



Cinvestav

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**Los espermatozoides de cobayo (*Cavia porcellus*) adheridos a
una matriz de fibronectina inmovilizada alteran su fisiología y
aumentan su supervivencia**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Coral Yamileth Jorge Cruz

Para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Biología Celular

Director de Tesis

Dr. Enrique Othón Hernández Gonzáles

El presente trabajo se realizó en el laboratorio No 51 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la tutoría del Dr. Enrique Othón Hernández Gonzales.

Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) a través de la beca de Doctorado con número de becario 721681, así como de los proyectos de Ciencia Básica No. 284183 y del de Ciencia Básica y Fronteras 2023-2024-1894 otorgados al Dr. Enrique O. Hernández G.

Agradezco a la Dra. Ana Lilia Roa Espitia, Auxiliar del laboratorio 51 del departamento de Biología Celular, del CINVESTAV, quien inicio el presente estudio y quien coadyuvo con ideas para la investigación.

DEDICATORIA

La presente tesis es dedicada con amor a mis padres, por sembrar en mí el cariño, responsabilidad, dedicación y compromiso por el trabajo.

***Mi padre Miguel Jorge**, por alentarme con su ejemplo de perseverancia y entrega a todos los proyectos que realiza, esta cosecha de valores que sembró en mí está dando resultados, Eternamente Gracias papi, Te amo.*

***Mi madre Socorro Cruz**, por ser la mujer más importante en mi vida, ejemplo de profesión y madre a su vez, siempre alentarme a seguir adelante, ser un soporte en cualquier situación, cuidar de mi bebé Hylia con amor para que culmine mi investigación. Eternamente Gracias, Te amo mami.*

*A **mi esposo Rafael**, por ser un soporte incondicional y motivarme con cariño a seguir adelante en mis proyectos, mi compañero de vida. Gracias amor, Te amo.*

*A **mi hermosa hija Hylia Ainara**, por ser mi principal motivación, mi mayor bendición, Te amo hija.*

*A **mis hermanas** Nalleli, Itzel, Monse y mi hermosa **sobrino** Ximena por su apoyo y cariño. Las amo.*

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Enrique Othón Hernández Gonzáles por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación y permitirme desarrollar los proyectos de Maestría y Doctorado, agradezco su tutoría, conocimientos y compromiso.

A la Dra. Ana Lilia Roa Espitia, por auxiliarme con paciencia y dedicación en técnicas del laboratorio.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz, el Dr. José Manuel Hernández Hernández, la Dra. Mayel del Valle Chirinos Espín y el Dr. Humberto González Márquez, por formar parte de mi comité tutorial, sus invaluable asesorías, conocimientos compartidos y ser parte esencial en mi formación académica.

A la Dra. Mónica Salgado y la Dra. Daniela Ramírez por sus asesorías en las técnicas, sugerencias, compartir sus experiencias y conocimientos científicos.

A la Dra. Paola Ortiz y la Dra. Aideé López por brindarme sus conocimientos científicos, su amistad invaluable y fomentar bellos recuerdos juntas.

A la técnico Eva Salgado, Deniss, Tania y Cesar, por su apoyo en el laboratorio y hacer amena la estancia.

ÍNDICE

ÍNDICE	5
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN.....	12
El espermatozoide.....	12
Capacitación.....	14
Reacción acrosomal	16
Transporte en el tracto reproductor femenino	16
Reservorio Oviductal	18
Características de los espermatozoides adheridos al reservorio oviductal.	20
Integrinas.....	22
Fibronectina como receptor de Integrinas	26
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Animales	32
Reactivos	32
Obtención y capacitación de los espermatozoides	33
Ensayo de adhesión a la MTZ-FNTi.....	33
Evaluación de la motilidad de los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi.....	34
Cuantificación de rosetas.....	34
Valoración de la reacción acrosomal.....	34
Evaluación de viabilidad y caspasas	36
Identificación de integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ <i>in vivo</i>	36
Ensayos de inhibición de la adhesión con el péptido RGD y anticuerpos	37
Evaluación del estado fisiológico de los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi.....	38
<i>Localización de proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas y flotilina-1</i>	38
<i>Evaluación del calcio intracelular</i>	39

<i>Evaluación de la actina F</i>	39
<i>Efecto de latrunculina A sobre la adhesión</i>	40
Análisis de datos.....	40
RESULTADOS	41
Los espermatozoides de cobayos tienen una mayor capacidad para adherirse a la MTZ-FNTi.....	41
La adhesión de los espermatozoides al MTZ-FNTi requiere un tiempo mínimo de capacitación.	42
Los espermatozoides adheridos se desprenden gradualmente de la MTZ-FNTi... ..	42
Los espermatozoides liberados de MTZ-FNTi forman rosetas y no experimentan reacción acrosomal espontanea	45
Las integrinas median la adhesión de los espermatozoides a la MTZ-FNTi	48
Los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi retrasan la activación de las caspasas 3/7 y presentan membrana íntegra.....	50
La adhesión de los espermatozoides a una MTZ-FNTi altera la fisiología de los espermatozoides	53
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIÓN	67
PERSPECTIVAS	68
APÉNDICE I DETALLES DEL PROCEDIMIENTO	69
Medio TYRODE-HEPES.....	69
PBS 10X	69
Anticuerpos	70
FIGURA SUPLEMENTARIA	71
BIBLIOGRAFÍA	72

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i: Calcio intracelular

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ASB: Albúmina de suero bovino

CAP: Capacitado

CEO: Células epiteliales oviductales

FNTi: Fibronectina inmovilizada

FNTs: Fibronectina soluble

FP-Y: Fosforilación de proteínas en residuos de Tirosina

Lat A: Latronculina A

MEC: Matriz extracelular

MTZ-FNTi: Matriz de Fibronectina inmovilizada

NC: No Capacitado

PBS: Buffer fosfato salino

RA: Reacción Acrosomal

RA_s: Reacción acrosomal espontanea

RGD: Arg-Gly-Asp

P1: Patrón 1

P2: Patrón 2

RESUMEN

Los espermatozoides, en su trayectoria a través del oviducto de la hembra, quedan adheridos a las células epiteliales en el denominado reservorio oviductal (istmo). Aquí, los espermatozoides adheridos exhiben una morfología normal, acrosoma y membrana íntegra, así como una baja o nula fragmentación del ADN. También se sugiere que los espermatozoides presentan baja capacitación, término que implica bajos niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y fosforilación de proteínas en residuos de Tyr (FP-Y). Estos eventos que han sido relacionados con el incremento de su sobrevivencia, por lo que mantienen su fertilidad hasta que el ovocito se libere para ser fecundado. Se ha demostrado la presencia de fibronectina (FNT) en la parte basal de las células epiteliales del reservorio oviductal. La FNT es una glicoproteína con masa molecular de aproximadamente 250 kDa. En su estructura, presenta monómeros con el dominio RGD, un tripéptido formado por arginina, glicina y ácido aspártico, sitio de reconocimiento de receptores denominados Integrinas. Las integrinas son glicoproteínas de adhesión que se encuentran en la superficie celular, compuestas por subunidades α y β . En espermatozoides de los mamíferos se han encontrado las integrinas: $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 6\beta 4$ y $\alpha 3\beta 1$. Las integrinas, al interactuar con ligandos de la matriz extracelular, se conectan al andamiaje del citoesqueleto a través de proteínas de anclaje formando complejos de adhesión focal, estas proteínas están presente en el espermatozoide de cobayo y ratón. La interacción FNT-integrina desencadena vías de señalización que intervienen en la capacitación y la reacción acrosomal. Por lo antes mencionado, hipotetizamos que la presencia de integrinas y de proteínas de adhesiones focales en el espermatozoide de cobayo, podrían generar una interacción funcional con componentes de la matriz extracelular como FNT, donde dicha interacción altere la fisiología espermática, modificando la capacitación, la reacción acrosomal y la sobrevivencia de los espermatozoides. El proyecto tuvo como

objetivo, evaluar la capacidad de adhesión de los espermatozoides de cobayo a la MTZ-FNTi, así como analizar los efectos que tiene la adhesión sobre la fisiología y la sobrevivencia espermática. Los resultados obtenidos muestran que los espermatozoides de cobayo tuvieron una alta afinidad para adherirse a la MTZ-FNTi, dicha interacción fue mediana por las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$, que reconocen el sitio RGD de la FNT. La adhesión a la MTZ-FNTi, mantuvo a los espermatozoides en un estado de baja capacitación: caracterizado por bajos niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y fosforilación de proteínas en residuos de Tyr. Durante la adhesión los espermatozoides presentaron movilidad flagelar, manteniendo su membrana plasmática y acrosoma intacto, así como también mostraron baja activación de caspasas 3/7. Los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi se desprendieron gradualmente, formando rosetas y no experimentaron reacción acrosomal espontánea, pero sí llevaron a cabo la reacción acrosomal inducida por progesterona. En conclusión, la adhesión de los espermatozoides de cobayo a la MTZ-FNTi altera su fisiología, manteniendo al espermatozoide vivo por más tiempo, manteniendo el acrosoma intacto, hemos sugerido definirlo como “un estado de capacitación estacionario”, que le permite a la célula incrementar su sobrevivencia, resultados similar a lo que ha sido reportado para los espermatozoides adheridas a las células epiteliales del oviducto.

ABSTRACT

Spermatozoa, in their path through the female oviduct, remain attached to the epithelial cells in the so-called oviductal reservoir (isthmus). Here, the attached spermatozoa exhibit normal morphology, intact acrosome and membrane, as well as low DNA fragmentation. It is also suggested that spermatozoa present low capacitation, a term that implies low levels of $[Ca^{2+}]_i$ and protein phosphorylation in Tyr residues. Events that have been related to the increase in their survival, so they maintain their fertility until the oocyte is released to be fertilized. Fibronectin (FNT) is present in the basal part of the epithelial cells of the oviductal reservoir. FNT is a glycoprotein with a high molecular mass (250 kDa). In its structure, it presents monomers with the RGD domain, a tripeptide formed by arginine, glycine and aspartic acid; this conforms to the recognition site for receptors called integrins. Integrins are adhesion glycoproteins found on the cell surface, composed of α and β subunits. The presence of integrins $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_6\beta_4$ and $\alpha_3\beta_1$ is reported in mammalian sperm. FNT-integrin interaction triggers signaling pathways that intervene in acrosomal capacitation and reaction. Integrins, when interacting with ligands of the extracellular matrix, connect to the cytoskeletal scaffolding through anchoring proteins, forming focal adhesion complexes. These proteins are present in guinea pig, mouse and human spermatozoa. Based on the above, we hypothesize that the presence of integrins and focal adhesion proteins in guinea pig spermatozoa could generate a functional interaction with components of the extracellular matrix, such as FNT. This interaction could alter sperm physiology, modifying capacitation and the acrosomal reaction. Therefore, the objective of the project was to evaluate the adhesion capacity of guinea pig spermatozoa to a matrix made up of immobilized fibronectin, as well as to analyze the effects that adhesion has on sperm physiology and survival. The results obtained shown that guinea pig spermatozoa had a high affinity to adhere to the matrix made up of immobilized fibronectin; this interaction was mediated by the integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$, which recognize the RGD site.

Adhesion to iFNT-MTX kept spermatozoa in a state of low capacitation: low levels of $[Ca^{2+}]_i$ and phosphorylation of proteins in Tyr residues. During adhesion, they presented flagellar mobility, maintained their plasma membrane and acrosome intact, and low activation of caspases 3/7. Spermatozoa adhered to iFNT-MTX, gradually detached, and rosettes formed. They did not carry out spontaneous acrosomal reactions, but they experienced progesterone-induced AR. In conclusion, the adhesion of guinea pig sperm to iFNT-MTX alters their physiology, maintaining the spermatozoa in a stationary

INTRODUCCIÓN

El espermatozoide

El espermatozoide es la célula producto final del proceso de espermatogénesis. Son producidos a través de una serie de fases mitóticas, meióticas y postmeióticas sucesivas que suceden dentro de los túbulos seminíferos. Los dos componentes principales de un espermatozoide maduro son la cabeza y el flagelo, unidos por la pieza conectora. La cabeza contiene el núcleo, donde reside la cromatina condensada por protaminas. Un tercio del núcleo está cubierto por el acrosoma, adherido a través de la teca perinuclear, un citoesqueleto especializado que rodea al núcleo de los espermatozoides de los mamíferos. El acrosoma es una vesícula citoplasmática originada en el complejo de Golgi que contiene las enzimas hidrolíticas necesarias para penetrar el óvulo y lograr una fertilización exitosa(Eddy, 2006).

El flagelo se divide en tres regiones: pieza media, pieza principal y pieza final. Contiene un complejo central de microtúbulos que forman el axonema, rodeado, a su vez, por nueve fibras exteriores densas que se extienden desde la pieza conectora hasta la pieza principal y que tiene una participación esencial en la motilidad de los espermatozoides de los mamíferos. La pieza media contiene una envoltura mitocondrial que rodea las fibras densas externas y el axonema, y que suele estar dispuestas en dos hélices paralelas que, en el ratón, presentan en promedio 87 enrollamientos alrededor del flagelo. La mayor parte de la longitud del flagelo se compone de la pieza principal, definida por la presencia de una envoltura alrededor del axonema y fibras densas externas. El flagelo tiene las fuentes de energía y maquinaria para generar la movilidad necesaria para que los espermatozoides alcancen al óvulo y penetren sus envolturas, con los objetivos de: entregar su material genético, activar al óvulo, se produzca el cigoto e iniciar el desarrollo (Fig. 1A)(Eddy, 2006).

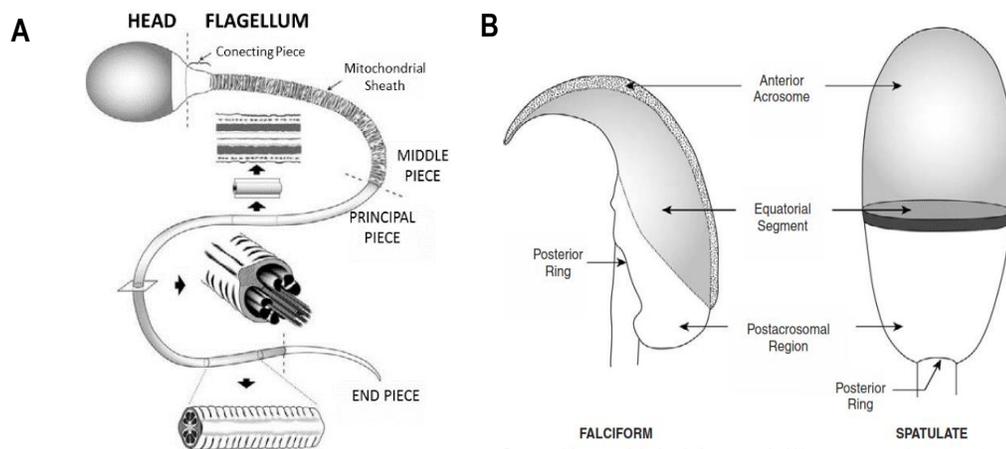


Figura 1. Estructura de los espermatozoides de mamíferos. A. Morfología del espermatozoide; **B.** Divisiones de la cabeza espermática de ratón (falciforme) y de conejo (espatulado). Tomada de (Eddy, 2006).

Una característica de los espermatozoides es la subdivisión de la membrana plasmática en dominios regionales que difieren en composición y función. En la cabeza las regiones principales de la membrana plasmática de la mayoría de los mamíferos son: la región acrosomal (región anterior de la cabeza) y la región postacrosómica (región posterior de la cabeza). La membrana plasmática de la región acrosomal se puede subdividir en dominio del segmento marginal, dominio del segmento principal y dominio del segmento ecuatorial. El dominio regional postacrosomal incluye la membrana entre el margen posterior del acrosoma y la pieza conectora. El anillo posterior está localizado en la unión entre la cabeza y la pieza conectora (Fig. 1B) (Eddy, 2006).

Los espermatozoides de mamífero dentro del tracto reproductor femenino experimentan dos procesos esenciales para tener la capacidad de fertilizar al óvulo: Capacitación (CAP) y Reacción Acrosomal (RA) (M. C. Chang, 1951; Yanagimachi, 1994a).

Capacitación

Chang, en 1951 (M. C. Chang, 1951), demostró que los espermatozoides de los mamíferos deben residir en el tracto reproductivo de la hembra por un periodo de tiempo, para adquirir la capacidad fertilizante (M.C. Chang, 1951). Este periodo fue denominado “capacitación” y está definida por cambios bioquímicos y fisiológicos que permite al espermatozoide llevar a cabo la fertilización del óvulo.

Durante la capacitación, los espermatozoides de los mamíferos responden a los cambios ambientales cuando son depositados en el oviducto o incubados en un medio de cultivo específico. La capacitación se inicia con la pérdida de colesterol de la membrana plasmática, lo que le permite una mayor fluidez, facilitando el transporte de iones de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , y Cl^- , con el consecuente incremento de la concentración intracelular de HCO_3^- y Ca^{2+} . Ambos iones estimulan a adenilato ciclasa soluble (SACY), que, a su vez, incrementa el nivel de cAMP, lo que activa a la PKA y, como consecuencia, aumenta la fosforilación de proteínas en sus residuos de tirosina (FP-Y), uno de los marcadores principales de la capacitación (Fig. 2) (Krapf et al., 2010; Stival et al., 2016; Visconti et al., 2011). Otros cambios importantes son: la remodelación de los citoesqueletos formados por espectrina y actina, localizados entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, el primero es degradado y el segundo produce una barrera que impide que la reacción acrosomal suceda tempranamente (Cabello-Agueros et al., 2003). Además se producen cambios en el potencial de la membrana plasmática (E_m), la que se hiperpolariza, llevando a la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Arnoult et al., 1999; Hernandez-Gonzalez et al., 2006). La movilidad flagelar cambia durante la capacitación, de un estado móvil a uno hiper móvil, caracterizado porque el flagelo muestra una mayor amplitud y una longitud de onda corta, por lo que la trayectoria de la cabeza

es menos lineal, con lo que el espermatozoide puede desplazarse (Yanagimachi, 1994b). Otro evento relacionado con la capacitación es la relocalización de los marcadores de balsas lipídicas, como las proteínas caveolina-1 y flotilina-1, redistribuyéndose hacia la región apical de la cabeza del espermatozoides, la reorganización de las balsas lipídicas espermáticas puede facilitar los eventos de señalización específicos de la capacitación (van Gestel et al., 2005).

Todos estos cambios preparan al espermatozoide para someterse a un proceso conocido como reacción acrosómica o acrosomal.

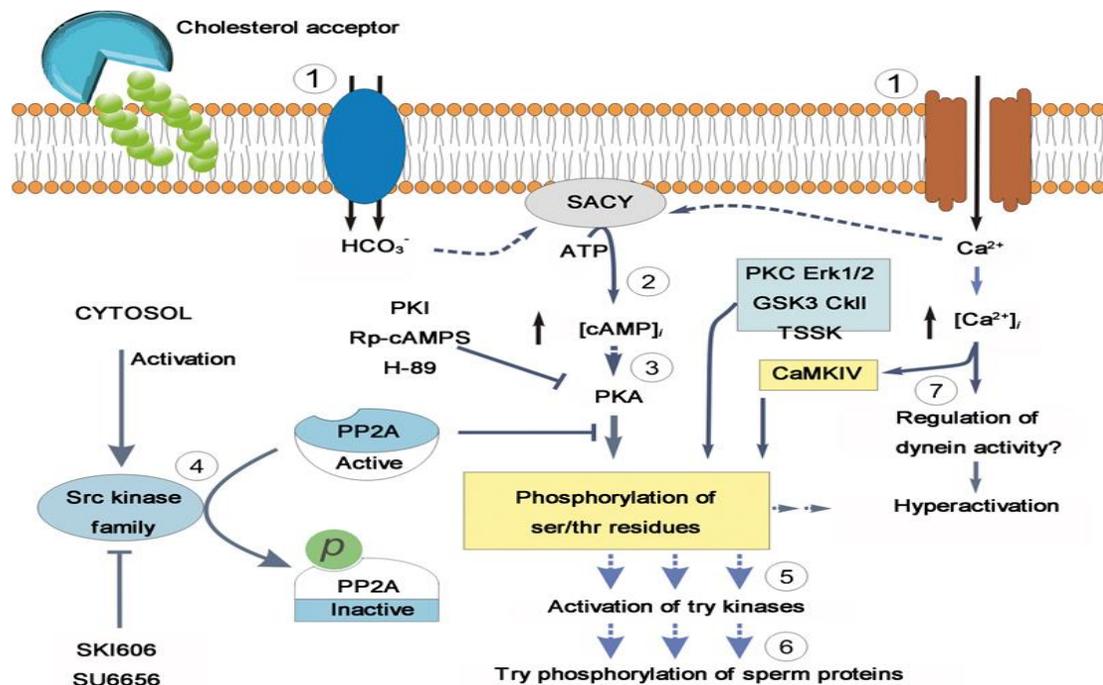


Figura 2. Modelo de la regulación de vías de fosforilación durante la capacitación.

La ruta está modulada por la eliminación del colesterol de la membrana plasmática. (1) La afluencia de HCO_3^- y Ca^{2+} estimulan a SACY. (2) Aumento de las concentraciones intracelulares del segundo mensajero cAMP. (3) Los niveles altos de cAMP activan a PKA, la fosforilación de los sustratos de PKA se somete a regulación mediante fosfatasas Ser/Thr, estas fosfatasas a su vez están reguladas negativamente por un miembro de la familia Src cinasa (4). (5) El inicio de la fosforilación de los sustratos de PKA es seguido por la activación de tirosina cinasas no identificadas y la promoción de la fosforilación de tirosina de los espermatozoides (6). (7) El aumento de Ca^{2+} intracelular lleva a la hiperactivación. Tomada de (Visconti et al., 2011).

Reacción acrosomal

El acrosoma es una vesícula cuyo origen está en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi que recubre un tercio del núcleo del espermatozoide (Eddy, 2006). En respuesta a estímulos fisiológicos, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan formando vesículas mixtas que conduce liberar el contenido acrosomal al ambiente extracelular. Este proceso se denomina reacción acrosomal o acrosómica (RA) y su finalización es un requisito previo absoluto para que los espermatozoides atraviesen las envolturas del óvulo y se fusionen con su membrana plasmática (oolema).

Los inductores fisiológicos de la RA mejor conocidos son la progesterona y la proteína ZP3; ambas inducen flujos de Ca^{2+} en el espacio entre la membrana plasmática apical y la membrana acrosomal externa, permitiendo su fusión. Este proceso se puede producir durante el contacto del espermatozoide con la matriz *cumulus oophorus* o con la zona pelúcida, desencadenando la liberación de las enzimas acrosomales que degradan las envolturas del óvulo, favoreciendo el paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida. Una vez sucedida la RA se expone la membrana acrosomal interna como el nuevo dominio de membrana en la superficie celular y el espermatozoide adquiere la capacidad fertilizante que le permite adherirse y fusionarse con el oolema. (Gadella & Luna, 2014).

Transporte en el tracto reproductor femenino

La trayectoria del espermatozoide a través del tracto reproductivo se encuentra regulado por una serie de barreras que permiten asegurar que los espermatozoides con morfología, fisiología normal y ADN íntegro sean los que tengan éxito en la fertilización (Holt & Fazeli, 2016), por lo que este paso a través del tracto reproductor es un proceso riguroso de selección espermática. (Mahe et al., 2021).

Durante la eyaculación el plasma seminal compuesto esencialmente de proteínas que son secretadas por las glándulas del tracto reproductor masculino y que son adsorbidas en la superficie de espermatozoides. El plasma seminal mantiene la estabilidad de la membrana del espermatozoide, la movilidad y viabilidad de los espermatozoides hasta el proceso de capacitación. Varios polipéptidos del plasma seminal se unen a los espermatozoides, jugando un papel importante en su capacidad de fertilización, ya que, dependiendo de su composición, afectan de forma diferente la fisiología espermática (Muino-Blanco et al., 2008). Después de la eyaculación, el espermatozoide humano entra por el canal cervical donde debe lidiar con el pH del fluido vaginal, normalmente es un pH ácido entre 4-5, y cuya función es microbicida para algunos patógenos de transmisión sexual, esta acidez se mantiene, principalmente, debido a la producción de ácido láctico por lactobacilos anaerobios de la flora vaginal (Boskey et al., 2001). Los espermatozoides que alcanzan el moco cervical deben atravesarlo para alcanzar el útero y en este proceso se liberan de la mayor parte de los componentes del plasma seminal que los protegían (Hernandez-Silva & Chirinos, 2019). Posteriormente, los espermatozoides que sobreviven están sujetos a tensiones físicas durante contracciones del tracto femenino (de Ziegler et al., 2001). La función principal de la contractilidad uterina en la fase folicular tardía es facilitar el transporte retrogrado (del cuello al fondo del útero) de los espermatozoides para que después puedan llegar al extremo distal de las trompas de Falopio donde, normalmente, se produce la fertilización (de Ziegler et al., 2001). El transporte rápido de espermatozoides a través del útero, mediante las contracciones, puede mejorar la supervivencia de los espermatozoides al propulsarlos más allá de las defensas inmunológicas de la hembra. Cuando los espermatozoides ingresan en el útero, superan en número a los leucocitos. Probablemente, para garantizar la fecundación, los espermatozoides deben pasar a través de la cavidad uterina antes de que lleguen cantidades significativas de leucocitos (Suarez & Pacey, 2006). Posteriormente, estos llegan a la unión uterotubal (conexión entre la cavidad

endometrial del útero y las trompas de Falopio), donde se presenta otra barrera, ya que en el estrecho lumen de la unión uterotubal se ha encontrado moco, que debe ser atravesado por los espermatozoides (Jansen, 1980). A medida que atraviesan la unión uterotubal y entran al istmo tubárico, los espermatozoides pueden quedar retenidos en un reservorio denominado como reservorio oviductal.

Reservorio Oviductal

Los espermatozoides se unen de forma reversible al epitelio oviductal de la región del istmo, lo que resulta en la formación de un reservorio funcional de espermatozoides. La región del istmo del oviducto permite asegurar que los espermatozoides alcancen el óvulo en el momento adecuado (Hunter et al., 1980). El reservorio puede cumplir tres funciones: Primero, previene la fertilización polispermica, permitiendo que unos pocos espermatozoides alcancen al óvulo, en la ampolla oviductal. En segundo lugar, los espermatozoides adheridos a las CEO pueden mantener la capacidad de fertilizar hasta que el óvulo se libere, incrementando su vida fértil. En tercer lugar, el estado fisiológico de los espermatozoides es regulado dentro del depósito, garantizando que los espermatozoides estén en el estado adecuado cuando la ovulación ocurre (Holt & Fazeli, 2016; Suarez, 2002).

Los espermatozoides que están adheridos en el istmo están unidos a las células epiteliales ciliadas, estableciendo interacciones carbohidrato-proteína, por lo tanto, parecen estar equipados con ligandos (oligosacáridos) y receptores complementarios (lectinas) que pueden estar involucrados en la unión espermatozoide-epitelio. Se ha sugerido que los espermatozoides adheridos al epitelio del istmo disocian las moléculas de adhesión de la superficie de los espermatozoides para desprenderse de las CEO, permitiendo que los espermatozoides sean liberados para completar el proceso de capacitación y migren al sitio de fertilización (Hung & Suarez, 2012; Topfer-

Petersen et al., 2002). Las moléculas receptoras del espermatozoide parece variar entre especie, por ejemplo ácido siálico en hámster y galactosa en caballo (Topfer-Petersen et al., 2002). La unión de los espermatozoides de cerdo al epitelio oviductal antes de la fertilización está mediada por varias proteínas: Espermadhesina AQN1 (Calvete et al., 1997), cuyos ligandos son la proteína oviductal del cerdo (SBG) (Talevi & Gualtieri, 2010) y la anexina A2 (Teijeiro et al., 2009), y las BSP (Binder of Sperm Protein) 5 y 3 (Hung & Suarez, 2012), que tienen como blanco a las anexinas 1, 2, 4 y 5 (Ignotz et al., 2007). Sin embargo, ninguna de éstas induce la activación de vías de señalización que pudieran estar relacionadas con la capacitación o la sobrevivencia espermática. La liberación de los espermatozoides en el reservorio oviductal está regulado por la acción combinada de agentes quimio-atrayentes como la progesterona, por las contracciones oviductales y por los movimiento de cilios de las células epiteliales (Fig.3) (Guidobaldi et al., 2012).

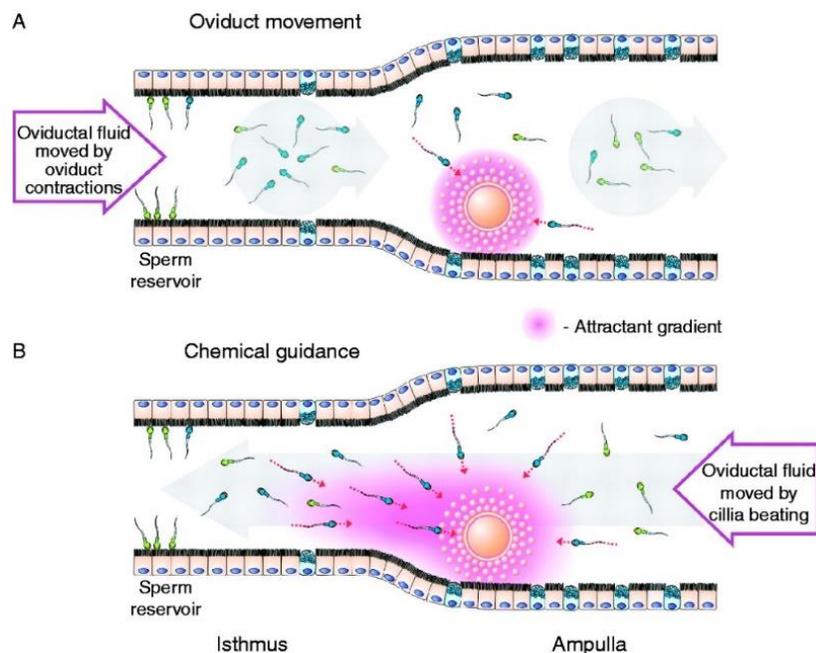


Figura 3. Transporte y retención de espermatozoides en el sitio de fertilización mediado por quimiotaxis y movimiento del oviducto. El movimiento del oviducto impulsa mecánicamente por el líquido oviductal que contienen espermatozoides capacitados que nadan libremente hacia el ovario (A). Las células asociadas al óvulo secretan continuamente un atrayente que forma un gradiente en el entorno del cúmulo que puede

expandirse hacia el istmo por la corriente de golpes de los cilios. Este gradiente de atrayente puede guiar químicamente a los espermatozoides capacitados hacia el óvulo (B). El gradiente de atrayente interrumpido durante las contracciones del oviducto puede restablecerse mediante los cilios durante el período de inactividad entre las contracciones. Tomada de (Guidobaldi et al., 2012).

Características de los espermatozoides adheridos al reservorio oviductal.

La adhesión de los espermatozoides a las células epiteliales del Istmo ejerce una rigurosa selección dentro de una población de espermatozoides ya muy seleccionada, incrementando en este sitio la sobrevivencia o vida fértil de los espermatozoides (Lopez-Ubeda et al., 2017; Talevi & Gualtieri, 2010).

Los espermatozoides adheridos al epitelio del Istmo muestran características específicas: morfología normal, membrana plasmática íntegra, estado de capacitación bajo, que se define por sus bajos niveles de calcio intracelular y fosforilación de proteínas en Tyr y baja fragmentación del ADN. (García-Vázquez et al., 2016; Petrunkina et al., 2001; Topfer-Petersen et al., 2002)

Morfología normal y membrana plasmática íntegra. En un eyaculado hay espermatozoides con morfología normal y anormal, la observación en seres humanos de espermatozoides seleccionados naturalmente en el tracto genital femenino y los recuperados en la superficie de la zona pelúcida han permitido definir a un espermatozoide normal: cabeza ovalada, una región acrosomal que ocupa entre el 40%-70% del área total de la cabeza, pieza media con un ancho $>1\mu\text{m}$, pieza principal y pieza final más estrechas y de manera uniforme. Un espermatozoide anormal, presenta defectos en la cabeza: grandes, pequeñas, amorfa vacuolada, área acrosomal pequeña $<49\%$, cabezas dobles; el flagelo con defectos en la pieza media (gruesa e irregular), cola corta, múltiple, doblada ($>90^\circ$) y toda combinación entre estos. El manual de la organización mundial de la salud (OMS) para el análisis de semen en seres humanos indica que solo alrededor del 4% de los espermatozoides eyaculados

de humano fértil se ajusta a la definición morfológica de un espermatozoide normal. Una vez en el oviducto, las células epiteliales ejercen rigurosa selección, siendo solo capaz de unirse a este epitelio espermatozoides con morfología normal (García-Vázquez et al., 2016). Además, en los espermatozoides de cerdo se ha descrito que la integridad de la membrana plasmática de las células adheridas a las CEO, fue mayor en comparación con espermatozoides no adheridos (Petrunina et al., 2001).

Estado de capacitación bajo. Se ha demostrado que los espermatozoides adheridos en las células epiteliales oviductales mantienen niveles bajos de $[Ca^{2+}]_i$ y de FP-Y demostrando que el epitelio oviductal selecciona a espermatozoides con una capacitación baja, estos parámetros son controlados hasta que los espermatozoides se separan del epitelio oviductal, reiniciándose el proceso de capacitación (Petrunina et al., 2001; Topfer-Petersen et al., 2002)

Fragmentación del ADN en espermatozoides. Los espermatozoides unidos al reservorio oviductal presentan mayor integridad en el ADN (Ellington et al., 1999; Soto-Heras et al., 2023). La infertilidad en los seres humanos está relacionada con la fragmentación del ADN espermático. Aunque concentraciones basales de agentes oxidantes son indispensables para la capacitación (Aitken, 2017b; O'Flaherty, 2015) una de las causas de la fragmentación del ADN puede ser el estrés oxidante al que podrían estar expuestos los espermatozoides.

El cambio en una vía apoptótica comienza por desencadenar una mayor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y culmina en la fragmentación del ADN y la muerte celular, (Aitken et al., 2013). Las células epiteliales ejercen una rigurosa selección de espermatozoides, incluso dentro de una población ya seleccionada de espermatozoides. (Lopez-Ubeda et al., 2017).

Integrinas

Las integrinas son una familia de receptores de adhesión a la superficie celular; son heterodímeros compuestos de subunidades α y β asociadas no covalentemente, y cada una de estas cadenas son proteínas transmembranales de un solo paso de tipo I. En los vertebrados, la familia está compuesta por 18 subunidades α y 8 subunidades β que pueden ensamblarse para formar 24 heterodímeros diferentes. Las integrinas se pueden agrupar en subgrupos basándose en las propiedades de unión al ligando o en su composición de subunidad. La unión específica de los dominios extracelulares de las integrinas a las proteínas de matriz extracelular o a los receptores de las células adyacentes apoya a la adhesión celular y es crucial para la fertilización, el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos, la defensa del huésped y la hemostasia celular. Este proceso se basa en el enlace de las integrinas al citoesqueleto intracelular a través de las colas citoplasmáticas, lo cual permite la transmisión bidireccional de fuerza a través de la membrana plasmática. Las integrinas transmiten señales químicas y mecánicas a la célula desde el exterior, proporcionando información sobre su ubicación, entorno local, estado adhesivo y matriz circundante. Estas señales determinan respuestas celulares tales como migración, supervivencia, diferenciación y motilidad (Calderwood et al., 2000).

La subunidad α se compone de una hélice β con siete pliegues que están conectados a un "tight", un dominio "calf-1" y un dominio "calf-2" formando juntos una estructura de pie que soporta la cabeza de la integrina (fig. 4 a,b). Los últimos 3 o 4 pliegues de la hélice β contienen dominios que unen Ca^{2+} , lo cual afecta alostéricamente la unión del ligando. La subunidad α determina la especificidad del ligando de la integrina. Nueve de las cadenas α de las integrinas contienen un dominio I, compuesto por aproximadamente 2000 aa (Barczyk et al., 2010).

La subunidad β contiene un dominio de plexina-sempahorina-integrina (PSI), un dominio híbrido, un dominio B1, y cuatro repeticiones de factor de crecimiento epidérmico (EGF) ricos en cisteínas (fig.4a y b). El dominio B1 contiene un sitio de adhesión dependiente del ion metal (MIDAS) en coordinación con Mg^{2+} y un sitio adyacente a MIDAS (ADMIDAS) a este sitio se une al ion Mg^{+2} y conduce un cambio conformacional que da como resultado una forma activa de la integrina. En cambio, la unión de Ca^{2+} a este sitio inhibe dicho cambio conformacional (Barczyk et al., 2010).

El sitio de unión al ligando se forma en una región en la intersección de la hélice β de la cadena α de las integrinas y el dominio $\beta 1$. Las integrinas con un dominio αI se unen a los ligando a través este dominio (Luo et al., 2007).

Las integrinas se unen a ligandos solubles o receptores celulares. Se sabe que muchas integrinas adoptan conformaciones de baja afinidad, afinidad intermedia y alta afinidad, (fig. 4C) y éstas existen en un equilibrio dinámico entre ellas (Margadant et al., 2011; Pang et al., 2023). El ligando principal de algunas integrinas contiene la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD), secuencia que se encuentra principalmente en la Fibronectina, Vitronectina, Fibrinógeno y otras proteínas de la matriz extracelular. Ambas subunidades de las integrina pueden reconocer y unirse al motivo RGD, solo 8 integrinas ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$, y $\alpha 8\beta 1$) de 24 reconocen la secuencia de RGD , ya que los ligandos específicos para cada integrina se definen adicionalmente por la secuencia de aminoácidos que rodea esta secuencia RGD (Jacquemet et al., 2013) Los péptidos RGD pueden usarse para evaluar la participación de las integrinas de unión a RGD en un cierto evento (Barczyk et al., 2010).

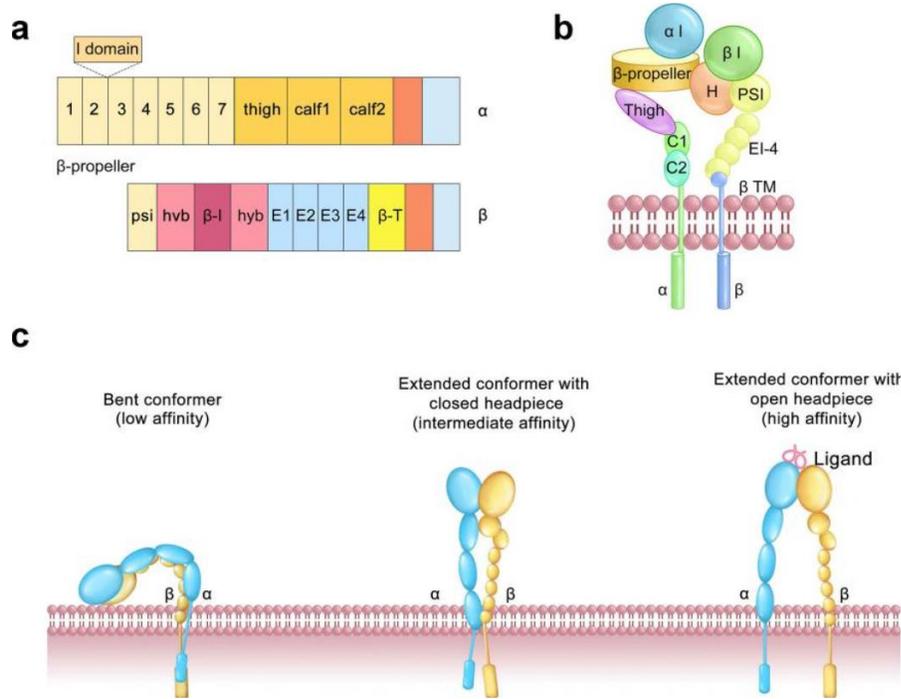


Figura 4 Estructura primaria y conformaciones representativas de las integrinas.
a Organización de los dominios dentro de las estructuras primarias. **b** Disposición de los dominios dentro de la estructura cristalina tridimensional representativa de las integrinas. **c** Cambio conformacional de las integrinas: conformaciones cerradas dobladas, cerradas extendidas y abiertas extendidas. (Pang et al., 2023)

Las integrinas forman parte de una amplia red proteica con las tetraspaninas, que son socios de unión de las integrinas en los gametos. En espermatozoide se localizan principalmente, CD9, CD81 y CD151(fig. 5) (Merc et al., 2021) Se han reportado en espermatozoides humanos, ratones, bovinos, cerdos y cobayos, las integrinas: $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 6\beta 4$ y $\alpha 3\beta 1$ (tabla 1) (Barraud-Lange et al., 2007; Boissonnas et al., 2010; Frolikova et al., 2016; Frolikova et al., 2019; Fusi et al., 1996; Glander & Schaller, 1993; Glander et al., 1998; Jankovicova et al., 2020; Klentzeris et al., 1995; Merc et al., 2021; Palenikova et al., 2021; Reddy et al., 2003; Roa-Espitia et al., 2016). Estas integrinas se sitúan principalmente en la membrana plasmática (segmento ecuatorial, región post acrosomal y en la pieza media), membrana acrosomal

interna y membrana acrosomal externa (Merc et al., 2021) (fig.5). Se demostró que el uso de anticuerpos monoclonales bloqueadores de funciones contra una integrina seleccionada durante la fertilización *in vitro* redujo la capacidad del espermatozoide al unirse con el ovocito.

Tabla 1 Integrinas presentes en el espermatozoide de mamíferos.

INTEGRINAS	LIGANDOS	MODELO	AUTOR
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectina	Ser Humano, Bovino, Cobayo	Thys, M., et al 2009, Roa-Espitia, et. al, 2018
$\alpha 6\beta 1$	Laminina	Ratón, Cobayo	Barraud-Lange et al., 2007, Frolikova et. al., 2019
$\alpha 6\beta 4$	Laminina	Ratón	Frolikova et. al., 2019
$\alpha v\beta 3$	Vitronectina, Fibronectina	Ratón, Cobayo	Boissonnas, et al 2010, Roa-Espitia, 2018
$\alpha 3\beta 1$	Fibronectina, Laminina y Colágeno	Ratón	Frolikova et. al., 2019

Las integrinas junto con las tetraspaninas desempeñan un papel clave en la interacción de los espermatozoides con los componentes del líquido oviductal. Al unirse al reservorio oviductal, el espermatozoide entra en contacto con vesículas del fluido oviductal, denominados oviductosomas, donde se demostró que la fusión de oviductosomas con la membrana del espermatozoide puede inhibirse en presencia de fibronectina y vitronectina, que se unen específicamente a las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$.

También se ha postulado que las integrinas pueden desempeñar un papel clave durante la unión de gametos, ya que estudios previos mostraron que los

anticuerpos contra las integrinas $\beta 1$ impidieron la fusión con el ovocito (Almeida et al., 1995; Evans, 1999; Evans et al., 1997; Miller et al., 2000).

En el presente proyecto de investigación se realizaron ensayos con las integrinas que reconocen a FNT presente en el espermatozoide de cobayo $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ (Roa-Espitia, 2018).

Fibronectina como receptor de Integrinas

El dominio RGD está presente en la Fibronectina (FNT), esta es una glicoproteína de masa molecular alta, que consta de dos subunidades similares de 250 kDa, unidas por dos enlaces disulfuro cerca de su región carboxilo terminal. Se encuentra, principalmente, como un dímero soluble (FNTs) y como un multímero insoluble de masa molecular elevada (FNTi), mantenido por enlaces covalentes y dispuesto como un componente de la matriz extracelular fibrilar (Bradshaw & Smith, 2014). La FNT fibrilar está presente en la parte apical de las CEO, y también está presente en el fluido oviductal, donde fluctúa durante el ciclo estral de la hembra (Osycka-Salut et al., 2017). La FNT está implicada en la capacitación de los espermatozoides humanos y en la reacción acrosómica mediante la activación de la vía de señalización cAMP/PKA (Martinez-Leon et al., 2019; Martinez-Leon et al., 2015; Osycka-Salut et al., 2020).

Por otro lado, la interacción cabeza-cabeza en los espermatozoides de cobayo en la formación de rosetas está mediada por la unión de FNT-Integrina, ya que los espermatozoides presentan Fibronectina y la integrina $\alpha 5\beta 1$ dicha interacción rio abajo aumenta los niveles de ERK1/2 fosforilada, favoreciendo la polimerización de la actina (Salgado-Lucio et al., 2020).

Las integrinas conectan la matriz extracelular al andamiaje del citoesqueleto a través de varias proteínas adaptadoras intermediarias, proporcionando múltiples puntos para regular y controlar la adhesión. Estas proteínas

adaptadoras forman parte del complejo de adhesión focal (Kanchanawong & Calderwood, 2023). La presencia de estas proteínas adaptadoras y su activación en medio capacitante se ha descrito en espermatozoides de cobayo (Roa-Espitia et al., 2016).

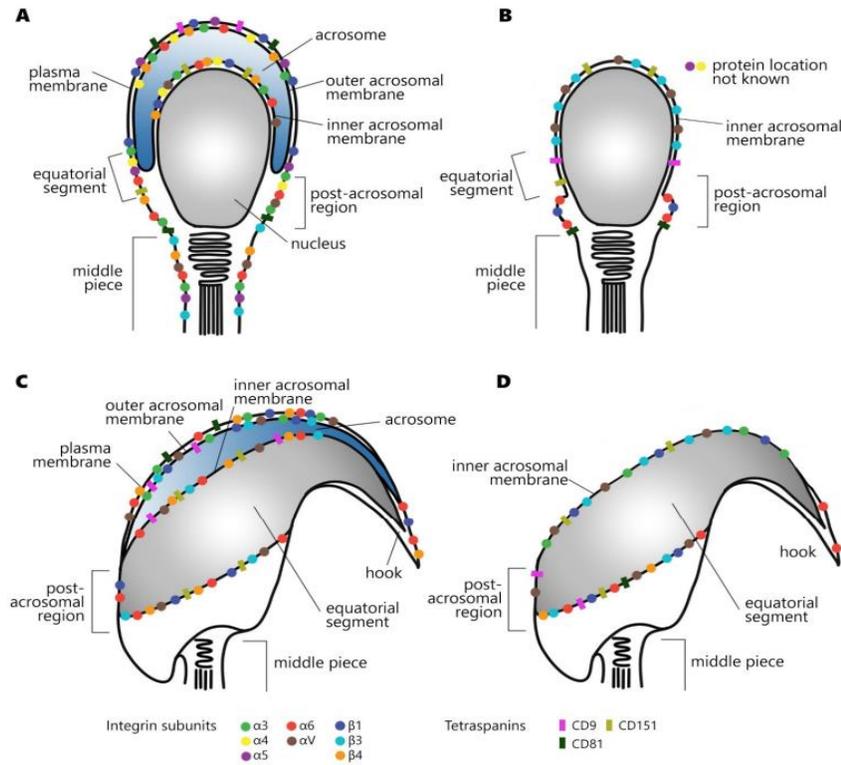


Figura 5 Localización de las subunidades de integrinas y tetraspaninas en espermatozoide de mamífero, en ser humano (A, B), ratón (C, D), acrosoma intacto (A, C), y con reacción acrosomal (B, D). Tomada de.(Merc et al., 2021).

JUSTIFICACIÓN

La interacción de integrinas ($\alpha 6\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 6\beta 4$ y $\alpha 3\beta 1$) en los espermatozoides de los mamíferos, que reconocen a componentes de la matriz extracelular, como fibronectina que está presente en las células epiteliales oviductales del reservorio oviductal, podría permitir la formación de adhesiones focales, las cuales se asocian a moléculas de señalización relacionadas con los procesos que involucran la sobrevivencia celular. Por tanto, la interacción de integrinas ($\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$) en el espermatozoide que reconocen a una matriz de Fibronectina inmovilizada podrían regular diferentes procesos fisiológicos del espermatozoide, que le permitan al espermatozoide sobrevivir por más tiempo.

HIPÓTESIS

La presencia de proteínas de adhesiones focales incluidas las integrinas ($\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$) en los espermatozoides de mamíferos sugiere que estas células podrían tener la capacidad de asociarse con una matriz compuesta por fibronectina inmovilizada, esta asociación podría alterar el estado fisiológico de la célula espermática, modificando la capacitación y la reacción acrosomal.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad de adhesión de los espermatozoides de cobayo a una matriz conformada por fibronectina inmovilizada y analizar los efectos que tiene la adhesión sobre la fisiología y la sobrevivencia espermática.

Objetivos particulares

1. Determinar la capacidad de adhesión de los espermatozoides con los principales componentes de la matriz extracelular (Fibronectina, Colágeno tipo I y Laminina).
2. Caracterizar la adhesión de los espermatozoides adheridos a la matriz de Fibronectina inmovilizada.
3. Analizar los espermatozoides desprendidos de la matriz de fibronectina inmovilizada.
4. Definir cuál de las integrinas presentes en los espermatozoides de cobayo si $\alpha 5\beta 1$ y/o $\alpha v\beta 3$ es la encargada de asociarse a la matriz de Fibronectina inmovilizada.
5. Determinar la viabilidad y apoptosis de los espermatozoides adheridos de forma *in vitro* a la matriz de Fibronectina inmovilizada.

6. Analizar el estado fisiológico de los espermatozoides adheridos a la matriz de fibronectina inmovilizada, comparado con aquellos que son capacitados en suspensión.

7. Evaluar los cambios que experimenta el citoesqueleto de actina durante la adhesión de espermatozoides a la matriz de Fibronectina, así como las alteraciones en la adhesión espermática provocadas por la inhibición de la polimerización de actina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los experimentos se realizaron con cobayos machos de Dunkin-Hartley (*Cavia porcellus*) de un peso entre 800 y 900 g. El bioterio del Cinvestav-IPN brindó alojamiento a los animales bajo un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, con acceso a agua y alimento. El Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, (CICUAL N° 321-02; Cinvestav-IPN) aprobó los procedimientos de manejo de animales y el diseño experimental siguiendo las directrices de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria. Hicimos todo lo posible para minimizar el dolor y el estrés en los animales.

Reactivos

Fibronectina plasmática humana (FC010-10 mg), placa de cultivo de colágeno tipo I de 6 pocillos (PICL06P05), cajas de adhesión celular de laminina humana de 96 pocillos (ECM 103) se adquirieron de Millipore, Merck (Darmstadt, Alemania). Cajas de Fibronectina de 24 -pocillos, transparente, fondo plano, tratadas (354411). Portaobjeto de cultivo con Fibronectina de 4-pocillos, 3/paquete 12(353559) se compraron a Merck Millipore, Corning BioCoat. El cloruro de calcio dihidratado, el piruvato de sodio DL-ácido láctico al 85%, la albúmina sérica bovina (BSA), el tripéptido sintético RGD (A8052), latrunculina A (L5163), HEPES, la progesterona, la faloidina-FITCI (P5282) se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis MO) y el anticuerpo monoclonal anti-integrina β 3 de ratón (CRC54, ab34409) se compraron a Abcam (Cambridge, Reino Unido). Se compraron anti P-Tyr-100 monoclonales de ratón (9411S) a Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Se compraron anticuerpo β 1 de integrina policlonal de conejo (M-106, sc-8978), anticuerpo monoclonal anti-flotilina-2 de ratón (B-6, sc-28320) a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos secundarios TRITC o FITC se obtuvieron de Jackson

Immunoresearch Laboratories Inc (West Grove, PA). Fluo-3 AM (2523267) se compraron a Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). El kit de ensayo de caspasa-3/7 FAM-FLICA (157896) se adquirió a Immunochemistry Technologies (Davis, CA). Se compraron placas de cultivo celular de 24 pocillos con superficie tratada para cultivo de tejidos (0030722.116) a Merck, Eppendorf (Darmstadt, Alemania).

Obtención y capacitación de los espermatozoides

Los espermatozoides de cobayo se obtuvieron de los conductos deferentes y se lavaron en una solución de PBS. Los espermatozoides (2.5×10^6 células/ml) se incubaron en medio de capacitación TYRODE-HEPES (116.7 mM de NaCl, 2.8 mM de KCl, 1.8 mM de CaCl₂, 0.36 mM de NaH₂PO₄, 0.49 MgCl₂ mM, 11.9 mM de NaHCO₃, 0.25 mM de piruvato de potasio, 0.25 mM de piruvato de sodio, 20.0 mM de ácido láctico, 2.0 mM de HEPES, pH 7,6) a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire.

Ensayo de adhesión a la MTZ-FNTi

Para los ensayos de adhesión se utilizaron placas activas de fondo plano de 24 pocillos recubiertas con fibronectina colágeno tipo I y laminina. Los sitios activos libres de las placas se bloquearon incubando las placas con BSA al 1% diluido en PBS durante una hora a 37 °C. Se eliminó el exceso de BSA y la placa se lavó tres veces con PBS para eliminar la BSA sin unir. A estas placas bloqueadas se añadieron 2.5 millones de espermatozoides en medio no capacitante o capacitante durante 0.5, 1, 2 y 3 horas. Las placas se transfirieron a una incubadora, mantenida a 37°C bajo una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire. Los espermatozoides adheridos se observaron con un microscopio invertido ICM 405 (Alemania), y los videos se tomaron con una cámara Nikon 5X Coolpix S4100 (China). Se tomaron videos de un minuto con un aumento de 20x. Para cada experimento,

se cuantificaron los espermatozoides adheridos de cuatro campos diferentes. Se utilizaron placas de cultivo recubiertas solo con BSA como control.

Evaluación de la motilidad de los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi

La motilidad de los espermatozoides durante la adhesión *in vitro* a placas recubiertas de FNT se evaluó utilizando un microscopio invertido (ICM 405) y videos tomados con una cámara Nikon 5X Coolpix S4100 (China). Las imágenes adquiridas fueron analizadas visualmente, cuantificando el número de espermatozoides adheridos que mostraban flagelo aleteando. Se cuantificaron espermatozoides de cuatro campos diferentes.

Cuantificación de rosetas

Un resultado significativo es que los espermatozoides adheridos se desprendieron gradualmente durante el tiempo de incubación y formaron rosetas durante el tiempo de incubación restante. Se tomaron videos de un minuto con un aumento de 20x y, para cada experimento, se cuantificaron las rosetas formadas en cuatro campos diferentes

Valoración de la reacción acrosomal

Espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi. La RA se determinó mediante la cuantificación óptica de los espermatozoides adheridos a diferentes tiempos de incubación (30, 60, 120 y 180 min). Se retiraron los espermatozoides no adheridos y se lavó la placa tres veces con medio TYRODE-HEPES. Los espermatozoides se fijaron con formaldehído al 1.5%-glutaraldehído al 0.2%, diluido en PBS. El porcentaje de RA se estimó a partir del conteo de

espermatozoides con y sin acrosomas de los espermatozoides adheridos al MTZ-FNTi (300 células por cada experimento).

Espermatozoides liberados de la MTZ-FNTi. En el caso de los espermatozoides desprendidos del MTZ-FNTi, se cuantificó el RA de la siguiente manera: se recuperó y fijó una alícuota de espermatozoides desprendidos, luego se cuantificó el número de espermatozoides con y sin acrosoma (300 células por cada experimento) en una cámara de Neubauer. Para definir si estos espermatozoides desprendidos de la MTZ-FNTi son capaces de experimentar una reacción acrosómica, se recuperó una alícuota de espermatozoides desprendidos cada hora y se adicionó progesterona (10 μ M). Después de 20 min, se fijaron los espermatozoides y se cuantificó la reacción acrosómica.

Espermatozoides capacitados en suspensión. Se fijaron los espermatozoides capacitados en diferentes momentos (0, 30, 60, 90 y 120 min) en medio TYRODE-HEPES, y se cuantificó el número de espermatozoides con y sin acrosoma (500 células por cada experimento) en una cámara de Neubauer.

Reacción acrosómica inducida por progesterona. Los espermatozoides desprendidos del MTZ-FNTi o capacitados en suspensión se incubaron durante 20 minutos con 10 μ M de progesterona (P4), mantenidos a 37°C bajo una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire. Posteriormente, se fijaron y se cuantificó la RA.

Evaluación de RA en presencia de Fibronectina soluble. Los espermatozoides se incubaron con FNT soluble a dos concentraciones, 50 μ g/ml y 100 μ g/ml de FNT. Se mantuvieron a 37°C bajo una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire. La RA espontánea se midió en diferentes momentos (30, 60, 90, 120 y 180 min). Los

espermatozoides sin y con acrosoma se cuantificaron a partir de 4 alícuotas por separado (300 células por alícuota) en una cámara de Neubauer.

Evaluación de viabilidad y caspasas

Para determinar el nivel de apoptosis y la viabilidad, se utilizó el El kit de ensayo de caspasa-3/7 FAM-FLICA, siguiendo el protocolo establecido por el kit. Los experimentos se llevaron a cabo en espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi o capacitados en suspensión, ambos en medio capacitante a una concentración celular de 2.5×10^6 células/ml. A continuación, se añadió el reactivo marcado con FLICA en una dilución (1:30) 10 minutos antes del tiempo de capacitación, y se añadió el reactivo marcado con HOECHST 33342 (0.0025%, concentración final). Posteriormente, se realizó un lavado con el tampón de lavado, añadiendo inmediatamente yoduro de propidio 638 (0.0025% de concentración final) durante 5 minutos a 37°C. Se realizaron dos lavados con el tampón de lavado. Los espermatozoides se fijaron (0.1% de glutaraldehído-3% de formaldehído en PBS) durante una hora. Los espermatozoides se lavaron con PBS, y los portaobjetos se observaron en un microscopio óptico de epifluorescencia Olympus BX50 con una cámara Nikon en un objetivo de 20x, con las siguientes longitudes de onda: FLICA (488-492 nm) Hoesch (365 nm) yoduro de propidio (488-492 nm), y las imágenes fueron analizadas en el software NIS Elements AR (Versión 3.1).

Identificación de integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ *in vivo*

Los espermatozoides resuspendidos en PBS ($2,5 \times 10^6$ células/ml) se incubaron de forma independiente con anticuerpos específicos que reconocen la región N-terminal de las integrinas $\beta 1$ o $\beta 3$ (1:50). La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C bajo una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire. Posteriormente, los espermatozoides se centrifugaron a 600 g durante 3 min, se retiró el sobrenadante y los

espermatozoides se Resuspendieron en PBS. Este procedimiento se repitió tres veces. A continuación, los espermatozoides se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario adecuado (1:500) marcado con TRITC. Posteriormente, los espermatozoides se centrifugaron a 600 g durante 3 min, se retiró el sobrenadante y los espermatozoides se resuspendieron en PBS. Este último procedimiento se repitió tres veces. Los espermatozoides se fijaron (Glutaraldehído 0.05%-Formaldehído 1,5%, concentración final) durante 1 hora. Una vez fijados, los espermatozoides se lavaron tres veces con PBS y se montaron en portaobjetos con gelvatol. Las muestras se examinaron con un microscopio óptico de epifluorescencia Olympus BX50 con un objetivo de 20X, y las fotografías se tomaron con una cámara digital Nikon utilizando el software NIS-Element, versión 3.1.

Ensayos de inhibición de la adhesión con el péptido RGD y anticuerpos

Para los ensayos de inhibición de la adhesión de la MTZ-FNTi, se realizaron cinco tratamientos, se preincubaron de forma independiente durante 30 minutos en medio capacitante Tyrode-HEPES considerando: (1) Espermatozoides previamente incubados con el péptido RGD de 100 μ M, (2) espermatozoides preincubados con los anticuerpos anti- β 1 (1:50) o (3) anti- β 3 (1:50), (4) ambos anticuerpos, y (5) control (ausencia de anticuerpos y RGD). Posteriormente, cada tratamiento se expone a la MTZ-FNTi de forma independiente. Las placas se transfirieron a una incubadora, mantenida a 37°C bajo una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire. Se tomaron videos de cuatro campos de 1 minuto cada uno a 1, 2 y 3 horas. Se realizaron tres lavados con medio Tyrode-HEPES cada hora. Las células se observaron con un microscopio invertido ICM 405 (Alemania) con un objetivo de 20X, y los videos se tomaron con una cámara Nikon 5X Coolpix S4100 (China).

Evaluación del estado fisiológico de los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi.

Para definir el estado fisiológico de los espermatozoides adheridos a MTZ-FNTi, se evaluó la fosforilación de proteínas, la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$), localización de flotilina-1 y la polimerización de actina (cambios de F-actina), para lo cual se realizó el siguiente procedimiento. Los espermatozoides se obtuvieron a partir de los conductos deferentes y se capacitaron en medio Tyrode-HEPES, como se menciona en la sección "Obtención y capacitación de espermatozoides". Después de 30 minutos de incubación, se utilizó una alícuota de espermatozoides ($2,5 \times 10^6$ espermatozoides) para los ensayos de adhesión a MTZ-FNTi en los portaobjetos con FNTi y el resto se mantuvo en suspensión. Las pruebas fueron evaluadas en diferentes momentos (0, 0.5, 1.0, 2.0, y 3.0 horas).

Localización de proteínas fosforiladas en residuos de tirosinas y flotilina-1

Para determinar la localización de diferentes proteínas, los espermatozoides no capacitados y capacitados en suspensión o adheridos a la MTZ-FNTi se fijaron durante una hora a temperatura ambiente utilizando una solución de glutaraldehído y formaldehído (0.05% y 1.5%, concentración final, respectivamente) diluida en PBS. A continuación, los espermatozoides se incubaron durante 10 min con 50 mM de NH_4Cl diluido en PBS. Los espermatozoides se lavaron tres veces con PBS. En el caso de los espermatozoides capacitados en suspensión, se realizaron frotis para detectar diferentes proteínas.

Para detectar proteínas fosforiladas en residuos en Tyr y flotilina-1, los espermatozoides fijados se permeabilizaron con PBS-Triton X100 al 0.1% durante 20 minutos, seguidos de tres lavados con PBS. Los espermatozoides se incubaron con el anticuerpo que reconoce las proteínas fosforiladas en Tyr (anti-p-Tyr, 1:100) o con el anticuerpo anti-flotilina-1 (1:100) disuelto en BSA

al 1% durante 14 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los espermatozoides fueron lavados tres veces en PBS. Las proteínas se revelaron mediante incubación durante 1 hora a 37 °C, con el segundo anticuerpo apropiado marcado con TRITC diluido en BSA al 1%. Posteriormente se lavaron con PBS y agua helix y se montaron con gelvatol. Las muestras se examinaron con un microscopio confocal (Leica TCS SP8).

Evaluación del calcio intracelular

Se utilizó la sonda Fluo-3AM (506/526 nm) para detectar calcio intracelular. A las células adheridas a la MTZ-FNTi y en suspensión, en oscuridad total, se añadieron 2 µl/ml de Fluo-3AM 20 minutos antes de que transcurriera el tiempo de capacitación. Se realizaron dos lavados con PBS para eliminar el exceso de Fluo-3AM. La muestra fue fijada (0.05% de Glutaraldehído más 1.5% de Formaldehído, concentraciones finales). Las muestras se lavaron con PBS; En el caso de los espermatozoides en suspensión, se centrifugaron (600 g) y se mantuvieron en el botón hasta que se observaron al microscopio. Las muestras se examinaron con un microscopio óptico de epifluorescencia Olympus BX50 y se tomaron fotografías con una cámara digital NIKON utilizando el software NIS-Element, versión 3.1. Se cuantificaron los patrones de fluorescencia y se evaluó la fluorescencia emitida por Fluo-3AM.

Evaluación de la actina F

Utilizando una sonda específica que reconoce F-actina (faloidina-TRITC), se evaluó el estado del citoesqueleto de actina de espermatozoides capacitados en suspensión o adheridos a la MTZ-FNTi. Los espermatozoides fijos se permeabilizaron con PBS-Triton X100 al 0,1% (concentración final) durante 20 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en una cámara húmeda durante una hora a temperatura ambiente con faloidina-TRICT (1:20 en PBS). Se realizaron cinco lavados de 7 minutos con PBS. Las muestras se montaron con gelvatol y se examinaron con un microscopio óptico

de epifluorescencia Olympus BX50 y se tomaron fotografías con una cámara digital NIKON y la fluorescencia emitida por la faloidina-TRICT se analizó utilizando el software NIS-Element, versión 3.1.

Efecto de latrunculina A sobre la adhesión

Los espermatozoides se capacitaron durante 30 min en suspensión y en presencia de latrunculina-A (5 μ M). A continuación, los espermatozoides se añadieron a placas de 24 pozos recubiertas con fibronectina. Las placas se transfirieron a una incubadora, mantenida a 37°C bajo una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire. Se tomaron videos de 4 campos de 1 minuto cada uno a los 30, 60, 120 y 180 minutos. Las células se observaron con un microscopio invertido ICM 405 (Alemania) y los videos se tomaron con una cámara Nikon 5X Coolpix S4100 (China).

Análisis de datos

Cada experimento se realizó al menos tres veces. Las diferencias entre las medias se determinaron mediante una prueba T o un ANOVA de una via seguido de la prueba de Tukey para comparar dos grupos o comparaciones múltiples respectivamente. Los resultados mostrados se expresan como las medias \pm E.E. Para el análisis se utilizó SigmaPlot versión 11.0 y se consideró estadísticamente significativo $P < 0.05$.

RESULTADOS

Los espermatozoides de cobayos tienen una mayor capacidad para adherirse a la MTZ-FNTi

El entorno del reservorio oviductal es esencial para la interacción de los espermatozoides con las células epiteliales oviductales (CEO). Estas células de la región apical presentan una matriz extracelular compuesta principalmente por fibronectina, colágeno tipo I y laminina (Qin et al., 2003). Por lo tanto, la primera evaluación que realizamos fue para determinar la capacidad de los espermatozoides para adherirse a los principales componentes de la matriz extracelular que se encuentran en los CEO. Por lo tanto, se utilizaron placas de cultivo recubiertas con fibronectina, colágeno tipo I y laminina de forma específica, se bloquearon sitios inespecíficos con BSA al 1%, y asegurar que la adhesión sea específica para cada proteína. Los espermatozoides incubados en medio TYRODE-HEPES (2×10^6 espermatozoides/ml) se añadieron a los pocillos de las placas de cultivo y se incubaron durante una hora. Transcurrido el tiempo establecido y una vez retirados los espermatozoides no adheridos, se tomaron videos y se evaluó el número de espermatozoides adheridos por campo. Los resultados muestran que el número promedio de espermatozoides adheridos por campo para las placas de cultivo recubiertas de fibronectina inmovilizada fue el más alto (46.67 ± 0.88 SE $n = 3$) los espermatozoides adheridos a placas de cultivo recubiertas con laminina (14.33 ± 1.45 E.E. $n=3$) o colágeno-I, donde la adhesión fue prácticamente nula, menos de un espermatozoide por campo (0.27 ± 0.07 E.E. $n=3$) (Fig. .6A). El control negativo realizado mediante el recubrimiento de los pocillos de las placas de cultivo con albúmina sérica bovina (BSA) no mostró adhesión de los espermatozoides (0.07 ± 0.07 E.E. $n = 3$). Los resultados indican que los espermatozoides tienen una gran capacidad de adherirse a la MTZ-FNTi en comparación con los formados por laminina o colágeno-I.

La adhesión de los espermatozoides al MTZ-FNTi requiere un tiempo mínimo de capacitación.

Con el fin de definir en qué estado fisiológico los espermatozoides fueron capaces de adherirse al MTZ-FNTi, se realizaron pruebas de adhesión utilizando espermatozoides incubados en medio capacitante a diferentes tiempos (0, 10, 20 y 30 min). Los resultados muestran que la capacidad de los espermatozoides para adherirse a la MTZ-FNTi 0 min es muy baja ($4 \pm 1,15$ S.E. $n=3$). Aunque el número de espermatozoides adheridos aumentó después de 10 y 20 min de capacitación ($5,67 \pm 0,88$, $10,0 \pm 1,15$ S.E. $n = 3$, respectivamente), esto no fue significativo con respecto al tiempo cero (Fig. 6B). El número de espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi fue significativamente mayor cuando se incubó durante 30 min ($54,67 \pm 5,04$ S.E. $n=3$) (Fig. 6B). Los resultados sugieren que los espermatozoides requieren un tiempo mínimo de capacitación para adquirir la capacidad de adherirse a la MTZ-FNTi. A partir de entonces, todos los ensayos se realizaron utilizando espermatozoides capacitados durante 30 min.

Curiosamente, más del 95% de los espermatozoides se adhirieron a través de la región acrosómica a la MTZ-FNTi, mostrando un acrosoma intacto, bien definido y sin cambios morfológicos aparentes. Además, los espermatozoides adheridos mantenían su flagelo batiendo durante 7 horas (Fig. 6C). Lo anterior indica que los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi permanecen viables.

Los espermatozoides adheridos se desprenden gradualmente de la MTZ-FNTi.

Con el fin de definir el tiempo que los espermatozoides permanecen adheridos a la MTZ-FNTi, espermatozoides capacitados durante 30 min se incubaron en la MTZ-FNTi y se evaluó el número de espermatozoides adheridos a diferentes tiempos (0.5-7 horas). Los resultados muestran que, a las 0,5 h, un número

considerable de espermatozoides están adheridos ($53,83 \pm 7,68$ S.E. $n=3$), y este número no disminuye después de una hora (Fig. 6D). El número de espermatozoides adheridos disminuye significativamente después de dos horas y permanece sin variación significativa hasta las 4 horas (Fig. 6D). A las cinco horas el número de espermatozoides adheridos vuelve a disminuir significativamente y a las 6 y 7 horas el número de espermatozoides adheridos es muy bajo ($1 \pm 0,51$ y $0,88 \pm 0,44$ E.E., respectivamente. La reducción en el número de espermatozoides adheridos sugiere que se desprenden gradualmente de la MTZ-FNTi, sin requerir factores externos para desprenderse.

Por otro lado, entre 1 a 3 horas de incubación, el número de espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi es considerable para definir posibles cambios. Con estos tiempos se llevaron a cabo todos los siguientes experimentos.

Estos resultados indican que los espermatozoides se adhieren específicamente a un matriz compuesta de MTZ-FNTi, requieren de tener un tiempo mínimo (30 min) en medio capacitante para adquirir la habilidad de adhesión, durante la adhesión mantienen el acrosoma intacto y el flagelo móvil durante 7 horas, lo que podría indicar que los espermatozoides incrementan su sobrevivencia.

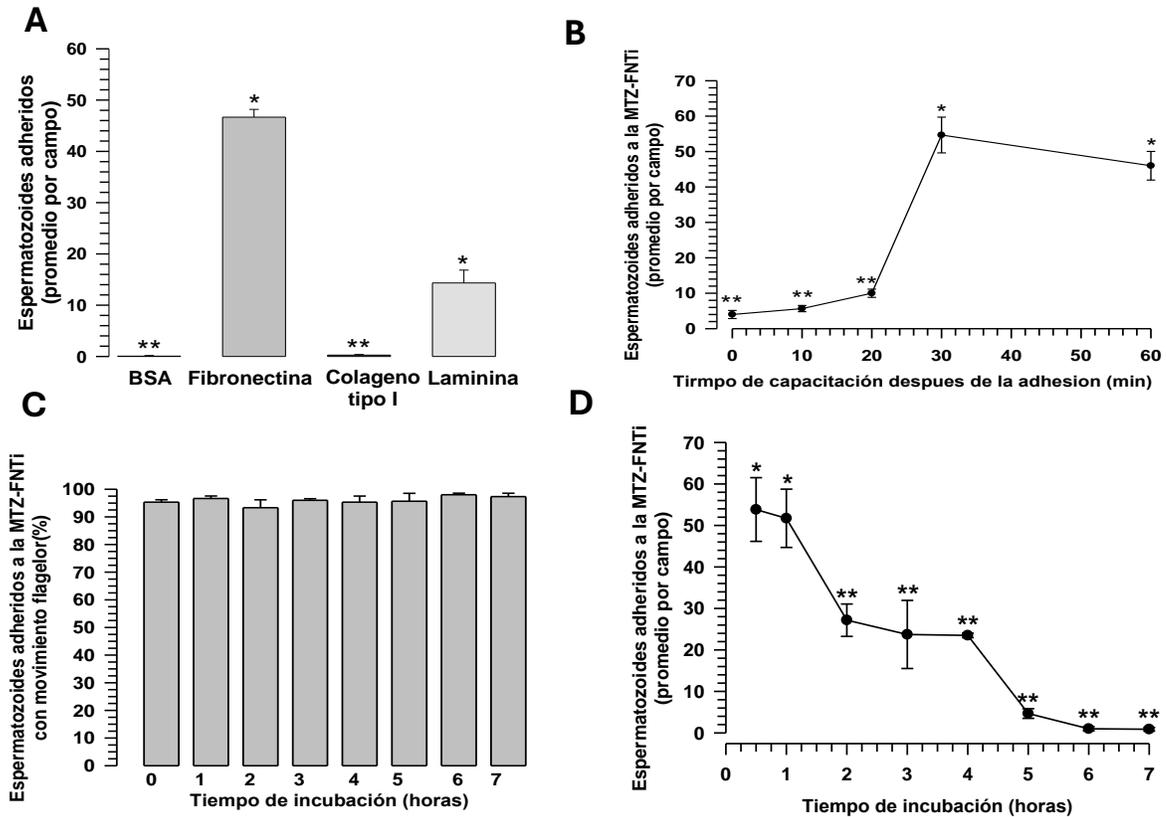


Figura 6. Caracterización de la adhesión de los espermatozoides a la matriz de fibronectina inmobilizada. (A) Evaluación de la adhesión de los espermatozoides a diferentes proteínas inmobilizadas. La prueba se llevó a cabo utilizando espermatozoides (2×10^6 espermatozoides/ml) capacitados durante 30 min en un medio de cultivo TYRODE-HEPES. Estos se añadieron a placas de cultivo recubiertas con fibronectina, laminina o colágeno-I. Se utilizaron placas de cultivo recubiertas de BSA como control. Después de 30 min de incubación, se lavaron las placas de cultivo y se cuantificó el número de espermatozoides adheridos (ver Métodos, Ensayo de adhesión). Los resultados se expresan como la media \pm E.E. ($n=3$), * vs ** $P < 0.001$. (B) Los espermatozoides requieren un tiempo mínimo de capacitación para adherirse a la matriz de fibronectina inmobilizada. Los espermatozoides fueron capacitados en diferentes momentos en el medio de cultivo TYRODE-HEPES. El tiempo de adhesión en este caso fue de solo 10 min, e inmediatamente se retiraron los espermatozoides no adheridos, se lavó la placa y se cuantificó el número de espermatozoides. Los resultados se expresan como la media \pm E.E. ($n=3$), * vs ** $P < 0.001$. (C) La mayoría de los espermatozoides adheridos a la matriz de fibronectina inmobilizada mantienen sus flagelos bateando. Los espermatozoides se capacitaron durante 30 min en un medio de cultivo TYRODE-HEPES. Después de 30 min de incubación, se lavaron las placas de cultivo y se cuantificó el número de espermatozoides cada hora durante siete horas.

Los resultados se expresan como la media \pm E.E. (n= 3). **(D)** Los espermatozoides unidos a la matriz de fibronectina inmovilizada se desprenden gradualmente. Los espermatozoides se capacitaron durante 30 min en medio TYRODE-HEPES después de que los espermatozoides se añadieran a las placas de cultivo recubiertas de fibronectina y se incubaran durante 30 min. Se lavaron las placas de cultivo y se cuantificó el número de espermatozoides cada hora durante siete horas. Los resultados se expresan como la media \pm E.E. (n= 3), * vs ** P < 0.01.

Los espermatozoides liberados de MTZ-FNTi forman rosetas y no experimentan reacción acrosomal espontánea

Cuando los espermatozoides de cobayos se capacitan en suspensión *in vitro* en suspensión se agrupan en forma de rosetas esto podría considerarse una señal de que los espermatozoides están pasando por el proceso de capacitación (Salgado-Lucio et al., 2020). Que son cúmulos de células que se adhieren cabeza con cabeza manteniendo móvil el flagelo. Los espermatozoides desprendidos de la MTZ-FNTi forman rosetas. La cuantificación de rosetas mostró un incremento con respecto al tiempo de incubación en medio capacitante en la MTZ-FNTi, alcanzando un valor máximo a las seis horas de incubación (Fig. 7A).

Por otro lado, también se evaluó si los espermatozoides desprendidos de la MTZ-FNTi experimentaron reacción acrosómica espontánea (RAs). Los resultados muestran que los espermatozoides liberados entre 30 min y siete horas experimentaron una RAs inferior al uno por ciento (Fig. 7B), muy baja en comparación con espermatozoides que estaban capacitados en suspensión, en ausencia o presencia de FNT, que después de tres horas de incubación mostraron aproximadamente un 50% o 60% de RAs, respectivamente (Fig. 7D). Con el fin de definir si los espermatozoides liberados de la MTZ-FNTi eran capaces de experimentar RA inducida por progesterona, los espermatozoides liberados de la MTZ-FNTi se incubaron con progesterona (10 μ M) durante 20 min. Los resultados muestran que los espermatozoides liberados de la MTZ-FNTi experimentaron RA inducida por

progesterona, que fue significativamente mayor que la mostrada por aquellos espermatozoides que estaban capacitados en suspensión y en ausencia de FNT y en los que RA fue inducida con progesterona (Fig.7C).

El siguiente experimento tuvo como objetivo conocer los efectos de la FNT soluble (FNTs) sobre la fisiología espermática. Se ha determinada en otras especies como bovino y humano que inducen la capacitación y la reacción acrosomal (Martinez-Leon et al., 2019; Martinez-Leon et al., 2015; Osycka-Salut et al., 2020) se capacitaron los espermatozoides en suspensión y la presencia de FNT soluble. Se observa un aumento significativo de la RA en las dos concentraciones de FNT solubles utilizadas (50 y 100 mg/mL), en comparación con los espermatozoides capacitados en ausencia de FNT (Fig. 7D). Estos y los resultados anteriores sugieren efectos diferenciales cuando los espermatozoides se asocian con FNT soluble o inmovilizada: Donde los espermatozoides adheridos y liberados de la matriz de fibronectina inmovilizada mantienen el acrosoma intacto y los espermatozoides incubados con FNTs inducen la reacción acrosomal.

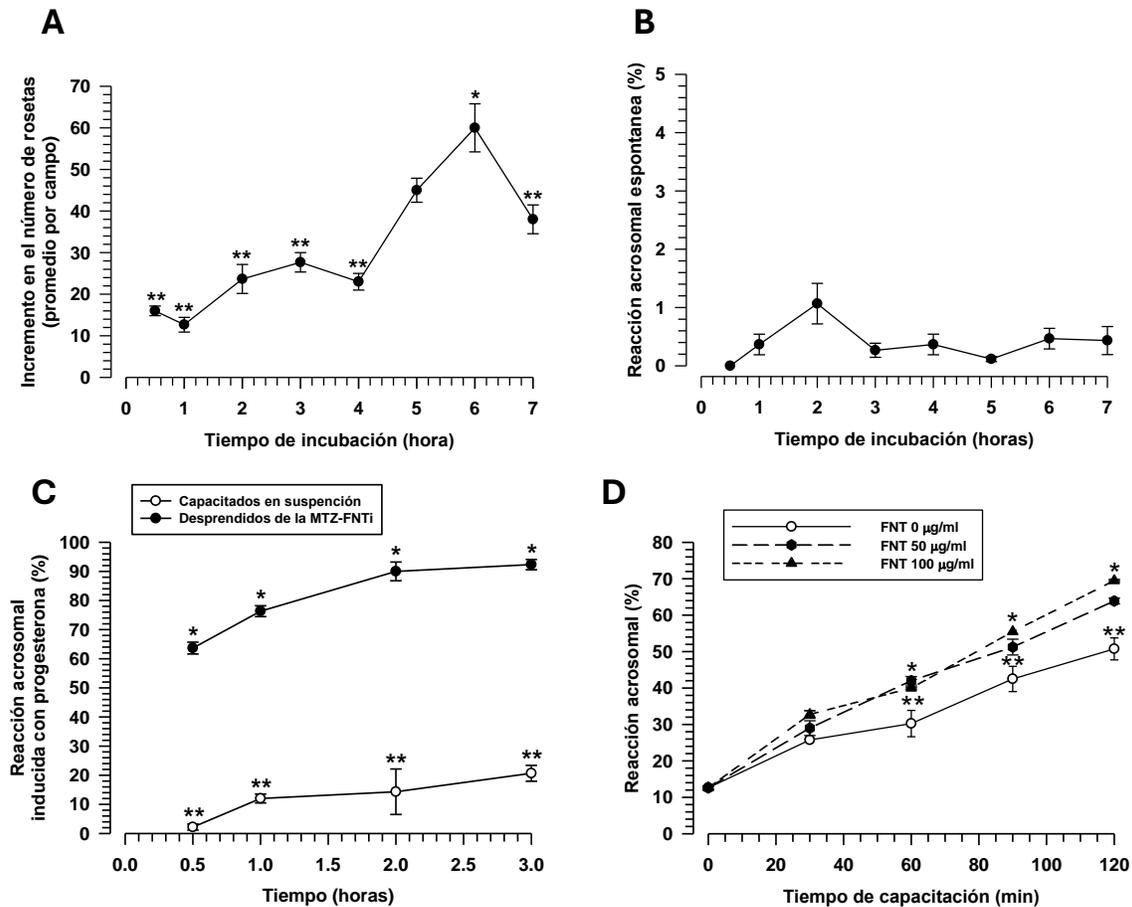


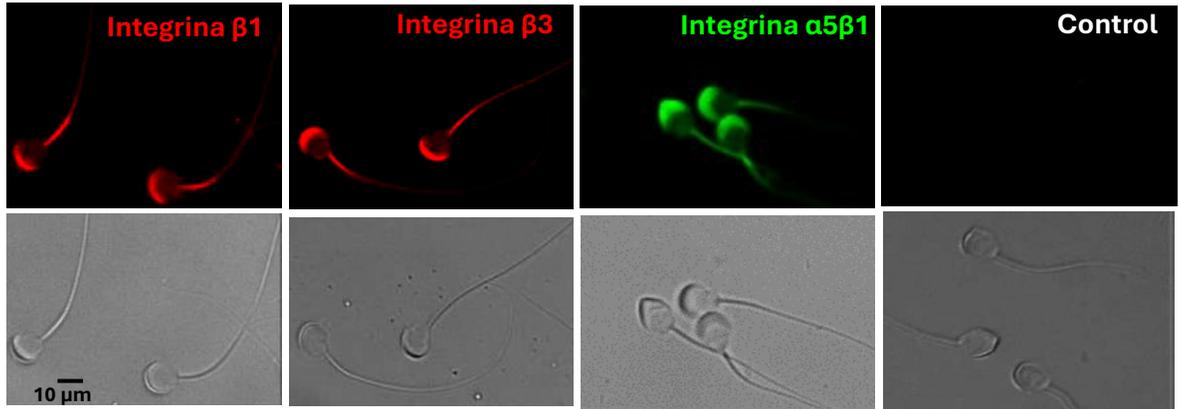
Figura 7. Caracterización de espermatozoides desprendidos de la matriz de fibronectina inmovilizada. (A) Los espermatozoides desprendidos forman rosetas. El gráfico representa el número de rosetas formadas por los espermatozoides desprendidos de la matriz de fibronectina inmovilizada. Las rosetas se cuantificaron directamente a partir de los videos tomados cada hora durante siete horas de incubación. Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * vs ** P < 0.01. (B) Los espermatozoides desprendidos de la matriz de fibronectina inmovilizada no experimentan reacción acrosómica espontánea. Se tomaron alícuotas de espermatozoides desprendidos de la matriz de fibronectina inmovilizada, se fijaron y se evaluó la reacción acrosómica espontánea (ver Métodos Evaluación de la reacción acrosómica). El gráfico representa el porcentaje de espermatozoides que experimentaron una reacción acrosómica espontánea una vez que se separaron de la matriz de fibronectina. Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * vs ** P < 0.01. (C) Evaluación de la reacción acrosómica inducida por la progesterona en espermatozoides desprendidos. Se tomaron alícuotas de espermatozoides desprendidos de la matriz de fibronectina inmovilizada y se trataron con progesterona (10 μ M) durante 20 min. Se comparó con la reacción acrosómica experimentada por los

espermatozoides capacitados en suspensión. Los datos muestran la RA después de que la RAs fue restada de la RA inducida por progesterona. Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * vs ** P < 0.01. (D) Efecto de la fibronectina sobre los espermatozoides capacitados en suspensión. Los espermatozoides se capacitaron en suspensión en presencia de diferentes concentraciones de fibronectina (0, 50 y 100 mg/ml) y se evaluó la reacción acrosómica espontánea. Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * vs ** P < 0.05.

Las integrinas median la adhesión de los espermatozoides a la MTZ-FNTi

Considerando que los espermatozoides de los mamíferos expresan integrinas con capacidad de asociarse a fibronectina, determinamos la participación de las integrinas en la adhesión de los espermatozoides a la MTZ-FNTi. En primer lugar, se utilizaron anticuerpos contra las subunidades $\beta 1$, $\beta 3$, y contra el heterodímero $\alpha 5\beta 1$ de las integrinas ($I\beta 1$, $I\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ respectivamente). A través de la tinción *in vivo*, se determinó que los anticuerpos reconocen las subunidades $\beta 1$, $\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ de las integrinas en la superficie de la región acrosómica y la pieza media de los espermatozoides (Fig. 8A). Al preincubar los espermatozoides con anti- $I\beta 1$ y anti- $I\beta 3$ la adherencia se redujo parcialmente, se observó un efecto similar con el heterodímero $\alpha 5\beta 1$ (Fig. 8B). Mientras que cuando los espermatozoides fueron preincubados simultáneamente con anti- $I\beta 1$ y anti- $I\beta 3$ la reducción de la adherencia fue significativamente mayor en relación con el control que cuando los anticuerpos fueron preincubados individualmente (Fig. 8B). Adicionalmente, los espermatozoides fueron preincubados con el péptido RDG antes de la prueba de adhesión, lo que redujo significativamente la adhesión de los espermatozoides a la anti- $I\beta 1$, anti- $I\beta 3$ con respecto a las tres pruebas anteriores (Fig. 8B). Los resultados anteriores sugieren que la adhesión de los espermatozoides a la MTZ-FNTi está mediada por ambas integrinas, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$.

A



B

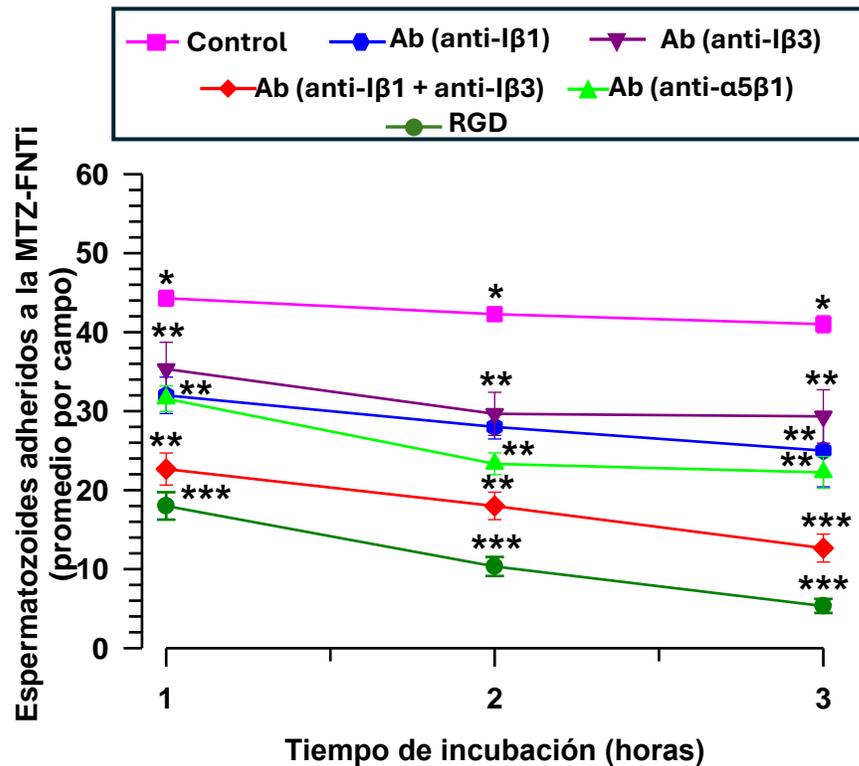


Figura 8. Las integrinas median la adhesión de los espermatozoides a la matriz de fibronectina inmobilizada. El ensayo se realizó con espermatozoides (2×10^6). Los espermatozoides se añadieron a placas de cultivo recubiertas de fibronectina recubiertas y se incubaron durante 1, 2 y 3 horas. **(A)** Localización de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ en la superficie de los espermatozoides de cobaya. Las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ se detectaron in vivo utilizando anticuerpos específicos. Se utilizó un anticuerpo inespecífico como control. Las micrografías representan tres experimentos

independientes. **(B)** Efectos de la preincubación de espermatozoides con anti- $\beta 1$ o anti- $\beta 3$ (por separado o juntos), anti- $\alpha 5\beta 1$ y el péptido RGD sobre la adhesión de los espermatozoides a la matriz de fibronectina. Se utilizó un anticuerpo inespecífico como control. Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * vs ** $P < 0.01$, * vs *** $P < 0.001$.

Los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi retrasan la activación de las caspasas 3/7 y presentan membrana íntegra.

La adhesión de los espermatozoides a la MTZ-FNTi durante varias horas, manteniendo la movilidad flagelar, sugirió que los espermatozoides eran viables. Se analizó la actividad de la caspasa 3/7 y la integridad de su membrana plasmática para conocer mejor el estado de los espermatozoides adheridos. Se corroboró con un control positiva la eficacia del Kit-FLICA que detecta la actividad de la caspasa 3/7, induciendo a los espermatozoides a desencadenar la activación de las caspasas en presencia de H_2O_2 (Figura suplementaria 2). En espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi durante 1 a 3 horas, se evaluó la activación de la caspasa 3/7 y se comparó con espermatozoides capacitados en suspensión durante el mismo tiempo. En la Figura 9B se muestra la tinción de caspasas activadas 3/7 en espermatozoides capacitados en suspensión y adheridos a la MTZ-FNTi. La evaluación de esta tinción muestra que más del 40% de la población de espermatozoides no capacitados, así como los capacitados en suspensión durante una y dos horas, mostraron activación de caspasas 3/7, mientras que después de tres horas de capacitación se observó un aumento significativo en la activación de caspasas 3/7 (Fig. 9B). En el caso de los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi, a la hora de incubación aproximadamente el 10% de los espermatozoides mostraron activación de caspasa 3/7. Este porcentaje se redujo significativamente después de dos horas (10.33 ± 0.88 vs 2.0 ± 0.58 S.E. n=3. $P < 0.002$) (Fig. 9B). Sin embargo, el número de espermatozoides con caspasas activadas 3/7 aumentó significativamente (2.0 ± 0.58 vs 22.0 ± 4.16 S.E. n=3. $P < 0.01$) después de tres horas de incubación (Fig. 9B). Es importante

considerar que la intensidad de fluorescencia en los espermatozoides capacitados en suspensión es mayor que la que muestran los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi (Fig. 9A).

Durante el proceso de capacitación, los espermatozoides pueden sufrir daños en la membrana plasmática (Aitken, 2017a; Silva & Gadella, 2006; Tapia et al., 2012). Por lo tanto, se realizaron ensayos de yoduro de propidio (PI) para definir la integridad de la membrana plasmática. El ensayo mostró que menos del 5% de los espermatozoides de cobayo capacitados en suspensión mostraron daño en la membrana plasmática (Fig. 9C). En el caso de los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi, el número de espermatozoides con daño en la membrana plasmática fue menor en comparación con los espermatozoides capacitados en suspensión, principalmente fue significativo a las dos y tres horas de incubación (Fig. 9C). En conjunto, los resultados de la activación de la caspasa 3/7 y el ensayo PI indican que principalmente los espermatozoides en buen estado se adhieren y permanecen adheridos a la MTZ-FNTi.

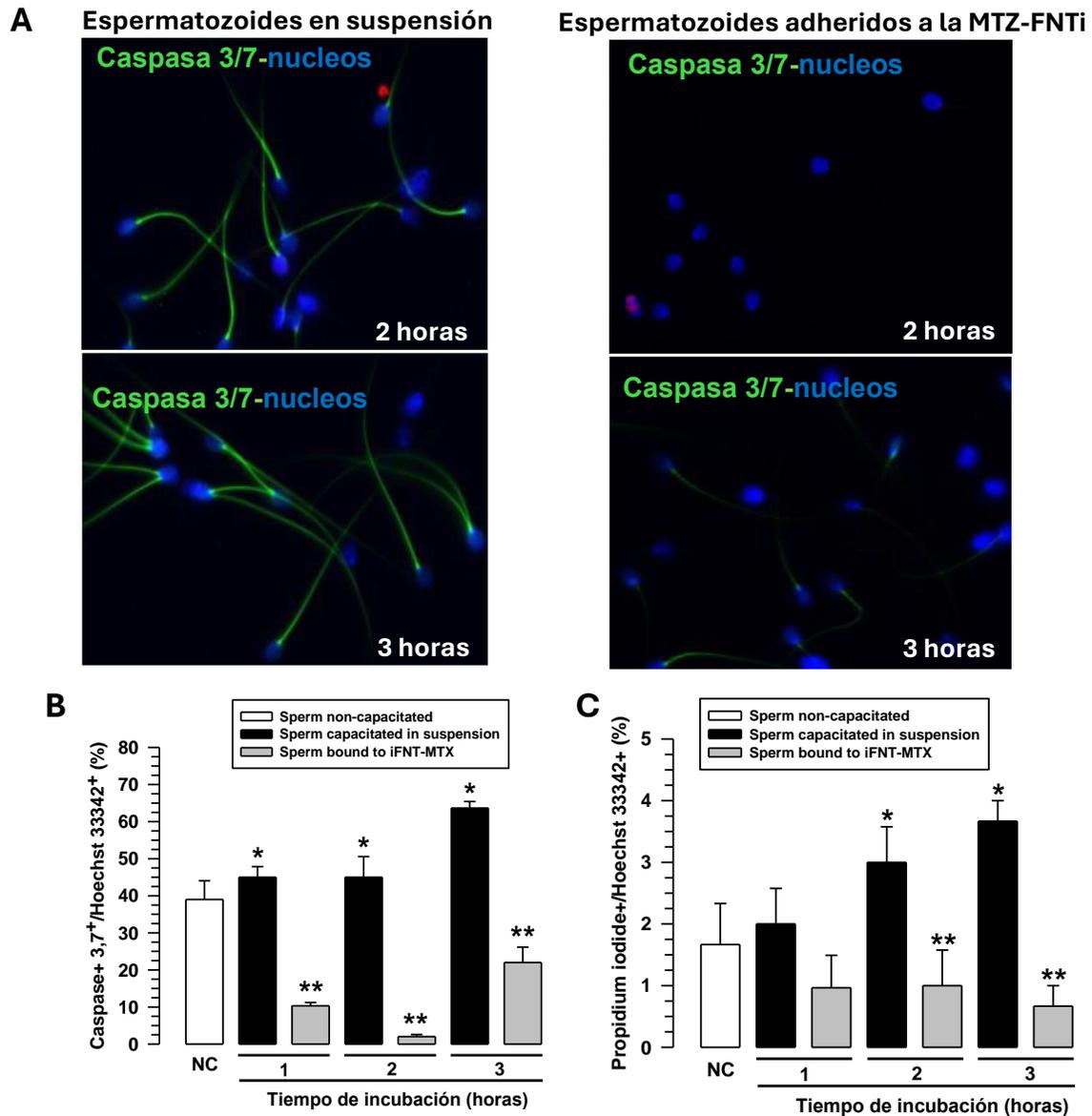


Figura 9. Los espermatozoides se adherieron a una matriz de fibronectina inmovilizada, retrasaron la actividad de las caspasas y permanecieron viables. (A) Tinción para caspasas 3/7 (FLICA), el núcleo (HOECHST 33342) y yoduro de propidio. Paneles derechos: Espermatozoides capacitados en suspensión. Paneles izquierdos: Espermatozoides adheridos a la matriz de fibronectina inmovilizada (MTZ-FNTi). **(B)** Cuantificación de espermatozoides que mostraron tinción para caspasas 3/7 (FLICA) y núcleo (HOECHST 33342). Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * vs ** P < 0.01. **(C)** Cuantificación de espermatozoides que mostraron tinción para yoduro de propidio y HOECHST 33342. Los resultados se expresan como media \pm S.E. (n= 3). * vs ** P < 0.01.

La adhesión de los espermatozoides a una MTZ-FNTi altera la fisiología de los espermatozoides

El estado fisiológico de los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi se evaluó mediante cuatro procesos relacionados con la capacitación y se comparó con los espermatozoides capacitados en suspensión: A) niveles de fosforilación de tirosina proteica (PEP); B) niveles de calcio intracelular; C) polimerización de actina; y D) reorganización de la flotillina.

A) Fosforilación de la tirosina proteica (FP-Y).

El FP-Y se evaluó mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-pTyr. En los espermatozoides capacitados en suspensión, se observó una fluorescencia pálida en la región de la pieza media de los espermatozoides (Fig. 10A). A la hora de capacitación, se observó fluorescencia en todo el flagelo. mientras que, a las 2 y 3 horas, también se observó fluorescencia en el acrosoma, (Fig. 10A). La evaluación de la fluorescencia mostró que aumentó gradualmente en relación con el tiempo de incubación en condiciones de capacitación (Fig. 10B). Los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi después de 30 min (una hora de incubación) mostraron una disminución no significativa de la fluorescencia, que alcanzó valores similares a los de los espermatozoides no capacitados (Fig. 10A y 10B). Después de una hora, la fluorescencia tendió a variar con respecto al tiempo de una manera estadísticamente no significativa. Después de dos horas de adhesión, la fluorescencia aumentó solo en la pieza central y disminuyó nuevamente después de tres horas (Fig. 10A y 10B).

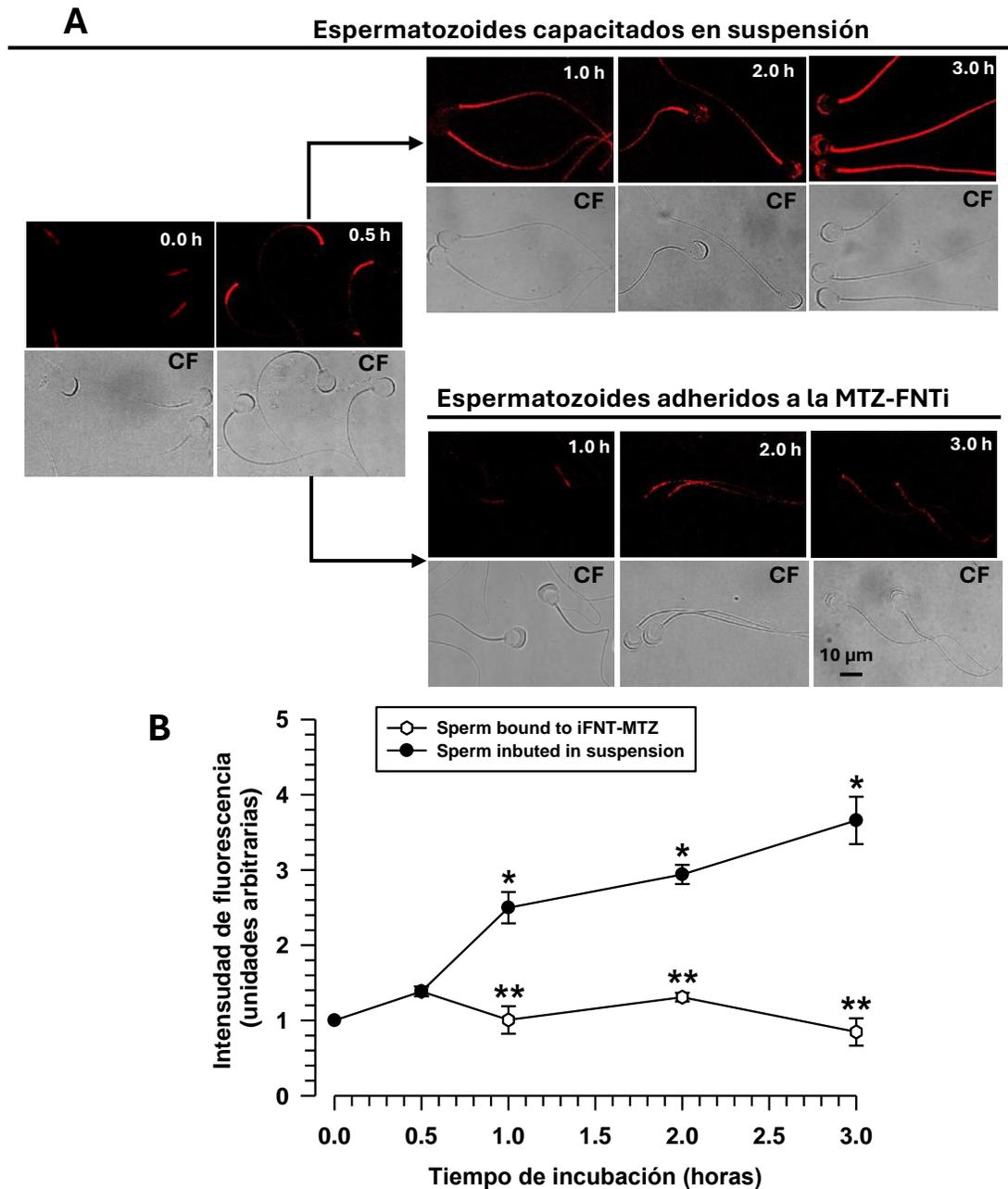


Figura 10. La adhesión de los espermatozoides a la matriz de fibronectina modifica la fisiología de los espermatozoides. La prueba se llevó a cabo utilizando espermatozoides (2×10^6 espermatozoides/ml) capacitados durante 30 minutos en el medio TYRODE-HEPES. Los espermatozoides se añadieron a la placa de cultivo recubierta de fibronectina, y después de 30 min de incubación, las placas de cultivo se lavaron y los espermatozoides se incubaron en diferentes tiempos (1, 2 y 3 horas).

Después de la incubación, se lavó la placa de cultivo y se fijaron los espermatozoides. **(A)** Detección in situ de la fosforilación de proteínas en Tyr, tanto en espermatozoides capacitados en suspensión como en aquellos adheridos a la matriz de fibronectina inmovilizada. Las micrografías representan tres experimentos independientes. **(B)** Cuantificar la fluorescencia emitida por detección in situ de la fosforilación de proteínas en Tyr, tanto en espermatozoides entrenados en suspensión como adheridos a la matriz de fibronectina inmovilizada. Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * vs ** P < 0.01.

B) Niveles de calcio intracelular.

Inicialmente, se evaluaron los patrones de fluorescencia que presentaban los espermatozoides. Así, los espermatozoides capacitados en suspensión se definieron tres patrones de fluorescencia: P1, fluorescencia baja en la región acrosómica y la pieza media; P2, fluorescencia media en la región acrosómica y en la pieza media; P3, fluorescencia intensa en la región acrosómica (Fig. 11A). La evaluación de estos patrones mostró que, en los espermatozoides no capacitados, el patrón P2 fue el más prominente. Por el contrario, en los espermatozoides capacitados en suspensión durante 1 hora, la P2 disminuyó significativamente, mientras que el patrón P3 aumentó significativamente (Fig. 11B). La evaluación de los patrones de fluorescencia producidos por Fluo-3AM en los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi mostró que, a la hora de incubación, el patrón P2 fue el más prominente, sin cambios a las dos y tres horas de incubación (Fig. 11C). Los patrones P1 y P3 fueron significativamente más bajos (Fig. 11C).

La fluorescencia emitida por los diferentes patrones se evaluó en células individuales utilizando el software Nis Element 3.1. Los resultados muestran que, en los espermatozoides capacitados en suspensión, la fluorescencia emitida por Fluo-3AM aumentó gradualmente durante el período de capacitación, hasta dos horas, después de lo cual la intensidad de fluorescencia disminuyó significativamente (Fig. 11D). Mientras que en los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi, después de 30 min de adhesión la

fluorescencia disminuyó significativamente con respecto a los espermatozoides capacitados en suspensión durante 30 min ($0,46 \pm 0,05$ y $1,59 \pm 0,09$ respectivamente. S.E. $n=3$. $P < 0,001$). A las dos y tres horas de incubación, los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi no mostraron cambios significativos en la fluorescencia (Fig. 11D).

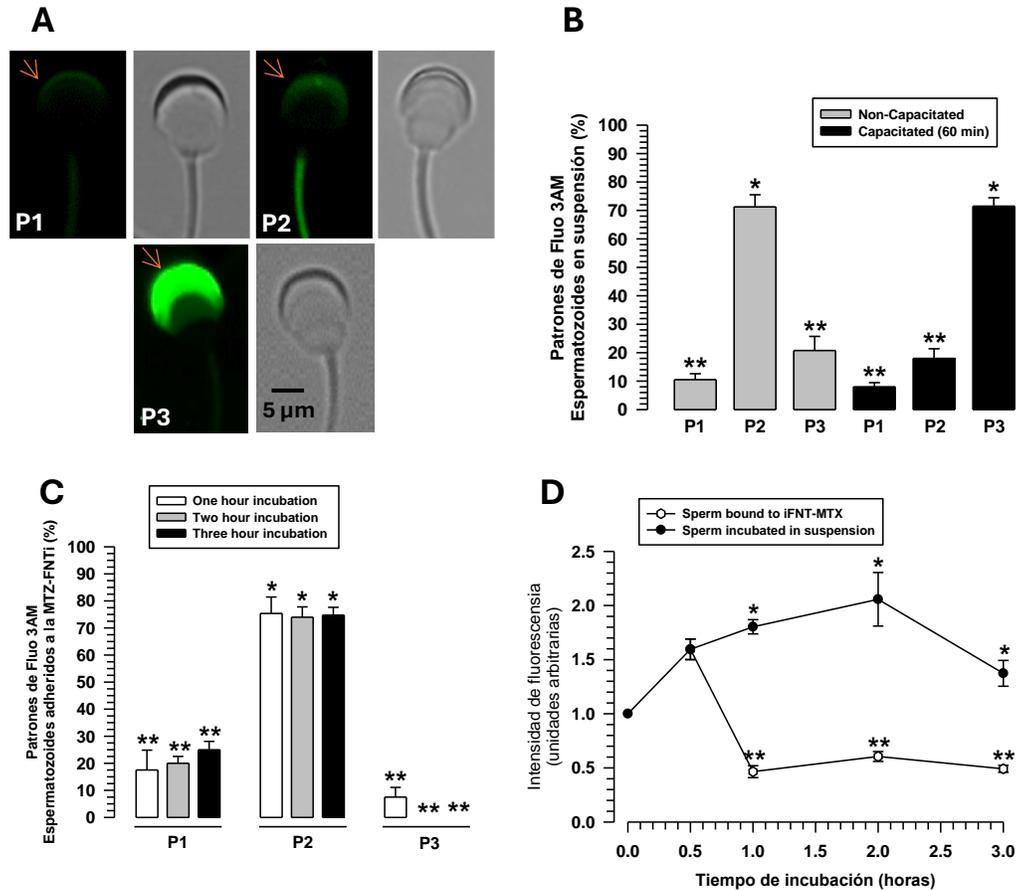


Figura 11. La adhesión de los espermatozoides a la matriz de fibronectina evita la entrada de Ca^{2+} . El ensayo se llevó a cabo utilizando espermatozoides (2×10^6 espermatozoides/ml) capacitados durante 30 minutos en medio TYRODE-HEPES en presencia de Fura-3AM, un indicador del Ca^{2+} intracelular. Los espermatozoides se añadieron a la placa de cultivo recubierta de fibronectina, y después de 30 min de incubación, las placas de cultivo se lavaron y los espermatozoides se incubaron en diferentes momentos (1, 2 y 3 horas). **(A)** Definición de los patrones de Fura-3AM que se producen durante la capacitación de los espermatozoides en suspensión. Las micrografías representan cuatro experimentos independientes. **(B)** Cuantificación de patrones de Fura-3AM en espermatozoides capacitados en suspensión. Los resultados se expresan como media \pm S.E. ($n=4$). * vs ** $P < 0,001$. **(C)** Cuantificación de los

patrones de Fura-3AM en espermatozoides adheridos a la matriz de fibronectina inmovilizada. Los resultados se expresan como media \pm S.E. (n= 4). * vs ** P < 0.001. **(D)** Evaluación en diferentes momentos de la fluorescencia emitida por Fura-3AM tanto en espermatozoides capacitados en suspensión como en espermatozoides adheridos a la matriz de fibronectina inmovilizada. Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * vs ** P < 0.01.

C) Polimerización de actina.

La evaluación de la F-actina con faloidina-FITC mostró que los espermatozoides no capacitados tienen baja fluorescencia, que aumentó rápidamente hasta la hora de capacitación, no variando las 3 h. La fluorescencia disminuyó significativamente (6.19 ± 0.11 y 3.15 ± 0.19 E.E. respectivamente, $P < 0.001$. Fig. 12A y 12B). En el caso de los espermatozoides adheridos al MTZ-FNTi después de 30 min de adhesión (una hora de incubación), la fluorescencia disminuyó significativamente respecto a los espermatozoides incubados en suspensión durante 30 min ($3,57 \pm 0,33$ y $2,04 \pm 0,5$ respectivamente. S.E. n=3). La fluorescencia se mantuvo a las dos y tres horas sin cambios significativos (Fig. 12B).

Aunque la polimerización de actina en espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi es significativamente menor respecto a los espermatozoides capacitados en suspensión, este proceso es necesario para la adhesión, ya que la inhibición de la polimerización de actina por tratamiento con latrunculina A disminuyó significativamente el número de espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi en todos los tiempos estudiados (Fig. 12D).

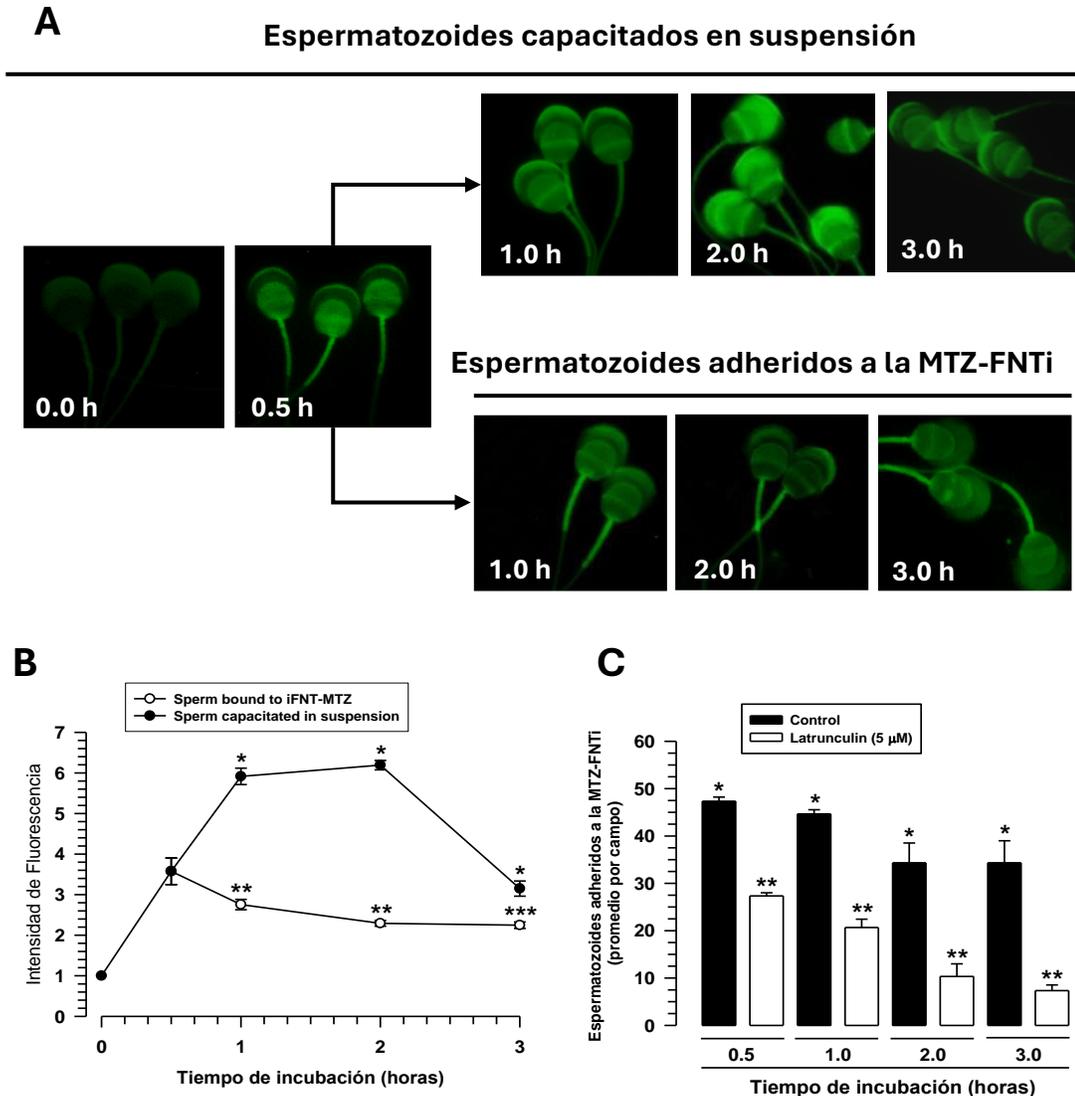


Figura 12. La adhesión de los espermatozoides a la matriz de fibronectina evita la polimerización de la actina. El ensayo se llevó a cabo utilizando espermatozoides (2×10^6 espermatozoides/ml) capacitados durante 30 minutos en el medio TYRODE-HEPES. Inmediatamente, los espermatozoides se añadieron a la placa de cultivo recubierta de fibronectina, y después de 30 min de incubación, se lavaron las placas de cultivo y los espermatozoides se incubaron en diferentes momentos (1, 2 y 3 horas). **(A)** Utilizando la sonda fluorescente, la F-actina se localizó en espermatozoides capacitados en suspensión o adheridos a faloidina-TRITC la matriz de fibronectina inmovilizada. Las micrografías representan cuatro experimentos independientes. **(B)** Cuantificar la fluorescencia emitida por la faloidina-TRITC en espermatozoides capacitados en suspensión y adheridos a la matriz de fibronectina inmovilizada. Los resultados se expresan como la media \pm S.E. ($n=3$). * vs ** $P < 0.01$. **(C)** Efectos de la

despolimerización de actina en la adhesión de los espermatozoides a la matriz de fibronectina inmobilizada. Los espermatozoides se incubaron durante 30 min en presencia de latunculina A antes de ser añadidos a la placa de cultivo recubierta con fibronectina. El número de espermatozoides adheridos a la matriz de fibronectina insoluble se contó en diferentes momentos. Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * frente a **P<0.001, * frente a ***P<0.05.

D) Relocalización de flotillina-1

En la Figura 13 se muestran los dos patrones de localización de la flotillina-1 reportados para los espermatozoides capacitados en suspensión (Maldonado-Garcia et al., 2017): P1, flotillina-1 se encontró dispersa por toda la región acrosómica y en el flagelo; y P2, la flotillina-1 se localizó concentrada en la región apical del acrosoma y el flagelo (Fig. 13A). La cuantificación de estos patrones muestra que, en los espermatozoides no capacitados, predominó el patrón P1, mientras que, para los espermatozoides capacitados en suspensión, en cualquier momento (1-3 horas), predominó el P2 (13B). La cuantificación de los patrones P1 y P2 en los espermatozoides adheridos al MTZ-FNTi mostró que el patrón P1 fue el más predominante en todos los momentos de incubación (Fig. 13B).

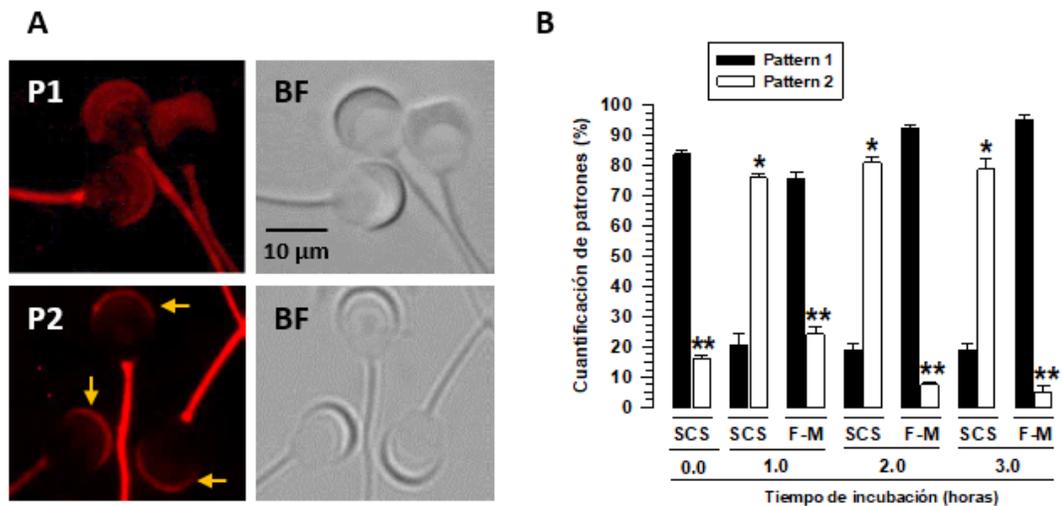


Figura 13. La adhesión de los espermatozoides a la matriz de fibronectina inmobilizada impide la redistribución de las balsas lipídicas. Los espermatozoides

se capacitaron durante 30 min en suspensión (2×10^6 espermatozoides/ml) y luego se añadieron a la placa de cultivo recubierta con fibronectina. Después de 30 min de incubación, se lavaron las placas de cultivo y se incubaron los espermatozoides adheridos en diferentes momentos (1, 2 y 3 horas). Al final de la incubación, se lavaron las placas de cultivo y se fijaron los espermatozoides adheridos para determinar la localización de la flotillina-2, un marcador de balsa lipídica. **(A)** Las micrografías muestran los dos patrones de localización de la flotillina-2 que ocurren antes y después de la capacitación de los espermatozoides en suspensión: P1, la distribución de la flotillina-2 es a lo largo del acrosoma, y P2, la flotillina-2 está agrupada en la región apical del acrosoma (flechas amarillas). Las micrografías representan tres experimentos independientes. **(B)** Cuantificación de los patrones de localización de la flotillina-2 tanto en espermatozoides con capacidad en suspensión (SCS) como en espermatozoides unidos a la matriz de fibronectina inmovilizada (F-M). Los resultados se expresan como la media \pm S.E. (n= 3). * frente a **P<0.01

DISCUSIÓN

Los espermatozoides en el reservorio oviductal están expuestos a estímulos ambientales. Uno de estos estímulos requiere que los espermatozoides interactúen con las células epiteliales oviductales, y a su vez podrían tener la capacidad de interactuar con componentes de la matriz extracelular.

En el presente estudio los objetivos fueron estudiar la capacidad de los espermatozoides de cobayo para adherirse a la matriz de fibronectina inmovilizada, las moléculas que median esta interacción, así como los efectos que la adhesión a la MTZ-FNTi tiene sobre el estado fisiológico de los espermatozoides. Los resultados indican que los espermatozoides tienen una mayor capacidad de adherirse a la MTZ-FNTi, que los formados por colágeno tipo I o laminina. Por otro lado, la adhesión de los espermatozoides requiere un tiempo mínimo de capacitación, lo que les permite adherirse a MTZ-FNTi. Cuando los espermatozoides se adhieren a MTZ-FNTi, su estado fisiológico cambia a uno similar al de los espermatozoides no capacitados. Una condición que hemos llamado estado estacionario de capacitación. La adhesión a la MTZ-FNTi aumenta la vida media de los espermatozoides, ya que varias horas después de desprenderse de la MTZ-FNTi, no experimentan una reacción acrosómica espontánea.

Los espermatozoides de diferentes mamíferos tienen la -capacidad de adherirse a las células epiteliales oviductales (Saint-Dizier et al., 2020; Suarez, 2016). Diferentes trabajos sugieren que la adhesión de los espermatozoides a las CEO selecciona espermatozoides de alta calidad para lograr la fecundación (Ellington et al., 1999; Gualtieri & Talevi, 2003; Yeste et al., 2009). Los espermatozoides adheridos a las CEO se caracterizan por tener un acrosoma intacto (Gualtieri & Talevi, 2000). Muestran un estado fisiológico de los espermatozoides no capacitados (Fazeli et al., 1999; Lefebvre & Suarez, 1996; Thomas et al., 1995): bajos niveles de calcio, reducción FP-Y (Petrunkina et al., 2001), morfología normal (Thomas et al., 1994) y una

estructura normal de la cromatina, con baja fragmentación del ADN. Los espermatozoides de cobayo adheridos a una MTZ-FNTi muestran características similares a los espermatozoides adheridos a la CEO: 1) Acrosomas intactos. Nuestros resultados muestran que los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi poseen un acrosoma definido, sin alteraciones morfológicas aparentes. Este resultado se apoya en el hecho de que los espermatozoides adheridos siguen batiendo su flagelo, lo que no sería posible si los espermatozoides hubieran presentado daños en su estructura celular. Además, el daño a la membrana plasmática es muy bajo en los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi (Fig. 9C). 2) Estado fisiológico de los espermatozoides adheridos a la CEO es similar al de espermatozoides no capacitados. Los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi muestran características similares a un espermatozoide en estado fisiológico no capacitado: niveles bajos de **FP-Y** (Fig. 10A y 10B) y actina F (Fig. 12B), ambos parámetros se consideran marcadores de capacitación de los espermatozoides de los mamíferos (Breitbart & Finkelstein, 2018; Gervasi & Visconti, 2016). Además, los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi muestran otras características relacionadas con el estado fisiológico de los espermatozoides no capacitados. El reordenamiento de las balsas lipídicas en la región apical del acrosoma durante la capacitación se ha considerado un signo de capacitación espermática (Maldonado-Garcia et al., 2017; van Gestel et al., 2005) y espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi no muestran esta característica evaluada por los patrones de tinción de flotilina (Fig. 13A y 13B). 3) Niveles bajos de calcio. Los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi mostraron niveles bajos de calcio intracelular (Fig. 11D). En conjunto, todas estas evidencias nos llevan a concluir que la adhesión de los espermatozoides a una matriz formada por fibronectina inmovilizada activa vías de señalización que permiten que los espermatozoides permanezcan en un estado fisiológico similar al de los espermatozoides no capacitados. La interacción entre la fibronectina y las integrinas no es un proceso sencillo; nuestro grupo reportó que los complejos de adhesión requieren al menos de 30 minutos para ser

estructurados (Roa-Espitia et al., 2016) período que se correlaciona con el requerimiento de que los espermatozoides adquieran la capacidad de adherirse a la MTZ-FNTi (Fig. 6B).

Los espermatozoides se adhirieron a la MTZ-FNTi después de un tiempo desprendiéndose de la MTZ-FNTi, y en suspensión, se asocian formando rosetas (Fig. 7A). De esta forma, los espermatozoides experimentan una RA muy baja, inferior al 1,0% durante más de siete horas (Fig. 7B). Lo anterior sugiere que los espermatozoides que se adhirieron a la MTZ-FNTi experimentaron un cambio en su fisiología que les permite mantener su acrosoma estable y no experimentar RAs, en comparación con los que fueron capacitados en suspensión y capacitados en presencia de la FNT soluble, que después de dos horas de incubación experimentan aproximadamente un 50% de RAs (Figura 7D). Lo anterior nos lleva a considerar que los cambios que experimentan los espermatozoides al interactuar con la fibronectina dependen de si la fibronectina se encuentra en estado soluble o inmovilizado. Así, en estado soluble, la fibronectina podría activar vías de señalización que conducen a la inducción de la capacitación y la reacción acrosómica (Diaz et al., 2007; Martínez-Leon et al., 2015; Osycka-Salut et al., 2020) Por otro lado, nuestros resultados nos hacen sugerir que la interacción de los espermatozoides con la fibronectina inmovilizada conduciría a la activación de vías de señalización que aumentan la vida media de los espermatozoides, como las relacionadas con la mecanotransducción (Stutchbury et al., 2017).

Se ha reportado que los espermatozoides son seleccionados y asociados a CEO en estado no capacitado, dadas las características que muestran los espermatozoides adheridos a CEO (Fazeli et al., 1999; Lefebvre & Suarez, 1996; Rodríguez-Martínez et al., 2005; Thomas et al., 1995). Lo anterior es controvertido ya que la mayoría de los estudios hasta el momento carecen de evidencia para verificar que los espermatozoides se adhieren a CEO en un estado no capacitado debido a los tiempos de incubación relativamente largos previos a su interacción con CEO. (Petrunina et al.,

2001). Nuestros resultados pueden proporcionar nueva evidencia sobre esta controversia. Así, los espermatozoides, previos a su adhesión a la MTZ-FNTi, requieren un tiempo mínimo de incubación (30 min) en el que los espermatozoides experimentan cambios relacionados con la capacitación: aumentan relativamente los niveles de FP-Y (Fig. 10B), los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 11D) y actina F (12B), siendo este el estado en el que los espermatozoides se adhieren a la MTZ-FNTi, “parcialmente capacitados”. Sin embargo, después de 30 min de adhesión, los espermatozoides, una vez adheridos a la MTZ-FNTi, volvieron a mostrar signos del estado no capacitado: niveles bajos de FP-Y, niveles bajos de $[Ca^{2+}]_i$ y niveles bajos de actina F. Lo anterior sugiere que la adhesión de los espermatozoides a la MTZ-FNTi a través de integrinas podrían cambiar la condición fisiológica de los espermatozoides, revirtiendo los cambios que experimentaron durante 30 min de incubación en un medio que apoya la capacitación, permitiendo a la célula sobrevivir por más tiempo, manteniendo su acrosoma intacto. El presente trabajo se realizó *in vitro* es importante considerar que *in vivo* existen factores como el ambiente del reservorio oviductal que contiene moléculas solubles y de superficie que podrían contribuir a mantener un estado de capacitación bajo.

La interacción de los espermatozoides con las CEO, está mediada por diferentes moléculas de adhesión, entre las que destacan las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$, que tienen como ligandos principales la fibronectina y la vitronectina, con las que interactúa a través del dominio RGD (Oszycka-Salut et al., 2017). Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de Oszycka-Salut y col. (Oszycka-Salut et al., 2017), ya que el dominio RGD y los anticuerpos anti- $\beta 1$ y anti- $\beta 3$ inhibieron la adhesión de los espermatozoides a la MTZ-FNTi. Por lo tanto, sugerimos que la interacción de estas integrinas con la fibronectina presente en la matriz extracelular es de suma importancia para la interacción de los espermatozoides con las CEO y el aumento de la vida fértil de los espermatozoides.

Las integrinas, las proteínas de señalización y diferentes proteínas estructurales forman complejos de adhesión llamados adhesiones focales, que asocian la MEC con el citoesqueleto de actina [65]. Dos módulos estructuran complejos de adhesión focal: 1) módulo estructural, cuyas proteínas (talina, tensina y vinculina) unen las integrinas con el citoesqueleto de actina, detectando la rigidez de la matriz extracelular; y 2) módulo de señalización, cuyas proteínas (FAK y paxilina) señalizan de forma dependiente de la adhesión (Stutchbury et al., 2017). Los dos módulos están relacionados con la mecanotransducción, que participa en la motilidad, proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Tomakidi et al., 2014). Ambos módulos cooperan en la mecanotransducción: las proteínas estructurales unidas a la MEC detectan estímulos mecánicos. Por el contrario, las proteínas de señalización generan señales intracelulares que responden a la mecanodetección, lo que conduce a cambios celulares críticos (Stutchbury et al., 2017). Por otro lado, se han reportado proteínas relacionadas con complejos de adhesión focal (FAK, paxilina, talina, vinculina y α -actinina) en espermatozoides de cobayo y ratón (Roa-Espitia et al., 2016). Por lo tanto, sugerimos que las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$, presentes en espermatozoides humanos, de ratón y de cobayos (Fusi et al., 1996; Glander & Schaller, 1993; Klentzeris et al., 1995; Roa-Espitia et al., 2016) en conjunto con las proteínas del complejo de adhesión (FAK, paxilina, talina, vinculina y α -actinina), forman complejos de adhesión focal que asocian los espermatozoides con la MTZ-FNTi, lo que conduce a la activación de FAK, que a su vez activa diferentes vías de señalización, como la relacionada con ERK1/2, implicada en la polimerización de actina y la capacitación (Jin & Yang, 2017; Salgado-Lucio et al., 2020). Otra de las vías de señalización relacionada con el mantenimiento de la viabilidad celular, es la relacionada con PIK3/AKT, donde la activación de FAK promueve la activación de dicha vía, que junto con ERK1/2 promueven la expresión y activación de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, NF- κ B) (Paoli et al., 2013). Proponemos que ambas vías de señalización podrían estar relacionadas con la reversión del proceso de capacitación y el mantenimiento

de los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi en un estado estacionario de capacitación, similar al de los espermatozoides no capacitados. Asimismo, estas vías de señalización estarían relacionadas con el aumento de la viabilidad espermática al inhibir la activación de las caspasas 3/7 (Fig. 9A y 9B), implicadas en la apoptosis. Sin embargo, esta hipótesis requiere más estudio, especialmente para explicar por qué los espermatozoides no experimentan una reacción acrosómica espontánea después de varias horas de desprendimiento de la MTZ-FNTi.

El modelo aquí propuesto, puede ser importante para el estudio de la interacción de los espermatozoides con proteínas de la matriz extracelular de CEO y los cambios que experimentan los espermatozoides en su fisiología durante esta interacción, ya que los espermatozoides adheridos a la MTZ-FNTi muestran las mismas características que los espermatozoides adheridos a las CEO. Estos resultados en combinación con otros estudios realizados por nuestro grupo (Roa-Espitia et al., 2016; Salgado-Lucio et al., 2020), nos han permitido sugerir que los espermatozoides, al igual que otras diversas células somáticas unidas a una matriz extracelular, responden a la mecanotransducción con la activación de vías de señalización que cambian el estado fisiológico de los espermatozoides, invirtiendo el proceso de capacitación y manteniendo a los espermatozoides en una condición que hemos denominado "estado estacionario de capacitación" y que lleva a los espermatozoides a no experimentar una reacción acrosómica espontánea y aumentar su vida. Es importante destacar que este estudio abre nuevas líneas de investigación sobre las vías de señalización y las moléculas implicadas en el aumento de la vida fértil de los espermatozoides adheridos a la matriz extracelular de las células epiteliales oviductales.

CONCLUSIÓN

El presente proyecto de investigación determinó que los espermatozoides de cobayo se adhieren específicamente a una matriz de Fibronectina inmovilizada a través de sus integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$, esta interacción modifica su fisiología, manteniendo bajos rangos de capacitación, que le permite a la célula incrementar su sobrevivencia por varias horas, evitando la reacción acrosomal por un periodo de tiempo largo.

PERSPECTIVAS

1. Determinar si vías de señalización relacionadas con la supervivencia (FAK, ERK1/2, PI3K/AKT) son activadas durante la capacitación y la adhesión espermática a la matriz de fibronectina inmovilizada.
2. Establecer si vías de señalización relacionadas con la mecanotransducción (RHOA, CDC42 Y RAC1) que interviene en la adhesión a la matriz de fibronectina.
3. Analizar el estado de capacitación de los espermatozoides desprendidos de la MTZ-FNTi.
4. Determinar la participación de los complejos de adhesión focal en los espermatozoides adheridos a MTZ-FNTi.
5. Realizar ensayos de adhesión con dos o más proteínas de la matriz extracelular.
6. Evaluar si los espermatozoides de otras especies de mamífero se adhieren a la MTZ-FNTi.

APÉNDICE I DETALLES DEL PROCEDIMIENTO

Medio TYRODE-HEPES

Soluciones	Proveedor	mM	PM	1x (g/100 ml)
NaCl		116.7	58.44	0.68217
KCl		2.8	74.557	0.02087
CaCl ₂ .H ₂ O	SigmaAldrich	1.8	147.026	0.02646
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O		0.36	137.99	0.00496
MgCl ₂ 6H ₂ O		0.49	203.33	0.00996
NaHCO ₃		11.9	84.01	0.0997
Piruvato de sodio	SigmaAldrich	0.25	110.04	0.00275
Ácido Láctico	SigmaAldrich	20.0	90.081	0.018016
HEPES	SigmaAldrich	2.0		
pH 7.6				
Tomado de: Rogers & Yanagimachi, 1975 (Biol. Reprod, 13:568-575)				

PBS 10X

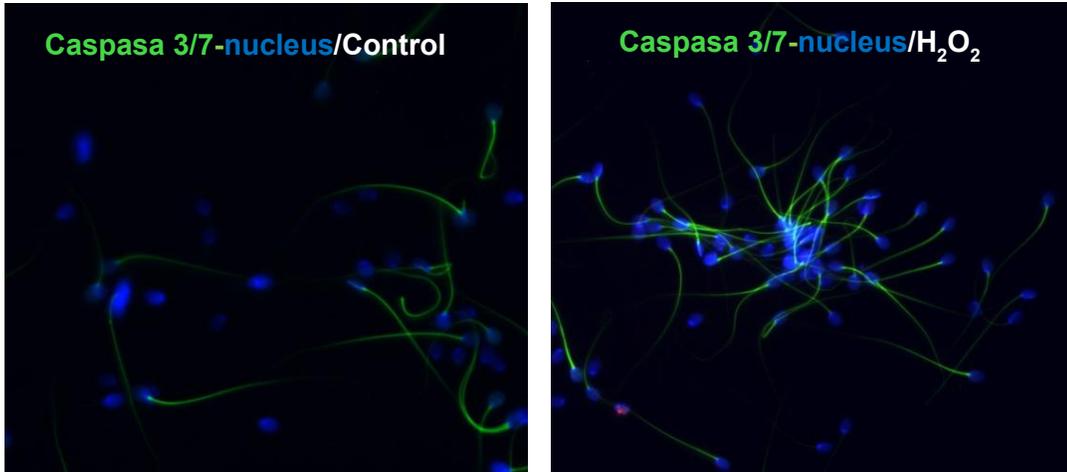
SOLUCIONES	CONCENTRACIÓN
Cloruro de Sodio	0.14 M
Fosfato de potasio monobásico	1.5 mM
Fosfato de sodio dibásico pentahidratado	8.1 M
Cloruro de potasio	2.7 mM

Anticuerpos

Target	Supplier	Catalog number	Specific use	Dilution	RRID
Integrin β3	Abcam	Ab34409	Immunofluorescence	1:100	AB_775738
			Adhesion inhibition Assay (Figure 4)	1:50	
Integrin β1	SANTA CRUZ	sc-8978	Immunofluorescence	1:100	AB_2130101
			Adhesion inhibition assay (Figure 4)	1:50	
Integrin α5β1	Millipore	MAB2514	Immunofluorescence	1:50	AB_94626
			Adhesion inhibition assay (Figure 4)	1:100	
Phospho-Tyrosine	Cell Signaling Technology	9411s	Immunofluorescence (Figure 5)	1:100	AB_331228
Flotillin-2	SANTA CRUZ	sc-28320	Immunofluorescence (Figure 8)	1:100	AB_627618

FIGURA SUPLEMENTARIA

A



B

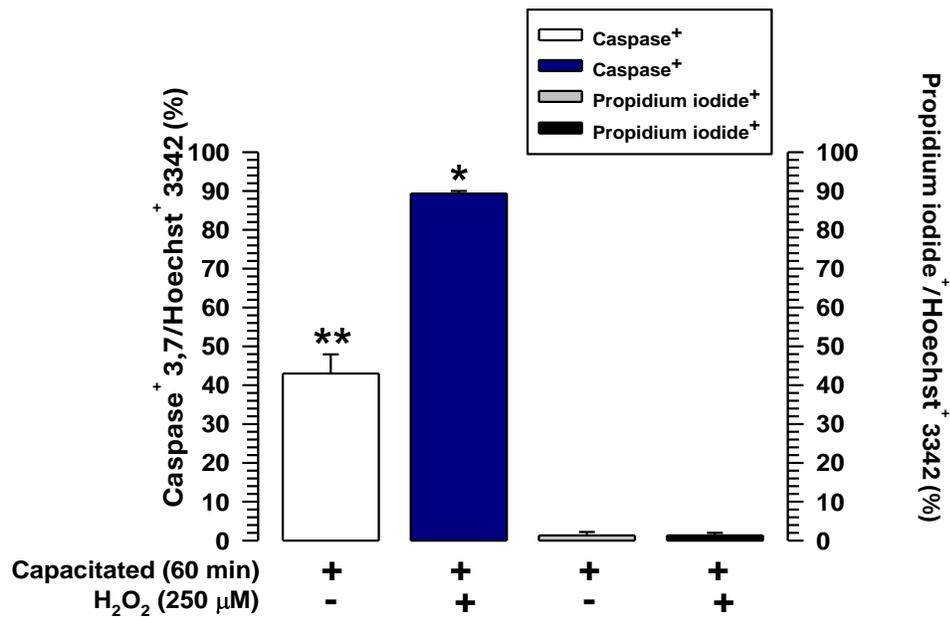


Figura suplementaria 1. Viabilidad y detección de caspasas 3/7 en los espermatozoides de cobayo tratados con H₂O₂. (A) Tinción para caspasas 3/7 (FLICA), el núcleo (HOECH 33342) y yoduro de propidio. Panel derecho: Espermatozoides capacitados en presencia de H₂O₂. Panel izquierdo: Espermatozoides en ausencia de H₂O₂ (B) Cuantificación de espermatozoides que mostraron tinción para caspasas 3/7 (FLICA), núcleo (HOECH 33342) y con Yoduro de propidio

BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, R. J. (2017a). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*, 84(10), 1039-1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>
- Aitken, R. J. (2017b). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*, 84(10), 1039-1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>
- Aitken, R. J., Bronson, R., Smith, T. B., & De Iuliis, G. N. (2013). The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod*, 19(8), 475-485. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat025>
- Almeida, E. A., Huovila, A. P., Sutherland, A. E., Stephens, L. E., Calarco, P. G., Shaw, L. M., Mercurio, A. M., Sonnenberg, A., Primakoff, P., Myles, D. G., & White, J. M. (1995). Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell*, 81(7), 1095-1104. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80014-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80014-5)
- Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M., & Florman, H. M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12), 6757-6762. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359785>
- Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 269-280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Barraud-Lange, V., Naud-Barriant, N., Saffar, L., Gattegno, L., Ducot, B., Drillet, A. S., Bomsel, M., Wolf, J. P., & Ziyat, A. (2007). Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC Dev Biol*, 7, 102. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-102>
- Boissonnas, C. C., Montjean, D., Lesaffre, C., Auer, J., Vaiman, D., Wolf, J. P., & Ziyat, A. (2010). Role of sperm alphavbeta3 integrin in mouse fertilization. *Dev Dyn*, 239(3), 773-783. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22206>
- Boskey, E. R., Cone, R. A., Whaley, K. J., & Moench, T. R. (2001). Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod*, 16(9), 1809-1813. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11527880>
- Bradshaw, M., & Smith, M. (2014). Multiscale relationships between fibronectin structure and functional properties. *Acta biomaterialia*, 10(4), 1524-1531.
- Breitbart, H., & Finkelstein, M. (2018). Actin cytoskeleton and sperm function. *Biochem Biophys Res Commun*, 506(2), 372-377. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.001>
- Cabello-Agueros, J. F., Hernandez-Gonzalez, E. O., & Mujica, A. (2003). The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. *Cell Motil Cytoskeleton*, 56(2), 94-108. <https://doi.org/10.1002/cm.10135>
- Calderwood, D. A., Shattil, S. J., & Ginsberg, M. H. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*, 275(30), 22607-22610. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900037199>
- Calvete, J. J., Raida, M., Gentzel, M., Urbanke, C., Sanz, L., & Topfer-Petersen, E. (1997). Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding

- proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Lett*, 407(2), 201-206. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9166899>
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), 697-698. <https://doi.org/10.1038/168697b0>
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), 697-698.
- de Ziegler, D., Bulletti, C., Fanchin, R., Epiney, M., & Brioschi, P. A. (2001). Contractility of the nonpregnant uterus: the follicular phase. *Ann N Y Acad Sci*, 943, 172-184. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11594539>
- Diaz, E. S., Kong, M., & Morales, P. (2007). Effect of fibronectin on proteasome activity, acrosome reaction, tyrosine phosphorylation and intracellular calcium concentrations of human sperm. *Hum Reprod*, 22(5), 1420-1430. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem023>
- Eddy. (2006). The spermatozoon in the physiology of reproduction (E Knobil and Neill, Eds).
- Elsevier.*
- Ellington, J. E., Evenson, D. P., Wright, R. W., Jr., Jones, A. E., Schneider, C. S., Hiss, G. A., & Brisbois, R. S. (1999). Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro. *Fertil Steril*, 71(5), 924-929. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00095-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00095-3)
- Evans, J. P. (1999). Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front Biosci*, 4, D114-131. <https://doi.org/10.2741/evans>
- Evans, J. P., Kopf, G. S., & Schultz, R. M. (1997). Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction. *Dev Biol*, 187(1), 79-93. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8611>
- Fazeli, A., Duncan, A. E., Watson, P. F., & Holt, W. V. (1999). Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod*, 60(4), 879-886. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.4.879>
- Frolikova, M., Sebkova, N., Ded, L., & Dvorakova-Hortova, K. (2016). Characterization of CD46 and beta1 integrin dynamics during sperm acrosome reaction. *Sci Rep*, 6, 33714. <https://doi.org/10.1038/srep33714>
- Frolikova, M., Valaskova, E., Cerny, J., Lumeau, A., Sebkova, N., Palenikova, V., Sanches-Hernandez, N., Pohlova, A., Manaskova-Postlerova, P., & Dvorakova-Hortova, K. (2019). Addressing the Compartmentalization of Specific Integrin Heterodimers in Mouse Sperm. *Int J Mol Sci*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051004>
- Fusi, F. M., Tamburini, C., Mangili, F., Montesano, M., Ferrari, A., & Bronson, R. A. (1996). The expression of alpha v, alpha 5, beta 1, and beta 3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. *Mol Hum Reprod*, 2(3), 169-175. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.3.169>
- Gadella, B. M., & Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, 81(1), 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.005>

- Garcia-Vazquez, F. A., Gadea, J., Matas, C., & Holt, W. V. (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J Androl*, 18(6), 844-850. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.186880>
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2016). Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Mol Reprod Dev*, 83(10), 860-874. <https://doi.org/10.1002/mrd.22663>
- Glander, H. J., & Schaller, J. (1993). Beta 1-integrins of spermatozoa: a flow cytophotometric analysis. *Int J Androl*, 16(2), 105-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1993.tb01162.x>
- Glander, H. J., Schaller, J., Rohwedder, A., & Henkel, R. (1998). Adhesion molecules and matrix proteins on human spermatozoa. *Andrologia*, 30(4-5), 289-296. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1998.tb01173.x>
- Gualtieri, R., & Talevi, R. (2000). In vitro-cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release. *Biol Reprod*, 62(6), 1754-1762. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1754>
- Gualtieri, R., & Talevi, R. (2003). Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction*, 125(2), 251-258. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12578539>
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Unates, D. R., & Giojalas, L. C. (2012). Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reproduction*, 143(5), 587-596. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0478>
- Hernandez-Gonzalez, E. O., Sosnik, J., Edwards, J., Acevedo, J. J., Mendoza-Lujambio, I., Lopez-Gonzalez, I., Demarco, I., Wertheimer, E., Darszon, A., & Visconti, P. E. (2006). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem*, 281(9), 5623-5633. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508172200>
- Hernandez-Silva, G., & Chirinos, M. (2019). Proteins from male and female reproductive tracts involved in sperm function regulation. *Zygote*, 27(1), 5-16. <https://doi.org/10.1017/S096719941800062X>
- Holt, W. V., & Fazeli, A. (2016). Sperm Storage in the Female Reproductive Tract. *Annu Rev Anim Biosci*, 4, 291-310. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111350>
- Hung, P. H., & Suarez, S. S. (2012). Alterations to the bull sperm surface proteins that bind sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod*, 87(4), 88. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099721>
- Hunter, R. H., Nichol, R., & Crabtree, S. M. (1980). Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reprod Nutr Dev*, 20(6), 1869-1875. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6897579>
- Ignatz, G. G., Cho, M. Y., & Suarez, S. S. (2007). Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biol Reprod*, 77(6), 906-913. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062505>
- Jacquemet, G., Humphries, M. J., & Caswell, P. T. (2013). Role of adhesion receptor trafficking in 3D cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 25(5), 627-632. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.05.008>

- Jankovicova, J., Frolikova, M., Palenikova, V., Valaskova, E., Cerny, J., Secova, P., Bartokova, M., Horovska, L., Manaskova-Postlerova, P., Antalikova, J., & Komrskova, K. (2020). Expression and distribution of CD151 as a partner of alpha6 integrin in male germ cells. *Sci Rep*, *10*(1), 4374. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61334-2>
- Jansen, R. P. S. (1980). Cyclic Changes in the Human Fallopian-Tube Isthmus and Their Functional Importance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *136*(3), 292-308. [https://doi.org/Doi.10.1016/0002-9378\(80\)90853-4](https://doi.org/Doi.10.1016/0002-9378(80)90853-4)
- Jin, S. K., & Yang, W. X. (2017). Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget*, *8*(2), 3600-3627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12274>
- Kanchanawong, P., & Calderwood, D. A. (2023). Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell-ECM adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *24*(2), 142-161. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00531-5>
- Klentzeris, L. D., Fishel, S., McDermott, H., Dowell, K., Hall, J., & Green, S. (1995). A positive correlation between expression of beta 1-integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Hum Reprod*, *10*(3), 728-733. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136023>
- Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. V., Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M., & Visconti, P. E. (2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem*, *285*(11), 7977-7985. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085845>
- Lefebvre, R., & Suarez, S. S. (1996). Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol Reprod*, *54*(3), 575-582. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.3.575>
- Lopez-Ubeda, R., Garcia-Vazquez, F. A., Gadea, J., & Matas, C. (2017). Oviductal epithelial cells selected boar sperm according to their functional characteristics. *Asian J Androl*, *19*(4), 396-403. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.173936>
- Luo, B. H., Carman, C. V., & Springer, T. A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*, *25*, 619-647. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618>
- Mahe, C., Zlotkowska, A. M., Reynaud, K., Tsikis, G., Mermillod, P., Druart, X., Schoen, J., & Saint-Dizier, M. (2021). Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviductdagger. *Biol Reprod*, *105*(2), 317-331. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab105>
- Maldonado-Garcia, D., Salgado-Lucio, M. L., Roa-Espitia, A. L., Reyes-Miguel, T., & Hernandez-Gonzalez, E. O. (2017). Calpain inhibition prevents flotillin re-ordering and Src family activation during capacitation. *Cell Tissue Res*, *369*(2), 395-412. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2591-2>
- Margadant, C., Monsuur, H. N., Norman, J. C., & Sonnenberg, A. (2011). Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol*, *23*(5), 607-614. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.08.005>
- Martinez-Leon, E., Osycka-Salut, C., Signorelli, J., Kong, M., Morales, P., Perez-Martinez, S., & Diaz, E. S. (2019). Fibronectin modulates the endocannabinoid system through the cAMP/PKA pathway during human sperm capacitation. *Mol Reprod Dev*, *86*(2), 224-238. <https://doi.org/10.1002/mrd.23097>

- Martinez-Leon, E., Osycka-Salut, C., Signorelli, J., Pozo, P., Perez, B., Kong, M., Morales, P., Perez-Martinez, S., & Diaz, E. S. (2015). Fibronectin stimulates human sperm capacitation through the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Hum Reprod*, 30(9), 2138-2151. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev154>
- Merc, V., Frolikova, M., & Komrskova, K. (2021). Role of Integrins in Sperm Activation and Fertilization. *Int J Mol Sci*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111809>
- Miller, B. J., Georges-Labouesse, E., Primakoff, P., & Myles, D. G. (2000). Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *J Cell Biol*, 149(6), 1289-1296. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.6.1289>
- Muino-Blanco, T., Perez-Pe, R., & Cebrian-Perez, J. A. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*, 43 Suppl 4, 18-31. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x>
- O'Flaherty, C. (2015). Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*, 17(4), 583-590. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153303>
- Osycka-Salut, C. E., Castellano, L., Fornes, D., Beltrame, J. S., Alonso, C. A. I., Jawerbaum, A., Franchi, A., Diaz, E. S., & Perez Martinez, S. (2017). Fibronectin From Oviductal Cells Fluctuates During the Estrous Cycle and Contributes to Sperm-Oviduct Interaction in Cattle. *J Cell Biochem*, 118(11), 4095-4108. <https://doi.org/10.1002/jcb.26067>
- Osycka-Salut, C. E., Martinez-Leon, E., Gervasi, M. G., Castellano, L., Davio, C., Chiarante, N., Franchi, A. M., Ribeiro, M. L., Diaz, E. S., & Perez-Martinez, S. (2020). Fibronectin induces capacitation-associated events through the endocannabinoid system in bull sperm. *Theriogenology*, 153, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.031>
- Palenikova, V., Frolikova, M., Valaskova, E., Postlerova, P., & Komrskova, K. (2021). alphaV Integrin Expression and Localization in Male Germ Cells. *Int J Mol Sci*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179525>
- Pang, X., He, X., Qiu, Z., Zhang, H., Xie, R., Liu, Z., Gu, Y., Zhao, N., Xiang, Q., & Cui, Y. (2023). Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01259-6>
- Paoli, P., Giannoni, E., & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3481-3498. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026>
- Petrunkina, A. M., Friedrich, J., Drommer, W., Bicker, G., Waberski, D., & Topfer-Petersen, E. (2001). Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction*, 122(3), 469-480. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220469>
- Qin, L., Wang, Y. L., Bai, S.-x., Xiao, Z. J., Herva, R., & Piao, Y.-s. (2003). Expression of integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface during tubal implantation. *Reproduction*, 126 3, 383-391.
- Reddy, V. R., Rajeev, S. K., & Gupta, V. (2003). Alpha 6 beta 1 Integrin is a potential clinical marker for evaluating sperm quality in men. *Fertil Steril*, 79 Suppl 3, 1590-1596. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(03\)00368-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)00368-6)
- Roa-Espitia, A. L., Hernandez-Rendon, E. R., Baltierrez-Hoyos, R., Munoz-Gotera, R. J., Cote-Velez, A., Jimenez, I., Gonzalez-Marquez, H., & Hernandez-Gonzalez, E. O.

- (2016). Focal adhesion kinase is required for actin polymerization and remodeling of the cytoskeleton during sperm capacitation. *Biol Open*, 5(9), 1189-1199. <https://doi.org/10.1242/bio.017558>
- Rodriguez-Martinez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vazquez, J. M., Martinez, E., Roca, J., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, 63(2), 514-535. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.028>
- Saint-Dizier, M., Mahe, C., Reynaud, K., Tsikis, G., Mermillod, P., & Druart, X. (2020). Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Mol Cell Endocrinol*, 516, 110956. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110956>
- Salgado-Lucio, M. L., Ramirez-Ramirez, D., Jorge-Cruz, C. Y., Roa-Espitia, A. L., & Hernandez-Gonzalez, E. O. (2020). FAK regulates actin polymerization during sperm capacitation via the ERK2/GEF-H1/RhoA signaling pathway. *J Cell Sci*, 133(8). <https://doi.org/10.1242/jcs.239186>
- Silva, P. F., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Soto-Heras, S., Sakkas, D., & Miller, D. J. (2023). Sperm selection by the oviduct: perspectives for male fertility and assisted reproductive technologies dagger. *Biol Reprod*, 108(4), 538-552. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac224>
- Stival, C., Puga Molina Ldel, C., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., & Krapf, D. (2016). Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 220, 93-106. https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_5
- Stutchbury, B., Atherton, P., Tsang, R., Wang, D. Y., & Ballestrem, C. (2017). Distinct focal adhesion protein modules control different aspects of mechanotransduction. *J Cell Sci*, 130(9), 1612-1624. <https://doi.org/10.1242/jcs.195362>
- Suarez, S. S. (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim*, 37(3), 140-143. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00346.x>
- Suarez, S. S. (2016). Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res*, 363(1), 185-194. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2244-2>
- Suarez, S. S., & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*, 12(1), 23-37. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>
- Talevi, R., & Gualtieri, R. (2010). Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology*, 73(6), 796-801. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.005>
- Tapia, J. A., Macias-Garcia, B., Miro-Moran, A., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G. M., Pena, F. J., & Aparicio, I. M. (2012). The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reprod Domest Anim*, 47 Suppl 3, 65-75. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02046.x>
- Teijeiro, J. M., Ignatz, G. G., & Marini, P. E. (2009). Annexin A2 is involved in pig (*Sus scrofa*) sperm-oviduct interaction. *Mol Reprod Dev*, 76(4), 334-341. <https://doi.org/10.1002/mrd.20958>
- Thomas, P. G., Ball, B. A., Miller, P. G., Brinsko, S. P., & Southwood, L. (1994). A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine

- oviductal epithelial cell monolayers. *Biol Reprod*, 51(2), 303-309.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod51.2.303>
- Thomas, P. G., Ignatz, G. G., Ball, B. A., Brinsko, S. P., & Currie, W. B. (1995). Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells. *Am J Vet Res*, 56(12), 1657-1662.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8599529>
- Tomakidi, P., Schulz, S., Proksch, S., Weber, W., & Steinberg, T. (2014). Focal adhesion kinase (FAK) perspectives in mechanobiology: implications for cell behaviour. *Cell Tissue Res*, 357(3), 515-526. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1945-2>
- Topfer-Petersen, E., Wagner, A., Friedrich, J., Petrunkina, A., Ekhlas-Hundrieser, M., Waberski, D., & Drommer, W. (2002). Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *J Exp Zool*, 292(2), 210-215. <https://doi.org/10.1002/jez.1157>
- van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Helms, J. B., Brouwers, J. F., & Gadella, B. M. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol Hum Reprod*, 11(8), 583-590.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gah200>
- Visconti, P. E., Krapf, D., de la Vega-Beltran, J. L., Acevedo, J. J., & Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*, 13(3), 395-405. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.69>
- Yanagimachi, R. (1994a). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371-372. <https://doi.org/10.1017/s0967199400002240>
- Yanagimachi, R. (1994b). Mammalian fertilization. In *The physiology of reproduction* E Knobil and Neill. 189-317.
- Yeste, M., Lloyd, R. E., Badia, E., Briz, M., Bonet, S., & Holt, W. V. (2009). Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro. *Anim Reprod Sci*, 113(1-4), 263-278. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.08.018>
- Zhao, W., Li, Z., Ping, P., Wang, G., Yuan, X., & Sun, F. (2018). Outer dense fibers stabilize the axoneme to maintain sperm motility. *J Cell Mol Med*, 22(3), 1755-1768.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13457>