel width") de 30 microsegundos y un ciclo de toma de datos de 15 min para cada muestra. Los datos se analizaron con el programa CW380 v1.51 y se representaron graficando la frecuencia en función del diámetro de las vesículas.

Co-incubación de las VE con los espermatozoides

Las VE se tiñeron con el colorante fluorescente PKH26 (Sigma, St. Lois, EE. UU.) a una concentración final de 2 µM durante 5 min. La reacción se detuvo mediante el agregado de ASB al 1%, y luego de 1 min de incubación las VE se lavaron por ultracentrifugación en PBS a 100.000 xg durante 70 min, para eliminar el exceso de colorante. Los espermatozoides bovinos fueron co-incubados con las VE marcadas durante 15 min a 38.5 °C, y luego fueron lavados dos veces con PBS, fijados con formaldehído al 2%, y transferidos a un portaobjetos. Los portaobjetos fueron observados y fotografiados bajo un microscopio de epifluorescencia a 1.000X.

Análisis de la incorporación de las VE por los espermatozoides mediante citometría de flujo

Después de la extracción del plasma seminal, la suspensión de espermatozoides se incubó en medio Sp-TALP "no capacitante" y se expuso a 0,05 µM de calceína-AM (Invitrogen L3224). Los datos de fluorescencia se recopilaron continuamente y después de 1 min de adquisición inicial, se agregaron a la suspensión de espermatozoides VE (10 ug/ml) marcadas con PKH-16. Como control negativo, las células se incubaron con VE no marcadas. También se realizó un control adicional centrifugando la misma cantidad de colorante sin la presencia de VE ("PBS control").

El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro de flujo Acuri C6 (Becton Dickinson, CA) con un láser de argón de 488 nm. Las mediciones de emisiones se realizaron utilizando filtros de paso de banda de 530/30 nm (verde/FL-1), 585/42 nm (rojo/FL-2), 661/16 nm (rojo/FL-3) y 670 nm (rojo lejano/FL-4). El debris celular fue eliminado mediante un gráfico de puntos de dispersión frontal/lateral, y se analizaron 10.000 células por muestra. El análisis de los datos fue realizado con el software FlowJo v10.0.7 (Becton Dickinson. CA).

Evaluación de la capacitación espermática

Después de la separación del criopreservante, las suspensiones de espermatozoides se incubaron bajo diferentes condiciones: con medio Sp-TALP "no capacitante" como control negativo (Sp-TALP formulado como se describe en la sección "obtención y preparación de los espermatozoides"); con medio Sp-TALP no capacitante conteniendo 10 µg/ml de VE (de istmo o ámpula); o con medio Sp-TALP "capitante" como control de las condiciones de capacitación (Sp-TALP suplementado con 25 mM de NaHCO y 3 mg/ml de albúmina de suero bovino; Sigma Cat. A-7906). Después de una incubación de 2 horas, la capacitación de los espermatozoides se determinó como la capacidad de los espermatozoides para experimentar la reacción acrosómica inducida (Jaiswal et al., 1998) y para fosforilar proteínas en residuos de tirosina (Visconti et al., 1995) de acuerdo al siguiente procedimiento:

Reacción acrosómica (RA). Después de una incubación, se determinó la capacitación de los espermatozoides mediante la evaluación de la RA (Jaiswal et al., 1998). La RA se indujo con el ionóforo de calcio A23187 (8 µM) durante 30 min en estufa gaseada con 5% de CO₂ y a 38,5°C, para luego analizar el estado acrosomal (intacto o reaccionado) bajo microscopio de epifluorescencia, previa tinción con PSA-FITC ("Pisum sativum agglutinin" conjugado con FITC) de acuerdo a metodología previamente descrita (Kaul et al., 2001). Cada muestra de espermatozoides se dividió en dos alícuotas, sometiendo una de ellas al estímulo con ionóforo de calcio. La evaluación del número de células reaccionadas en el tubo que no recibió el estímulo permite determinar el porcentaje de espermatozoides que experimentan la RA de manera espontánea. Este valor puede variar entre los diferentes tratamientos, por lo cual se descuenta al valor de RA inducida en cada caso. Para cada tratamiento se determinó el

porcentaje de espermatozoides capacitados calculando la diferencia entre el porcentaje de células con RA inducida y RA espontánea.

Fosforilación en residuos tirosina de proteínas espermáticas. Extractos de proteínas espermáticas separados por SDS-PAGE fueron sometidos a Western Blot. Las proteínas fosforiladas en tirosina fueron identificadas, previo bloqueo con ASB al 3%, mediante la incubación con el anticuerpo primario anti-fosfotirosina 4G10 (1: 4.000, Millipore Cat. 05-321), y un anticuerpo secundario anti-ratón unido a peroxidasa (1:2.000). A continuación, las membranas fueron lavadas con buffer de “stripping (Glicina 0,5 M pH 2), con TBS-T (3 veces por 10 min), bloqueadas con leche al 5% y re-incubadas con anti-tubulina (1:1.000, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA, USA), que se usó como de control de carga de proteínas totales para el análisis semi-cuantitativo. El revelado se llevó a cabo mediante el método de quimioluminiscencia enzimática (ECL) usando una mezcla reactiva de ácido cumárico 280 μ M, luminol 1,25 mM, 0,003 % H₂O₂ en Tris 0,1 M pH 8,5 y placas radiográficas “X-ray film green” (Carestream Cat. 525-3349). Finalmente, el análisis densitométrico se llevó a cabo (considerando todas las bandas inmuno-reactivas) mediante el programa Imaje J (Schneider et al., 2012) y se calculó un nivel de fosforilación en relación al tratamiento control.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa “InfoStat” (Rienzo et al., 2011). Las diferencias entre tratamientos se determinaron mediante el análisis de la varianza (ANAVA) o test “t” para diferencias entre medias, considerándose significativas con un nivel de confianza $P < 0,05$.

RESULTADOS

El estudio de los efectos de las VE oviductales sobre la fisiología espermática se llevó a cabo con VE aisladas a partir de fluido oviductal y espermatozoides bovinos criopreservados. Este modelo es ampliamente utilizado en investigación debido a las dificultades para contar con muestras de semen de toro frescas en el laboratorio. Por otro lado, en el ámbito de la producción y mejoramiento animal, la gran mayoría de los procedimientos se realiza con muestras de semen criopreservado, lo cual confiere relevancia a estudios realizados con este modelo debido a que los aportes que surjan como resultados de la investigación serían directamente trasladables a las prácticas de producción.

Identificación y caracterización de las VE del fluido oviductal bovino

El oviducto de los mamíferos presenta cuatro regiones: infundíbulo, ampulla, istmo y útero-tubárica (Figura 6). El ampulla es la porción media y de mayor longitud, y es en donde tiene lugar el encuentro de las gametas que culminará en la fecundación. El istmo forma el tercio proximal del oviducto y está adyacente al útero. Debido a las diferencias funcionales de las distintas regiones, y con el objetivo de analizar posibles diferencias en las características de las VE de cada región, los oviductos fueron disecados obteniendo la región del ampulla y del istmo por separado. De cada una de estas regiones se obtuvo fluido oviductal a partir del cual, de acuerdo al protocolo descrito en la sección de materiales y métodos, se aislaron las VE que fueron identificadas y caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión (MET), dispersión dinámica de luz (DLS) y Western blot.

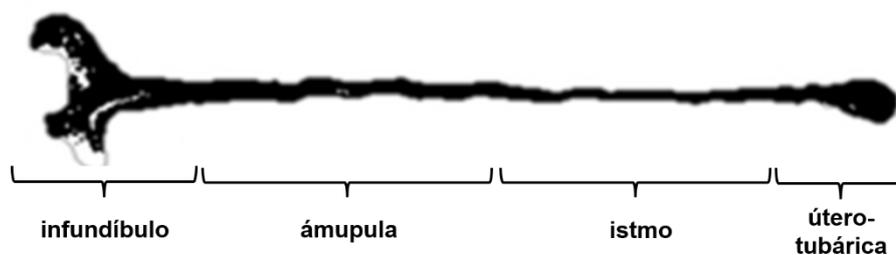


Figura 6. Esquema de un oviducto bovino. Se indican las diferentes regiones del oviducto, de las cuales el ampulla y el istmo se utilizaron para la obtención de VE.

Para el análisis por microscopía electrónica, una alícuota del pellet de VE obtenido por ultracentrifugación fue colocado en grillas cubiertas de formvar/carbono, lavado y teñido con acetato de uranilo. Las muestras fueron observadas y fotografiadas bajo un MET. Como se observa en la Figura 7, tanto las muestras de istmo como de ampulla presentaron una población heterogénea de VE con la característica morfología en forma de copa y con diámetros aproximados de 25 a 500 nm de tamaño, lo que indica la presencia de exosomas y microvesículas.

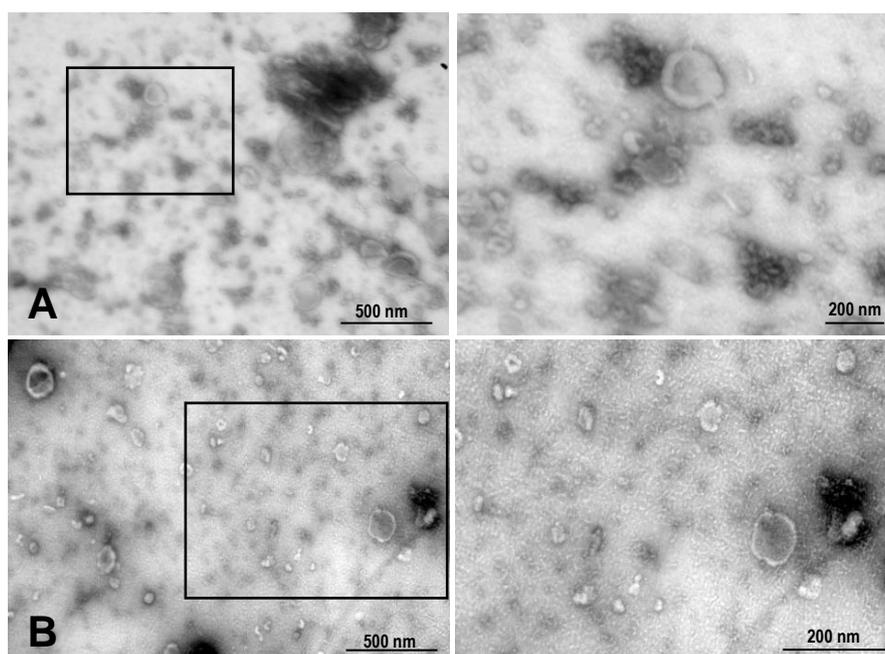


Figura 7. El fluido oviductal bovino contiene vesículas extracelulares. Se obtuvieron VEOB de las regiones istmo y ampulla del oviducto, se colocaron en grillas recubiertas de formvar/carbono y se tiñó con acetato de uranilo al 4%. Las muestras fueron observadas y fotografiadas bajo un microscopio electrónico de transmisión. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de VE del ampulla a 36.000x (A, izquierda), y la imagen ampliada correspondiente a 100.000x (A, derecha), así como VE del istmo a 36.000x (B, izquierda) y 60.000x (B, derecha).

Posteriormente, las muestras de VE de ambas regiones fueron analizadas por DLS para determinar el tamaño de las vesículas en cada caso. Como se muestra en la Figura 8, las VE de ambas regiones exhiben la presencia de una población de exosomas y una de microvesículas. Esta última población es la que contiene una menor proporción de partículas, lo cual se ve acentuado en las VE provenientes de la región ampular. Las VE del istmo mostraron un perfil de tres picos, con diámetros medios de alrededor de 25, 150 y 400 nm; mientras que el

perfil de las VE del ámpula presenta dos picos, de 35 y 190 nm de diámetro medio.

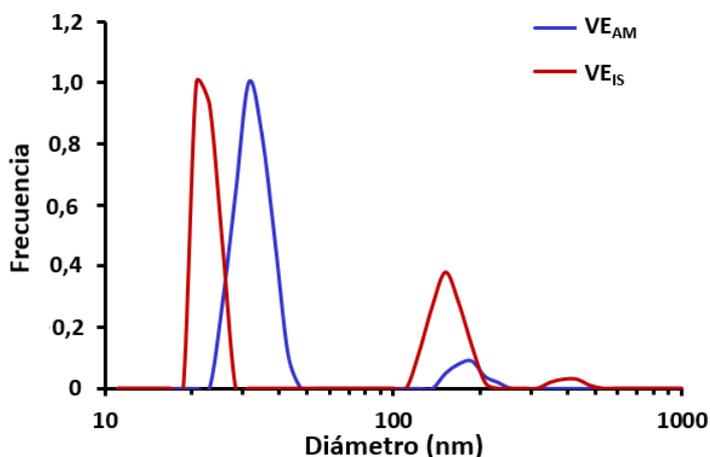
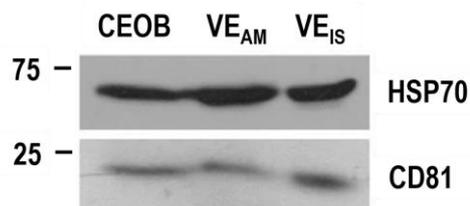


Figura 8. Análisis de VE de ambas regiones del oviducto por DLS. Muestras de VEOB de las regiones istmo y ámpula del oviducto se analizaron por DLS para determinar el tamaño de las poblaciones de exosomas y microvesículas presentes en cada muestra. El gráfico representa la frecuencia de aparición de partículas en función del diámetro.

Finalmente se analizó la presencia de proteínas marcadoras en extractos proteicos de VE, usando extractos de células epiteliales oviductales bovinas (CEOB) como control positivo. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF para la detección de las proteínas marcadoras específicas (Figura 9). El análisis por Western blot muestra, tanto para el extracto proteico de CEOB como de VE, una banda de 23 kDa que corresponde a la proteína CD81, mientras que la presencia de HSP70 es detectada como una banda inmuno-reactiva de aproximadamente 70 kDa, ambas en concordancia con los tamaños esperados.

Figura 9. Detección de marcadores específicos. Extractos de proteínas totales de CEOB o de VE fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF para la detección de proteínas específicas con anticuerpos contra CD81 y HSP70.



Determinación de la interacción de las VE con espermatozoides bovinos

Las BOEV fueron teñidas fluorescentemente con el colorante lipofílico rojo PKH26, y luego ultracentrifugadas en PBS para remover el exceso de colorante. Los espermatozoides, una vez separados del criopreservante, fueron co-incubados con las VE teñidas, lavados con PBS y fijados. Finalmente, las células fueron transferidas a portaobjetos, observados y fotografiados bajo un microscopio de epifluorescencia.

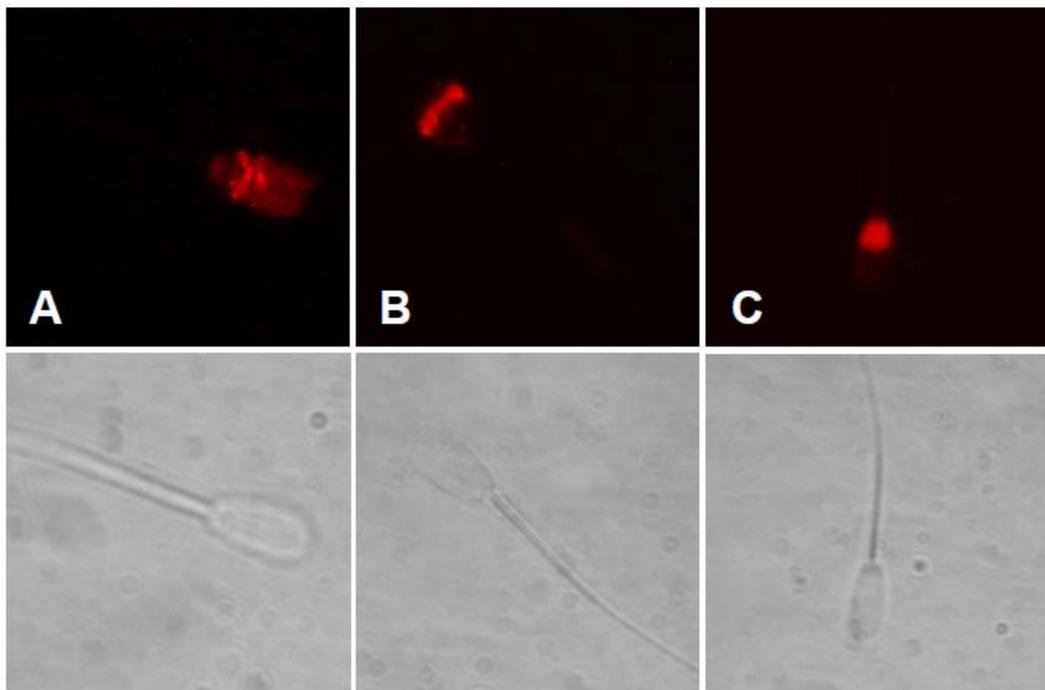


Figure 10. Las VE interaccionan con los espermatozoides bovinos. Los espermatozoides fueron co-incubados con VE marcadas con PKH26 (rojo). Las imágenes del panel superior corresponden a la tinción fluorescente, en la que pueden observarse diferentes patrones de marcación. En el panel inferior se observan las imágenes correspondientes a las fotos de contrastes de fase respectivas.

En una proporción de los espermatozoides se observó una tinción fluorescente correspondiente a la incorporación de VE en distintas regiones de la célula. La mayoría de los espermatozoides presentaron marca en alguna zona de la cabeza, a veces en conjunto con una marca punteada en el flagelo. Sin embargo, en algunos se observó marca solamente en el flagelo. En algunos casos la marca presentó un patrón punteado (Figura 10A), mientras que en otras células la distribución del colorante fue homogénea (Figura 10B y C).

Para determinar el porcentaje de células que incorporan VE y la cinética de este proceso, se llevaron a cabo ensayos de citometría de flujo en los que se

determinó la intensidad de fluorescencia para PKH26 de las células a distintos tiempos luego de la co-incubación con VE marcadas, o con diferentes controles según se detalla en la leyenda de la figura 11A. El análisis de los espermatozoides co-incubados con las VE marcadas mostró que la señal aumenta con el tiempo, lo que indica la captación progresiva de las VE oviductales. Un minuto después de la adición de VE ya fue posible observar un aumento en el porcentaje de células teñidas en comparación con los controles ("control PBS" y control VE sin marcar). El incremento en el porcentaje de células marcadas continuó creciendo hasta alcanzar, al cabo de 120 min de co-incubación, una meseta en la que el 62% de los espermatozoides presentan tinción positiva para el marcador fluorescente (Figura 11B).

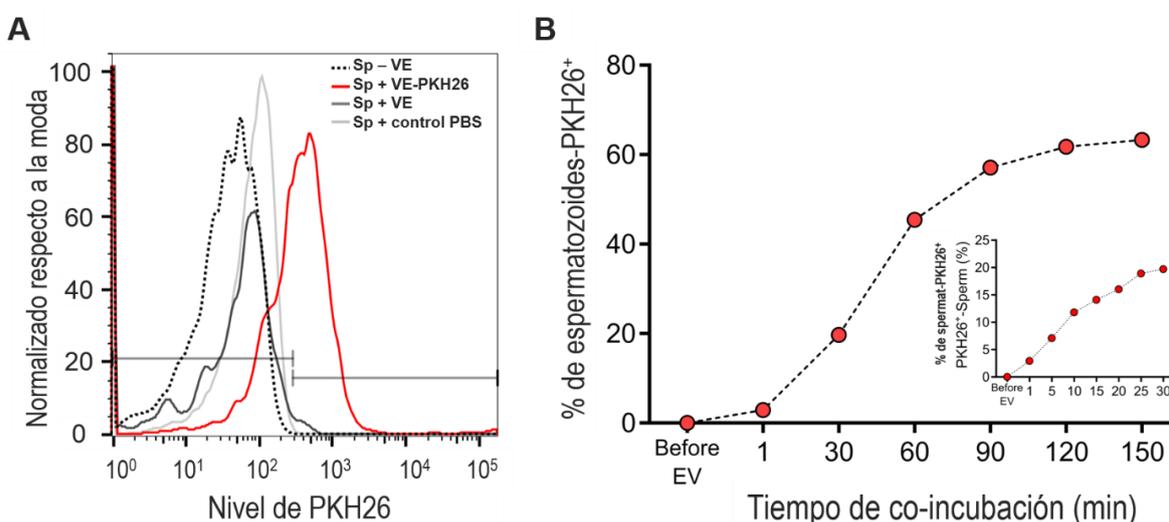


Figura 11. Análisis de la incorporación de VE por los espermatozoides. Se evaluó en diversos puntos temporales mediante citometría de flujo. (A) Los histogramas de PKH26 muestran las señales superpuestas de espermatozoides incubados (30 min) en ausencia de VE (Sp -VE), en presencia de VE marcadas con PKH26 (Sp +VE-PKH26), en presencia de VE no marcadas (Sp +EV) e incubados con control de PBS (Sp + control PBS). (B) Porcentaje de espermatozoides con marca positiva para PKH26 a lo largo del tiempo; inserto: detalle de la incorporación de VE en varios puntos temporales en el período entre 0 y 30 minutos de co-incubación.

Evaluación del efecto de las VE sobre la capacitación espermática

Para evaluar la capacitación espermática, se analizaron la habilidad para llevar a cabo la reacción acrosómica (RA) inducida por un ionóforo de calcio (Jaiswal et al., 1998), y el nivel de fosforilación de proteínas en residuos tirosina (PY) (Visconti et al., 1995). Estos dos parámetros son ampliamente utilizados, y constituyen una medida indirecta del proceso de capacitación.

Una vez separados del criopreservante, los espermatozoides se incubaron por 120 minutos bajo diferentes condiciones: con medio Sp-TALP "no capacitante" ("NoCAP"); con medio Sp-TALP no capacitante conteniendo 10 µg/ml de VE de istmo o ámpula; o con medio Sp-TALP capacitante ("CAP", como control positivo de la capacitación). Después de la incubación, se determinó el nivel de capacitación espermática evaluando los dos parámetros citados anteriormente.

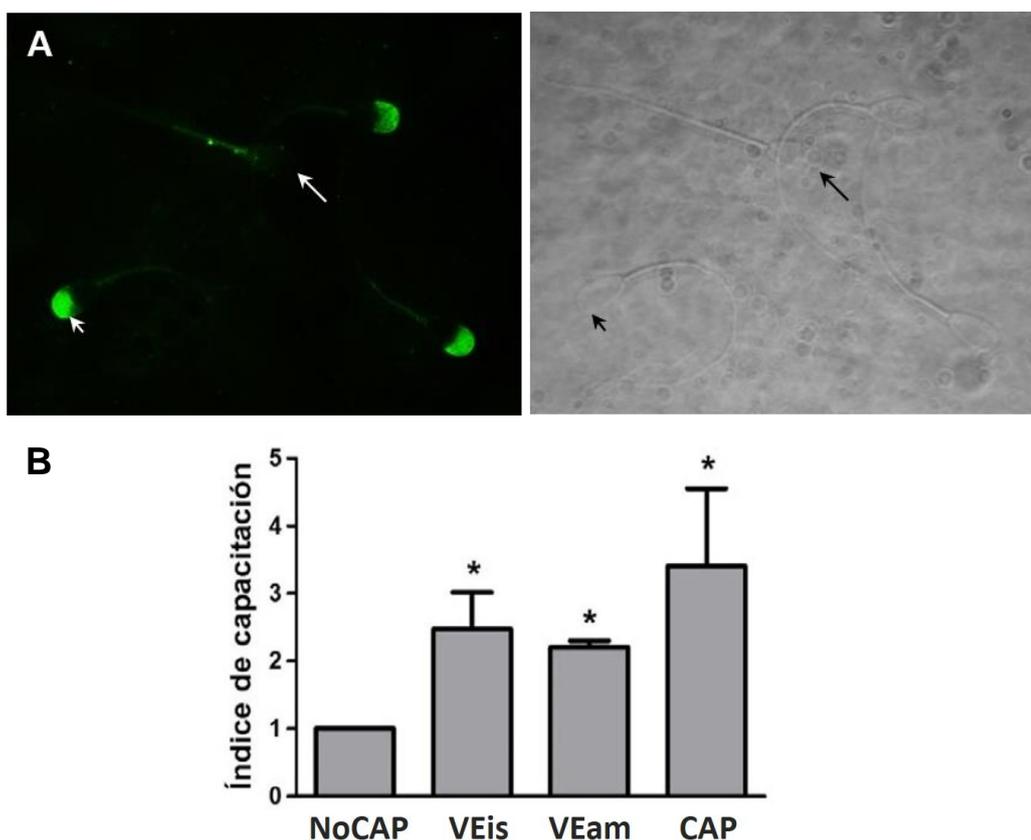


Figure 12. Las VE estimulan la capacitación de espermatozoides bovinos. El estado del acrosoma se determinó mediante la tinción con PSA bajo un microscopio de epifluorescencia. La flecha corta señala un espermatozoide con acrosoma intacto; la larga uno con acrosoma reaccionado (A). Los espermatozoides bovinos criopreservados fueron separados, incubados en medio no capacitante (NoCAP), medio No CAP en presencia de VE del istmo (VEis) o ámpula (VEam) o medio capacitante (CAP). Los datos se expresan como la media ± EE del índice de capacitación de tres experimentos realizados con muestras de diferentes individuos (B); * indica diferencias significativas respecto al control, $p < 0,05$.

Para visualizar el acrosoma, los espermatozoides fueron fijados y teñidos con PSA-FITC, una lectina marcada que reconoce residuos glucídicos presentes en el acrosoma. Esto permite determinar, en función de la región teñida, el estado del acrosoma, intacto o reaccionado (Figura 12A). Los preparados fueron observados a un aumento de 1.000x bajo un microscopio de epifluorescencia en 200 células contadas al azar, en preparados duplicados. El porcentaje de espermatozoides

capacitados se calculó como la diferencia entre el porcentaje de espermatozoides que presentaban RA inducida y RA espontánea. Los datos fueron expresados como un “índice de capacitación”, calculado en relación al valor obtenido para el tratamiento control.

Como se observa en el gráfico (Figura 12B), los índices de capacitación para las células expuestas al medio conteniendo VE, tanto de istmo como de ampulla, son entre 2 y 3 veces mayores al valor del medio NoCAP. Valores similares se obtuvieron para espermatozoides incubados en el medio capacitante, que se utilizó como control positivo.

Para verificar mediante otra aproximación el efecto de las VE sobre la capacitación se evaluó el nivel de PY, un evento temprano asociado a dicho proceso. Para esto, extractos de proteínas espermáticas totales se analizaron mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (clon 4G10), y anti-tubulina como control de carga (Figura 13A). Los resultados del análisis semicuantitativo de la intensidad de las bandas correspondientes a proteínas fosforiladas se muestran en el gráfico de barras (Figura 13B). Como se puede observar, el nivel de PY correspondiente a los tratamientos con VE provenientes de ambas regiones es mayor comparado con el del control. Similar nivel de inducción de PY se observó para células incubadas en medio capacitante, el cual se utilizó como control positivo.

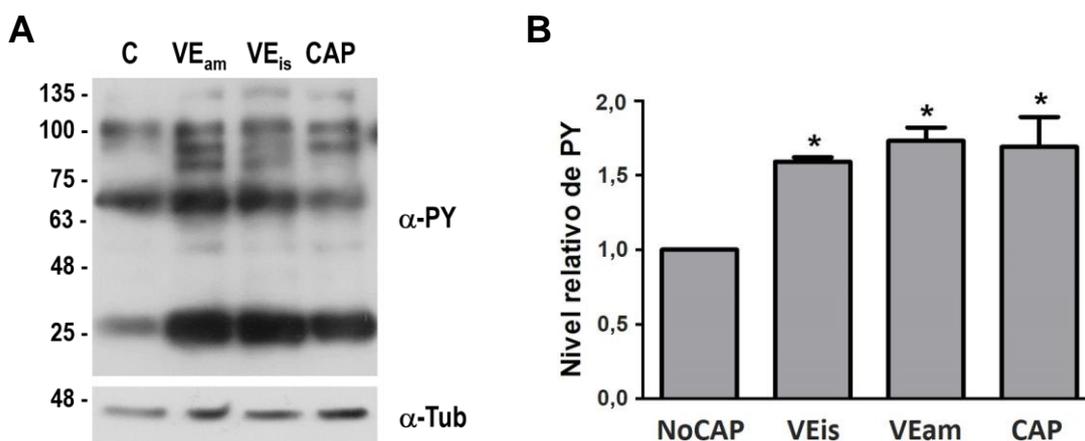


Figure 13. Las VE estimulan la fosforilación de proteínas en tirosina en espermatozoides bovinos. El estado de fosforilación de las proteínas se analizó por Western blot usando el anticuerpo 4G10 y anti-tubulina como control de carga (A); la cuantificación de las bandas se realizó usando el software ImageJ. Los espermatozoides bovinos criopreservados fueron separados, incubados en medio no capacitante (No CAP), medio No CAP en presencia de VE del istmo (VEis) o ampulla (VEam) o medio capacitante (CAP). Los datos se expresan como la media \pm EE de la intensidad de PY de tres experimentos realizados con muestras de diferentes individuos; * indica diferencias significativas respecto al control, $p < 0,05$ (B).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó la caracterización de VE obtenidas de la región del istmo y del ámpula del oviducto bovino, y se analizaron sus efectos sobre eventos asociados al proceso de capacitación espermática. Las VE de ambas regiones son capaces de unirse a los espermatozoides e inducir un aumento en los niveles de fosforilación de proteínas en residuos tirosina y un incremento en el porcentaje de células que experimenta la reacción acrosomal inducida.

Luego de la espermatogénesis, si bien los espermatozoides están morfológicamente diferenciados, siguen siendo incapaces de fertilizar un ovocito y deben pasar por varios cambios imprescindibles para adquirir esta competencia. El último de estos procesos de maduración es la capacitación espermática, y tiene lugar durante el tránsito de los espermatozoides por el tracto reproductor femenino. De esta forma las células adquieren, entre otras, la capacidad de experimentar la reacción acrosómica y fertilizar al ovocito (Gadella et al., 2008). Aunque los mecanismos responsables de la capacitación han sido estudiados extensamente, aún no han sido completamente definidos los factores que la regulan *in vivo*. Publicaciones recientes sugieren la participación de VE de distintos orígenes como moduladores de la capacidad fertilizante a través de la incorporación de nuevas proteínas funcionales a los espermatozoides (Al-Dossary et al., 2015, Al-Dossary et al., 2013, Griffiths et al., 2008, Olli et al., 2018).

Estudios previos de nuestro laboratorio evaluaron la influencia de los productos de secreción células endometriales epiteliales en la fisiología espermática, incubando espermatozoides humanos en medio condicionado derivado de dichas células. Los resultados indicaron que el porcentaje de espermatozoides capacitados aumentó 3 a 4 veces en presencia de MC, incluso luego de 15 min de incubación (Franchi et al., 2014). La búsqueda de los componentes responsables del efecto observado llevó al aislamiento de VE, cuya caracterización fue profundizada. De esta forma se observó que una breve co-incubación de las VE con los espermatozoides estimula la capacitación espermática, determinada por el aumento del nivel de reacción acrosómica inducida y el incremento en los niveles de PY (Franchi et al., 2016). Estos

resultados pusieron de manifiesto la capacidad de los espermatozoides para interactuar brevemente con las VE, y sugieren que el transporte de los espermatozoides por cada una de las regiones del tracto femenino puede tener consecuencias fisiológicas, a pesar del período limitado de tiempo que dure dicha interacción.

Está bien establecido que los espermatozoides de mamíferos tienen interacciones moleculares con el tracto femenino. Durante el almacenamiento en el reservorio del istmo oviductal los espermatozoides se unen al epitelio (Coy et al., 2012), una interacción que ayuda a mantener su capacidad fertilizante según lo revelado por la incubación *in vitro* de espermatozoides de toro con el epitelio oviductal (Chian and Sirard, 1995, Pollard et al., 1991). Además de la interacción directa, las interacciones moleculares indirectas se producen a través de las secreciones de las células epiteliales oviductales, tales como lo demuestran el aumento en la reacción acrosómica inducida y la fosforilación de proteínas en tirosina observada en espermatozoides humanos en presencia de la proteína lactoferrina, presente en las secreciones oviductales humanas (Zumoffen et al., 2015). Una de las primeras evidencias de la participación de las VE como nuevos mediadores de la comunicación intercelular en la regulación de la fisiología espermática por el tracto femenino, la constituye el trabajo de Al-Dossary y colaboradores (2013). Este grupo demostró la existencia de VE en el fluido oviductal ("Oviductosomas") y su participación en la transferencia de la bomba de calcio PMCA4a a los espermatozoides, cuyo papel es esencial en el proceso de hiperactivación de la movilidad espermática y la fertilidad (Al-Dossary et al., 2013). Aunque las VE se han descrito desde hace tres décadas, sólo en los últimos años se ha intensificado el interés por ellas, debido al hallazgo de que son secretadas por todos los tipos celulares estudiados hasta el momento y participan en la comunicación célula-célula mediante la transferencia de proteínas y material genético (ADN, ARN y microARN) a las células receptoras (Valadi et al., 2007).

En el presente trabajo, la caracterización de las EV oviductales bovinas aisladas del fluido obtenido de las regiones del istmo y del ámpula mostró que las VE tienen diámetros de 30 a 500 nm, similares a los reportados anteriormente (Lopera-Vasquez et al., 2016, Lopera-Vasquez et al., 2017) y presentan las proteínas marcadoras características CD81 y HSP70. Estos resultados indican

que ambas subpoblaciones, exosomas y microvesículas, están presentes en las secreciones de las dos regiones del oviducto analizadas.

La co-incubación de espermatozoides con VE marcadas con la sonda fluorescente PKH26 reveló la incorporación de las VE por las células. Mediante el análisis microscópico de los espermatozoides después de la co-incubación con las VE, se observó la marca fluorescente en diferentes regiones de la célula, que en algunos casos presentan un patrón punteado y en otros una distribución más difusa y homogénea. Estas diferencias podrían responder a diversos mecanismos y/o velocidades de incorporación de las VE, posiblemente debido a las diferencias en el tamaño que poseen las microvesículas y los exosomas. El análisis de la cinética de incorporación de las VE por citometría de flujo mostró un aumento de la señal fluorescente en los espermatozoides en función del tiempo de co-incubación con las VE marcadas, lo cual indica la captación progresiva de las VE oviductales. El incremento en el porcentaje de células marcadas alcanzó un máximo que se estabilizó a los 120 min de co-incubación, tiempo al cual el 65% de los espermatozoides presentaron marca positiva.

Dado que resultados anteriores de nuestro laboratorio demostraron que las VE secretadas por células epiteliales endometriales inducen un aumento en el porcentaje de células que experimenta la reacción acrosómica inducida y la fosforilación de proteínas en tirosina de espermatozoides humanos (Franchi et al., 2014), nos propusimos evaluar el posible efecto de las VE oviductales bovinas en estos dos parámetros asociados a la capacitación. En los espermatozoides incubados durante 90 min en un medio conteniendo VE de la región del istmo o del ampulla, se observó un aumento de aproximadamente 2,5 veces en el porcentaje de células que experimenta la RA en comparación con el medio NoCAP, similar al valor observado para las células incubadas en condiciones capacitantes. Esto está de acuerdo con el efecto inducido por las vesículas uterinas (Franchi et al., 2016) y también con la reciente publicación de Fereshteh y colaboradores (2018) que muestra, en un modelo murino, el aumento de la RA inducida por la progesterona tras una incubación de 10 min en presencia de vaginosomas (Fereshteh et al., 2018).

Como una aproximación alternativa a la evaluación del efecto de las VE sobre la capacitación, se analizó el efecto de las VE del istmo y del ampulla sobre la fosforilación de las proteínas espermáticas en tirosina (PY) mediante Western

blot. El análisis demuestra que las vesículas de ambas regiones estimularon un aumento similar en la PY, apoyando la idea de que estas VE son capaces de inducir cambios en los espermatozoides que finalmente conducirán a la exocitosis acrosómica. Fereshteh y colaboradores (2018) reportaron la presencia de proteínas fosforiladas en tirosina en oviductosomas, uterosomas y vaginosomas, y la transferencia de éstas a los espermatozoides después de 30 min de co-incubación (Fereshteh et al., 2018). Sin embargo, nuestros datos sugieren que el aumento de intensidad de PY observado por western blot responde a un incremento en el nivel de fosforilación de proteínas espermáticas como resultado de una señalización iniciada por las VE, ya sea por la transferencia de contenido mediante la fusión o por la interacción superficial con la membrana plasmática de los espermatozoides. En concordancia con esta posibilidad, algunas de las bandas de proteínas fosforiladas están presentes en las células incubadas en condiciones control (medio no capacitante) y muestran una mayor intensidad en los espermatozoides incubados en presencia de VE (Figura 13), lo que parece indicar que las proteínas ya están presentes en los espermatozoides (al menos algunas de ellas) y el aumento en la fosforilación es el resultado de la exposición a las VE. Incluso el menor período de incubación (30 min) utilizado por Fereshteh, podría ser un tiempo suficiente para permitir que tenga lugar una cascada de señalización que produzca la fosforilación de tirosina de las proteínas espermáticas (Fereshteh et al., 2018). Esto estaría de acuerdo con publicaciones que muestran la presencia, en los espermatozoides, de sustratos de proteína quinasa A (PKA) fosforilados después de tan sólo 1 min de incubación en medio capacitante (Battistone et al., 2013). Estudios más detallados son necesarios para definir los mecanismos moleculares responsables de los efectos observados en este trabajo, sin embargo, resultados preliminares de nuestro laboratorio indicarían que la fusión es al menos una de las formas en las que se iniciarían dichas señales (Franchi et al., 2017).

En relación a otros eventos del proceso de reproducción que podrían estar regulados por VE, un estudio reciente utilizó VE derivadas de células madre endometriales mesenquimales en el medio de cultivo de embriones obtenidos por fertilización *in vitro* en un modelo de ratón envejecido. Los datos indican que las VE mejoraron la competencia del desarrollo de los cigotos, un efecto aparentemente mediado por su actividad reductora de las especies reactivas del

oxígeno (Marinaro et al., 2018). Por otro lado, exosomas secretados por células endometriales fueron internalizados por células trofoblásticas humanas, mejorando su capacidad de adhesión en ensayos realizados *in vitro*. Dichos resultados sugieren la posible participación de los exosomas a la interacción embrión-endometrio, esencial en el microambiente uterino humano para el éxito de la implantación (Greening et al., 2016). Estos antecedentes ponen de manifiesto la importancia del papel que tendrían las VE en diversos procesos asociados a la reproducción.

Los resultados presentados en el presente trabajo constituyen un aporte al desarrollo de los conocimientos relacionados a los mecanismos de comunicación de los espermatozoides con el tracto femenino, y abren nuevas fronteras de investigación. Así, contribuyen a descifrar los procesos celulares que preparan al espermatozoide para la fertilización, lo cual podría además tener implicancias en los tratamientos de infertilidad humana.

Algunos de los resultados obtenidos durante esta tesina fueron presentados en reuniones científicas* y forman parte del manuscrito en preparación “Extracellular vesicles from oviductal isthmus and ampulla increase protein tyrosine phosphorylation and intracellular calcium levels during capacitation”.

* Franchi NA, Moreno A, **Adre AJ**, Giojalas LC. “Extracellular vesicles regulate survival, Ca²⁺, and tyrosine phosphorylation in bovine spermatozoa”. LIV Reunión Anual de la Sociedad de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, 5-8 de Noviembre de 2018. *Biocell* 42 (Suppl. 4) 2018, pag 80.

* Franchi A, Domínguez E, **Adre AJ**, Piotto, M, Giojalas LC. “Oviductal extracellular vesicles interact with bovine spermatozoa and enhance capacitation”. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, 13-17 de Noviembre, 2017, Buenos Aires. *Medicina BsAs* 77 (Suppl. I), pag 548.

BIBLIOGRAFÍA

- AALBERTS, M., STOUT, T. A. & STOORVOGEL, W. 2014. Prostatosomes: extracellular vesicles from the prostate. *Reproduction*, 147, R1-14.
- AL-DOSSARY, A. A., BATHALA, P., CAPLAN, J. L. & MARTIN-DELEON, P. A. 2015. Oviductosome-Sperm Membrane Interaction in Cargo Delivery: detection of fusion and underlying molecular players using three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM). *J Biol Chem*, 290, 17710-23.
- AL-DOSSARY, A. A., STREHLER, E. E. & MARTIN-DELEON, P. A. 2013. Expression and secretion of plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PLoS One*, 8, e80181.
- ARIENTI, G., CARLINI, E., SACCARDI, C. & PALMERINI, C. A. 2004. Role of human prostatosomes in the activation of spermatozoa. *J Cell Mol Med*, 8, 77-84.
- AUSTIN, C. R. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170, 326.
- BATTISTONE, M. A., DA ROS, V. G., SALICIONI, A. M., NAVARRETE, F. A., KRAPF, D., VISCONTI, P. E. & CUASNICU, P. S. 2013. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases. *Mol Hum Reprod*, 19, 570-80.
- BREITBART, H. 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol*, 187, 139-44.
- BURNS, G., BROOKS, K., WILDUNG, M., NAVAKANITWORAKUL, R., CHRISTENSON, L. K. & SPENCER, T. E. 2014. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS One*, 9, e90913.
- CABALLERO, J. N., FRENETTE, G., BELLEANNEE, C. & SULLIVAN, R. 2013. CD9-positive microvesicles mediate the transfer of molecules to Bovine Spermatozoa during epididymal maturation. *PLoS One*, 8, e65364.
- COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I., DOR, J., MASHIACH, S. & EISENBACH, M. 1995. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11039-43.
- COY, P., GARCIA-VAZQUEZ, F. A., VISCONTI, P. E. & AVILES, M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, 144, 649-60.
- CHIAN, R.-C. & SIRARD, M.-A. 1995. Fertilizing Ability of Bovine Spermatozoa Cocultured with Oviduct Epithelial Cells¹. *Biology of Reproduction*, 52, 156-162.
- FERESHTEH, Z., BATHALA, P., GALILEO, D. S. & MARTIN-DELEON, P. A. 2018. Detection of extracellular vesicles in the mouse vaginal fluid: Their delivery of sperm proteins that stimulate capacitation and modulate fertility. *J Cell Physiol*.
- FLORMAN, H. & FISSORE, R. 2015. Chapter 4—Fertilization in Mammals. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 4th ed.; Plant, TM, Zeleznik, AJ, Eds*, 149-196.

- FRANCHI, A., CUBILLA, M., GUIDOBALDI, H. A., BRAVO, A. A. & GIOJALAS, L. C. 2016. Uterosome-like vesicles prompt human sperm fertilizing capability. *Mol Hum Reprod*, 22, 833-841.
- FRANCHI, N. A., CUBILLA, M. A. & GIOJALAS, L. C. Regulation of sperm physiology by extracellular microvesicles from endometrial epithelial cells. L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 2014 Rosario. Biocell, 100.
- FRANCHI, N. A., GRASSO, E. J., BRAVO, A. A. & GIOJALAS, L. C. Uterine extracellular vesicles fuse to human spermatozoa and regulate intracellular calcium levels. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, 13-17 de Noviembre, 2017 Buenos Aires. Medicina BsAs, 2017 Buenos Aires. 548.
- GADELLA, B. M., TSAI, P. S., BOERKE, A. & BREWIS, I. A. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol*, 52, 473-80.
- GIOJALAS, L. C., ROVASIO, R. A., FABRO, G., GAKAMSKY, A. & EISENBACH, M. 2004. Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertil Steril*, 82, 247-9.
- GREENING, D. W., NGUYEN, H. P., ELGASS, K., SIMPSON, R. J. & SALAMONSEN, L. A. 2016. Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions. *Biol Reprod*, 94, 38.
- GRIFFITHS, G. S., GALILEO, D. S., REESE, K. & MARTIN-DELEON, P. A. 2008. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75, 1627-1636.
- HUNG, W. T., HONG, X., CHRISTENSON, L. K. & MCGINNIS, L. K. 2015. Extracellular Vesicles from Bovine Follicular Fluid Support Cumulus Expansion. *Biol Reprod*, 93, 117.
- HUNTER, R. H. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2004. Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Mol Reprod Dev*, 67, 243-50.
- JAISWAL, B. S., COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I. & EISENBACH, M. 1998. Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Lett*, 427, 309-13.
- KAUL, G., SHARMA, G., SINGH, B. & GANDHI, K. 2001. Capacitation and acrosome reaction in buffalo bull spermatozoa assessed by chlortetracycline and Pisum sativum agglutinin fluorescence assay. *Theriogenology*, 55, 1457-1468.
- KOPF, G., NING, XP, VISCONTI, PE, PURDON, MA, GALANTINO-HOMER, H, ET AL. 1999. Signaling mechanisms controlling mammalian sperm fertilization competence and activation. *The Male gametes*.
- LEAHY, T. & GADELLA, B. M. 2015. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian J Androl*, 17, 561-7.
- LOPERA-VASQUEZ, R., HAMDY, M., FERNANDEZ-FUERTES, B., MAILLO, V., BELTRAN-BRENA, P., CALLE, A., REDRUELLO, A., LOPEZ-MARTIN, S., GUTIERREZ-ADAN, A., YANEZ-MO, M., RAMIREZ, M. A. & RIZOS, D. 2016. Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLoS One*, 11, e0148083.
- LOPERA-VASQUEZ, R., HAMDY, M., MAILLO, V., GUTIERREZ-ADAN, A., BERMEJO-ALVAREZ, P., RAMIREZ, M. A., YANEZ-MO, M. & RIZOS, D.

2017. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality in vitro. *Reproduction*, 153, 461-470.
- MARINARO, F., PERICUESTA, E., SANCHEZ-MARGALLO, F. M., CASADO, J. G., ALVAREZ, V., MATILLA, E., HERNANDEZ, N., BLAZQUEZ, R., GONZALEZ-FERNANDEZ, L., GUTIERREZ-ADAN, A. & MACIAS-GARCIA, B. 2018. Extracellular vesicles derived from endometrial human mesenchymal stem cells improve IVF outcome in an aged murine model. *Reprod Domest Anim*, 53 Suppl 2, 46-49.
- NG, Y. H., ROME, S., JALABERT, A., FORTERRE, A., SINGH, H., HINCKS, C. L. & SALAMONSEN, L. A. 2013. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS One*, 8, e58502.
- OLLI, K. E., LI, K., GALILEO, D. S. & MARTIN-DELEON, P. A. 2018. Plasma membrane calcium ATPase 4 (PMCA4) co-ordinates calcium and nitric oxide signaling in regulating murine sperm functional activity. *Journal of cellular physiology*, 233, 11-22.
- OSHEROFF, J. E., VISCONTI, P. E., VALENZUELA, J. P., TRAVIS, A. J., ALVAREZ, J. & KOPF, G. S. 1999. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod*, 5, 1017-26.
- PALMERINI, C. A., SACCARDI, C., CARLINI, E., FABIANI, R. & ARIENTI, G. 2003. Fusion of prostasomes to human spermatozoa stimulates the acrosome reaction. *Fertil Steril*, 80, 1181-4.
- PARK, K. H., KIM, B. J., KANG, J., NAM, T. S., LIM, J. M., KIM, H. T., PARK, J. K., KIM, Y. G., CHAE, S. W. & KIM, U. H. 2011. Ca²⁺ signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Sci Signal*, 4, ra31.
- PARRISH, J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M. & FIRST, N. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction*, 38, 1171-1180.
- PARRISH, J. J. 2014. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81, 67-73.
- POLLARD, J. W., PLANTE, C., ALLAN KING, W., HANSEN, P. J., BETTERIDGE, K. J. & SUAREZ, S. S. 1991. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. *Biology of reproduction*, 44, 102-107.
- PUGA MOLINA, L. C., LUQUE, G. M., BALESTRINI, P. A., MARIN BRIGGILER, C. I., ROMAROWSKI, A. & BUFFONE, M. G. 2018. Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 72.
- RAPOSO, G. & STOOORVOGEL, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*, 200, 373-83.
- RIENZO, J. D., BALZARINI, F. C., GONZALEZ, L., TABLADA, M. & ROBLEDO, C. 2011. InfoStat versión 2011. *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- ROBAIRE, B., HINTON, B. T. & ORGEBIN-CRIST, M. C. 2006. The Epididymis. In: NEILL, J. D. (ed.) *Physiology of Reproduction*. 3rd ed. San Diego, CA.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9, 671.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. &

- KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- STEGMAYR, B. & RONQUIST, G. 1982. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res*, 10, 253-7.
- SUAREZ, S. S. 2007. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev*, 19, 103-10.
- SUAREZ, S. S. 2008. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol*, 52, 455-62.
- SUAREZ, S. S. & PACEY, A. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human reproduction update*, 12, 23-37.
- SUHAIMAN, L., DE BLAS, G. A., OBEID, L. M., DARSZON, A., MAYORGA, L. S. & BELMONTE, S. A. 2010. Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinase are involved in a novel signaling pathway leading to acrosomal exocytosis. *J Biol Chem*, 285, 16302-14.
- SULLIVAN, R. & SAEZ, F. 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, 146, R21-35.
- TEA, N., JONDET, M. & SCHOLLER, R. 1984. A 'migration-gravity sedimentation' method for collecting motile spermatozoa from human semen. *In Vitro Fertilization, Embryo Transfer and Early Pregnancy*. Springer.
- THERY, C., AMIGORENA, S., RAPOSO, G. & CLAYTON, A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3 22.
- THERY, C., BOUSSAC, M., VERON, P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G., GARIN, J. & AMIGORENA, S. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*, 166, 7309-18.
- VALADI, H., EKSTROM, K., BOSSIOS, A., SJOSTRAND, M., LEE, J. J. & LOTVALL, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9.
- VISCONTI, P. E., BAILEY, J. L., MOORE, G. D., PAN, D., OLDS-CLARKE, P. & KOPF, G. S. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121, 1129-37.
- YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. y Neill J.D. (eds), New York.
- ZUMOFFEN, C., MASSA, E., CAILLE, A., MUNUCE, M. & GHERSEVICH, S. 2015. Effects of lactoferrin, a protein present in the female reproductive tract, on parameters of human sperm capacitation and gamete interaction. *Andrology*, 3, 1068-1075.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Córdoba, por brindarme la posibilidad de acceder gratuitamente a una excelente formación académica.

A todos los docentes de la Escuela de Biología por haberme acompañado durante el paso por la facultad en esta apasionante carrera.

A Anahí Franchi, mi directora, por invitarme a formar parte de su proyecto de investigación, por su constante guía en la elaboración del presente trabajo, su apoyo incondicional, paciencia, buena predisposición y confianza.

A la Dra. Laura Giojalas, directora del CEBICEM, por brindarme un espacio para realizar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio que forman parte del CEBICEM, por haber sido siempre tan amables y atentos conmigo, y por ayudarme en todo lo que necesitara.

A los integrantes del Tribunal de Tesina, Dr. Alejandro Guidobaldi, Dr. Eduardo Clop y Dra. Angélica Rivarola, que formaron parte de este proceso y me brindaron su tiempo y atención.

A todos mis compañeros y amigos, por los momentos compartidos, el apoyo y los consejos brindados durante todo este tiempo.

Para finalizar, agradezco enormemente a mi familia, que es mi pilar fundamental y desde siempre me incentiva a lograr mis metas y me apoya incondicionalmente.