Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

Identificación de vesículas extracelulares y su carga proteica, secretadas por los túbulos de almacenamiento espermático del oviducto de hembras de pavo criollo (*Meleagris gallopavo*), y su efecto sobre espermatozoides conservados *in vitro.*

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Veterinarias

MAKARENA AURORA RUBILAR QUEZADA
CHILLÁN-CHILE
2024

Profesor Guía: Dr. Fidel O. Castro
Dpto. de Ciencia Animal
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

© Makarena Rubilar Quezada. 2024

Se autoriza la reproducción con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencia Animal de la Facultad de CienciasVeterinarias, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Fidel Ovidio Castro Reboredo
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora

Dra. Lleretny Rodriguez Alvarez
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. Fernado Saravia Ramos
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Dr. Marcelo Ratto Fuster
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Austral de Chile

Director (s) de Programa

Dr. Sebastian Muñoz Leal
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

TABLA DE CONTENIDOS

	Páginas
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES REPRODUCTIVOS DEL PAVO MACHO (*Meleagris gallopavo*)	1
1.1. Espermatogénesis	1
1.2. Control hormonal	3
1.3. Capacitación espermática	4
2. ANTECEDENTES REPRODUCTIVOS DE LA HEMBRA DE PAVO (*Meleagris gallopavo*)	5
2.1. Anatomía e histología del aparato reproductor	5
2.2. Túbulos de almacenamiento espermático (TAE)	13
2.3. Ingreso y tránsito de espermatozoides en el oviducto	22
2.4. Fecundación	25
2.5. Modelos de análisis de los TAE	26
3. SECRETÓMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	29
3.1. Caracterización	29
3.2. Secretómica oviductal	30
3.3. Secretómica oviductal y sus efectos sobre los espermatozoides	33
3.4. Secretómica del epitelio de los TAE	34
3.5. Incubación espermática con vesículas extracelulares	36
4. PREGUNTA BIOLÓGICA	38
5. HIPÓTESIS	39
6. OBJETIVOS	39
6.1. Objetivo general	39
6.2. Objetivos específicos	39
II. MATERIALES Y MÉTODOS	40

ANIMALES 40
1.1. Análisis de perfiles séricos de hormonas sexuales 41
1.2. Análisis de EVs de origen oviductal 41
PATRONES SÉRICOS DE HORMONAS SEXUALES 42
2.1. Diseño experimental 42
2.2. Toma de muestras 42
2.3. Ensayos endocrinos 43
2.4. Fotoperíodo 44
2.5. Análisis estadístico 45
CARACTERIZACION DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES OVIDUCTALES 46
3.1. Diseño experimental 46
3.2. Aislamiento del tejido oviductal 47
3.3. Fuentes de recolección de vesículas extracelulares 47
3.4. Aislamiento de vesículas extracelulares 49
3.5. Identificación y caracterización de vesículas extracelulares 50
3.6. Diseño estadístico 55
EFECTO E INTERACCIÓN DE LAS VESÍCULAS EXTRACEULARES DE LOS TAE SOBRE ESPERMATOZOIDES *IN VITRO* 56
4.1. Diseño experimental 56
4.2. Concentración de EVs 57
4.3. Preparación de muestras espermáticas para la co-incubación con EVs 57
4.4. Co-incubación de las EVs con espermatozoides 58
4.5. Diseño estadístico 61
III. RESULTADOS 62
PATRONES SÉRICOS DE HORMONAS SEXUALES 62
OBJETIVO 1 62
1.1. Análisis hormonal de la hembra 62
1.2. Análisis hormonal del macho 67
CARACTERIZACION DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES OVIDUCLALES 70
OBJETIVO 2 70

2.1. Análisis de NTA 70
2.1.1. Tamaño de partículas 72
2.1.2. Concentración de partículas 73
2.1.3. Resumen del conjunto de datos 76
2.2. TEM 77
OBJETIVO 3 78
3.1. Cultivos celulares 78
3.2. Análisis de NTA 80
3.2.1. Tamaño de partícula 81
3.2.2. Concentración de partículas 82
3.2.3. Resumen de conjunto de datos 87
3.3. TEM 88
OBJETIVO 4 89
4.1. Identificación y cuantificación de proteínas, análisis general en base al origen de la muestra (*in vivo* e *in vitro*) 89
4.2. Identificación y cuantificación de proteínas en base a las funciones biológicas de las diferentes secciones anatómicas (M v/s UUV) 97
4.3. Ontología de genes 100
EFECTO E INTERACCION DE LAS VESÍCULAS EXTRACEULARES DE LOS TAE SOBRE ESPERMATOZOIDES *IN VITRO* 103
OBJETIVO 5 103
5.1. Internalización de EVs en espermatozoides 103
5.2. Viabilidad espermática en co-incubación con EVs 105
5.3. Movilidad espermática en co-incubación con EVs 108
IV. DISCUSIÓN 110
PATRONES SÉRICOS DE HORMONAS SEXUALES 110
CARACTERIZACION DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES OVIDUCLALES 112
1. Biometría de las EVs 112
2. Proteómica de las EVs 113

EFECTO E INTERACCION DE LAS VESÍCULAS EXTRACEULARES SOBRE ESPERMATOZOIDES *IN VITRO* 119
1. Internalización de EVs en espermatozoides 119
2. Viabilidad espermática en co-incubación con EVs 119
3. Movilidad espermática en co-incubación con EVs 122
V. CONCLUSIONES 125
VI. ANEXOS 126
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 138

ÍNDICE DE TABLAS

Figura		Página
Tabla 1	Cuantificación de proteínas secretables, por cada grupo experimental, de acuerdo a los factores tejido, origen y estado reproductivo de muestras de EVs de *Meleagris gallopavo.*	89
Tabla 2	Perfil cuantitativo del proteoma mediante LFQ, de acuerdo a las comparaciones del factor origen (*in vivo* v/s *in vitro*) y tipo de tejido (M v/s UUV), en el estado reproductivo de fotoperiodo positivo con y sin ovulación (FP y FP en O) de muestras de EVs de *Meleagris gallopavo*.	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Dibujo esquemático de un oviducto aviar, la dinámica de formación del huevo y el sitio de fertilización.	12
Figura 2	Imágenes de los túbulos de almacenamiento espermático.	15
Figura 3	Sumatoria de las horas de luz diarias durante el fotoperíodo de las fechas de muestreos, para la determinación de la concentración plasmática de hormonas sexuales en machos y hembras de pavo criollo.	44
Figura 4	Diagrama del flujo de trabajo para el análisis de espectrometría de masas. Adaptado de los reportes de Melisa Institute®.	54
Figura 5	Concentración plasmática de estradiol, en hembras de pavo criollo, en Chile, durante invierno y primavera.	62
Figura 6	Regresión no lineal de la concentración plasmática de estradiol de acuerdo a las horas de luz diarias en hembras de pavo criollo, en Chile, durante invierno (julio, agosto y septiembre) y primavera (octubre, noviembre y diciembre).	64

Figura 7	Concentración plasmática de progesterona, en hembras de pavo criollo, en Chile, durante invierno y primavera.	65
Figura 8	Regresión no lineal de la concentración plasmática de progesterona de acuerdo a las horas de luz diarias en hembras de pavo criollo, en Chile, durante invierno (julio, agosto y septiembre) y primavera (octubre, noviembre y diciembre).	66
Figura 9	Concentración plasmática de testosterona, en machos de pavo criollo, en Chile, durante invierno y primavera.	67
Figura 10	Regresión no lineal de la concentración plasmática de testosterona de acuerdo a las horas de luz diarias en machos de pavo criollo, en Chile, durante invierno (julio, agosto y septiembre) y primavera (octubre, noviembre y diciembre).	68
Figura 11	Histograma de dispersión de partículas, mediante la técnica de NTA, a partir del grupo control en base a PBS filtrado (0,22 µm). Concentración promedio: 1.06e+06 partículas/ml.	69
Figura 12	Histogramas de dispersión de partículas asociadas a vesículas extracelulares, obtenidos mediante la técnica de NTA, a partir de las muestras de la unión útero vaginal (UUV) y el magnum (M), en fotoperiodo negativo (FN), fotoperiodo positivo (FP) y fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), de muestras colectadas *in vivo* (lavado) del oviducto de hembras de pavo (*Meleagris gallopavo*).	71
Figura 13	Determinación del tamaño de partícula, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas a partir del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.	72
Figura 14	Determinación de la concentración de partículas, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas a partir del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos	73

Figura 15	Determinación de la concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos.	74
Figura 16	Determinación de la concentración de partícula grandes (> 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.	75
Figura 17	Microscopía electrónica de transmisión de muestras *in vivo* de EVs colectadas del oviducto de hembras de pavo (*Meleagris gallopavo*), desde las regiones del magnum y la unión útero vaginal, en distintos fotoperiodos y estados ovulatorios.	77
Figura 18	Microfotografía del cultivo de células epiteliales de las secciones del magnum y la unión útero vaginal del oviducto de pavas criollas (Meleagris gallopavo). A1 y A2: magnum; B1 y B2: unión útero vaginal.	79
Figura 19	Histogramas de dispersión de partículas asociadas a vesículas extracelulares, obtenidos mediante la técnica de NTA, a partir de las muestras de la unión útero vaginal (UUV) y el magnum (M), fotoperiodo positivo (FP) y fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), de muestras colectadas *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del oviducto de hembras de pavo (*Meleagris gallopavo*).	80
Figura 20	Determinación del tamaño de partículas, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos.	82
Figura 21	Determinación de la concentración de partículas, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.	83
Figura 22	Determinación de la concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e	85

"in vitro" del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos.

Figura 23 Determinación de la concentración de partículas grandes (> 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos. 86

Figura 24 Microscopía electrónica de transmisión de muestras *in vitro* de EVs colectadas del sobrenadante de cultivos celulares del oviducto de hembras de pavo (*Meleagris gallopavo*), de las regiones del magnum y la unión útero vaginal, en ausencia y presencia de ovulación. 88

Figura 25 Diagrama de Venn con el número de proteínas que se secretan de forma individual y compartida, en las comparaciones entre tratamientos, de acuerdo al factor "tejido" (M v/s UUV) y el "estado reproductivo" (FP v/s FP en O). 91

Figura 26 Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas identificadas en las muestras de EVs obtenidas a partir de condiciones *in vivo* e *in vitro*, en fotoperiodo negativo (FN), fotoperiodo positivo (FP) y fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), de las regiones del magnum (M) y la unión útero vaginal (UUV), a partir del oviducto de hembras de pavo criollo (*Meleagris gallopavo*). 92

Figura 27 Mapa de calor (Heatmap) con la representación del perfil de expresión de proteínas de EVs de muestras *in vivo* (lavado) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del M y la UUV del oviducto pavas criollas (*Meleagris gallopavo*), de acuerdo al fotoperiodo y estado reproductivo de las hembras. 93

Figura 28 Volcano plot del perfil de expresión proteica de EVs de muestras *in vivo* (lavado) versus *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular), en FP (fotoperiodo positivo) y FP en O 95

(fotoperiodo positivo en ovulación) del M y la UUV del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*).

Figura 29 Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas identificadas en las muestras de EVs obtenidas a partir de condiciones *in vivo* e *in vitro*, fotoperiodo positivo (FP) y fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), de las regiones del magnum (M) y la unión útero vaginal (UUV), a partir del oviducto de hembras de pavo criollo (*Meleagris gallopavo*). 96

Figura 30 Mapa de calor (Heatmap) con la representación del perfil de expresión de proteínas de EVs de muestras *in vivo* (lavado) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del M y la UUV del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*). M: magnum; UUV: unión útero vaginal; FP; fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positive en ovulación. 97

Figura 31 Volcano plot del perfil de expresión proteica de EVs de muestras del magnum versus la unión útero vaginal, en FP (fotoperiodo positivo) y FP en O (fotoperiodo positivo en ovulación) de muestras *in vivo* (lavado oviductal) e *in vitro* (de sobrenadante de cultivo celular) del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*). El valor de significancia para asignar a un grupo u otro fue de $p < 0,05$. 98

Figura 32 Mapa de calor (Heatmap) del perfil de expresión de proteínas de EVs de muestras *in vivo* (lavado) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del M y la UUV del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*), utilizando términos específicos de ontología genética, relacionada con procesos biológicos relacionados con los espermatozoides, respecto a aptitudes de movilidad y reacción acrosomal. 100

Figura 33 Mapa de calor (Heatmap) del perfil de expresión de proteínas de EVs de muestras *in vivo* (lavado) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del M y la UUV del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*), utilizando términos específicos de 101

ontología genética, relacionada con procesos biológicos ligados a la fertilización.

Figura 34 Internalización de EVs, del lavado de la unión útero vaginal del oviducto de gallinas, efectuada por espermatozoides de gallo. 103

Figura 35 Viabilidad espermática, de espermatozoides de gallo, co-incubados con EVs oviductales de magnum y la unión útero vaginal de gallinas, en distintas concentraciones. 104

Figura 36 Movilidad espermática, de espermatozoides de gallo, co-incubados con EVs oviductales de M y la UUV de gallinas, en distintas concentraciones. 107

ÍNDICE DE ANEXOS

Figura		Página
Anexo 1	Tamaño de partícula, mediante la técnica de NTA, en muestras	125
Tabla 1	"*in vivo*" de EVs obtenidas a partir del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.	
Anexo 2	Concentración de partícula, mediante la técnica de NTA, en	126
Tabla 2	muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas a partir del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.	
Anexo 3	Concentración de partícula pequeñas (≤ 120 nm), mediante la	127
Tabla 3	técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos.	
Anexo 4	Concentración de partícula grandes (> 120 nm), mediante la	128
Tabla 4	técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.	
Anexo 5	Tamaño de partículas, mediante la técnica de NTA, en	129
Tabla 5	muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos.	
Anexo 6	Concentración de partículas, mediante la técnica de NTA, en	130
Tabla 6	muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.	
Anexo 7	Concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm), mediante	131
Tabla 7	la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos.	
Anexo 8	Concentración de partículas grandes (> 120 nm), mediante la	132
Tabla 8	técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.	
Anexo 9	Viabilidad espermática, de espermatozoides de gallo, en	133
Tabla 9	distintos tiempos de co-incubación con EVs de origen	

oviductal de gallinas. Análisis de varianza de acuerdo a los tiempos de co-incubación.

Anexo 10 Tabla 10 Viabilidad espermática, de espermatozoides de gallo, co-incubados con EVs oviductales de M y la UUV de gallinas, en distintas concentraciones. Análisis de varianza de acuerdo a las muestras de EVs. 134

Anexo 11 Tabla 11 Movilidad espermática, de espermatozoides de gallo, en distintos tiempos de co-incubación con EVs de origen oviductal de gallinas. Análisis de varianza de acuerdo a los tiempos de co-incubación. 135

Anexo 12 Tabla 12 Movilidad espermática, de espermatozoides de gallo, co-incubados con EVs oviductales de M y la UUV de gallinas, en distintas concentraciones. Análisis de varianza de acuerdo a las muestras de EVs. 136

.

.

RESUMEN

Las hembras aviares, como las pavas, poseen la particularidad de presentar una “fertilización sostenida” en el tiempo, dependiente de la capacidad de la hembra para almacenar y liberar esperma en el transcurso de los ciclos ovulatorios, capacidad que es conferida por estructuras especializadas, llamadas “túbulos de almacenamiento espermático” (TAE), localizadas en la unión útero vaginal (UUV). Los TAE permiten asegurar la viabilidad de los espermatozoides tras la conservación por períodos prolongados de hasta 70 días en pavas. Sin embargo, a pesar del gran interés práctico que tendría para su conservación *in vitro*, las condiciones bioquímicas, mecanismos fisiológicos y la base genética que permiten la conservación y supervivencia de los espermatozoides aviares son prácticamente desconocidas. El líquido oviductal ha sido indicado como el principal responsable para que espermatozoides presenten un entorno óptimo durante los eventos reproductivos, identificándose a las vesículas extracelulares (EVs) como su principal constituyente. Las EVs son definidas como mediadores en la comunicación intercelular mediante el transporte de múltiples componentes moleculares bioactivos desde la célula de origen hacia la célula receptora, transportando proteínas, lípidos, ARN y ADN. De éste modo se postula que el contenido de las EVs de la UUV, donde están los TAE, del oviducto de hembras de pavo criollo (*Meleagris gallopavo*), inhibe la movilidad sin afectar la viabilidad espermática. Frente a lo cual se buscó establecer la relación entre el fotoperiodo estacional y las temporadas reproductivas, para determinar la concentración y contenido proteico de las EVs procedentes de la UUV del oviducto de hembras de pavo criollo, en diversas condiciones estacionales y reproductivas, probando la influencia de las EVs sobre la movilidad y viabilidad espermática *in vitro*. Para ello se efectuaron análisis de perfiles séricos de hormonas sexuales en hembras (estrógeno y progesterona) y machos (testosterona), mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA), a partir de lo cual se determinaron las temporadas de muestreo, de acuerdo al fotoperiodo y estado ovulatorio de las hembras. Se extrajeron EVs, mediante la técnica de ultracentrifugación, a partir del fluido oviductal (*in vivo*) y el sobrenadante de cultivos celulares (*in vitro*) de las regiones oviductales del M (sin TAE) y la UUV (con TAE), de acuerdo a las etapas reproductivas de fotoperiodo negativo (FN), fotoperiodo positivo (FP) y FP en estado ovulatorio (FP en O). Se efectuó una caracterización biométrica por medio de las técnicas de NTA y TEM, y se efectuó una

caracterización molecular mediante espectometría de masas. Una vez determinadas las muestras de EVs con mejores resultados bioactivos, correspondiente a las muestras *in vivo* de M y la UUV en FP en O, se efectuaron pruebas de interacción, movilidad y viabilidad espermática mediante la co-incubación de EVs con espermatozoides, a partir de tres concentraciones de EVs (4×10^7, 4×10^8 y 4×10^{10} partículas/mL) y 4 puntos en el tiempo (2, 4, 6 y 10 horas de co-incubación). Empleando las técnicas de visualización con PKH para interacción, microscopía para evaluación de movilidad, y la tinción de eosina y visualización por microscopía para viabilidad. Los resultados permitieron señalar que los picos de hormonas sexuales se desarrollan entre fines de invierno e inicios de primavera, correspondiendo al período de mayor interés reproductivo para la especie. Se pudo establecer que el tamaño de las EVs *in vivo* (en FN, FP y FP en O) dependiente del estado ovulatorio y es independiente del fotoperiodo y el tejido, mientras que la concentración es dependiente del fotoperiodo y el tejido. Respecto al tamaño de las EVs de muestras *in vivo* e *in vitro* (en FP con y sin O), es dependiente del estado ovulatorio y el origen de la muestra, mientras que la concentración sólo depende del origen de la muestra. En cuanto al contenido proteico de las EVs, depende principalmente del origen de las muestras, validándose el método de lavado oviductal (*in vivo*) por sobre el método *in vitro*, observándose un diferencial de expresión (ANXA5, STX2, LZTFL1, STXBP1, ATP2B4, RAB34, APOB, TTLL3) respecto a las funciones biológicas de movilidad espermática y reacción acrosomal. En relación a la co-incubación de EVs de la UUV con espermatozoides, se pudo establecer la internalización a partir de las 2 hrs, con conservación de la viabilidad y reducción de la movilidad en función del tiempo. De éste modo se puede establecer que existen ciclos reproductivos definidos de acuerdo al fotoperiodo estacional, con EVs secretadas en función del estado reproductivo, origen de la muestra y tejido oviductal, con mayor fidelidad de la realidad secretora a partir de muestras de lavado oviductal, con EVs que transportan proteínas importantes para la función espermática, colaborando positivamente en su viabilidad y movilidad.

ABSTRACT

Avian females, like turkeys hen (*Meleagris gallopavo*), have the particularity of presenting “sustained fertilization” over time, dependent on the female's ability to store and release sperm during the ovulatory cycles, a capacity that is conferred by specialized structures. , called “sperm storage tubules” (SST), located in the utero-vaginal junction (UVJ). SSTs ensure the viability of sperm after conservation for prolonged periods of up to 70 days in turkeys hen. However, despite the great practical interest that it would have for its *in vitro* conservation, the biochemical conditions, physiological mechanisms and genetic basis that allow the conservation and survival of avian spermatozoa are practically unknown. The oviductal fluid has been indicated as the main responsible for spermatozoa presenting an optimal environment during reproductive events, identifying extracellular vesicles (EVs) as its main constituent. EVs are defined as mediators in intercellular communication through the transport of multiple bioactive molecular components from the cell of origin to the recipient cell, transporting proteins, lipids, RNA and DNA. In this way, it is postulated that the content of the EVs of the UVJ, where the SSTs are located, of the oviduct of turkeys hen, inhibits motility without affecting sperm viability. Against which we sought to establish the relationship between the seasonal photoperiod and the reproductive seasons, to determine the concentration and protein content of the EVs from the UVJ of the oviduct of female Creole turkeys, in various seasonal and reproductive conditions, testing the influence of EVs on sperm motility and viability in vitro. For this, analyzes of serum profiles of sexual hormones were carried out in females (estrogen and progesterone) and males (testosterone), using the radioimmunoassay technique, from which the sampling seasons were determined, according to the photoperiod and ovulatory state of females. EVs were extracted, using the ultracentrifugation technique, from the oviductal fluid (*in vivo*) and the supernatant of cell cultures (*in vitro*) from the oviductal regions of the M (without SST) and the UVJ (with SST), according to the reproductive stages of negative photoperiod (NP), positive photoperiod (PP) and PP in the ovulatory state (PP in O). A biometric characterization was carried out using NTA and TEM techniques, and a molecular characterization was carried out using mass spectrometry. Once the EVs samples with the best bioactive results were determined, corresponding to the *in vivo* samples of M and UVJ in PP in O, interaction, motility and

sperm viability tests were carried out by co-incubating EVs with sperm, from of three concentrations of EVs (4×10^7, 4×10^8 and 4×10^{10} particles/mL) and 4 points in time (2, 4, 6 and 10 hours of co-incubation). Using visualization techniques with PKH for interaction, microscopy for mobility assessment, and eosin staining and visualization by microscopy for viability. The results allowed us to point out that the peaks of sexual hormones develop between the end of winter and the beginning of spring, corresponding to the period of greatest reproductive interest for the species. It was possible to establish that the size of EVs *in vivo* (in NP, PP and PP in O) depends on the ovulatory state and is independent of the photoperiod and tissue, while the concentration is dependent on the photoperiod and tissue. Regarding the size of EVs from in vivo and in vitro samples (in PP with and without O), it depends on the ovulatory state and the origin of the sample, while the concentration only depends on the origin of the sample. Regarding the protein content of EVs, it depends mainly on the origin of the samples, validating the oviductal washing method (*in vivo*) over the *in vitro* method, observing a differential expression (ANXA5, STX2, LZTFL1, STXBP1, ATP2B4, RAB34, APOB, TTLL3) regarding the biological functions of sperm motility and acrosomal reaction. In relation to the co-incubation of UVJ EVs with sperm, internalization could be established after 2 hours, with conservation of viability and reduction of motility as a function of time. In this way it can be established that there are reproductive cycles defined according to the seasonal photoperiod, with EVs secreted depending on the reproductive state, origin of the sample and oviductal tissue, with greater fidelity of the secretory reality from oviductal washing samples, with EVs that transport proteins important for sperm function, positively collaborating in their viability and mobility.

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES REPRODUCTIVOS DEL PAVO MACHO (*Meleagris gallopavo*)

1.1. Espermatogénesis

1.1.1. Espermatocitogénesis. La espermatocitogénesis es la primera etapa que compone a la espermatogénesis, y considera la división de las células madre germinales, llamadas espermatogonias, para la producción de células madre de reemplazo y la generación de las células que se convertirán en espermatozoides (Gordon, 2005). La espermatocitogénesis comienza con la mitosis de una espermatogonia Ad como la célula madre precursora de las células hijas Ad y Ap1, de este modo cada célula Ap1 genera espermatogonias Ap2, espermatogonias B, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios derivadas de la primera división meiótica (n = 16) y espermátidas a partir de la segunda división meiótica (Lin y Jones, 1992; Asano y Tajima, 2017).

1.1.2. Espermiogénesis. La espermiogénesis corresponde a la segunda fase que constituye la espermatogénesis, periodo en que las espermátidas redondas haploides experimentan una diferenciación de carácter morfológico para así transformarse en espermatozoides (Sauveur, 1992; Gordon, 2005; Sturkie, 2015). La transformación se desarrolla a medida que los espermatozoides se movilizan hacia la región luminal de los túbulos seminíferos (Gunawardana y Scott, 1977). De este modo la espermátida circular, que contiene un núcleo, aparato de Golgi, centriolos y mitocondrias, madura morfológicamente mediante una serie de pasos que consideran la formación de estructuras accesorias y condensación nuclear (Aire, 2014). Las transformaciones morfológicas implican la formación de un acrosoma y un axonema, la pérdida de citoplasma y el reemplazo de histonas por protaminas, que acompaña a la condensación nuclear (Gunawardana y Scott, 1977; Sprando y Russell, 1988). Los espermatozoides liberados presentan una baja o nula movilidad (Ashizawa y Sano, 1990), poseen aspecto vermiforme, acrosoma cónico, un núcleo cilíndrico ligeramente doblado y una hélice de 25 a 30 mitocondrias que rodean la porción proximal de un flagelo largo, en los pavos se

ha descrito que el flagelo representa aproximadamente el 84 % de la longitud de la célula, un ancho máximo de 0,5-0,7 µm y una longitud de 75-90 µm (Thurston y Hess, 1987).

1.1.3. Transporte extra gonadal y maduración. El transporte de los espermatozoides dura varios días al interior de los conductos espermáticos, asociándose a la presión hidrostática del líquido tubular y la contractibilidad mioepitelial de la superficie externa en los túbulos seminíferos (Rothwell y Tingari, 1973; De Reviers, 1975). Mientras que el transporte en los conductos distales, principalmente el conducto deferente, depende de reacciones peristálticas. Respecto a la movilidad, estudios en codorniz japonesa han descrito aumentos en el movimiento flagelar de espermatozoides que ingresan al epidídimo (Nixon *et al*., 2014), mientras que en el gallo se ha descrito que los espermatozoides permanecen inmóviles antes de la eyaculación (Hafez y Hafez, 2000).

En mamíferos se ha descrito que el epidídimo se relaciona con los procesos de maduración funcional de los espermatozoides (Cornwall y Hann, 1995), relacionanadose con la incorporación de proteínas funcionales y miARN mediante vesículas extracelulares (EVs) (Govindaraju, 2012; Sullivan, 2015). En el caso de las aves, se ha descrito que los espermatozoides desarrollan una maduración gradual, en la que adquieren las habilidades para la fertilización mediante el transito genital, previo a la eyaculación (Ahammad *et al*., 2011a, Ahammad *et al*., 2011b). Aunque actualmente se desconocen los mecanismos involucrados en los cambios funcionales del espermatozoide aviar (Sturkie, 2015; Asano y Tajima, 2017), se ha señalado que la incorporación de proteínas y fragmentos de material genómico, secretados por el epidídimo, proporcionaría las funciones necesarias para la fertilización (Asano y Tajima, 2017; Xu *et al*., 2017).

1.2. Control hormonal

1.2.1. Control central de la función testicular**.** El desarrollo de la espermatogénesis, la actividad de las células de Sertoli, así como las interacciones entre las células germinales y las células de Sertoli, dependen de la presencia de testosterona y FSH (Sharpe, 1994). Sin embargo, se describe un control más importante, que depende de la actividad neurosecretora, que a su vez es afectada por estímulos somáticos y ambientales, que afectan la secreción de gonadotropina de forma estacional (Wingfield *et al*., 1992), donde la cantidad de horas de luz en un día resulta ser el principal factor que estimula el desarrollo de la espermatogénesis en aves galliformes como el pavo doméstico (Kuenzel, 1993). De este modo los fotoreceptores involucrados en la respuesta fotoperiódica se involucran con el hipotálamo basal medial, mediante inervaciones directas de las neuronas GnRH por fotorreceptores encefálicos (Saldanha *et al*., 2001) o a través de la pars tuberalis de la adenohipófisis (Yasuo y Yoshimura, 2009; Yoshimura, 2006, 2010).

1.2.2. Efectos de las gonadotropinas en la función testicular. Las gonadotropinas ejercen efectos sobre los testículos, mediante la unión a receptores específicos de la superficie en las células de Leydig, con una mayor vinculación a LH, y células de Sertoli, con mayor asociación a FSH, hormonas esenciales para el desarrollo de la espermatogénesis en aves galliformes (Sauveur, 1992). De este modo, la hormona LH estimula a las células de Leydig para efectuar la secreción de enzimas que generen la producción de andrógenos (Johnson, 1986), incluyendo testosterona y androstenediona, un precursor de testosterona (Galli *et al*., 1973; Sharp *et al*., 1977). La secreción de testosterona sigue muy cercana los pulsos de LH (Vizcarra *et al*., 2004), relacionándose en el macho adulto con la espermatogénesis, la mantención de los conductos deferentes, atributos sexuales secundarios, expresión del comportamiento reproductivo y la alteración en el patrón de secreción de GnRH acciones que junto a la inhibición hormonal dependen de la transformación de testosterona mediada por enzimas como la aromatasa, la 5α-reductasa y la 5β-reductasa (Balthazart, 1989; Ottinger, 1983).

Respecto a la vinculación de la hormona FSH con las células de Sertoli, se desconoce mayor información respecto al método en que interactúa y ejerce su función en aves, sin embargo, estudios en otros vertebrados, han determinado que la unión activa al menos cinco vías de señalización celular, vinculadas con el tamaño testicular y la proliferación celular (Vizcarra *et al*., 2010), potenciando su efecto frente la presencia de testosterona (Walker y Cheng, 2005).

1.3. Capacitación espermática

Los espermatozoides de mamíferos, en condiciones *in vitro,* son incapaces de fecundar después de la eyaculación, requiriendo de un lapso de permanencia en el tracto reproductor femenino (Chang, 1951; Austin, 1951). Dicha permanencia es requerida para generar un proceso de capacitación, involucrado en la modificación de aspectos como la composición lipídica (Davis, 1976), la permeabilidad y fluidez de la membrana espermática (Abou-haila y Tulsiani, 2009), activación de vías de señalización complejas (Visconti *et al*., 1995a; Visconti *et al*., 1995b) y mejora de la respuesta acrosomal (Cross, 1999; Iborra *et al*., 2000). En cuanto a las aves, no ha sido descrito un proceso de capacitación similar, generándose la reacción acrosomal directamente en la membrana perivitelina que rodea el óvulo aviar (Ashizawa *et al*., 2004, Ashizawa *et al*., 2006; Lemoine *et al*., 2008).

La falta de capacitación en los espermatozoides aviares se refuerza por antecedentes que señalan la capacidad fecundante de éstos, al ser extraído directamente del testículo y depositarse en el magnum del oviducto de la hembra, generando así una reacción acrosomal inmediata al contactar la membrana perivitelina del ovocito (Lemoine *et al*., 2008). Además, otros estudios han descrito que espermatozoides inseminados vaginalmente, posterior a la ovoposición, pueden atravesar el oviducto y fecundar un ovocito en aproximadamente 15 minutos (Bobr *et al*., 1964), tiempos de fecundación que coincidieron con espermatozoides de gallo (Fujihara *et al*., 1973) y de pavo (Howarth y Palmer, 1972). Una alta velocidad de migración al interior del oviducto (Bobr *et al*., 1964), producto del breve intervalo de tiempo, de alrededor de 15 minutos, del que disponen los espermatozoides para fertilizar el ovocito *in vivo* (Bakst *et al*., 1994) y los 2,5 minutos

(Robertson *et al*., 1997), que tardan los espermatozoides en iniciar la penetración del ovocito *in vitro*. Dichos antecedentes hacen pensar que los espermatozoides aviares no requieren un periodo de capacitación, ya que son competentes para fertilizar el óvulo sin permanecer largos periodos de tiempo en el aparato reproductor de la hembra o en medios de capacitación *in vitro*, e incluso al extraerse directamente del testículo (Wishart y Horrocks, 2000; Lemoine *et al*., 2008).

Del mismo modo, la naturaleza aparentemente menos compleja que involucra a los eventos de interacción espermatozoide/ovocito en las aves, podrían explicarse por un proceso de maduración espermática breve y presumiblemente menos dificultoso, al ser comparado con los procesos homólogos en mamíferos (Howarth, 1995). Es así como los acotados cambios que sufren los espermatozoides aviares durante la maduración, en el aparato reproductor del macho, han llevado a pensar que la capacitación espermática sea menos importante e incluso innecesaria para la fertilidad aviar (Howarth, 1984; Howarth, 1995). Considerando la probable incapacitación espermática descrita al interior de los túbulos de almacenamiento espermático (TAE) (Bakst y Bauchan, 2015) y la rápida activación al momento del transporte espermático al sitio de fecundación y su posterior fertilización (Bobr *et al*., 1964; Wishart y Horrocks, 2000).

2. ANTECEDENTES REPRODUCTIVOS DE LA HEMBRA DE PAVO (*Meleagris gallopavo*)

2.1. Anatomía e histología del aparato reproductor

La formación del huevo involucra la participación de dos estructuras anatómicas impares, el ovario izquierdo para la yema y el infundíbulo izquierdo para el albumen y la cáscara, siendo la ovulación el proceso que permite la continuidad de una estructura a la otra (Sauveur, 1992; North y Bell, 1993; Dyce *et al*., 2007; Sturkie, 2015).

2.1.1. Ovario. La estructura del ovario, funcionalmente maduro, está organizada por una jerarquía evidente de folículos (Sturkie, 2015), observándose el aspecto de un racimo de uvas, sin una definición clara de médula y corteza. Posee numerosos folículos pequeños

en fase de crecimiento lento (Sturkie, 2015), encontrándose más de 1000 folículos ováricos “pequeños blancos”, de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro, compuestos por una base lipídica (Sauveur, 1992; Gilbert, 1979; Etches, 1996). Se describen alrededor de 20 folículos “blancos grandes” en fase intermedia, de alrededor de 6 a 8 mm (Gilbert, 1979; Etches, 1996; Sturkie, 2015), formados por una estructura llamada vitelo blanco, en base a lípidos y proteínas (Sauveur, 1992). Los folículos preovulatorios grandes, en fase de crecimiento acelerado, y portadores de sus respectivas yemas (Sturkie, 2015), depositadas mediante anillos concéntricos de lípidos y proteínas (Sturkie, 1968), se encuentren en tamaños de orden decreciente, donde F1 es el más grande y próximo a la ovulación, encontrándose desde 4 a 8 folículos disponibles (Gilbert, 1979; Etches, 1996; Sturkie, 2015) y 1 o 2 folículos postovulatorios vacíos (Sauveur, 1992).

2.1.2. Oviducto. Corresponde a un conducto estrecho que se extiende desde el ovario a la cloaca, compuesto de 7 capas, presentes a lo largo de toda su estructura (Sauveur, 1992; Nys y Guyot, 2011), que desde la zona luminar hacia el exterior corresponden al epitelio secretor, lámina propia, capa de tejido conectivo interno, capa de fibras musculares circulares, conectivo externo, capas de fibras musculares longitudinales y capa serosa externa (Gilbert, 1979; Sauveur, 1992; Etches, 1996). El epitelio secretor del oviducto corresponde a una capa unicelular que cubre los repliegues y se compone de células ciliadas y células caliciformes o mucosas, en varias proporciones de acuerdo al segmento en que se encuentren (Sauveur, 1992; Nys y Guyot, 2011). Mientras que la lámina propia alberga las glándulas tubulares pluricelulares (Sauveur, 1992), formadas por invaginaciones superficiales de aspecto ramificado, ausentes en la unión de las secciones oviductales del magnum e istmo (Wyburn *et al*., 1970; Nys y Guyot, 2011). Respecto a la síntesis de secreciones al interior del oviducto, se ha determinado que sólo las células caliciformes y las glándulas tubulares son responsables de dicha tarea, mientras que las células ciliadas podrían estar involucradas en el transporte espermático (Sauveur, 1992; Nys y Guyot, 2011).

2.1.2.1. Infundíbulo. Se describe como una zona con paredes finas con forma de embudo y repliegues en la mucosa interna, no conectado directamente al ovario (Sauveur, 1992;

Sturkie, 2015). Su función radica en la recepción de la yema al momento de la ovulación, ser el sitio donde se efectúa la fertilización y generar el depósito de la capa extravitelina (Sauveur, 1992; North y Bell, 1993; Sturkie, 2015). La porción anterior del infundíbulo, más delgada y expandida, es particularmente activa en el momento de la ovulación, rodeando el folículo ovárico dominante y atrapando el óvulo liberado mediante contracciones musculares (Wishart y Horrocks, 2000; Nys y Guyot, 2011). Sin embargo, su actividad envolvente parece no estar controlada por la ovulación, ya que es capaz de absorber cuerpos extraños colocados en la cavidad abdominal previo a una ovulación (Sturkie, 1968; 2015). Respecto a las seccionas más internas del infundíbulo, se ha descrito la presencia de túbulos de almacenamiento espermático (TAE) secundarios, presentes en la mayoría de las hembras aviares (Wishart y Horrocks, 2000), que favorecen la conservación espermática durante la espera del ovocito para efectuar la fertilización. La yema permanece alrededor de 18 minutos al interior del infundíbulo (Wolford *et al*., 1964), proporcionando un tiempo de fertilización de aproximadamente 15 minutos (Bakst *et al*., 1994), previos al bloqueo mecánico del disco germinal producto de la formación de la capa extravitelina (Wishart y Horrocks, 2000). La capa extravitelina corresponde a una capa delgada de entre 10 a 12 mm de grosor (Nys y Guyot, 2011), compuesta de pequeñas fibras similares a las que conforman el albumen denso, protegiendo a la yema de las transferencias de agua provenientes del albumen (Sauveur, 1992). Cumplido el periodo señalado, la yema inicia un movimiento rotatorio en su eje longitudinal, que permiten su avance hacia las demás secciones del oviducto (Sturkie, 1968).

2.1.2.2. Magnum. Es la sección más larga del oviducto, con paredes gruesas y elásticas, capas musculares bien desarrolladas y grandes pliegues superficiales (4 a 5 mm de altura), posee coloración y aspecto fluctuante, entre blanco lechoso y gris claro translúcido, de acuerdo a la secreción proteica y el paso del huevo, sección que posee la mayor dotación de células y glándulas secretoras (Sauveur, 1992; Nys y Guyot, 2011; Dyce *et al*., 2007; Sturkey, 2015). Su función radica en la secreción de albumen, descrita como una solución acuosa compuesta de un 88% de agua, encontrando un 90% de proteínas, 6% de minerales y 3,5% de glucosa libre en la fracción sólida (Sauveur, 1992; Nys y Guyot, 2011). A diferencia de los constituyentes de la yema, que son sintetizados

y secretados a nivel hepático durante un periodo que tarda entre 8 a 10 días, las proteínas de albumen son sintetizadas y secretadas localmente en el magnum en un periodo corto inferior a dos días (Sturkey, 2015). La síntesis proteica se genera de forma continua, acumulando un volumen proteico para dos huevos, independiente de la presencia de un huevo en el oviducto, acelerando a medida que aumenta la concentración de ARNm durante el paso del huevo en formación (Muramatsu *et al*., 1991).

La síntesis de las proteínas de albumen se relaciona directamente con la regulación multi hormonal de hormonas esteroidales (Gilbert, 1979; Strkie, 2015). Donde la presencia de receptores específicos para estrógenos, progesterona, testosterona y glucocorticoides permite la formación de complejos hormona-receptor, los que se internalizan en las células epiteliales (Nys y Guyot, 2011), y mediante la unión a sitios específicos de manera retrógrada en la secuencia de codificación (Chambon *et al*., 1984), inducen la producción de ARNm para la síntesis de las proteínas de albumen (Nys y Guyot, 2011). Se ha descrito que las proteínas ovoalbúmina y ovotransferrina son inducidas por estrógenos, progesterona, y en menor medida, por glucocorticoides y testosterona (Chambon *et al*., 1984; Nordstrom *et al*., 1993) mediante un efecto sinérgico. Sin embargo, la proteína avidina, al contrario de lo mencionado, depende estrictamente de la progesterona (Joensuu *et al*., 1990). La síntesis proteica del albumen continúa con el proceso estándar que efectúan las células secretoras, basado en la síntesis reticular, la empaquetadura en gránulos secretados por el aparato de Golgi, la fusión de vesículas pequeñas en gránulos grandes en la región celular apical y la liberación mediante la fusión con la membrana celular (Nys y Guyot, 2011).

La mucosa del magnum se describe con un epitelio superficial de una altura con aumento progresivo hacia la región del istmo (de 10 a 30 µm) y una alternancia característica entre células ciliadas, que generalmente muestran poca evidencia de actividad secretora, y células no ciliadas granulares, con agregados prominentes de material secretor de aspecto espumoso, a menudo con forma de gránulos bien definidos (Wyburn *et al*., 1970; Bakst y Howarth, 1975). Se ha señalado que las células caliciformes, glándulas unicelulares del tipo globoso de la superficie del magnum, son las responsables de la

secreción de ovomucina y avidna (Sturkie, 1968; Wyburn *et al*., 1970; Tuohimaa *et al*., 1989; Sauveur, 1993; Sturkie, 2015). Las glándulas tubulares se encuentran bajo el epitelio superficial, con tejido glandular secretor (Wyburn *et al*., 1970), compuesto por células no globosas aciliadas (Sauveur, 1992), que se extiende desde la base hasta la superficie glandular, donde las células se vuelven continuas al fusionarse con el epitelio de cobertura (Wyburn *et al*., 1970). Se ha descrito que las glándulas tubulares son las responsables de la síntesis de ovoalbúmina, ovotransferrina, ovomucoide y lisozima, principales proteínas de albumen, que alcanzan el 80% de la secreción proteica total (Sturkie, 1968; Nys y Guyot, 2011; Sturkie, 2015).

Respecto a la secreción y depósito de las proteínas de albumen sobre la yema, estas son expulsadas a la luz tubular mediante el estímulo mecánico, no estrictamente esencial para su liberación (Sauveur, 1992), aparentemente independiente del control nervioso u hormonal (Nys y Guyot, 2011) provocado por la distención tisular que genera el paso de la yema (Sauveur, 1992). La liberación proteica fluctúa en torno al 50% del total sintetizado (Muramatsu *et al*., 1991), es lineal y proporcional a las cantidades estándar que requiere el huevo (Nys y Guyot, 2011).

2.1.2.3. Istmo. Presenta un diámetro ligeramente más reducido que el magnum, distinguiéndose fácilmente de éste mediante una línea de demarcación. Posee una capa muscular gruesa y una capa de tejido glandular con repliegues menos acentuados, de menor número y tamaño (Sturkie, 1968; Sauveur, 1992; Sturkie, 2015). El istmo se divide en una zona proximal llamada istmo blanco y una zona distal más vascularizada llamada istmo rojo (Sauveur, 1992). La superficie del istmo proximal se caracteriza por presentar un elevado número de glándulas tubulares, semejante a las glándulas magnales, pero disímiles en la estructura que compone el material secretor, observándose secreciones proteicas filamentosas, correspondientes a las fibras de colágeno tipo X (Wyburn *et al*., 1970; Fernández *et al*., 1997; Nys y Guyot, 2011; Fernández *et al*.,2000). Dichas fibras proteicas dan origen a la formación de las membranas testáceas, o membrana interna y externa del cascarón (North y Bell, 1993; Sturkie, 2015), mediante el recubrimiento constante de fibras proteicas, que en contacto con las moléculas de agua, se dilatan formando redes muy densas (Sauveur, 1992). El istmo rojo posee glándulas tubulares,

similares a las del istmo blanco (Wyburn *et al*., 1970), responsables de generar la secreción de fibras proteicas que darán origen a la capa mamilar, correspondiente a la base de la matriz orgánica de la cáscara, que se une fuertemente a la membrana testácea externa (Sauveur, 1992). Finalmente se da inicio a la cristalización e incorporación del carbonato de calcio (Sauveur, 1992; Sturkie, 2015), mediante pequeñas acumulaciones en la superficie de las membranas del cascarón, correspondientes a los sitios de iniciación de los depósitos de calcio en el útero (North y Bell, 1993). Debido a su estructura y funcionalidad, se a sugerido que el istmo rojo podría ser parte del útero, en lugar de categorizarse dentro de la sección del istmo (Nys y Guyot, 2011).

2.1.2.4. Útero o glándula del cascarón. Posee forma buciforme, mucosa de color rojo oscuro y un destacado espesor de la pared y la capa muscular longitudinal (Nys y Guyot, 2011). Sus pliegues internos presentan escasa continuidad, además de una serie de protuberancias transversales, que hacen de las paredes uterinas un relieve extraordinariamente complejo, permitiendo una fácil identificación visual de la estructura. (Stutkie, 1968; Sauveur, 1992; Dyce *et al*., 2007) Al igual que el magnum, el epitelio uterino se compone de células ciliadas, células caliciformes y glándulas tubulares, donde cada tipo celular posee cierta especificidad de acción respecto a la formación de la cáscara del huevo (Sauveur, 1992; Sturkie, 2015). Una vez dentro del útero, el huevo permanece allí un tiempo aproximado de 20 horas (Wishart y Horrocks, 2000), concretando la etapa de hidratación del óvulo blando y la formación de la cáscara del huevo (Nys y Guyot, 2011).

El huevo continúa su proceso de hidratación, incorporando lo que se conoce como líquido uterino acuoso (Sturkie, 1968), compuesto por moléculas de agua, anhidrasa carbónica, fosfatasa ácida y esterasas, además de una sección mineral compuesta por bicarbonato, sodio y potasio (Salevsky y Leach, 1980; Sauveur, 1992; North y Bell, 1993; Sturkie, 2015). Dicho proceso, sumado a un lento movimiento de rotación, permiten completar la hidratación del albumen, aumentando el volumen del huevo hasta llegar a su tamaño final (Wishart y Horrocks, 2000), y transformar el albumen denso inicial en las distintas capas de albumen. De este modo se genera el albumen denso, albumen fluido

interno, albumen fluido externo y las chalazas, duplicando el volumen de albumen inicial y tensando las membranas de cobertura hasta quedar en estrecho contacto con la mucosa uterina (Sauveur, 1992; Sauveur, 1993; North y Bell, 1993; Nys y Guyot, 2011).

En paralelo y posterior al proceso de hidratación de la clara, continúa el proceso de cristalización del carbonato de calcio para la formación de la cáscara (Sauveur, 1992; Nys y Guyot, 2011). La calcificación se asocia a estímulos iniciados por la ovulación o a factores neuroendocrinos, que controlan y coordinan la ovulación como la secreción de calcio. El calcio es transportado por la proteína calbindina, activando su producción al inicio de la formación del huevo en el oviducto y culminado con la ovoposición. El proceso de calcificación en el útero posee un inicio lento, luego acelera hasta 300 mg/h, para volver a disminuir. La proteína osteopontina, secretada para ser incorporada en la cáscara, se relaciona con la integridad estructural de la cáscara y con la terminación del proceso de calcificación (Sturkie, 2015). La calcificación culmina con un enriquecimiento de fosfatos en el líquido uterino, inhibiendo la cristalización del carbonato de calcio, y su respectivo depósito en la superficie del cascarón (Sauveur, 1992).

Los pigmentos, provenientes de la transformación de la hemoglobina por las células uterinas, son depositados a través de células ciliadas, en la capa superficial del huevo al finalizar la cristalización (Sauveur, 1992; Sturkie, 2015). Finalmente se agrega la cutícula orgánica, correspondiente a la última capa formada en el útero y sobrepuesta al cascarón, pudiendo estar pigmentada y presentarse en forma de manchas (Sauveur, 1992; North y Bell, 1993). Su función radica en la humectación durante la ovoposición y la prevención de intercambios gaseosos e ingreso de microorganismo, al ser expuesto el huevo al medio externo (North y Bell, 1993).

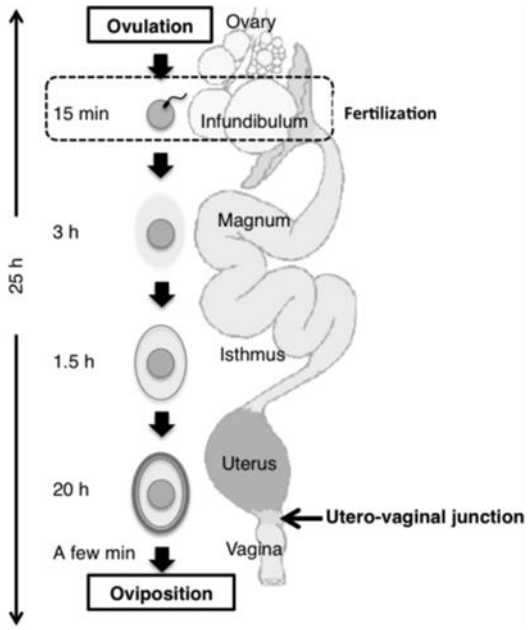

Figura 1. Dibujo esquemático de un oviducto aviar, la dinámica de formación del huevo y el sitio de fertilización (Sasanami *et al*., 2013).

2.1.2.5. Vagina. Corresponde a una estructura con paredes musculares estrechas y un trayecto acotado, con numerosos repliegues de la mucosa longitudinal (Sauveur, 1992; Nys y Guyot, 2011; Sturkie, 2015), revestida por células ciliadas y no ciliadas, y algunas glándulas de la mucosa tubular que pueden tener una función secretora (Sturkie, 2015). Se separa del útero por el músculo del esfínter úterovaginal, estructura fibrosa gruesa, y culmina en la región izquierda del urodeum cloacal (Sauveur, 1992; Sturkie, 2015). La mucosa de la unión útero vaginal posee TAE especializados, con diámetros superiores al que poseen las glándulas tubulares uterinas (Bakst *et al*., 2010; Nys y Guyot, 2011), mientras que la mucosa vaginal, carente de TAE, posee una función en la regulación del transporte espermático (Bakst *et al*.1994), funcionando además como sitio de transferencia de semen en la inseminación artificial (Bakst y Akuffo, 2008b). Si bien no participa en el proceso de formación del huevo, en coordinación con el útero, se encarga del proceso de la ovoposición (Sturkie, 2015), efectuada mediante la relajación de la musculatura lisa de la unión útero vaginal y la contracción vaginal (Gilbert, 1979; Etches, 1996).

2.2. Túbulos de almacenamiento espermático (TAE)

Las pavas, como las gallinas y otras hembras aviares, poseen la particularidad de presentar una “fertilización sostenida” en el tiempo (Bakst, 1998; Sasanami *et al*., 2013), dependiente de la capacidad de la hembra para almacenar y liberar esperma en el transcurso de los ciclos ovulatorios sucesivos diarios (Bakst, 1993; Bakst *et al*., 2010), como posible respuesta a la ausencia de un ciclo de celo que indique al macho el momento cercano a la ovulación (Bask, 2009). Dicha capacidad es conferida por estructuras especializadas, llamadas “túbulos de almacenamiento espermático”, mostradas en la Figura 2 (Sauveur, 1992; Bakst *et al*., 2010; Sturkey, 2015), punto focal de la fertilidad en las especies aviares, correspondientes a invaginaciones tubulares submucosas especializadas, que forman un sistema de glándulas complejo y versátil, del epitelio de la superficie de la unión uterovaginal (Bakst, 1987; Bakst *et al*., 1994; Zaniboni y Bakst, 2004; Bakst *et al*., 2010; Foye-Jackson *et al*., 2011). El almacenamiento espermático en los TAE permite prescindir de un alto número de cópulas sincronizado con el alto número de ovulaciones, además de proteger y favorecer el almacenamiento de esperma “seleccionado” (Bask, 2009; Sturkie, 2015). Si bien la localización de los TAE, como sitio principal del almacenamiento espermático ha sido descrito en la mucosa de la unión úterovaginal (Sauveur, 1992; Sturkey, 2015), también se han descrito estructuras similares a los TAE en la región infundibular (Bakst, 1994; Bakst *et al*., 1994) y la región cloacal del urodeum y el proctodeum ventral, estas últimas descritas sólo en las pavas (Bakst y Akuffo, 2008a). El término cloaca corresponde a una región anatómica, presente en las aves, subdividida en tres secciones diferentes, que nombrándolas de acuerdo al órden anteroposterior, corresponden al coprodeum, donde converge el intestino grueso, el urodeum, donde desembocan los uréteres y el oviducto izquierdo, y el proctodeum, que conduce al exterior mediante el orificio anal (Barioglio, 2001).

2.2.1. Morfología e histología de los TAE. Se ha descrito que el número aproximado de TAE de la región úterovaginal en las hembras de *Meleagris gallopavo* fluctúa entre 20.000 y 24.000 unidades (Goodrich-Smith y Márquez, 1978; Birkhead y Møller 1992b),

mayor al número descrito en hembras de la especie *Gallus gallus*, reportados con un aproximado de 13.500 TAE (Birkhead y Møller 1992b).

Los TAE de pava, localizados en la región proximal de los pliegues de la unión útero-vaginal, son notablemente cortos, algunos de no más de 40 µm de longitud, similares a las descritas en gallinas de engorda. Sus epitelios se caracterizan histológicamente por la presencia de células más cuboidales que columnares, y por la ausencia del extenso material lipídico característico de los epitelios columnares de los TAE que recubren las regiones media y distal (Bakst y Vinyard, 2002; Bakst *et al*., 2010). Los TAE de pava, en la región media de la unión útero-vaginal, se caracterizan por presentar una longitud de hasta 900 µm y una morfología pleomórfica que posee túbulos rectos, enrevesados o enrollados (Bakst, 1987; Bakst y Vinyard, 2002; Bakst *et al*., 2010). Dichas características difieren de las tipologías descritas para los TAE pertenecientes a gallinas de engorda, con longitudes de hasta 700 µm y morfología recta o curvada (Bakst *et al*., 2010). En cuanto a los TAE de la región distal de los pliegues de la unión útero-vaginal, se han descrito con características similares a los TAE de la región media, pero con menor densidad de distribución, disipándose gradualmente hacia la vagina (Bakst *et al*., 2010).

La altura estándar de las células epiteliales de los TAE varía de 18 a 22 µm y los diámetros exteriores de los túbulos son de aproximadamente 45 a 50 µm (Schuppin *et al*., 1984; Bakst *et al*., 1994; Kingg *et al*., 1999). La mucosa superficial de los TAE, cercana al epitelio pseudoestratificado de células secretoras ciliadas y no ciliadas de la unión útero-vaginal, se compone de una mono capa de células ciliadas (Sauveur, 1992; Bakst *et al*., 2010; Sturkie, 2015), interrumpida por microfoldes laterales, caracterizados como surcos estrechos de hasta 800 µm de largo, con células epiteliales ciliadas fuertemente apiladas (Bakst *et al*., 2010). Por otra parte, el epitelio medio e interno de los TAE, se describe compuesto por una capa de células columnares (18-20 µm de alto), unidas por desmosomas e interdigitaciones complejas, no ciliadas y no secretoras, con numerosas mitocondrias alargadas, retículos endoplasmáticos rugosos dispersos, vacuolas de lípidos supranucleares prominentes (Schuppin *et al*., 1984; Bakst *et al*., 1994; Bakst *et al*., 2010; Bakst y Bauchan, 2015), que se cree contienen colesterol,

ésteres de colesterol y fosfatidil etanolamina (Wall, 1975), y microvellosidades de diverso ancho (0,120 a 0,160 µm) y alto (0,8 a 2,0 µm), activas, con desprendimiento de vesículas extracelulares (EV), e inactivas (Schuppin *et al*., 1984; Bakst *et al*., 1994; Bakst y Bauchan, 2015).

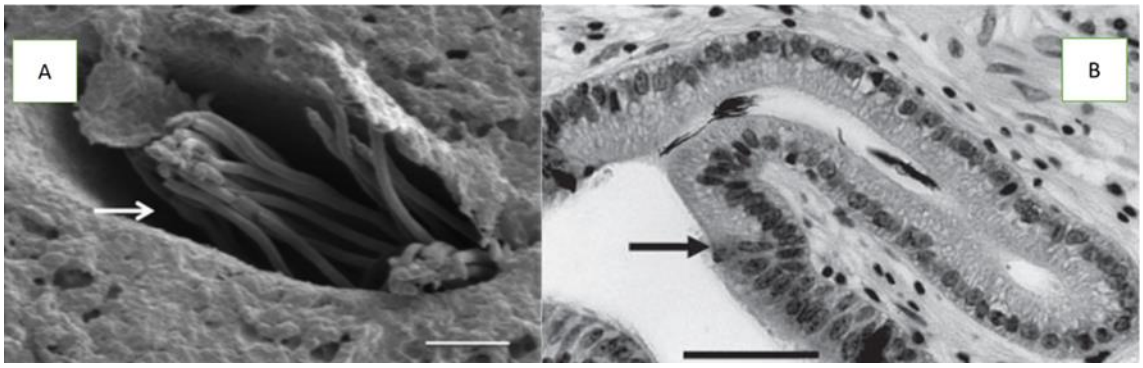

Figura 2. Imágenes de los túbulos de almacenamiento espermático. A: imagen ultraestructural de los espermatozoides residentes en los TAE, la flecha indica donde se encuentran los espermatozoides. Bar 2,5 µm (Sasanami *et al*., 2013). B: epitelio de un TAE con espermatozoides residentes, la flecha indica la transición abrupta del epitelio tubular hacia el epitelio de la luz de la unión útero vaginal. Bar 50 µm (Bakst *et al*., 2010).

2.2.2. Transporte y selección de espermatozoides para su ingreso a los TAE. Debido al desconocimiento referente a las interacciones celulares y moleculares precisas que permiten el desarrollo de los mecanismos involucrados en el transporte y selección de los espermatozoides para su ingreso a los TAE, se han formulado una serie de hipótesis alternativas (Zaniboni y Bakst, 2004; Bakst y Akuffo, 2008a). Esto en base al conocimiento inicial, que señala sólo el ingreso de espermatozoides móviles y morfológicamente normales al interior de los TAE, tras la monta natural o inseminación artificial (Allen y Grigg, 1958).

De este modo, respecto al transporte espermático en las pavas, se especula la existencia de una acumulación de espermatozoides inicial en los TAE de las regiones cloacales del urodeum y proctodeum, para ser posiblemente transportados por secreciones tubulares hacia los TAE principales, localizados en el esfínter útero-vaginal (Bakst y Akuffo, 2008a).

Por otra parte, en relación a las hipótesis referentes a la selección espermática, se postula que los espermatozoides sufren un proceso de selección intensiva al interior de la vagina, relacionado con la movilidad superior a la hora de atravesar un medio viscoso, siendo la motilidad el principal factor de selección (Sauveur, 1992; Bakst y Akuffo, 2008a).

Otras investigaciones apuestan a un proceso de selección relacionado a una posible inmunorespuesta respecto a los espermatozoides inseminados en la región vaginal. Suposición respaldada por ciertos reportes que señalan el aumento en el número de leucocitos, linfocitos polimorfonucleares, en la vagina y la unión útero-vaginal posterior al proceso de cópula (Higaki *et al*., 1995), y aumento significativo en la expresión de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II), en la región infundíbular posterior a la inseminación artificial (Zheng *et al*., 2001).

Otra hipótesis, respecto a la selección espermática, se asocia con la "elección críptica de la hembra" (Bakst y Akuffo, 2008a), conceptos que hacen referencia a la elección de la hembra postcopulatoria, que considera todos los eventos que siguen al inicio del acoplamiento genital, antecedentes evidenciables en todo el reino animal (Eberhard, 1996). De este modo, se ha descrito que las hembras poseen diversos mecanismos para efectuar elecciones de paternidad (Eberhard, 1996), algunos relacionados directamente con el aparato reproductor masculino (Tallamy *et al*., 2002), otros involucrados con el comportamiento o respuesta fisiológica de la hembra (Thornhill, 1983), algunos asociados con los gametos femeninos y otros con mecanismos involucrados directamente con la intervención espermática, donde la hembra descarta, digiere o frena el transporte de los espermatozoides provenientes de algunos machos (Briceño y Eberhard, 2009). A partir de lo anterior, se especula que en las aves los espermatozoides destinados a la fertilización son seleccionados por el aparato reproductor de la hembra, pudiendo corresponder a un mecanismo comandado por el sistema nervioso central o por elementos locales, mediante la captación de señales detectables en el esperma o plasma seminal que pudiesen ser recepcionadas por las células luminares epiteliales (Bakst y Akuffo, 2008a). Dicha especulación podría verse respaldada por antecedentes que señalan la incapacidad de los espermatozoides para superar la barrera vaginal e

ingresar a los TAE, producto de la reducción en su migración, cuando se muestran características superficiales inapropiadas, por la alteración de glucoproteínas de superficie, como por la presencia de espermatozoides de otra especie con diferente antigenicidad superficial (Wishart y Horrocks, 2000).

Sea cual fuese el mecanismo de selección de espermatozoides al interior de la vagina, se ha descrito que éste reduce significativamente el porcentaje de espermatozoides depositado en los TAE de la unión útero-vaginal (Bakst *et al*., 1994; Bakst y Akuffo, 2008a; Bakst *et al*., 2010; Sturkey, 2015). De este modo, del total de espermatozoides inseminados (entre 200 y 350 × 10^6 espermatozoides aproximadamente), morfológicamente normales, sólo ingresa el 2% de los espermatozoides en los TAE de las hembras de pavo (Brillard y Bakst, 1990; Sturkey, 2015) y el 1% en el caso de las gallinas (Brillard, 1993; Sturkey, 2015), considerando un lapso de 24 h posterior a la inseminación (Bakst *et al*., 2010). No obstante, este porcentaje, relativamente pequeño, se correlaciona positivamente con el número de espermatozoides incrustados en la membrana vitelina, circundante al disco germinal, y la duración de la fertilidad (Brillard y Bakst, 1990; Bakst *et al*., 2010; Sturkey, 2015).

El tiempo de llenado de los TAE de la unión útero-vaginal, a partir del momento de la inseminación, depende del estado reproductivo en el que se encuentre la hembra, de este modo, si son inseminadas antes del inicio de la producción de óvulos sólo tardarán cuatro horas para que el número máximo de espermatozoides, aproximadamente 4,1 × 10^6, ingrese a los TAE. Sin embargo, si la hembra inseminada ya inició su producción de huevos, se necesitarán al menos 48 h para que el número máximo de espermatozoides, aproximadamente 2 x 10^6, ingrese a los TAE (Brillard y Bakst, 1990). Durante este periodo, de llenado persistente, se ha comprobado que los espermatozoides residen en los TAE del urodeum, empleando dichos túbulos como sitios de almacenamiento temporal, comprobándose una permanencia de hasta 36 h después de la inseminación. El ingreso de un menor número de espermatozoides durante un mayor periodo de tiempo podría explicarse por un aumento de la eficiencia en el proceso de selección espermática, efectuado por la vagina (Bakst y Akuffo, 2008b), o un aumento en la

dificultad de avance de los espermatozoides, producto de la presencia de huevos en procesos de desarrollo (Zaniboni y Bakst, 2004).

Otras posibles explicaciones para la presencia de semen en los TAE ubicados en la zona cloacal del urodeum, podrían vincularse con el fenómeno de "espermatorrea", correspondiente a la pérdida de semen desde la vagina posterior a la inseminación (Bakst y Akuffo, 2008b). Considerando los reportes que señalan que el 57,6% de los espermatozoides inseminados se excretan por la cloaca dentro de los primeros 15 minutos posteriores a la inseminación artificial (Howarth, 1971). También se ha considerado que la presencia de espermatozoides en los TAE del urodeum podría explicarse por la presencia de una subpoblación de espermatozoides no viables liberados por los TAE de la unión útero-vaginal, al ser trasnportados de regreso para ser expulsados a la cloaca (Bakst, 1981).

2.2.3. Conservación de los espermatozoides al interior de los TAE. Los TAE permiten asegurar la viabilidad de los espermatozoides tras la conservación por períodos prolongados de hasta 14 días en gallinas y hasta 70 días en pavas. Atribuyéndose un mayor tiempo de almacenamiento en la pava debido al mayor número de TAE totales (Sturkie, 2015; Bakst y Vinyard, 2002). Sin embargo, las condiciones bioquímicas, los mecanismos fisiológicos y la base genética que permiten la conservación y supervivencia de los espermatozoides aviares, tras el almacenamiento prolongado al interior de los TAE, son prácticamente desconocidas, a pesar del gran interés práctico que tendría para su conservación *in vitro* (Sauveur, 1992; King *et al*., 1999; Bakst y Akuffo, 2008b; Foye-Jackson *et al*., 2011). El almacenamiento de los espermatozoides, efectuado en los TAE ubicados en el esfínter útero-vaginal, se genera de forma secuencial, sin mezclarse tras las inseminaciones sucesivas, por lo que los últimos espermatozoides inseminados serán los primeros en ser liberados (Sturkie, 2015). Los espermatozoides son conservados al interior de la zona luminar de los TAE, durante todo el proceso de aislamiento, ubicándose con mayor frecuencia en el extremo distal de los túbulos, de este modo se mantienen en grupos de hasta 100 espermatozoides en cada luz tubular, típicamente inmóviles o con lenta oscilación, sin incrustarse ni unirse a la región apical del epitelio tubular, pero manteniendo un contacto cercano a éste, manteniéndose

íntimamente asociados de forma paralela al plasmalema de los espermatozoides adyacentes, mediante el contacto estrecho entre sus cabezas, dirigidas y alineadas hacia el interior del extremo ciego de los TAE (Tingari y Lake, 1973; Sauveur, 1992; Bakst *et al*., 1994; King *et al*., 1999; Wishart y Horrocks, 2000). Dicha tendencia a la aglutinación puede ser la base del almacenamiento prolongado in vivo, considerando que es un tipo de residencia común, de los espermatozoides al interior de los TAE, en las aves domésticas (Sasanami *et al*., 2013).

Se ha sugerido que mientras los espermatozoides residen en los TAE se vuelven inactivos, con motilidad y metabolismo reprimidos de forma reversible (Bakst, 1985; Bakst y Richards, 1985), como resultado del consumo reducido de ATP, producto de la escasa disponibilidad de elementos energéticos en las mitocondrias espermáticas, colaborando en la reducción del daño oxidativo de los espermatozoides al reducir las especies reactivas de oxígeno producto de la respiración espermática, generando como consecuencia un plasmalema más estable (Bakst, 1985; Bakst y Richards, 1985; Sasanami *et al*., 2013).

También se ha descrito una reducción en la respuesta a enzimas hidrolíticas y una inmunogenicidad reprimida (Bakst, 1985; Bakst y Richards, 1985), factores que respaldan el almacenamiento espermático en los TAE como respuesta defensiva frente a las reacciones inmunitarias antiespermáticas presentes en el oviducto (Sasanami *et al*., 2013). Se ha determinado que uno de los posible responsable para reducir la inmunoreacción antiespermática, sobre los espermatozoides residentes en los TAE, sería el factor de crecimiento transformante β (TGFb) (Sporn *et al*., 1986; Mouri *et al*., 2002), el que se ha relacionado con la inmunosupresión al reprimir la proliferación de linfocitos T y B en mamífero y aves (Quere y Thorbecke, 1990; Huang y Huang., 2005). Particularmente en gallinas, se han descrito tres tipos de TGFb (TGFb2, b3 y b4), presentes en las células de los TAE como en los espermatozoides, y tres tipos de receptores (TbR1, TbR2 y TbR3) expresados en el esperma y linfocitos de la unión útero vaginal (Chowdhury *et al*., 2003; Chowdhury *et al*., 2004) La interacción de espermatozoides y las células de los TAE *in vivo* puede estimular la expresión de TGFbs

aumentando significativamente la expresión de ARNm de TGFbs y TbR en la unión útero vaginal cuando los TAE se llenan de espermatozoides (Das *et al*., 2006b).

Se sugiere que los TAE podrían ser responsables del suministro nutricional y la eliminación de los desechos metabólicos de los espermatozoides durante su almacenamiento *in vivo* (Van Krey *et al*., 1967). De este modo, respaldando las especulaciones anteriores, la presencia de lípidos al interior de las células de los TAE supone el resguardo del soporte nutricional de los espermatozoides (Bakst et al., 1994), así como el mantenimiento del plasmalema espermático y la protección contra el daño oxidativo (King *et al*., 1999).

El pH de la unión útero-vaginal del sistema reproductor de la hembra de pavo se ha reportado en 6,93 inmediatamente posterior a la ovoposición y 7,24 luego de 8 a 12 horas de la postura del huevo (Bakst, 1980). Junto a estos antecedentes, se ha demostrado que la motilidad de los espermatozoides de las aves domésticas se inhibe al disminuir el pH *in vitro* (Holm y Wishart, 1998). Dichas referencias hacen pensar en la posibilidad de que un pH ácido sea un mecanismo que permita a los espermatozoides permanecer quiescentes *in vivo*, al interior de los TAE del oviducto (Holm *et al*., 1996).

2.2.4. Liberación de los espermatozoides almacenados en los TAE de la unión útero-vaginal. Existe evidencia que ha permitido determinar, mediante el análisis de la estratificación del almacenamiento espermático, posterior a la inseminación, que los últimos espermatozoides ingresados a los TAE son los primeros en ser liberados (Burke y Ogasawara, 1969; Compton *et al*., 1978; Van Krey *et al*., 1981; Sauveur, 1992). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos responsables y la cronología de liberación del esperma almacenado en los TAE (Sauveur, 1992; Bakst y Akuffo, 2008b), y si su liberación se efectúa en pequeñas cantidades durante el ciclo ovulatorio o en grandes cantidades asociadas con la ovoposición (Bakst y Akuffo, 2008b). De este modo algunos autores creen en la existencia de una “descarga preferente” de espermatozoides desde los TAE al momento de la ovoposición (Bobr *et al*., 1964; Sauveur, 1992), permitiendo la migración consecutiva a la zona de fertilización infundibular, proceso que explicaría la sincronía precisa entre la ovulación y el proceso de fertilización (Bobr *et al*., 1964;

Sturkie, 2015). Otros autores postulan que los espermatozoides residentes en los TAE son liberados lentamente, mientras la hembra está en el proceso de producción de huevos, permitiendo un ascenso espermático gradual y permanente a la región infundibular, asegurando una población adecuada de espermatozoides en el sitio de fertilización (Burke *et al*., 1969; Bakst, 1993; Bakst, 1998; Bakst *et al*., 2002).

Se ha descrito que los TAE poseen inervación, con presencia de neuronas y ganglios pequeños, y que el epitelio posee una vasta red de actina bajo las microvellocidades apicales (Freedman *et al*., 2001). Dichos antecedentes han permitido hipotetizar que la inervación de los TAE y la red de actina juegan un papel importante en la liberación del esperma residente en los TAE (Freedman *et al*., 2001; Bakst y Akuffo, 2008a). Por otra parte, la presencia de acuaporinas 2, 3 y 9 localizadas en la porción apical de los TAE, ha especulado la ratificación de un modelo de liberación espermático basado en la excreción de líquidos hacia la luz de la unión útero-vaginal. Líquidos que permitirían la formación de corrientes de salida, facilitando la liberación espermática cuando la movilidad del esperma es menor a la fuerza de la corriente (Froman, 2003; Bakst y Akuffo, 2008a). También se ha planteado la liberación espermática mediante regulación hormonal, tras experimentos que han mostrado cambios morfológicos de reducción de los TAE con la consecuente expulsión de los espermatozoides residentes, al ser expuestos a progesterona *in vitro* (Ito *et al*., 2011). Asociando la liberación espermática con un evento regulado por el ciclo ovulatorio, considerando el periodo ventana de 5 h entre el aumento de progesterona, el consecutivo peack de hormona luteinizante y la ovulación (Sturkie, 1968; Wishart y Horrocks, 2000; Sturkie, 2015), permitiendo el ascenso libre de obstáculos al sitio de fertilización. Antecedentes que podría respaldarse por la liberación de los componentes cuticulares frente al aumento de progesterona, otorgando un posible efecto lubricante frente al transporte espermático (Ito *et al*., 2011).

2.3. Ingreso y tránsito de espermatozoides en el oviducto

Durante la etapa de apareamiento, los machos de aves sin órgano copulador intromitorio, como los gallos y pavos, depositan el semen en la cloaca para luego ser transferido a la vagina (Lake, 1981; Dyce *et al*., 2007), mientras que en aves con órgano copulador intromitorio, como patos y gansos, y prácticas de inseminación artificial, el semen es depositado directamente en la vagina distal (Wishart y Horrocks, 2000; Dyce *et al*., 2007; Bakst y Akuffo, 2008a), 2 a 3 cm al interior en el caso de la inseminación artificial (Bakst y Akuffo, 2008a). Al comparar el número de espermatozoides inseminados versus el número de espermatozoides ingresados a los TAE principales, se ha determinado que el número máximo se alcanza al menos a las 48 h posteriores a la inseminación, fluctuando entre el 1 a 2 % de los espermatozoides en pavas (Brillard y Bakst, 1990) y el 1 (Brillard, 1993) a 0,04 % en gallinas (McDaniel *et al*., 1997). Un bajo número de espermatozoides, que ingresa a los TAE en un periodo prolongado de tiempo, podría explicarse por la naturaleza altamente competitiva de los procesos de selección espermática en la sección vaginal, o por una capacidad finita de almacenamiento por parte de los TAE (Bakst y Akuffo, 2008a). Una vez ingresados los espermatozoides por la vagina, estos deben llegar a la base del infundíbulum para lograr fecundar el ovocito, tardando alrededor de 24 horas para que logre llegar la mitad de los espermatozoides inseminados hasta el sitio de la fecundación (Sauveur, 1992).

En el caso de las aves que copulan naturalmente, y que no poseen órgano copulador intromitorio, podría resultar muy importante la presencia de glándulas tubulares (TAE) en la lámina propia del urodeum y, en menor medida, en la lámina propia del proctodeum ventral (Bakst y Akuffo, 2008a). De este modo, se estima que dichas glándulas, descritas en pavas domésticas pero ausentes en gallinas (Bakst y Akuffo, 2008a; Dahm *et al*., 1980), podrían funcionar como reservorio espermático inicial temporal, que permita resguardar y transferir los espermatozoides de forma gradual y persistente (Bakst y Akuffo, 2008a) durante las 48 h que tardan en ingresar a los TAE principales de la unión útero vaginal (Brillard y Bakst, 1990).

El transporte espermático mediante la luz del epitelio vaginal requiere que los espermatozoides dispongan de una movilidad eficiente (Wishart, 1994), así como la presencia de características superficiales con glucoproteínas y antigenicidad adecuadas, que no frenen el movimiento de avance por inmunoreacción vaginal (Steele y Wishart, 1992; Steele y Wishart, 1996a; Steele y Wishart, 1996b). Considerando que se ha señalado a la vagina como un sitio de selección espermática, que podría involucrar posible inmunorespuesta anti-esperma en el proceso (Takeda 1974; Higaki *et al*., 1995), donde algunos exosomas acumulan un inhibidor de la proliferación celular y promotor de apoptosis (GAS5), se podría señalar que los tejidos de la mucosa vaginal podrían presentar factores citotóxicos (Koldemir *et al*., 2017). La unión útero vaginal, donde se encuentran los TAE, en que se guardan, almacenan y liberan los espermatozoides destinados a la fertilización (Bakst y Akuffo, 2008a; Bakst *et al*., 2010), desempeña un importante papel selectivo, puesto que solo puede superarse por espermatozoides con un movimiento de avance adecuado (Higaki *et al*., 1995; Bakst y Akuffo, 2008a). Respecto a la liberación espermática, se ha descrito que, del total de espermatozoides liberados por los TAE de gallinas y pavas, sólo el 1 a 2 % logra llegar al sitio de fertilización en la base del infundíbulum (Birkhead y Møller, 1992a; Wishart, 1995). Sin embargo, también se ha descrito el tránsito directo y rápido de espermatozoides hacia el sitio de fertilización, evitando el ingresar a los TAE de la unión útero vaginal. Dicho evento se efectúa cuando los espermatozoides son inseminados inmediatamente después de la ovoposición (Bask, 1994), aprovechando el intervalo de 30 a 60 minutos entre la ovoposición y la próxima ovulación que deja el oviducto vacío (Bask, 1994; Sturkie; 2015), permitiendo la colonización infundibular en un rango aproximado de dos horas (Bask, 1994).

Posterior al obstáculo selectivo que implican las regiones vaginales y unión útero vaginal, se inicia un transporte espermático pasivo a través del oviducto, independiente de la movilidad de los espermatozoides (Sauveur, 1992; Wishart y Horrocks, 2000), asegurado por el movimiento ciliar de las células epiteliales (Sauveur, 1992) y las contracciones anti-peristálticas (Sauveur, 1992; Wishart y Horrocks, 2000), generadas en algunas instancias dentro del ciclo de formación del huevo, como la actividad contráctil que muestra el útero previo a la ovulación (Sauveur, 1992). Sin embargo, otros autores

señalan la posibilidad de un transporte no tan pasivo, que involucraría la presencia de células epiteliales positivas a serotonina en el oviducto de las pavas (Bakst y Akuffo, 2008a). Dicho hallazgo hace pensar que los espermatozoides viables podrían expresar señales moleculares o metabólicas únicas que permitirían la liberación de serotonina oviductal, estimulando la frecuencia del movimiento de la cola del esperma y los cilios epiteliales (Stephens y Prior, 1992; Bakst y Akuffo, 2008a), además de promover la actividad peristáltica de las láminas musculares del oviducto, dando como resultado un transporte espermático más eficiente (Bakst y Akuffo, 2008a).

Dentro de los obstáculos que deben sortear los espermatozoides, la secreción de albumen en el magnum resulta uno de los más difíciles, principalmente por el bloqueo mecánico que este significa, producto del aplastamiento de los pliegues mucosos con el conjunto yema más albumen denso. Mientras que la presencia de un huevo con cáscara en el útero ofrece menores dificultades que el albumen (Sauveur, 1992). La ovoposición en las pavas posee una media que fluctúa entre las 6 y 10 horas después del acceso a luz diaria (Sauveur, 1992; Sturkie, 2015), por lo que se recomienda efectuar las inseminaciones inmediatamente después de iniciada la iluminación o inmediatamente antes de que se oscurezca. De este modo se evita que el transito diario del huevo perjudique el transporte o conservación de los espermatozoides en el interior del tracto reproductivo de la hembra (Sauveur, 1992).

Se ha descrito la presencia de glándulas tubulares similares a los TAE en la mucosa infundibular, a unos cuatro centímetros de la zona de transición entre el infundíbulo distal y el magnum proximal (Bakst, 1994; Bakst *et al*., 1994), describiéndose como un sitio de almacenamiento espermático secundario (Wishart y Horrocks, 2000; Sturkie, 2015). Sin embargo, la escasez de espermatozoides al interior de los túbulos infundibulares, independiente del estado del ciclo ovulatorio (Bakst, 1994), hace debatir respecto a su real capacidad de almacenamiento (Bakst, 2001). Se reportan con una progresión tubular hacia el área magnal, con mayor densidad y complejidad estructural, túbulos más cortos, al compararse con los TAE principales (Bakst, 1994; Bakst *et al*., 1994), compuestos por múltiples ramas formadas a partir de una sola invaginación, y la composición epitelial de células no ciliadas, donde algunas poseen gránulos secretores

en el citoplasma apical (Bask, 1994). Los espermatozoides serían liberados tras las ovulaciones posteriores, debido a la distención tisular de la mucosa infundibular, permitiendo su ingreso al disco germinal para concretar la fertilización (Bask, 1994).

2.4. Fecundación

La fecundación se genera en el infundíbulum, cuando la yema sólo está recubierta por la membrana perivitelina (Tauber, 1875; Sauveur, 1992), ya que el depósito de la capa extravitelina bloquea el acceso de los espermatozoides al ovocito (Bakst y Howarth, 1977; Bakst *et al*., 1994), de este modo los espermatozoos disponen de una "ventana de fertilización" de alrededor de 15 minutos, en gallinas (Olsen, 1952) y pavas (Olsen y Fraps, 1944), antes de que se bloquee el acceso para concretar la fertilización (Bakst *et al*., 1994). Es posible cuantificar la interacción óvulo/espermatozoide mediante el número de agujeros efectuados por la hidrólisis espermática en el momento de la fertilización (Bramwell *et al*. 1995) y los espermatozoides no penetrantes atrapados producto de la formación de membrana extravitelina (Wishart, 1987). Dicha cuantificación se relaciona con el número de espermatozoides en los TAE de la unión útero vaginal de gallinas (Brillard, 1993; McDaniel *et al*., 1997) y pavas (Brillard y Bakst, 1990), con una tasa de disminución diaria específica, del orden del 30% en gallinas y el 11% en pavas, representando la tasa de pérdida espermática de los TAE (Wishart y Staines, 1999). La duración de la fertilidad depende de la cantidad de espermatozoides almacenados en los TAE principales (Wishart, 1987), su tasa de liberación espermática y la cantidad de espermatozoides necesarios para la fertilización disponibles en el área infundibular (Wishart y Horrocks, 2000). Dichos factores se relacionan directamente con el tamaño corporal de la especie, que a su vez se asocia al tamaño del ovocito, número de espermatozoides asociados (Birkhead *et al*., 1994), y eventualmente al número de TAE principales (Birkhead y Møller, 1992b).

2.5. Modelos de análisis de los TAE

2.5.1 Cultivo celular. Como un intento por dar respuesta a las múltiples interrogantes respecto a la mantención de la viabilidad espermática prolongada al interior de los TAE, surge la inquietud de generar modelos *in vitro* de los TAE.

De este modo Talbot *et al*., (2018) es el primer autor en cultivar e intentar caracterizar las células epiteliales de los TAE de pava a partir de cultivos continuos. Sin embargo, los resultados descritos señalan que las células no proliferaron eficazmente o perdieron la apariencia de morfología epitelial normal, correspondiente a células cuboidales, por eventual transformación o contaminación celular. De este modo se establece que algunas de las características ultra estructurales contrastan con las características de las células de los TAE *in vivo*, particularmente por la ausencia de la gotita de lípidos supra nuclear, normal en células *in vivo*, y por la presencia de microvellosidades apicales y vacuolas mucosas citoplasmáticas, características de células mucosas de la superficie epitelial de la unión útero vaginal. A pesar de los esfuerzos de Talbot *et al*., (2018) aún sigue pendiente la replicación de la fidelidad fenotípica de las células de los TAE *in vivo*, para así emplear un modelo *in vitro* que permita investigar los mecanismos de la función de los TAE *in vivo*.

2.5.2. Proteómica**.** Junto a los intentos por realizar cultivos celulares de los TAE, Talbot *et al*., (2018) también reportó análisis de proteómica de las células obtenidas en los cultivos. A partir de sus resultados señala la ausencia en la secreción de alguna proteína particular a partir de los cultivos celulares. Las proteínas de pavo obtenidas se describen como resultados “decepcionantes” al corresponder a proteínas comunes a la mayoría de las células. Sin embargo, al observar el conjunto de resultados se pudo determinar la existencia de algunas proteínas de interés, ya fuese por su uso como proteínas marcadoras o por su potencial función biológica (Talbot *et al*., 2018).

De este modo, el análisis de proteómica, a partir de células cultivadas en medio acondicionado sin suero (SFCM), permitió la identificación de un total de 52 proteínas, de las cuales 35 eran propias de la especie *Meleagris gallopavo*, correspondientes a

proteínas citoplasmáticas o constituyentes de la membrana celular, comunes para la mayoría de las células. Sin embargo, también se encontraron proteínas de posible interés, entre ellas citoqueratinas aviares tipo 2, 18 y 19, anexina A8, proteínas clusterina, matrilisina, galectina-2, proteína similar a la zonadhesina, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y "anterior gradient protein 2" (AGR-2) (Talbot *et al*., 2018). Por otra parte, al realizar análisis de proteómica en medios celulares de TAE sin fraccionamiento ni enriquecimiento diferencial, se identificaron 153 proteínas, 93 correspondían a pavo y 60 a ratón, producto de las células residuales empleadas en los cultivos. En cuanto a las proteínas de pavo, la mayoría correspondía a proteínas citoplasmáticas o citoesqueléticas, comunes a todos los tipos de células. Se identificaron citoqueratinas (1, 2, 8, 10, 18, 19 y cocleales), anexinas (A2, A4, A5, A8, A11), al igual que en los análisis de células SFCM, además de proteínas "heat shock protein 90 alpha" (HSP90A), "maestro heat-like repeat-containing protein family member 7" y galectina-3, (Talbot *et al*., 2018).

Las citoqueratinas permiten confirmar la naturaleza epitelial de las células (Moll *et al*., 1982), las anexinas podrían ser importantes ya que la anexina A2 ha sido detectada en el epitelio superficial del oviducto aviar y en el análisis de expresión génica del útero de gallina (Chailley y Pradel, 1992; Yang *et al*., 2007). Además, las anexinas A2, A4 y A5 están involucradas con la adhesión y liberación de espermatozoides en células oviductales de otras especies (Talevi y Gualtieri, 2010).

La proteína AGR-2 se ha descrito como una proteína fuertemente expresada en tejidos que secretan moco (Park *et al*., 2009; Li *et al*., 2012a), como las células secretoras observadas en los cultivos de Talbot *et al*., (2018). Además, se ha descrito que AGR-2 presenta una expresión específica en el oviducto aviar (Kim *et al*., 2007), controlada por el estrógeno y su respectivo receptor (Vanderlaag *et al*., 2010; Bu *et al*., 2013), involucrándose en el crecimiento celular y reparación tisular (Wodziak *et al*., 2016; Zhu *et al*., 2017). De este modo, se cree que si AGR-2 es secretada por las células de los TAE estaría involucrada en el desarrollo, mantenimiento y función de los mismos, considerando la eventual importancia que pudiese tener el estrógeno en la citodiferenciación de los TAE, como lo es en la diferenciación de las glándulas tubulares

del magnum (Palmiter y Wrenn, 1971; Pescatore y Márquez, 1977; Yoshimura *et al*., 2000; Holm y Ridderstråle, 2002; Das *et al*., 2006a).

La proteína HSP90A también podría ser una proteína secretada por los TAE, se relaciona con proteínas objetivo como la proteína 1, la metalopeptidasa de matriz 2 y las tirosina quinasas, causando cambios en su expresión y función (Li *et al*., 2012b), relacionándose con la renovación de la matriz extracelular del oviducto (Leśniak-Walentyn y Hrabia, 2016; Leśniak-Walentyn y Hrabia, 2017) y un impacto favorable para la mantención de las funciones espermáticas normales en el fluido seminal (Birkenmeier *et al*., 1998). De este modo, la HSP90A se ha relacionado con la viabilidad *in vitro* de los espermatozoides bovinos y de cerdos (Huang *et al*., 1999; Wang *et al*., 2014), así como también se ha descrito su interacción con receptores de progesterona en oviductos de gallina (Renoir *et al*., 1993). Dichos antecedentes, que relacionan a la proteína HSP90 con el almacenamiento y liberación de esperma (Yoshimura *et al*., 2000; Ito *et al*., 2011), sumado a la secreción de HSP90 mediada por exosomas (Takeuchi *et al*., 2015), que coincide con el tipo de secreción efectuado por las células de los TAE, respaldan la hipótesis respecto a la posible participación de HSP90 en el soporte de mantención espermática de los TAE (Schuppin *et al*., 1984; Bakst y Bauchan, 2015).

Las proteínas restantes también están relacionadas con la biología del tracto reproductivo y el esperma, ya sea directa o indirectamente, y de varias maneras (Talbot *et al*., 2018). Es así como se ha descubierto que la proteína MIF, de los espermatozoides humanos, inhibe la capacitación y disminuye la motilidad de los espermatozoides (Carli *et al*., 2007). Dichos efectos resultan fundamentales para el desarrollo de la función de almacenamiento espermático ejercida por los TAE de pavo (Bakst, 1998; Sasanami *et al*., 2013). Respecto a la clusterina, corresponde a una proteína chaperona que, entre otras cosas, se expresa en el tracto reproductor masculino de mamíferos, asociada a espermatozoides, mejorando la supervivencia celular (Law y Griswold, 1994; Ammar y Closset, 2008). En cuanto a la proteína galectina-3, de modo similar a la clusterina, se ha reportado en el líquido seminal de machos y el tracto reproductivo de hembras en varios mamíferos (Jones *et al*., 2010; Nio-Kobayashi, 2017). Por su parte, la proteína matrilisina (metaloproteinasa de matriz 7) ha demostrado su expresión en el epitelio

glandular del oviducto de gallina (Leśniak-Walentyn y Hrabia, 2016). En relación a “heat-like repeat-containing protein family member 7”, se ha descubierto que proteínas similares forman parte de los componentes estructurales de la membrana del cascarón del huevo de gallina (Makkar *et al*., 2015). Finalmente, la proteína similar a la zonadhesina, relacionada con un componente proteico de los espermatozoides llamado zonadhesina, participa en la unión de espermatozoides y zonas pelúcidas de mamíferos (Lea *et al*., 2001), pudiendo estar relacionada con la interacción del esperma y óvulo aviar en los medios acondicionados de los TAE (Talbot *et al*., 2018).

3. SECRETÓMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

3.1. Caracterización

Recientemente se ha reportado que células como las células dendríticas, linfocitos B, diversas células madre, células epiteliales y células endoteliales secretan una gran variedad de vesículas hacia los espacios extracelulares (Pisitkun *et al*., 2004; Zhan *et al*., 2009). También se ha determinado que estas vesículas extracelulares están presentes en gran parte de los fluidos corporales, como el plasma sanguíneo, el líquido amniótico, el fluído ascítico, la orina y saliva (Simpson *et al*. 2008; Van der Pol *et al*., 2012).

Dentro de la nomenclatura de las vesículas extracelulares (EVs) se encuentran al menos tres subgrupos destacados, diferenciados según origen y tamaño, correspondientes a microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos (Simpson *et al*., 2008; Cocucci *et al*., 2009; Théry *et al*., 2009). Las microvesículas se caracterizan por ser secretadas directamente de la membrana celular (Colombo *et al*., 2014; Lopera *et al*., 2017; Almiñana y Bauersachs, 2019) mediante exocitosis no convencional (Cocucci *et al*., 2009), presentar forma heterogénea y un tamaño que puede fluctuar entre 120 y 1000 nm (Cocucci *et al*., 2009; Colombo *et al*., 2014; Lopera *et al*., 2017; Almiñana y Bauersachs, 2019). Los exosomas se describen como vesículas de origen endosómico (Almiñana, *et al.*, 2017; Lopera *et al*., 2017; Almiñana y Bauersachs 2019), que pueden ser liberados tras la fusión de un cuerpo multi-vesicular con la membrana plasmática celular (Almiñana, *et al*, 2017; Lakkaraju y Rodriguez-Boulan, 2008), o pueden degradar

su contenido tras la fusión con lisosomas intracelulares (Lakkaraju y Rodriguez-Boulan, 2008). Son más pequeños que las microvesículas y cuerpos apoptóticos, con un rango de tamaño reportado de 40 a 120 nm (Lakkaraju y Rodriguez-Boulan, 2008; Colimbo *et al*., 2014). Los cuerpos apoptóticos son generados por la gemación de una célula completa como consecuencia de la muerte celular apoptótica y poseen tamaños que pueden variar entre los 1000 y 5000 nm (Di Vizio *et al*., 2012; Hauser *et al*., 2017; Caruso *et al*., 2018).

La importancia de las EVs radica en la capacidad de actuar como mediadores en la comunicación intercelular (Valadi *et al*., 2007; Raposo y Stoorvogel, 2013; Van Niel *et al*., 2018), a nivel local y a distancia (Raposo y Stoorvogel, 2013), mediante el transporte de múltiples componentes moleculares bioactivos desde la célula de origen, para ejercer un efecto funcional sobre la célula receptora (Valadi *et al*., 2007; Almiñana, *et al.*, 2017; Van Niel *et al*., 2018), permitiendo la regulación de procesos fisiológicos y patológicos (Yañez-Mó *et al*., 2015).

Dentro de la carga molecular transportada se encuentran proteínas, ARNm, miARN, pequeños ARNnc, ADN genómico (Cocucci *et al*., 2009; Simons y Raposo, 2009, Da Silveira *et al*., 2012; Raposo y Stoorvogel, 2013; Wagas *et al*., 2017; Almiñana, *et al.*, 2017), lípidos (Cocucci *et al*., 2009; Subra *et al*., 2010; Raposo y Stoorvogel, 2013; Wagas *et al*., 2017) ácidos grasos libres (Subra *et al*., 2010), ligandos y receptores (Cocucci *et al*., 2009). Esta carga molecular se encuentra protegida de la degradación o modificación extracelular (Simon *et al*., 2018), y permite establecer un reflejo del estafo fisiopatológico de la célula de origen (Colombo *et al*., 2014).

3.2. Secretómica oviductal

El líquido oviductal ha sido indicado como el principal responsable para que espermatozoides, ovocitos y embriones presenten una estadía en un entorno óptimo, durante los eventos reproductivos tempranos, al interior de la hembra (Leese *et al*., 2008; Aviles *et al*., 2010). Definiéndose al líquido oviductal como un fluido complejo y dinámico, producido por las secreciones de células epiteliales oviductales, transudado del plasma

sanguíneo y elementos del líquido folicular post ovulatorio (Leese, 1988; Leese *et al*., 2008). Se ha identificado, en distintas especies, que el principal constituyente del fluido oviductal corresponde a EVs, vinculando a exosomas y microvesículas como importantes mediadores involucrados en múltiples procesos reproductivos, como la interacción de gametos, la producción embrionaria y el éxito del proceso de preñez (Ng *et al*., 2013; Al-Dossary *et al*., 2013; Almiñana *et al*., 2017). Las primeras EVs de origen oviducal (oEV, de acuerdo a sus siglas en inglés) fueron descubiertas en murinos, llamándolas "oviductosomas" (Al-Dossary *et al*., 2013), siguiendo la terminología de los epidimosomas, EVs liberadas por el epidídimo masculino, y prostosomas, EVs liberadas por la glándula prostática (Alberts *et al*., 2014).

El papel potencial de las oEV en el área reproductiva ha sido un hallazgo relativamente reciente, desempeñandose estudios principalmente en especies mamíferas. De este modo, reportes respecto a las funciones de oviductos bovinos han señalado que las oEV *in vitro* mejoran la calidad del embrión y la crío supervivencia (Lopera-Vásquez *et al*., 2016), señalando además que las vesículas pueden ser absorbidas por embriones *in vitro* mejorando así su calidad y desarrollo (Almiñana *et al*., 2017). En caninos se ha determinado que las oEV de origen *in vitro* contienen miRNAs relacionados con roles de maduración ovocitaria y mejoran la maduración ovocitaria *in vitro* (Lange-Consiglio *et al*., 2017), mientras que en felinos se ha identificado vesículas extracelulares con carga proteica vinculada a la movilidad y viabilidad espermática (Ferraz *et al*., 2019). En porcinos se ha establecido que las oEV *in vivo* poseen proteínas relevantes en eventos reproductivos como la regulación de la poliespermia (Alcântara-Neto *et al*., 2019) e *in vitro* mejoran la viabilidad espermática (Alcântara-Neto *et al*., 2020). En murinos se ha reportado la influencia de las oEV en la capacitación espermática y la reacción acrosomal (Al-Dossary *et al*. 2013), la interacción espermática con entrega de PMCA4, bomba de flujo de salida de Ca^{+}, involucrada en la motilidad espermática (Al-Dossary *et al*., 2015), la entrega de miRNAs responsable de la funcionalidad espermática (Fereshteh *et al*., 2018), modulación de la ciliogénesis oviductal (Nakano *et al*., 2017) y aumento del éxito en la transferencia de embriones (Qu *et al*., 2018). En humanos se ha determinado la vinculación de las oEV de las trompas de falopio con la presencia de proteínas moduladoras de la fertilidad (PMCA1-4) (Bathala *et al*., 2018). Mientras que en aves sólo

hay reportes en gallinas, los que señalan que las oEV de la vagina y la unión útero vaginal generan efectos sobre la viabilidad y la movilidad espermática (Huang *et al*., 2017).

En cuanto a las características de las oEV, se ha determinado que las vesículas liberadas en el sistema reproductivo bovino presentan mayor proporción de vesículas pequeñas en el istmo, e igual proporción de tamaño en el ámpula (Lopera-Vazquez *et al*., 2017), mientras que en el cerdo, se ha señalado igual proporción de tamaño de las oEV en ambas estructuras, reportando mayor concentración total en el ámpula (Jamaludin *et al*., 2019). Además, se ha determinado que el potencial zeta, magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre partículas, de las oEV del istmo y el ámpula es diferente, tanto en bovinos como en cerdos, relacionando dicho diferencial con las diversas características de superficie y composición de membrana de las distintas regiones. De este modo, ambos estudios muestran antecedentes que evidencian que las oEV difieren entre las distintas regiones oviductales y las diferentes especies, apuntando a distintos patrones de secreción y probables diferencias funcionales, sin embargo, aún se requieren estudios respecto a diferencias en las cargas moleculares (Lopera-Vasquez *et al*., 2017; Jamaludin *et al*., 2019).

En relación al contenido molecular de oEV, se ha determinado la presencia de proteínas y distintos tipos de ARN (ARNm, miARN, ARNr, ARNt, ARNsn y ARNsno) con roles importantes dentro del proceso de fertilización (Almiñana *et al*., 2017; Alminñana *et al.,* 2018). Estudios de oEV en bovinos, murinos y humanos, han mostrado que el contenido de oEV es dinámico y se regula mediante la influencia hormonal ejercida por el ovario a lo largo del ciclo reproductivo (Almiñana *et al*., 2018). Dicho control hormonal permitiría el empaque vesicular y posterior liberación, hacia la luz oviductal, de elementos como mARN, proteínas, ARNnc y algunos metabolitos (Greening *et al*., 2016; Alminana *et al*., 2017; Ferraz *et al*., 2019). Se ha demostrado que la presencia de progesterona exógena modula la secreción uterina de EV y las cargas vesiculares de ARN en ovinos. La presencia de espermatozoides, ovocitos y embriones (Burns *et al*., 2018), la estación reproductiva y el estado fisiológico de la hembra también podrían afectar la secreción y carga molecular de las oEV. Sin embargo, se sabe poco respecto al contenido molecular

y el funcionamiento bioactivo de las microvesículas oviductales (Almiñana y Bauersachs, 2019).

3.3. Secretómica oviductal y sus efectos sobre los espermatozoides

Las secreciones oviductales contienen una mezcla de moléculas orgánicas e inorgánicas que contribuyen y modulan las modificaciones funcionales de los espermatozoides (Leese *at al*., 2008), evidenciando un rol importante en los procesos de capacitación (Leese *at al*., 2008; Lamy *et al*., 2018), reacción acrosomal, unión a la zona pelúcida, selección, motilidad y viabilidad espermática en mamíferos (Lamy *et al*., 2018). Además, se ha determinado que los efectos del fluido oviductal de hembras murinas, ovinas y porcinas sobre la funcionalidad espermática masculina, difiere de acuerdo a la etapa del ciclo reproductivo de la hembra, ya que la composición bioquímica varía según las distintas etapas (Coy *et al*., 2008; Burns *et al*., 2018; Bognar *et al*., 2019).

En el caso de los mamíferos, se ha determinado que la presencia de espermatozoides en el oviducto podría tener un efecto específico sobre la proteómica oviductal (Georgiou *et al*., 2007), influyendo en la expresión de alrededor de 20 proteínas (Maillo *et al*., 2016). De este modo se sospecha que genes activados y proteínas activadas podrían influir en la mantención de la viabilidad espermática (Holt y Fazeli, 2016). Dichos antecedentes podrían explicar la viabilidad extendida que presentan los espermatozoides al adherirse transitoriamente a las células epiteliales del istmo caudal, reservorio espermático en mamíferos (Miller, 2015), y al vincularse estrechamente con las microvellosidades epiteliales en los TAE, reservorio espermático en aves (Van Krey *et al*., 1967).

Respecto a las diversas proteínas asociación a las oEV, se ha reportado la presencia de la proteína PMCA4 al interior de los oEV murinos, principal bomba de flujo de Ca^{+2} espermático, asociandose con la regulación de la motilidad espermática progresiva e hiperactiva, la capacitación, reacción acrosomal y viabilidad espermática, donde su eliminación conduce a una pérdida severa de la motilidad hiperactivada y la infertilidad masculina (Al-Dossary *et al*., 2013). Además, se ha reportado la presencia de proteínas espermáticas fosforiladas en tirosina, las que desempeñan un rol clave en la

capacitación espermática (Bognar *et al*., 2019). En bovinos las oEV han evidenciado la presencia abundante de ANXA2, OVGP1, HSPA90, HSP70, gelsolina y ezrin, asociadas con roles clave en la interacción de los gametos con el oviducto (Almiñana *et al*., 2017). OVGP1 se ha descrito en múltiples especies de mamíferos, asociándose con el mantenimiento de la viabilidad, motilidad, reacción acrosomal y capacidad de penetración espermática (King *et al*., 1994; Killian, 2004; Bemis *et al*., 2012; Rosenbluth *et al*., 2014). Otros han mostrado la presencia de HSPA8 en bovinos, proteína involucrada en mejorar la supervivencia y capacidad de fertilización espermática. En las oEV de la especie porcina se ha determinado la presencia de varias proteínas relacionadas con la fisiología reproductiva, como la proteína MYH9 y OVGP1, relacionadas con la asociación del espermatozoide al oviducto, ANXA1, 4 y 5 vinculadas con la integridad y transito espermático, RPS5 y VCP relacionadas con la secreción proteica y FLOT1 y CLU con la adhesión celular (Coy *et al*., 2008; Thippabhotla *et al*., 2019; Alcântara-Neto *et al*., 2020). En gatos se ha determinado que el contenido de los oEV posee proteínas esenciales para la fertilización, como OVGP1, HSP70, HSP90, CD9, CCT8, CCT7, responsables de aumentar las tasas de fertilización cuando se co-incubaron espermatozoides con oEV, previo a la fertilización *in vitro* (Ferraz *et al*., 2019).

3.4. Secretómica del epitelio de los TAE

Mientras la mayoría de los organelos celulares se encuentra en la zona basal de las células epiteliales de los TAE, la zona apical se describe rica en vesículas densas (20-280 nm) y microvellosidades con vesículas de 20 a 40 nm en su interior, formando exosomas con proteínas CD63 como marcadores de superficie vesicular (Bakst y Bauchan, 2015; Huang *et al.*, 2017) y ampollas microvellosas notorias, de varios tamaños y formas (Bakst y Bauchan, 2015).

Se ha descrito una alta concentración de exosomas, mediante el marcaje de la proteína CD63, en la región apical de las células mucosas de la unión útero-vaginal, la región apical de las células epiteliales de los TAE sin espermatozoides residentes y la luz de los TAE con presencia de espermatozoides (Huang *et al*., 2017). Aunque se desconocen los mecanismos de interacción de las células epiteliales de los túbulos con los

espermatozoides, se sugiere que los exosomas producidos por las células de los TAE son secretados a la luz tubular durante la presencia de espermatozoides almacenados. De este modo la producción de exosomas podría verse regulada por la presencia de espermatozoides y/o plasma seminal al interior de los TAE (Huang *et al*., 2017). De acuerdo a los antecedentes bibliográficos que señalan el transporte de ácidos grasos libres por parte de los exosomas (Subra *et al*., 2010) y la acumulación de ácidos grasos en el citoplasma de las células de los TAE, se piensa que los ácidos grasos pueden incorporarse a los exosomas y así ser transferidos a los espermatozoides almacenados (Huang *et al.*, 2017).

En cuanto a las ampollas microvellosas, aún se desconoce si corresponden a la categoría de exosomas (Huang *et al*., 2017), sin embargo, de acuerdo a la clasificación de los tipos de vesículas pequeñas, se han establecido como una variación de una "vesícula de desprendimiento", ya que se desprenden directamente de la membrana plasmática al espacio extracelular (Cocucci *et al*., 2009; Bakst y Bauchan, 2015). Dentro de los tipos de ampollas microvellosas, descritas al interior de los TAE de pava, se han descrito ampollas pequeñas (100 a 250 nm) de forma esférica y otras ampollas, posiblemente derivadas de las primeras, de aspecto irregular alargado, ambas con material granular fino en su interior. Con menor frecuencia, se ha descrito la presencia de vesículas esféricas y alargadas más grandes (500 nm a 1 µm), que pueden o no presentar material granular fino (Bakst y Bauchan, 2015). Vesículas de tipo similar en mamíferos, como epidisomas y prostasomas, ricas en contenido proteico y lipídico, se han descrito capaces de alterar la relación colesterol/potasio, la maduración, motilidad y capacidad antioxidante en espermatozoides (Hermo y Jacks; 2002; Rejraji *et al*., 2006; Sullivan y Saez, 2013). En el caso particular de los prostasomas, se han vinculado con la inhibición de la capacitación y la reacción acrosomal, relacionados con su alto contenido de colesterol (Pons-Rejraji *et al*., 2010). A partir de lo mencionado, se especula la posibilidad de que las ampollas microvellosas de los TAE sirvan como fuente de componentes bioactivos que colaboren como sustrato metabólico, inhibidores de la capacitación, estabilizadores del plasmalema y protectores del estrés oxidativo en los espermatozoides residentes (Bakst y Bauchan, 2015). De este modo se sugiere que las moléculas transportadas por las ampollas microvellosas interactúan con los

espermatozoides residentes en los TAE, permitiendo el desarrollo de un estado de incapacitación (Bakst y Bauchan, 2015).

3.5. Incubación espermática con vesículas extracelulares

Algunos estudios que han co-incubado espermatozoides con tejido de la unión útero vaginal, sección oviductal donde se encuentran los TAE principales, han señalado que el contacto cercano de los espermatozoides con el epitelio oviductal prolongó el tiempo de vida de los espermatozoides, al compararse con espermatozoides incubados sin tejido oviductal (Ashizawa *et al*., 1976). Por otra parte, un estudio en codornices japonesas que incubó espermatozoides en presencia y ausencia de extractos de la unión útero vaginal, determinó que los espermatozoides sin extracto mostraban un movimiento más vigoroso, mientras que los espermatozoides incubados con extractos presentaban un movimiento flagelar casi inactivo, disminuyendo la amplitud del movimiento flagelar y la velocidad de avance lineal (Sasanami *et al*., 2013). Respecto a la viabilidad, se pudo determinar que los espermatozoides sin extractos murieron dentro de las primeras cinco horas posteriores a la incubación, mientras que en presencia de extractos los espermatozoides nadaron vigorosamente incluso después de 48 horas (Sasanami *et al*., 2013). Resultados que coinciden con las funciones de inmovilidad y aumento de la viabilidad espermática descrita al interior de los TAE (Bakst *et al*., 1994; Wishart y Horrocks, 2000), respaldando la existencia de moléculas desconocidas como responsables del mantenimiento espermático (Sasanami *et al*., 2013).

Por otra parte, reportes más recientes, basados en investigaciones efectuadas en el oviducto de pavas, señalan que las cabezas y piezas medias de los espermatozoides, almacenados al interior de los TAE, se rodean por las microvellosidades del epitelio tubular, que a su vez libera cuerpos multivesiculares (30 a 130 nm de diámetro). Dichos antecedentes hacen pensar que el contenido de dichas ampollas, por liberación del contenido en la luz tubular o la fusión directa con el plasmalema espermático, podrían involucrarse con la supervivencia espermática prolongada al interior de los TAE (Bakst y Bauchan, 2015).

Respecto a la interacción de las oEV con los espermatozoides, se ha reportado que dicha interacción es dependiente del tiempo de co-incubación, la concentración de oEV y probablemente el origen espermático, relacionado con la fuente de recolección espermática (Ferraz *et al*., 2019; Alcântara-Neto *et al*., 2020). De este modo, se ha reportado que la co-incubación con espermatozoides de cerdo eyaculados, genera las primeras interacciones con las oEV después de las dos primeras horas de co-incubación, iniciando en la región apical de la cabeza del espermatozoide para luego extenderse a todo el resto del espermatozoide, de acuerdo al aumento del tiempo y la concentración de oEV (Alcântara-Neto *et al*., 2020). En el caso del gato, y el uso de espermatozoides de origen epididimario, se ha reportado que la unión de las oEV al espermatozoide se efectúa en la región acrosomal y la pieza media, con un 60% de unión a los 15 minutos de iniciada la co-incubación (Ferraz *et al*., 2019).

La evaluación espermática, tras la co-incubación con oEV de cerdo, ha establecido un aumento en la viabilidad y supervivencia espermática, después de 6 y hasta 17 horas, al compararse con un control de semen fresco sin EVs. Respecto a los parámetros de motilidad, se ha determinado que la co-incubación de espermatozoides con EVs genera una reducción en la motilidad total y progresiva después de dos horas de iniciada la co-incubación, aumentando la velocidad en línea recta después de dos horas y la velocidad curvilínea después de 20 h de iniciada la co-incubación (Alcântara-Neto *et al*., 2020). Reportes de co-incubación de espermatozoides de gato doméstico con EVs han determinado un aumento en la motilidad espermática, con mayor porcentaje de espermatozoides móviles con aumento en la motilidad hiperactiva, y la conservación de la integridad acrosomal, al compararlos con espermatozoides incubados sin EVs (Ferraz *et al*., 2019). Las diferencias obtenidas, respecto a la motilidad espermática, entre ambos estudios podría justificarse por las diferencias en la metodología implementada, contemplando los tiempos y concentraciones de EVs durante la co-incubación, así como el origen de los espermatozoides (Ferraz *et al*., 2019; Alcântara-Neto *et al*., 2020).

Un estudio en aves, que incubó espermatozoides de gallo con exosomas provenientes de la vagina y la unión útero-vaginal del oviducto de gallinas, determinó que la incorporación de exosomas generaba el mismo efecto sobre la conservación

espermática del que puede causar un extensor espermático convencional, con similar viabilidad y motilidad resultante (Huang *et al*., 2017). Si bien los autores esperaban resultados aún más prometedores, se debe considerar que el estudio no contempla un control negativo sin EVs, como los estudios desarrollados en gatos y cerdos (Ferraz *et al*., 2019; Alcântara-Neto *et al*., 2020), que pudiese dar diferencias más significativas respecto a aspectos de motilidad y viabilidad resultante. Por otra parte, no se contemplaron las características biológicas de las regiones oviductales evaluadas, considerando que la naturaleza intrínseca al interior de la luz de los TAE genera un efecto de quiescencia reversible en los espermatozoides residentes (Bakst *et al*., 1994; Wishart y Horrocks, 2000) y que la región vaginal genera inmuno-reacción anti esperma durante la selección espermática oviducal (Higaki *et al*., 1995; Koldemir *et al*., 2017).

Aunque se ha determinado que las EVs son clave en la funcionalidad espermática al interior del oviducto, para concretar una fertilización exitosa, no se han desarrollado muchos estudios a la fecha que permitan examinar el efecto de las EVs sobre los espermatozoides *in vitro* (Alcântara-Neto *et al*., 2020).

4. PREGUNTA BIOLÓGICA

A partir de los antecedentes bibliográficos mencionados, se deduce el potencial biológico que pudiesen tener las EVs de los TAE sobre la conservación espermática prolongada *in vivo*, y cómo este potencial pudiese emularse en sistemas de conservación espermática *in vitro*. Es por ello que el presente estudio buscó establecer una asociación entre las EVs secretadas por los TAE y los efectos que éstas pudiesen ejercer sobre los espermatozoides, respecto al potencial de conservación espermática prolongada generado al interior de los TAE de las hembras aviares, asociado a un contenido bioactivo con proteínas potencialmente específicas para la región anatómica.

5. HIPÓTESIS

El cargo y funcionalidad de las EVs secretadas en el oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*) varía en función del sitio de colecta de éstas (unión útero vaginal, donde hay TAE, o Magnum, donde no hay TAE) y del método empleado para obtener dichas vesículas (lavado o cultivo), siendo la combinación “UUV más lavado oviductal” la más apropiada para inhibir la movilidad sin afectar la viabilidad espermática.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar la composición del contenido de las vesículas extracelulares de los túbulos de almacenamiento espermático y su efecto sobre las funciones espermáticas de movilidad y viabilidad en pavos.

6.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el papel del fotoperiodo y la estacionalidad ambiental en los perfiles séricos de hormonas sexuales femeninas y masculinas.
2. Estudiar el patrón de secreción y las características de las EVs del fluido oviductal (*in vivo*) de hembras de pavo criollo, procedente de dos regiones oviductales (con y sin TAE), evaluando la influencia del fotoperiodo estacional (negativo y positivo) y el estado ovulatorio de la hembra (en ausencia y presencia de postura de huevos).
3. Evaluar la influencia de la fuente de recolección de la muestra, fluido oviductal (*in vivo*) y cultivo celular (*in vitro*), en hembras en fotoperiodo positivo, con y sin ovulación, sobre la secreción y las características de EVs del objetivo 1.
4. Determinar el contenido proteico de las EVs obtenidas del oviducto de hembras de pavo criollo a partir de los grupos experimentales definidos en los objetivos 2 y 3.
5. Analizar el efecto de los aislados de EVs de fluido oviductal (*in vivo*) de gallinas (con y sin TAE), sobre los patrones de unión, viabilidad y movilidad de espermatozoides de gallo criollo, de acuerdo al tiempo de incubación y la concentración de EVs.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se emplearon machos y hembras de las especies *Meleagris gallopavo* y *Gallus gallus*, de acuerdo al objetivo del estudio, provenientes del núcleo genético de “pavo criollo” y “gallina mapuche de huevo azul” de los proyectos “Selección y difusión de genética localmente adaptada para la producción de pavo de campo PYT 2017-0240” y “Modelo para la sustentabilidad de la avicultura campesina mediante la conservación y el mejoramiento genético de la gallina mapuche PYT 2014-0273 ” financiados por la Fundación para la Innovación Agraria y ejecutados por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, en dependencias de la Unidad Avícola, en la localidad de Chillán (latitud -36.60664 y longitud -72.10344), en Chile, durante los meses de julio a diciembre, desde un fotoperiodo negativo de días cortos hacia uno positivo de días largos.

Las aves fueron albergadas en un sistema ambiental semiconfinado, que emula las condiciones de traspatio de crianza campesina a nivel latinoamericano, donde son criadas tradicionalmente este tipo de aves, correspondiente a cubículos comunitarios de madera y malla, con acceso al ambiente exterior en piso de tierra, expuestas durante toda su etapa de recría, madurez sexual y reproducción a las temperaturas y fotoperiodo natural disponible en la región de experimentación. La alimentación se suministró *ad líbitum* en base a agua fresca y concentrado comercial, proporcionando una ración para aves de engorda (Champion Performance®, Nutrición Animal) durante las etapas de crianza y recría (19,5% de proteína cruda, 6% de fibra cruda y 3,5% de extracto etéreo), para luego efectuar una transición y cambio de concentrado a alimento para postura de huevos y reproducción (Champion Performance®, Nutrición Animal) a partir de las 22 semanas de vida en *Melesgris gallopavo* y 17 semanas en *Gallus gallus*, previo y durante la madurez sexual (15% de proteína cruda, 6,5% de fibra cruda y 3% de extracto etéreo).

1.1. Análisis de perfiles séricos de hormonas sexuales

Se emplearon hembras y machos de *Mleagris gallopavo* nacidos a finales de octubre de la temporada anterior, iniciando su primer ciclo reproductivo durante el desarrollo del estudio, desde julio a diciembre del año de muestro, con 28 semanas de vida. Las hembras y machos se mantuvieron en lotes de aves, separados de acuerdo al sexo del animal, durante todo el desarrollo del estudio.

1.2. Análisis de EVs de origen oviducta

Las hembras empleadas para el análisis y extracción de EVs y tejido oviductal fueron seleccionadas al azar y sacrificadas mediante la técnica de eutanasia por dislocación cervical (King *et al*., 1999; Bakst y Akuffo, 2008a; Bakst *et al*., 2010; Foye-Jackson *et al*., 2011), a una edad aproximada de 38 semanas de vida para fotoperiodo negativo en *Meleagris gallopavo* (correspondiente al mes de Julio, en invierno, de acuerdo al clima de 4 estaciones en el que se encuentra la unidad de experimentación, ubicada en el hemisferio sur), 47 a 70 semanas de vida para fotoperiodo positivo en *Melagris gallopavo* y 24 a 40 semanas de vida para fotoperiodo positivo en *Gallus gallus*, con y sin ovulación (correspondiente a los meses de septiembre, a fines de invierno, hasta fines de diciembre, a principio de la estación de verano en el hemisferio sur), categorizando el estado ovulatorio de las hembras de acuerdo al desarrollo de su anatomía ovárica, respecto al desarrollo folicular, y el desarrollo de huevos en el oviducto.

Los machos de *Maleagris gallopavo* y *Gallus Gallus* empleados para la fertilización de hembras mediante monta natural presentaron la misma edad que las hembras, y se dispusieron junto a ellas en las mismas condiciones ambientales descritas anteriormente. En el caso de los machos de *Gallus Gallus* empleados para la recolección de semen fresco, destinado a la evaluación espermática *in vitro,* también presentaron la misma edad que las hembras, se ubicaron en cubículos individuales, para evitar agresiones entre pares (Sauveur, 1992), y se sometieron a las mimas condiciones ambientales descritas para las hembras.

PATRONES SÉRICOS DE HORMONAS SEXUALES

OBJETIVO 1: Evaluar el papel del fotoperiodo y la estacionalidad ambiental en los perfiles séricos de hormonas sexuales femeninas y masculinas.

2.1. Diseño experimental

Para el cumplimiento del objetivo específico número 1, se emplearon 24 hembras y 16 machos de *Meleagris gallopavo*, a los cuales se le tomaron muestras sanguíneas seriadas desde julio a diciembre, en una fecha similar por cada mes, considerando los meses de julio, agosto y septiembre en temporada invernal y los meses de octubre, noviembre y diciembre en estación primaveral. A partir de las muestras séricas de las hembras, se determinaron las concentraciones de progesterona y estradiol, y a partir de las muestras de los machos, se determinaron las concentraciones de testosterona circulante.

2.2. Toma de muestras

Se efectuaron recolecciones mensuales de 1,5 ml de sangre, en un horario fijo desde las 9 hasta las 11 horas, previa restricción de alimento y agua por 12 hrs, a partir de la vena braquial de las aves, depositándose en tubos plásticos estériles de politereftalato de etileno etilendiaminotetraacético con paredes internas siliconizadas y activador de coagulación (Vacuette®). Las muestras fueron centrifugadas a 3.500 rpm a 4°C por 15 min (Heraeus Megafuge® 1.0 R), la fracción de plasma resultante fue extraída y almacenada a -20°C hasta su análisis.

2.3. Ensayos endocrinos

La concentración plasmática de estradiol y progesterona, en muestras de hembras, y testosterona, en muestras de machos, fueron determinadas mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA), empleando kits comerciales (E2-RIA-CT Kit KIP0629, PROG-RIA-CT Kit KIP1458 y TESTO-RIA-CT Kit KIR1709, DIAsource ImmunoAssays SA, Nivelles, Bélgica), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se validó previamente cada kit por medio de la cuantificación de la concentración de estradiol, progesterona y testosterona de muestras de concentración conocida (triplicado), las cuales posteriormente fueron añadidas (test de recuperación) o diluidas (test de dilución) en concentraciones conocidas empleando distintos factores de dilución, desde 1:2 hasta 1:36. Los resultados fueron graficados y por medio de ensayos de paralelidad, en la prueba de dilución y recuperación, se validaron los kits con resultados comprendidos entre el rango del 90 – 110% de dilución y recuperación, considerando los límites de cuantificación de 2,70 pg/mL de estradiol, 0,05 ng/mL de progesterona y 5 ng/dL de testosterona, con los coeficientes de variación de 1,71 – 5,69% para estradiol, 2,44 – 6,08% para progesterona y 0,47 – 4,90% para testosterona.

La cuantificación se efectuó mediante un ensayo de competencia para estradiol, uno para progesterona y otro para testosterona, a partir de las concentraciones hormonales presentes en las muestras (hormona fría), en conjunto con el estándar de estradiol, progesterona y testosterona iodados (hormona caliente), proveído entre los reactivos de cada kit, por un anticuerpo adherido a la base de un tubo de polipropileno. La determinación de la concentración plasmática se realizó a partir de la radioactividad adherida en la base de cada tubo, por medio de un contador gamma (Perkin Elmer Wizard, Helsinski Finlandia), y una recta de cuantificación obtenida a partir de los estándares de concentración conocida, presentes en cada kit, a través de la representación semilogarítmica de los valores de B/B0 (%) ([cuentas del calibrador/cuentas del estándar cero] × 100) frente a la concentración de cada calibrador.

2.4. Fotoperiodo

El fotoperiodo al cual se expuso a las aves (Figura 3) se determinó de acuerdo a la cantidad de horas luz presentes en la localidad en que se desarrolló el estudio, durante cada uno de los días de toma de muestras. De este modo, como la localidad de muestreo se rige por las estaciones climáticas del hemisferio sur, se iniciaron los muestreos a mediados de invierno durante el mes de julio, con 9 hrs y 50 min de luz, finalizando a fines de primavera durante el mes de diciembre, con 14 hrs y 38 min de luz. El comportamiento de la cantidad de horas de luz durante el período obedece a un fotoperiodo positivo con ascenso gradual y progresivo en el tiempo, con diferencias ($p < 0,05$) que alcanzan las 4 hrs y 48 min de aumento total de horas de luz. El mayor aumento se generó a mediados de primavera, entre los meses de octubre y noviembre, con 1 hr y 11 min, y el menor aumento se produjo a fines de primavera, entre los meses de noviembre y diciembre, con 36 min.

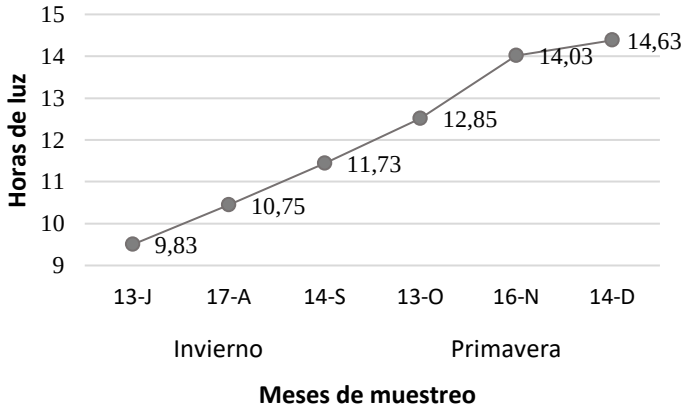

Figura 3. Sumatoria de las horas de luz diarias durante el fotoperiodo de las fechas de muestreos, para la determinación de la concentración plasmática de hormonas sexuales en machos y hembras de pavo criollo (METEOGRAM, 2022). 13-J: 13 de julio; 17-A: 17 de agosto; 14-S: 14 de septiembre; 13-O: 13 de octubre; 16-N: 16 de noviembre; 14-D: 14 de diciembre.

2.5. Análisis estadístico

La cantidad de horas de luz diaria, durante los meses de muestreo, fue evaluada mediante un análisis de varianza, el que contempló la interacción entre el número de horas y los meses de muestreo. Los resultados de las concentraciones plasmáticas de testosterona, estradiol y progesterona fueron evaluados mediante un análisis de varianza y un análisis de comparación de medias empleando el Test LSD de Fisher. Adicionalmente se efectuó una regresión no lineal, polinomial de segundo grado, entre las concentraciones hormonales y las horas de luz diarias. Los análisis fueron realizados mediante el software estadístico Infostat® (2020), considerando un valor de $P < 0,05$ como diferencia estadísticamente significativa.

CARACTERIZACION DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES OVIDUCTALES

OBJETIVO 2. Estudiar el patrón de secreción y las características de las EVs del fluido oviductal (*in vivo*) de hembras de pavo criollo, procedente de dos regiones oviductales (con y sin TAE), evaluando la influencia del fotoperiodo estacional (negativo y positivo) y el estado ovulatorio de la hembra (en ausencia y presencia de postura de huevos).

OBJETIVO 3. Evaluar la influencia de la fuente de recolección de la muestra, fluido oviductal (*in vivo*) y cultivo celular (*in vitro*), en hembras en fotoperiodo positivo, con y sin ovulación, sobre la secreción y las características de EVs del objetivo 1.

OBJETIVO 4. Determinar el contenido proteico de EVs obtenidas del oviducto de hembras de pavo criollo a partir de los grupos experimentales definidos en los objetivos 2 y 3.

3.1. Diseño experimental

Se empleó un total de 18 hembras de *Meleagris gallopavo*, las cuales fueron divididas en 3 grupos, correspondientes a 6 hembras en fotoperiodo negativo (FN), 6 hembras en fotoperiodo positivo (FP) y 6 hembras en fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O). Para la inseminación por monta natural se empleó un total de 6 machos, alternando su acceso a las hembras durante la temporada.

Para el cumplimento del objetivo específico número 2, se emplearon dos secciones del oviducto de cada pava, a partir de muestras *in vivo* de lavado oviductal de hembras en FN, FP y FP en O, mientras que para el objetivo específico 3, se utilizaron las mismas secciones anatómicas, pero de muestras *in vivo* de lavado e *in vitro* de sobrenadante de cultivo celular, a partir de hembras en FP y FP en O. De este modo, en ambos casos se obtuvo dos secciones: la sección A, sin TAE (control), para la cual se empleó la región anatómica del magnum (M) y la sección B, con TAE, correspondiente a la unión útero vaginal (UUV). En resumen, se obtuvo dos secciones oviductales, dos fuentes de recolección de EVs y tres estados reproductivos de las hembras. Cada grupo

experimental fue conformado por un total de 3 repeticiones (réplicas biológicas) constituidas por pools de resuspendidos vesiculares provenientes de 2 oviductos pertenecientes a 2 pavas distintas.

3.2. Aislamiento del tejido oviductal

El oviducto se aisló y se retiró del tracto reproductor en condiciones estériles, inmediatamente posterior a la eutanasia de la hembra (King *et al*., 1999; Kasperczyk *et al*., 2012), se lavó externamente con PBS que contenía solución de antibiótico-antimicótico (AAM) al 2 % (Glico, Thermo Fisher, Madrid, España) a temperatura fisiológica de 41°C (Kasperczyk *et al*., 2012). El oviducto fue dividido en dos grandes secciones, la sección A que contenía el magnum y la sección B que abarcó el útero y la vagina, asegurando la integridad de la unión útero vaginal, donde se encuentran los TAE principales (Bakst, 1992; King *et al*., 1999; Bakst *et al*., 2010; Talbot *et al*., 2018).

3.3. Fuentes de recolección de vesículas extracelulares

3.3.1. Lavado oviductal. Las secciones oviductales, A sin TAE, correspondiente al magnum, y la zona experimental B con TAE, relacionada con la unión útero vaginal, fueron sometidas a un lavado de la región luminar, con un total de 5 mL de PBS filtrado por 0,2 µm y 2 % de AAM a temperatura fisiológica de 41°C (Kasperczyk *et al*., 2012; Almiñana *et al*., 2017; Lopera *et al*., 2017). Cada sección fue sometida a clampado con pinzas hemostáticas quirúrgicas, se dejó reposar por 5 minutos y luego se procedió a la recolección del líquido de lavado, presionando suavemente desde el istmo hacia el infundíbulo en la sección A y desde la base del útero hasta el inicio de la vagina en la sección B, maximizando así la recuperación de líquido resultante. Los lavados de cada sección se sometieron a centrifugaciones sucesivas a velocidades crecientes, para eliminar células y restos celulares, eliminando el pellet y recuperando los sobrenadantes, de acuerdo al protocolo inicial de extracción de EVs decrito por Théry *et al*., (2006), partiendo con 300 g por 10 min a t° ambiente, 2.000 g por 10 min a t° ambiente y 10.000 g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante resultante fue almacenado a -80 °C hasta efectuar

el aislamiento de las vesículas extracelulares (Alcântara-Neto *et al*., 2019; Alcântara-Neto *et al*., 2020).

3.3.2. Establecimiento de cultivos celulares. Posterior al lavado oviductal, se extrajeron EVs a partir de cultivos celulares primarios obtenidos de los mismos tractos, a partir de muestras de la sección A (magnum) y B (unión útero vaginal). Para ello las secciones fueron diseccionadas mediante el corte suave, con micro tijeras curvas de disección y pinzas microquirúrgicas, para ser depositadas en placas Petri individuales. Una vez allí, fueron cortadas longitudinalmente con tijeras quirúrgicas, para exponer la superficie del epitelio luminal (Kasperczyk *et al*., 2012; Huang *et al*., 2017; Talbot *et al*., 2018).

3.3.2.1. Colecta de tejido sección A del oviducto. Para la sección A se efectuaron cortes de pequeños fragmentos de la región epitelial expuesta, empleando pinzas y tijera microquirúrgica, siendo fraccionados en trozos de 2 a 3 mm (Kasperczyk *et al*., 2012; Huang *et al*., 2017) y depositados en tubos estériles de 45 mL, los que contenían PBS con 2% de AAM a 39°C, para su posterior digestión.

3.3.2.2 Colecta de tejido sección B del oviducto. Respecto a la sección B, el tejido se observó previamente mediante estereomicroscopía (5 x) para detectar la presencia de los TAE incrustados en los pliegues longitudinales, y así asegurar el corte preciso de la zona del esfínter útero vaginal, entre el extremo craneal de la vagina y el extremo caudal del útero, mediante el uso de pinzas y tijeras microquirúrgicas (Brillard y Bakst, 1990; King *et al*., 1999; Bakst y Akuffo, 2008a). Los trozos de epitelio fueron depositados en tubos estériles de 45 mL, que contenían PBS con 2% de AAM a 39°C, para su posterior digestión.

3.3.2.3. Digestión de tejido y cultivo celular. Los tejidos colectados para el aislamiento celular de la sección A y B fueron incubados, por separado, con 1mg/mL de colagenasa tipo I (Gibco, Life technoilogies corporation, NY, USA) en medio de cultivo DMEM-F12 sin rojo fenol (Sigma-Adrich, Co., United Kingdom) con 2% de AAM, a 38,5 °C en un baño de agua termorregulado, con agitación cada 10-15 minutos, durante 30-40 min para la sección A y 60-70 min la sección B. Se agregó un volumen de 1:2 de medio de cultivo

DMEM-F12 sin rojo fenol que contenía 1% de AAM y 10% de suero fetal bovino (SFB) para detener la reacción. Las células fueron dispersadas mediante pipeteo, para luego filtrar la suspensión resultante a través de una malla de acero inoxidable, la cual fue lavada hasta 3 veces con el medio señalado.

Para el cultivo celular se efectuaron siembras celulares en placas estériles de 60 x 15 mm (Spl Lide Sciences), las que se incubaron a 39°C con 5 % de CO_2, en medio de cultivo DMEM-F12 sin rojo fenol con 10 % de SFB, 2% de suero de pava, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato, 1 % de AAM, 1 µL/mL de β-mercaptoethanol y 0,02 µL/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF). Cuando los cultivos alcanzaron un 70 % de confluencia y el 70 % de su población celular correspondió a células de carácter epitelial (las cuales fueron detectadas por su morfología y disposición característica) el medio de cultivo fue reemplazado por medio depletado, para ser cultivado durante 24 horas antes de colectar el medio con vesículas extracelulares (Huang *et al*., 2017). Considerando que, de acuerdo a los cultivos primarios de células de los TAE realizados por Talbot *et al*., (2018), las células cultivadas pueden conservar su morfología epitelial durante 2 a 3 semanas, independiente de su capacidad de proliferación.

Posterior a la recolección del medio con EVs las células fueron congeladas, asegurando su conservación para futuros experimentos. Para ello se utilizó medio de congelación compuesto por 10 % dimetil sulfóxido (DMSO), 10 % medio de cultivo DMEM y 80 % de SFB. Después de tripsinizadas las células éstas se centrifugaron, desechando el sobrenadante y resuspendiendo en 0,5 mL de medio de congelación, en viales de ultracongelación, para ser inmediatamente congeladas a -80 °C y posterior inmersión en nitrógeno líquido.

3.4. Aislamiento de vesículas extracelulares

El aislamiento de las EVs fue realizado mediante ultracentrifugación diferencial, de acuerdo al protocolo de Théry *et al*., (2006). Se empleó un control negativo (libe de EVs) en base a PBS filtrado (0,22 µm), y dos controles positivos (fuente de EVs) en base a

sangre humana. Mientras que los grupos experimentales correspondieron a lavados oviductales de M y la UUV de hembras en FN, FP y FP en O, y sobrenadantes de medios de cultivo celular de M y la UUV en hembras en FP y FP en O.

Previo al aislamiento de las EVs, el grupo control en base a sangre humana, fue sometidos a una fase de reposo de 60 minutos en posición vertical, a la espera de la coagulación de los glóbulos rojos, para luego sedimentar mediante centrifugación a 1300 g durante 10 min, y así extraer el suero resultante (Kuo y Jia, 2017). Todas las muestras, controles y tratamientos, fueron sometidas a un proceso de pre limpieza inicial basado en centrifugaciones crecientes, para eliminar células y restos celulares, eliminando el pellet y recuperando los clarificados, partiendo con 300 g por 10 min a t° ambiente, 2.000 g por 10 min a t° ambiente y 10.000 g por 30 min a 4° C. El sobrenadante final fue sometido a ultracentrifugación a 100.000 g por 70 min a 4° C para sedimentar las EVs, el sedimento resultante fue lavado en un gran volumen de PBS filtrado (0,22 µm) para eliminar las proteínas contaminantes, ultracentrifugándose nuevamente a la misma velocidad, tiempo y t°. El sedimenato resultante de ésta última centrifugación fue resuspendido en 50 µL de PBS filtrado y fue almacenado a -80° C hasta su uso (Théry *et al*., 2006).

3.5. Identificación y caracterización de vesículas extracelulares

La identificación y caracterización de exosomas y microvesículas se efectuó sobre los grupos de tratamiento anteriormente señalados, además de un control negativo sin EVs, correspondiente a PBS filtrado (0,22 µm) (Arab *et al*., 2019), y un control positivo para las técnicas, en base a EVs obtenidas de sangre humana (Sunkara *et al*., 2019).

3.5.1. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Para la determinación del tamaño y concentración de las EVs se empleó una porción representativa de 1/4 del volumen total de las muestras de resuspendido de EVs, para su análisis mediante el software Nanosight (Nanosight, Wiltshire, Reino Unido) (Lopera *et al*., 2017). Los resultados fueron analizados mediante la interpretación de gráficas y tablas que

muestran la distribución respecto al tamaño y concentración de los exosomas y microvesículas encontradas.

3.5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para la caracterización morfológica de las EVs, el sedimento resuspendido de las EVs fue diluido en PBS filtrado (0,22 µm) hasta lograr una concentración de partículas asociadas a EVs de $10x10^{10}$ partículas/mL. Una vez establecida la concentración, se tomó una alícuota de 3 µL de muestra para ser colocada en una rejilla recubierta de carbono (formvar) durante 5 minutos a temperatura ambiente, para luego ser lavada con agua destilada tibia con 3 enjuagues de 30 segundos por vez (Almiñana *et al*., 2017). Como contraste negativo se empleó acetato de uranilo al 2%, el cual se agregó durante 1 a 2 minutos, para luego dejar secar (Almiñana *et al.*, 2017; Lopera *et al*., 2017). La visualización y la recopilación de imágenes consideraron la captura de al menos 5 campos por muestra, mediante el uso de un microscopio electrónico de trasmisión (Talos F200C G2, Thermo Fisher Scientific,). El procesamiento de imágenes y la determinación de tamaño de las vesículas se efectuó mediante el software Thermo Scientific™ Maps (habilitado por el software Thermo Scientific™ Velox). Este servicio se externalizó a la Unidad de Microscopía Electrónica de la Pontificia Universidad Católica de Chile en Santiago.

3.5.3. Proteómica. Este análisis corresponde al objetivo específico 4, se ha colocado en esta sección a efectos de darle continuidad al estudio de las EVs. La secuenciación del patrón de secreción, global y diferencial, mediante espectrometría de masas (MS) de las EVs, se efectuó sobre los grupos experimentales de las muestras de la sección A del M (sin TAE) y la sección B de la UUV (con TAE) de muestras *in vivo* de lavado oviductal de pavas en FN, FP y FP en O, y la sección A y B de muestras *in vitro* de sobrenadante de cultivo celular de pavas en FP y FP en O. Los análisis se externalizaron a los servicios de laboratorio de la empresa Melisa Institute®, sede Concepción, Chile. El análisis bioinformático incluyó expresión diferencial y ontología, contra la base de datos curada de *Meleagris gallopavo*, UniProtKB - G1N1M9.

3.5.3.1. Preparación de las muestras. Las EVs de cada uno de los 10 grupos experimentales fueron concentradas mediante ultracentrifugación, formando pools a

partir de 4 muestras biológicas, siendo resuspendidas en 50 µL de PBS filtrado (0,22 µm). Las muestras fueron almacenadas a -80 °C en viales de congelación para luego ser trasladadas en nitrógeno líquido hasta los laboratorios de Melisa Institute®.

3.5.3.2. Extracción de Proteína. A cada pool de muestras, correspondiente a cada grupo experimental, se le añadió inhibidor de proteasas/fosfatasas (#1861284, Thermo Scientific) a una concentración final de 1 %, para luego ser liofilizadas y resuspendidas en 8 M de urea con 25 mM de bicarbonato de amonio a pH 8, siendo homogeneizadas mediante ultrasonido por 1 min con pulsos de 10 s (on/off) a una amplitud del 50 % utilizando un baño frio. Luego las muestras se incubaron a 4 °C por 5 min y se centrifugaron a 21.000 g por 10 min a 4° C, para eliminar debris. Inmediatamente después se efectuó la cuantificación proteica de las muestras mediante Qubit 4TM (Thermo Scientific) usando el kit Qubit Protein Assay, tomando 100 µg para digestión tríptica.

3.5.3.3. Preparación para espectrometría de masas. Las proteínas resultantes fueron precipitadas agregando 5 volúmenes de acetona fría e incubadas overnight a -80 °C, para luego ser equilibradas a temperatura ambiente por 10 min, se centrifugaron a 16.000 g por 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El pellet resultante fue lavado 3 veces con acetona fría al 80 %, dejándose secar en un concentrador rotatorio. Las proteínas fueron resuspendidas en 30 µL de 8 M Urea y 25 mM de bicarbonato de amonio, se redujeron con DTT a una concentración final de 20 mM en 25 mM bicarbonato de amonio e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Seguido, se alquilaron agregando Iodoacetamida a una concentración final de 20 mM en 25 mM de bicarbonato de amonio e incubaron por 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente, para ser diluidas 8 veces con 25 mM de bicarbonato de amonio. La digestión fue realizada con Tripsina grado secuenciación (#V5071, Promega) en una proporción 1:50 de proteasa: proteína (masa/masa), se incubaron por 16 hrs a 37 °C y la reacción de digestión se detuvo por diferencial de pH agregando acido fórmico al 10 %. Luego las muestras fueron sometidas a Clean Up Thermo Pierce C18 Spin Columns (cat cod 89870, ThermoFisher), según indicaciones del proveedor. Posteriormente, los péptidos limpios fueron secados en un concentrador rotatorio a 1.000 rpm overnight a 10 °C.

3.5.3.4. LC-MS/MS (Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry). Se tomaron 200 ng de los péptidos obtenidos en el paso anterior, los que fueron inyectados a un Evosep One (Evosep Biosystems) acoplado a un espectrómetro de masas timsTOF Pro ("Trapped Ion Mobility Spectrometry – Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometer", Bruker Daltonics) utilizando una columna PepSep Eight (8 cm x 150 µm ID, 1,5 µm C18, Bruker Daltonics). La cromatografía líquida se realizó utilizando la modalidad de 30 SPD ("Samples per Day") en todas las muestras. El gradiente utilizado fue de 2 % al 35 % de tampón B (0,1 % Ac. Fórmico – Acetonitrilo). La colección de resultados fue realizada utilizando el software TimsControl 2.0 (Bruker Daltonics) bajo 10 ciclos de PASEF, con un rango de masas de 100-1.700 m/z, ionización del capilar 1.500 V y una temperatura de 180 °C en el capilar, con una frecuencia del TOF 10 KHz a una resolución de 50.000 FWHM.

3.5.3.5. Identificación de Proteínas. Los datos obtenidos fueron analizados con el software MSFragger 3.7 (Kong *et al*., 2017) por medio de la plataforma Fragpipe v19.1 (https://fragpipe.nesvilab.org/) utilizando el flujo de trabajo "default", en un servidor de análisis de datos compuesto por 48 núcleos y 512 Gb de memoria RAM. Se utilizaron parámetros de tolerancia de masas de precursores de -20 a 20 PPM y tolerancia de fragmentos de masa de 40 PPM. Dentro de las opciones de digestión se utilizó la tripsina como enzima, modo de digestión específico, y un máximo de 2 escisiones de pérdidas por péptido ("missed cleavages per peptides"). Se utilizaron como modificaciones post-traduccionales (PTM): Carbamidometilación de la cisteína, como PTM fija: Oxidación de Metionina (M), Acetilación Nterminal, como PTMs variables. La base de datos utilizada para la identificación fue el proteoma de *Meleagris gallopavo* disponible en Uniprot (28.236 entradas totales). Se incluyó la estimación de FDR < 1 % por medio de una base de datos decoy. Adicionalmente, se agregó una base de datos de contaminantes comunes en espectrometría de masas para el análisis de identificación de proteínas.

3.5.3.6. Cuantificación de proteínas por Label-Free Quantification (LFQ). Utilizando los resultados de identificación de proteínas, se seleccionaron las columnas correspondientes a los códigos de acceso de Uniprot y valores de intensidad. Se realizó un filtro de valores válidos, correspondientes al 60 % de presencia, es decir, se tomaron

las proteínas que estaban presentes a lo menos en 3 de las 5 muestras analizadas por condición, por medio del software Perseus v2.0.7 (Tyanova *et al*., 2016). La matriz resultante fue sujeta a normalización por medianas. Las proteínas de expresión diferencial se determinaron aplicando un T-Test con una prueba de corrección múltiple de Benjamini Horschberg (valor-p ajustado < 0.05). Se realizó la identificación de DEPs (Differentially Expressed Proteins) entre las comparaciones:

• Lavado v/s sobrenadante, muestras: M *in vivo* FP, M *in vivo* FP en O, UUV *in vivo* FP y UUV *in vivo* FP en O v/s M *in vitro* FP, M *in vitro* FP en O, UUV *in vitro* FP, UUV *in vitro* FP en O.
• Magnum v/s unión útero vaginal, muestras: M *in vivo* FP, M *in vivo* FP en O, M *in vitro* FP y M *in vitro* FP en O v/s UUV *in vivo* FP, UUV *in vivo* FP en O, UUV *in vitro* FP y UUV *in vitro* FP en O.

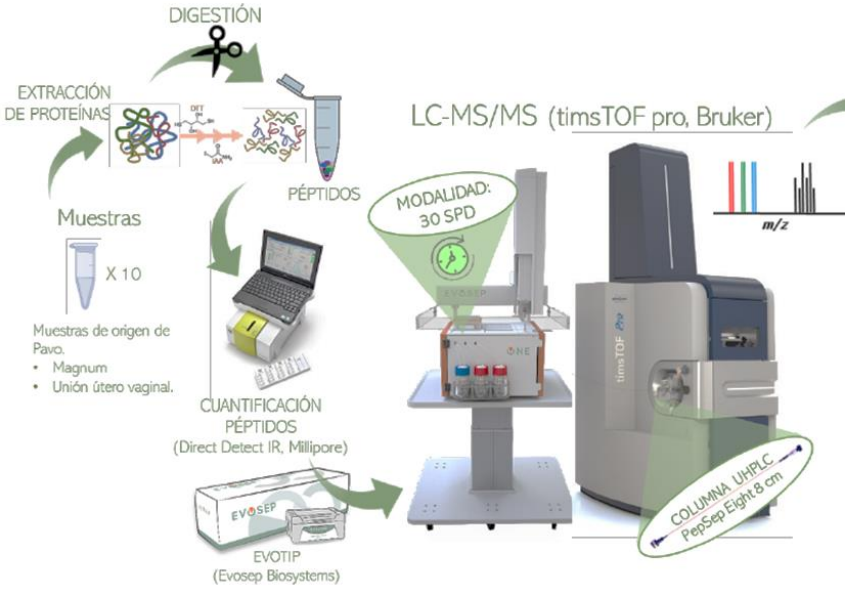

Figura 4. Diagrama del flujo de trabajo para el análisis de espectrometría de masas. Adaptado de los reportes de Melisa Institute®.

3.6. Diseño estadístico

Se efectuó mediante un diseño experimental factorial, correspondiente a 6 secciones oviductales a evaluar (M en FN, UUV en FN, M en FP, UUV en FP, M en FP en O y UUV en FP en O) y 2 fuentes de obtención vesicular (*in vivo* por lavo oviductal e *in vitro* por sobrenadante de cultivo celular), obteniendo 10 tratamientos experimentales a evaluar (FN sólo presentó muestras *in vivo*). Cada tratamiento se conformó por la repetición de 3 muestras, mientras que cada muestra se formó por 1 pool de la extracción vesicular de 2 oviductos de pavas distintas. Las variables a evaluar se dividieron en aspectos morfológicos, relacionados con la forma, tamaño y concentración, y aspectos moleculares, de acuerdo a la cantidad y tipo de proteína de las EVs (Blair y Taylor, 2008; Almiñana *et al*., 2017; Huang *et al*., 2017).

Una vez obtenidos los resultados, se determinó la normalidad de la distribución de los datos mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Los resultados de NTA, frente a la ausencia de distribución normal, fueron transformados en logaritmo en base 10 para ser evaluados mediante la prueba paramétrica de análisis de varianza de tipo factorial, incluyendo la interacción entre el tipo de sección oviductal (M y UUV), la fuente de recolección vesicular (*in vivo* e *in vitro*) y el fotoperiodo y estado reproductivo de la hembra (FN, FP y FP en O), mediante el uso del software estadístico Infostat®. En caso de existir interacción significativa, se empleó la prueba de LSD Fisher para la comparación de medias (Blair y Taylor, 2008).

EFECTO E INTERACCION DE LAS VESÍCULAS EXTRACEULARES DE LOS TAE SOBRE ESPERMATOZOIDES *IN VITRO*

OBJETIVO 5. Analizar el efecto de los aislados de EVs de fluido oviductal (*in vivo*) de gallinas (con y sin TAE), sobre los patrones de unión, viabilidad y movilidad de espermatozoides de gallo criollo, de acuerdo al tiempo de incubación y la concentración de EVs.

4.1. Diseño experimental

Todos los análisis de la sección 4 corresponden al objetivo específico número 5. Para la evaluación de las interacciones entre espermatozoides y EVs, se realizó una colecta de EVs *in vivo* del lavado de las secciones del M y la UUV del oviducto de hembras de la especie *Gallus gallus* en FPenO. Respecto al número de aves, se requirió un total de 6 hembras, a partir de las cuales se obtuvo 6 lavados de M y 6 lavados de la UUV, los cuales se agruparon en pools de 2 aves por muestra, disponiendo de 3 muestras de M y 3 muestras de la UUV para las 3 réplicas biológicas necesarias. Para la colecta de semen fresco se emplearon 5 machos, los cuales fueron seleccionados al azar, en pares, para la obtención de los pools a evaluar, considerando las 3 repeticiones de los tratamientos con EVs y los tratamientos control sin EVs. De este modo, los pools de semen, a concentración constante (10×10^6 espermatozoides/mL), fueron incubados con las muestras de EVs, de dos orígenes (M y UUV), a 3 concentraciones diferentes, y muestras control sin EVs, evaluando las 3 variables propuestas, correspondientes a la interacción (internalización y patrón de unión), viabilidad y movilidad espermática. El patrón de unión fue evaluado con muestras de EVs de la UUV y muestras control sin EVs, durante 3 puntos en el tiempo, correspondiente a 2, 4 y 6 hrs de iniciada la co-incubación a una concentración constante de EVs de 4×10^8 partículas/mL. Mientras que las variables de viabilidad y movilidad fueron evaluadas con EVs del M, EVs de la UUV y muestras control sin EVs, en 4 puntos en el tiempo, correspondientes al tiempo de 2, 4, 6 y 10 horas de co-incubación, de acuerdo a 3 concentraciones de muestras de EVs, 4×10^7, 4×10^8 y 4×10^{10} partículas/mL.

4.2. Concentración de EVs

La cuantificación de la concentración de EVs se calculó de acuerdo a la concentración de partículas por mL, mediante la cuantificación por NTA, tal como se describe en el punto 3.5.1., en base a los análisis más recientes respecto a los efectos de las EVs sobre la movilidad y viabilidad espermática, efectuados en las especies *Equus caballus*, *Canis lupus familiaris, Canis lupus, Panthera pardus* y *Felis catus* (De Ferrez *et al*., 2019; De Ferraz *et al*., 2020; Lange-consiglio *et al*., 2023). De éste modo se determinaron 3 concentraciones de EVs para la evaluación, estipulando la concentración más alta de 4 x 10^{10} partículas/mL en base a la concentración biológica de partículas obtenidas de los tractos del oviducto, a partir de los lavados *in vivo* del M y la UUV, provenientes de hembras de la especie *Gallus gallus*. Se determinó una concentración intermedia de 4 x 10^{8} partículas/mL, de acuerdo a los mejores resultados de movilidad y viabilidad espermática, en base al uso de EVs obtenidas del sobrenadante de cultivos de células endometriales, en la especie *Equus ferus caballus* (Lange-consiglio *et al*., 2023). Estableciéndose además una tercera concentración, como la más baja de las 3 concentraciones experimentales, de 4 x 10^{7} partículas/mL, a partir de su uso en EVs de lavado oviductal a partir de las especies *Canis lupus familiaris* y *Felis catus*, empleadas sobre semen criopreservado de *Canis lupus* y *Panthera pardus*, mejorando la integridad acrosomal y movilidad espermática (De Ferrez *et al*., 2019; De Ferraz *et al*., 2020).

4.3. Preparación de muestras espermáticas para la co-incubación con EVs

La obtención de semen fresco se efectuó mediante la técnica de masaje dorso abdominal (Burrows and Quinn, 1937; Sauveur; 1992). Los experimentos se realizaron en 3 réplicas biológicas, donde cada réplica se conformó de la agrupación del semen de 2 de los 5 machos disponibles, seleccionados al azar (Huang *et al*., 2017). A su vez, el preparado correspondiente a cada réplica fue dividiendo para la adición de muestras de EVs de M y la UUV, de hembras en FP en O, en 3 concentraciones diferentes (4 x 10^{7}, 4 x 10^{8} y 4 x 10^{10} partículas/mL) y la muestra control sin EVs.

Las muestras de semen agrupado se lavaron con diluyente espermático (136 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM $MgSO_4$, 1,26 mM $CaCl_2$, 4,2 mM $NaHCO_3$, 5,6 mM glucosa y 10

mM HEPES a pH 7,4) (Matsuzaki *et al.,* 2015) y se centrifugaron a 500 g por 10 minutos (Alcântara-Neto *et al*., 2020), para eliminar el plasma seminal, siendo resuspendidas en 1 mL de diluyente espermático. Tras el conteo espermático correspondiente, utilizando una cámara de Neubauer, se efectuó una dilución adicional, empleando el diluyente espermático mencionado, para alcanzar una concentración de $10x10^6$ espermatozoides/mL (Alcântara-Neto *et al*., 2020; Lange-Consiglio *et al*., 2023). Las diluciones resultantes fueron dispuestas al azar en los 7 grupos experimentales.

4.4. Co-incubación de las EVs con espermatozoides

Para evaluar la interacción y los efectos de las EVs sobre los espermatozoides, todas las muestras fueron sometidos a las mimas condiciones ambientales de co-incubación, contemplando una temperatura de 38,5 °C, con 5 % de CO_2, durante un periodo máximo de 6 horas para evaluar interacción y 10 horas para evaluar viabilidad y movilidad. Las evaluaciones contemplaron 2 experimentos, uno que evaluó la interacción (internalización y patrón de unión) entre las EVs y los espermatozoides y otro que evaluó los efectos de las EVs en la viabilidad y movilidad espermática, de acuerdo al tiempo y concentración de EVs durante la co-incubación.

4.4.1. Interacción de las EVs con los espermatozoides. Para la evaluación de la interacción entre EVs y espermatozoides se marcaron las EVs con un kit fluorescente verde PKH67 (MINI67, Sigma), tinte lipofílico empleado para la visualización de EVs (Almiñana *et al*., 2017). Se emplearon 10 µL de EVs de la UUV de hembras en FP en O, a una concentración de 4×10^8 partículas/mL, para ser incubados con 2 µL de PKH67 y 150 µL de diluyente C por 5 min a temperatura ambiente en obscuridad. Se incorporaron 200 µL de PBS filtrado (0,22 µm) y se centrifugaron a 2.500 g por 20 min a 4 °C en un Amicon® Ultra-15 (10 kDa), lavando y centrifugando hasta por 3 veces la muestra con 200 µL de PBS filtrado, recuperando la muestra que quedó en el filtro Amicon añadiendo 100 µL de diluyente espermático. En paralelo se efectuó un control negativo empleando el mismo protocolo, pero con PBS en lugar de los resuspendidos de EVs, permitiendo la verificación de la ausencia de precipitado de colorante y evitar la tinción inespecífica de PKH67 (Alcântara-Neto *et al*., 2020).

Las muestras de EVs marcadas con tinte fluorescente PKH67 fueron incubadas junto a los espermatozoides por un tiempo máximo de 6 horas (38,5°C, 5% de CO_2 en oscuridad), evaluándose a las 2, 4 y 6 horas de co-incubación (Lange-Consiglio, *et al*., 2023), observando si las EVs se internalizaban en las células espermáticas, y en qué área anatómica del espermatozoide se efectuaba la internalización. Para concretar la evaluación y facilitar la visualización de los espermatozoides, se adicionaron 2 gotas/mL de la tinción nuclear para células vivas NicBlue™ Live Cell Stain ReadyProbes™ (Invitrogen, ThermoFisher, USA), la cual ingresa a las células y emite una fluorescencia azul al unirse al ADN. La tinción fue aplicada 5 min previo a la culminación del tiempo de co-incubación, en las mismas condiciones atmosféricas descritas para la co-incubación. Luego se extrajeron alícuotas de 10 µL de muestras, a las cuales se les aplicó una proporción de 1:1 de formaldehido al 38 % para fijar las muestras, dicho procedimiento de fijación se efectuó cumplidos los tiempos de co-incubación de 2, 4 y 6 hrs para cada observación. Las muestras fueron centrifugadas a 700 g durante 5 min a 4 °C, se resuspendió el sedimento en 10 µL de PBS filtrado (0,22 µm) y se dispusieron 2 µL de cada muestra entre portaobjetos y cubreobjetos. Se efectuó la evaluación de las muestras mediante un microscopio EVOS para fluorescencia (Life technologies, ThermoFisher), con software de imágenes integrado y una cámara monocromática de alta sensibilidad (CCD Sony™ ICX285AL). Se tomaron fotografías y se evaluó la internalización y el patrón de unión en 5 áreas diferentes por cada una de las réplicas correspondientes a cada muestra a evaluar (Huang *et al*., 2017).

4.4.2. Efecto de las EVs en la viabilidad espermática. La evaluación de la influencia de las EVs en la viabilidad espermática se determinó de acuerdo al tiempo de co-incubación, en las mismas condiciones ambientales mencionadas anteriormente (38,5 °C y 5 % de CO_2), a las 2, 4, 6 y 10 horas de iniciada la co-incubación, a concentraciones de muestras de EVs de 4×10^7, 4×10^8 y 4×10^{10} partículas/mL, a partir de muestras del M y la UUV de hembras en FPenO, junto al control negativo sin EVs (Huang *et al*., 2017; Alcântara-Neto *et al*., 2020).

La evaluación de viabilidad se efectuó empleando la tinción supravital eosina, la cual se preparó al 0,67 % de eosina y 0,9 % de NaCl en agua destilada, disolviendo con

calentamiento suave para llevar a ebullición luego de la homogeneización de la solución, enfriando a t° ambiente (20 °C) y filtrando por 0,22 µm (Björndahl *et al*., 2003). Las muestras incubadas se evaluaron utilizando volúmenes similares de semen y tinción (3 µl), sobre portaobjetos previamente calentados (38,5 °C), incubando por 30 segundos a t° ambiente (20 °C), para luego agregar un cubreobjetos que facilite su visualización, en duplicado, con 2 frotis por cada muestra (Björndahl *et al*., 2003; Łukaszewicz *et al*., 2008). La observación se efectuó mediante un microscopio invertido (Olimpus CK X 41, Tokio, Japón) con corredera de contraste de fase de gran nitidez y maximización de ajuste óptico, en aumento de 1000 X. Las evaluaciones de viabilidad se efectuaron a partir de un mínimo de 100 células por muestra, clasificando a los espermatozoides como células vivas totales a aquellos visualizados como blancos (no teñidos) y apariencia ligeramente rosada o roja restringida a la región del cuello, y clasificando como células muertas a los espermatozoides teñidos de color rosado o rojo (Björndahl *et al*., 2003; Łukaszewicz *et al*., 2008; Blanch *et al*., 2014).

4.4.3. Efecto de las EVs en la movilidad espermática. Se evaluaron las muestras de acuerdo a los mismos tratamientos mencionados en el experimento 4.4.2. de viabilidad espermática, considerando las muestras con EVs, del M y la UUV, y las muestras sin EVs. Se consideraron los mismos tiempos de co-incubación, a las 2, 4, 6 y 10 hrs, y las mismas concentraciones de muestras de EVs de 4×10^7, 4×10^8 y 4×10^{10} partículas/mL. La movilidad espermática se evaluó mediante análisis visual de movilidad global (Sauveur, 1992), mediante un microscopio invertido (Olimpus CK X 41, Tokio, Japón) con corredera de contraste de fase de gran nitidez y maximización de ajuste óptico. En cada punto de tiempo se evaluaron 3 réplicas de cada tratamiento, empleando 3 µL por evaluación, en portaobjetos previamente calentados (38,5 °C). La evaluación de movilidad fue determinada a t° ambiente (20-25 °C) mediante la evaluación de 3 campos seleccionados al azar por cada una de las réplicas técnicas.

4.5. Diseño estadístico

La evaluación de la interacción espermática con EVs, que evaluó la internalización y el patrón de unión, contempló un diseño experimental de tipo factorial de 2 x 3, correspondiente al factor preparaciones de EVs incorporadas, constituido por 2 niveles (preparación con EVs de la UUV y preparación sin EVs) y el factor tiempo, con 3 niveles de evaluación (2, 4 y 6 hrs), obteniendo 6 tratamientos resultantes. Mientras que el estudio que evalúa las variables de viabilidad y movilidad espermática empleó dos diseños experimentales, uno que evaluó las variables respuesta de todos los grupos experimentales por cada punto de tiempo y otro que evaluó cada variable dependiente durante el tiempo de muestreo. De éste modo la evaluación por cada punto de tiempo corresponde a un análisis de varianza que considera a las preparaciones de EVs, constituido por 7 niveles (preparación con EVs de 4×10^7, 4×10^8 y 4×10^{10} partículas/mL del M y la UUV, y una preparación control sin EVs) como la variable independiente, mientras que la evaluación de cada preparación de EVs corresponde a un análisis de varianza que considera al tiempo de co-incubación como la variable independiente, con 4 niveles de evaluación (2, 4, 6 y 10 hrs). Cada tratamiento se conformó por la repetición de 3 muestras, mientras que cada muestra se formó por 1 pool de semen agrupado de la extracción de 2 de 5 machos seleccionados al azar y un pool de EVs formado por la extracción de 2 oviductos de hembras distintas.

Los resultados fueron evaluados de acuerdo al patrón de normalidad mediante la prueba estadística de Shapiro-Wilk, como la mayoría de los datos no presentaron distribución normal, se empleó la transformación de los datos a logaritmo en base 10 (Log_{10}). El análisis estadístico se desarrolló mediante un análisis de varianza de acuerdo a los grupos de preparaciones de EVs y otro de acuerdo a los tiempos de co-incubación, empleando el software estadístico Infostat®, evaluando las interacciones significativas mediante la prueba de comparación de medias de Fisher (Blair y Taylor, 2008).

III. RESULTADOS

PATRONES SÉRICOS DE HORMONAS SEXUALES

OBJETIVO 1. Evaluar el papel del fotoperiodo y la estacionalidad ambiental en los perfiles séricos de hormonas sexuales femeninas y masculinas.

Se estudiaron los perfiles de hormonas sexuales con la finalidad de establecer los comportamientos reproductivos asociados al fotoperiodo estacional (invierno y primavera). De éste modo se determinaron los periodos óptimos de muestreo para fotoperiodo negativo (de julio a agosto), fotoperiodo positivo (FP) y estado ovulatorio (septiembre para FP y fines de septiembre hasta inicios de noviembre como el mejor periodo de muestreo para FP en ovulación), empleados como criterios de evaluación para los objetivos 2, 3 y 4.

1.1. Análisis hormonal de la hembra

1.1.1.1. Concentración plasmática de estradiol

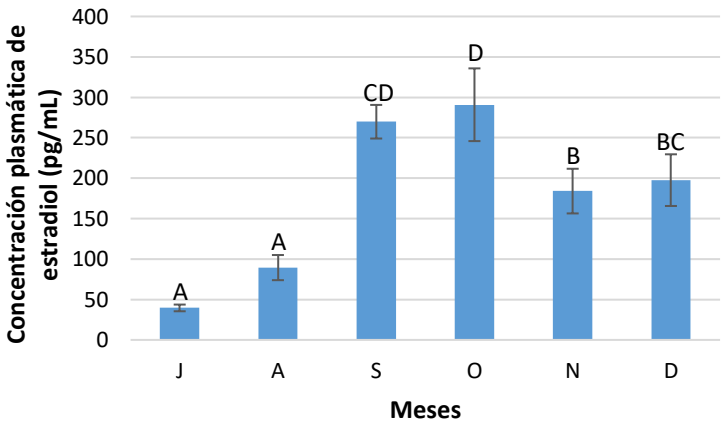

Figura 5. Concentración plasmática de estradiol, en hembras de pavo criollo, en Chile, durante invierno y primavera. J: julio; A: agosto; S: septiembre; O: octubre; N: noviembre; D: diciembre. Test LSD Fisher, donde medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

Las medias de la concentración plasmática de estradiol en pavas, durante invierno y primavera, en las fases de fotoperiodo negativo y positivo (Figura 5), muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas fechas de muestreo. De este modo, las concentraciones más bajas de estradiol a mediados de invierno, en los meses de junio y agosto con medias de 39,58 ± 21,11 pg/mL y 89,43 ± 79,33 pg/mL respectivamente, sin diferencias entre sí ($p \geq 0,05$), difieren ($p < 0,05$) con todos los demás puntos de muestreo, correspondientes a septiembre a fines de invierno, con 269,84 ± 99,63 pg/ml, y octubre, noviembre y diciembre en primavera, con 290,83 ± 215,65 pg/mL, 184,04 ± 135,29 pg/mL y 197,58 ± 156,57 pg/mL respectivamente. En cuanto a las concentraciones más altas de estradiol, registradas en septiembre a fines de invierno y octubre a principios de primavera, sin diferencias entre sí ($p \geq 0,05$), septiembre presenta diferencias con el mes de noviembre a mediados de primavera, mientras que octubre posee concentraciones de estradiol estadísticamente superiores a noviembre y diciembre, los que a su vez no presentan diferencias entre sí ($p \geq 0,05$). Respecto a la dispersión de los datos, se puede observar que las fases de análisis inicial, durante la temporada invernal de julio y agosto, muestran la mayor dispersión en la concentración de estradiol, mientras que las concentraciones plasmáticas de las muestras tomadas a fines de invierno en septiembre e inicios de primavera en octubre, durante los picos de estradiol, poseen menor dispersión.

1.1.1.2. Fotoperiodo y concentración plasmática de estradiol

Al evaluar la dispersión de los datos de la concentración plasmática de estradiol, como variable dependiente, y la cantidad de horas de luz disponibles durante los meses en que se efectuó el muestreo, se observa una tendencia que se ajusta a un modelo curvo, correspondiente a un análisis de regresión polinomial de segundo grado (Figura 6). De acuerdo al coeficiente de determinación (R^2) se puede establecer que el 83% de la variabilidad de los datos es explicada por el modelo, donde la concentración hormonal de estradiol responde significativamente diferente ($p < 0,05$) de acuerdo a las distintas horas de luz. De este modo se puede determinar que la concentración plasmática de estradiol durante la etapa de fotoperiodo negativo, a inicios de invierno, con la menor exposición promedio de horas de luz diarias, es la más baja del período. La

concentración de estradiol aumenta progresivamente en el tiempo a medida que se acerca la primavera y aumentan las horas de luz diarias, durante una fase foto sensible del ave. El pico de concentración de estradiol se alcanza a inicios de primavera, durante la etapa de fotoperiodo positivo, como respuesta de la hembra frente a una exposición a 12,85 horas de luz al día. Posterior al pico de estradiol, se aprecia un descenso en la concentración durante mediados y fines de primavera, donde el aumento en la cantidad de horas de luz no genera una mayor concentración de estradiol en la hembra, sino que, por el contrario, se genera un descenso en el tiempo. Durante la fase de asociación positiva entre variables es posible apreciar un aumento de 27,73 pg/mL frente a cada cambio unitario en las horas de luz diarias, mientras que en la fase de asociación negativa se aprecia un descenso de 33,80 pg/mL por cada cambio unitario en las horas de luz.

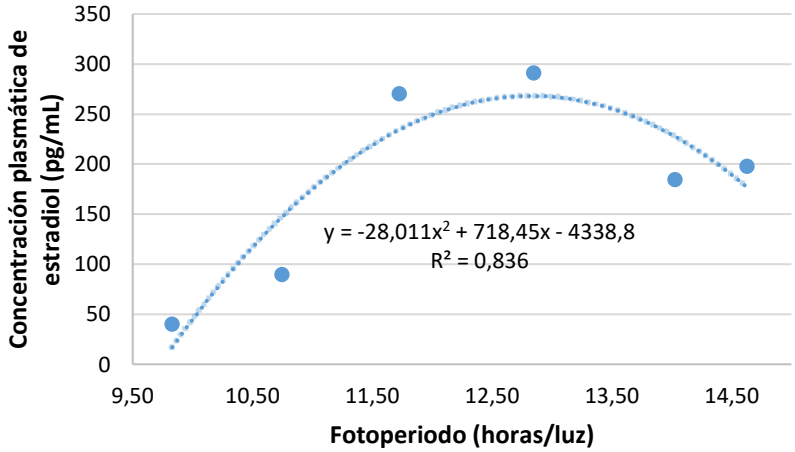

Figura 6. Regresión no lineal de la concentración plasmática de estradiol de acuerdo a las horas de luz diarias en hembras de pavo criollo, en Chile, durante invierno (julio, agosto y septiembre) y primavera (octubre, noviembre y diciembre).

1.1.2.1. Concentración plasmática de progesterona. Respecto a la concentración plasmática de progesterona de hembras de pavo criollo (Figura 7), durante los meses de invierno y primavera, correspondiente a las etapas de fotoperiodo negativo y positivo, se pudo establecer que existen diferencias ($p < 0,05$) de acuerdo a los distintos meses de muestreo durante el desarrollo del estudio. A partir de lo anterior se puede establecer que las concentraciones más bajas de progesterona, que se encuentran a mediados y fines de invierno en los meses de julio y agosto, con 0,69 ± 0,39 ng/mL y 0,88 ± 0,57

ng/mL respectivamente, sin diferencias entre sí ($p \geq 0,05$), son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) con el mes de septiembre a fines de invierno, con 1,46 ± 0,79 ng/mL, octubre a inicios de primavera, con 1,77 ± 1,14 ng/mL, y diciembre a fines de primavera, con 2,14 ± 2,71 ng/mL, sin diferencias entre sí ($p \geq 0,05$). En cuanto a la concentración de progesterona observada en el mes de noviembre, a mediados de primavera, con 1,13 ± 0,82 ng/mL, se aprecia una concentración que difiere del patrón ascendente establecido a lo largo del muestreo, con menores concentraciones en los meses a mediados de invierno y mayores en los meses de fines de invierno y primavera, en este caso el mes de noviembre, a mediados de primavera, sólo presenta diferencias ($p < 0,05$) con el mes de diciembre a fines de primavera, sin diferir ($p \geq 0,05$) de las medias observadas previamente durante el muestreo. En cuanto a la dispersión de los datos respecto a la media, se puede observar que durante los meses con menor concentración de progesterona, correspondientes a julio y agosto durante la temporada de invierno, y noviembre a mediados de primavera, existe mayor variación, mientras que durante los meses con mayor concentración de progesterona, en septiembre a fines de invierno y octubre a inicios de primavera, existe menor dispersión. Sin embargo, el pico de progesterona a fines de primavera, durante el mes de diciembre, muestra una variabilidad relativamente alta respecto al promedio.

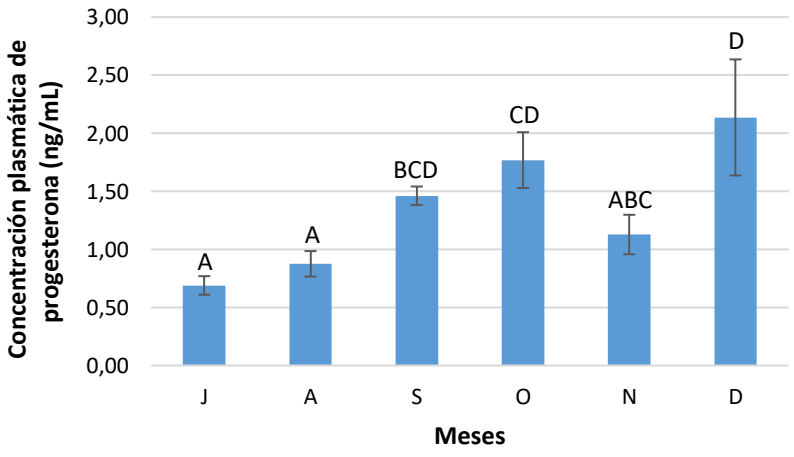

Figura 7. Concentración plasmática de progesterona, en hembras de pavo criollo, en Chile, durante invierno y primavera. J: julio; A: agosto; S: septiembre; O: octubre; N: noviembre; D: diciembre. Test LSD Fisher, donde medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

1.1.2.2. Fotoperiodo y concentración plasmática de progesterona

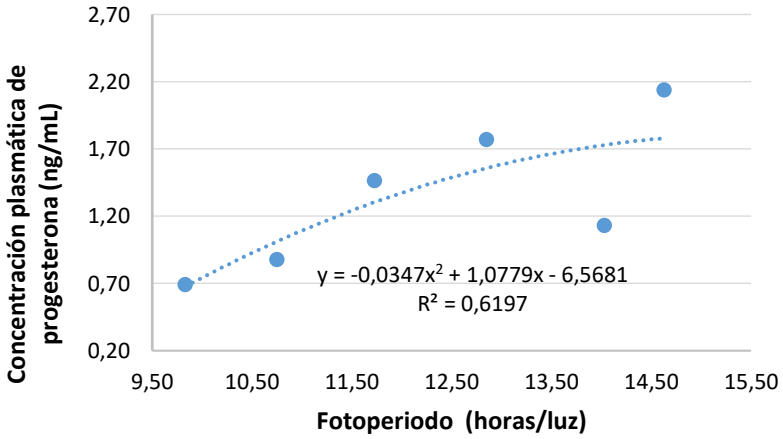

Figura 8. Regresión no lineal de la concentración plasmática de progesterona de acuerdo a las horas de luz diarias en hembras de pavo criollo, en Chile, durante invierno (julio, agosto y septiembre) y primavera (octubre, noviembre y diciembre).

Al efectuar un análisis de dispersión de los datos de concentración de progesterona, como variable dependiente, y compararlos con las horas de luz diarias durante las etapas de muestreo, se pudo constatar que los datos se ajustan a un modelo más curvo que lineal (Figura 8). Con un coeficiente de determinación (R^2) que demuestra con un 62 % de certeza que las variaciones expuestas por los datos son explicadas por el modelo, donde los cambios en la cantidad de horas de luz diarias influyen significativamente ($p < 0,05$) en la concentración plasmática de progesterona. Las concentraciones plasmáticas de progesterona son más bajas a inicios de invierno, donde se registra la menor cantidad de horas de luz, con 9,83 horas, para luego establecer un ascenso progresivo y gradual en el tiempo, donde la concentración de progesterona aumenta a medida que aumenta el número de horas de luz de exposición diaria, alcanzando la máxima concentración frente a la máxima exposición de horas de iluminación detectada, correspondiente a 14,6 horas. De este modo el registro de datos desde invierno a fines de primavera establece una asociación positiva, en la que la concentración de progesterona aumenta a medida que las horas de luz aumentan, estableciendo un aumento de 0,11 ng/mL de progesterona frente a cada aumento unitario en la cantidad de horas de luminosidad.

1.2. Análisis hormonal del macho

1.2.1. Concentración plasmática de testosterona

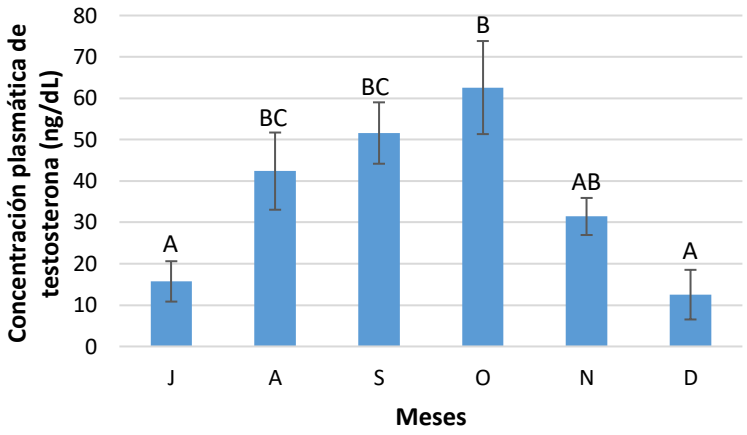

Figura 9. Concentración plasmática de testosterona, en machos de pavo criollo, en Chile, durante invierno y primavera. J: julio; A: agosto; S: septiembre; O: octubre; N: noviembre; D: diciembre. Test LSD Fisher, donde medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

En cuanto a la concentración plasmática de testosterona en machos de pavo criollo (Figura 9), se pudo determinar que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos meses de muestreo. De este modo, los meses con menor concentración plasmática de testosterona fueron los meses de inicio y término del muestreo, sin diferencias entre sí ($p \geq 0,05$), correspondientes a julio en invierno, con 15,72 ± 18,26 ng/dL, y diciembre a fines de primavera, con 12,52 ± 23,23 ng/dL. Mientras que los meses intermedios del muestreo, sin diferencias entre sí, correspondientes a agosto y septiembre en invierno, con 43,38 ± 37,31 ng/dL y 51,59 ± 29,68 ng/dL respectivamente, y octubre a comienzos de primavera, con 62,58 ± 43,55 ng/dL, poseen concentraciones de testosterona significativamente superiores ($p < 0,05$). En cuanto a la concentración de testosterona registrada en noviembre a mediados de primavera, con 31,42 ± 17,34 ng/dL, no se detectan diferencias ($p \geq 0,05$) con ningún punto de muestreo. En cuanto a la variabilidad de los datos respecto a la media, ésta presenta valores elevados durante el comienzo y término del muestreo, cuando inicia el aumento de testosterona a fines de invierno y cuando decae la curva de concentración plasmática a fines de primavera en

diciembre. Sin embargo, durante los meses con mayor concentración de testosterona, en septiembre a fines de invierno y octubre a inicios de primavera, se observan las menores dispersiones respecto a la media.

1.2.2. Fotoperiodo y concentración plasmática de testosterona

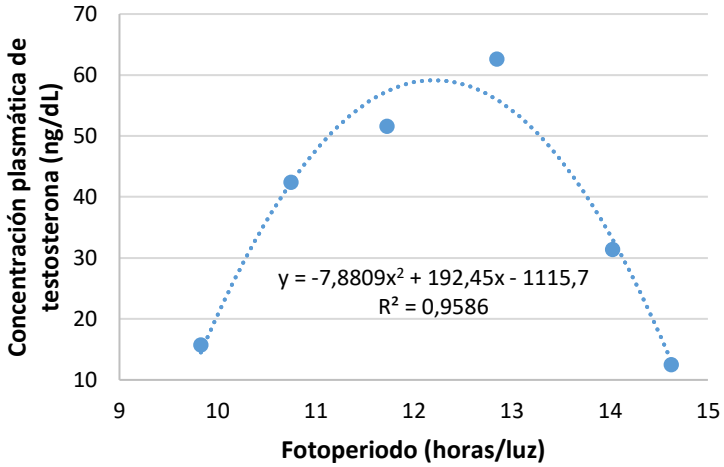

Figura 10. Regresión no lineal de la concentración plasmática de testosterona de acuerdo a las horas de luz diarias en machos de pavo criollo, en Chile, durante invierno (julio, agosto y septiembre) y primavera (octubre, noviembre y diciembre).

El análisis de dispersión de los datos obtenidos a partir de la relación entre la concentración plasmática de testosterona y la cantidad de horas de luz diarias, muestra un marcado ajuste a un modelo de asociación de datos con forma curva, para el cual se efectuó un análisis de regresión polinomial de segundo grado (Figura 10). En este caso el coeficiente de determinación (R^2) indica que las variaciones de los datos se pueden justificar en un 95 % por la asociación establecida en el modelo, de este modo, se consigue establecer que la concentración plasmática de testosterona responde significativamente diferente ($p < 0,05$) de acuerdo a las variaciones en las cantidades de horas de luz durante el muestreo. En cuanto al análisis de la curva de regresión, se puede señalar que existen bajas concentraciones de testosterona al inicio del muestreo, cuando las horas de luz disponibles son las más reducidas, alcanzando las 9,83 horas por día, para luego efectuarse una asociación positiva entre variables, observándose un

aumento en la concentración de testosterona a medida que aumentan las horas de luz diarias, aumento que se mantiene hasta el equinoccio de primavera, con un aumento de 5,17 ng/dL frente a cada cambio unitario en las horas de luz diarias, apreciando un pico de concentración a las 12,85 horas de luz diarias. Posterior al pico de testosterona se observa un proceso de asociación negativa, en el cual, a medida que la exposición del macho a un mayor número de horas de luz diarias aumenta, la concentración plasmática de testosterona disminuye, alcanzando un promedio de concentración tan bajo como el valor reportado a inicios del proceso de muestreo, al disponer de 14,63 hrs de luz diarias, con un descenso de 14,06 ng/dL por cada cambio unitario en las horas de luz.

Los resultados de éste objetivo fueron publicados en la revista Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences.

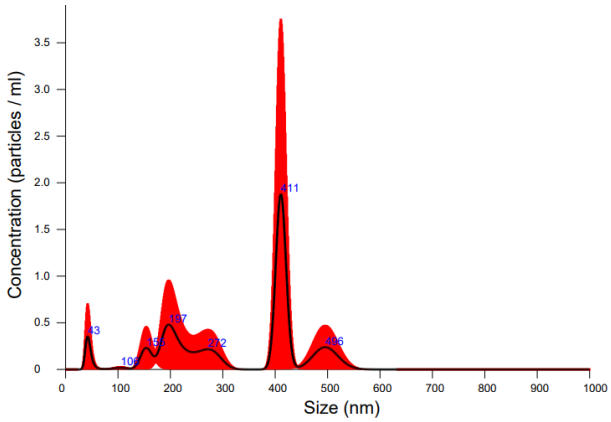

Figura 11. Histograma de dispersión de partículas, mediante la técnica de NTA, a partir del grupo control en base a PBS filtrado (0,22 μm). Concentración promedio: 1.06e+06 partículas/ml. Tamaño promedio de partículas: 330.9 nm.

CARACTERIZACION DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES OVIDUCLALES

De acuerdo a los criterios evaluados para la identificación y clasificación de una partícula dentro de la categoría de vesícula exracelular, éste estudio logró evaluar el “tamaño de las partículas” mediante NTA, la “forma de las partículas” mediante TEM y la identificación molecular de biomarcadores mediante la detección de “proteínas específicas” a través del análisis de proteómica. Logrando identificar la presencia de EVs, de acuerdo a los criterios mencionados, en todos los grupos experimentales que se evaluaron.

OBJETIVO 2. Estudiar el patrón de secreción y las características de las EVs a partir de fluido oviductal (*in vivo*), procedente de dos regiones oviductales de hembras de pavo criollo (con y sin TAE), evaluando la influencia del fotoperiodo estacional (negativo y positivo) y el estado ovulatorio de la hembra (en ausencia y presencia de postura de huevos).

Se obtuvieron muestras de lavado oviductal (*in vivo*) de hembras en fotoperiodo negativo sin ovulación (FN), fotoperiodo positivo sin ovulación (FP) y fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), de las regiones oviductales del magnum (M) y la unión útero vaginal (UUV), donde se encuentran los túbulos de almacenamiento espermático (TAE). A partir de ellas, se aislaron vesículas extracelulares y se realizó el análisis de seguimiento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis-NTA) y la visualización por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

2.1. Análisis de NTA

Los análisis estadísticos fueron efectuados tras la transformación de los datos en logaritmo en base 10 (Log_{10}).

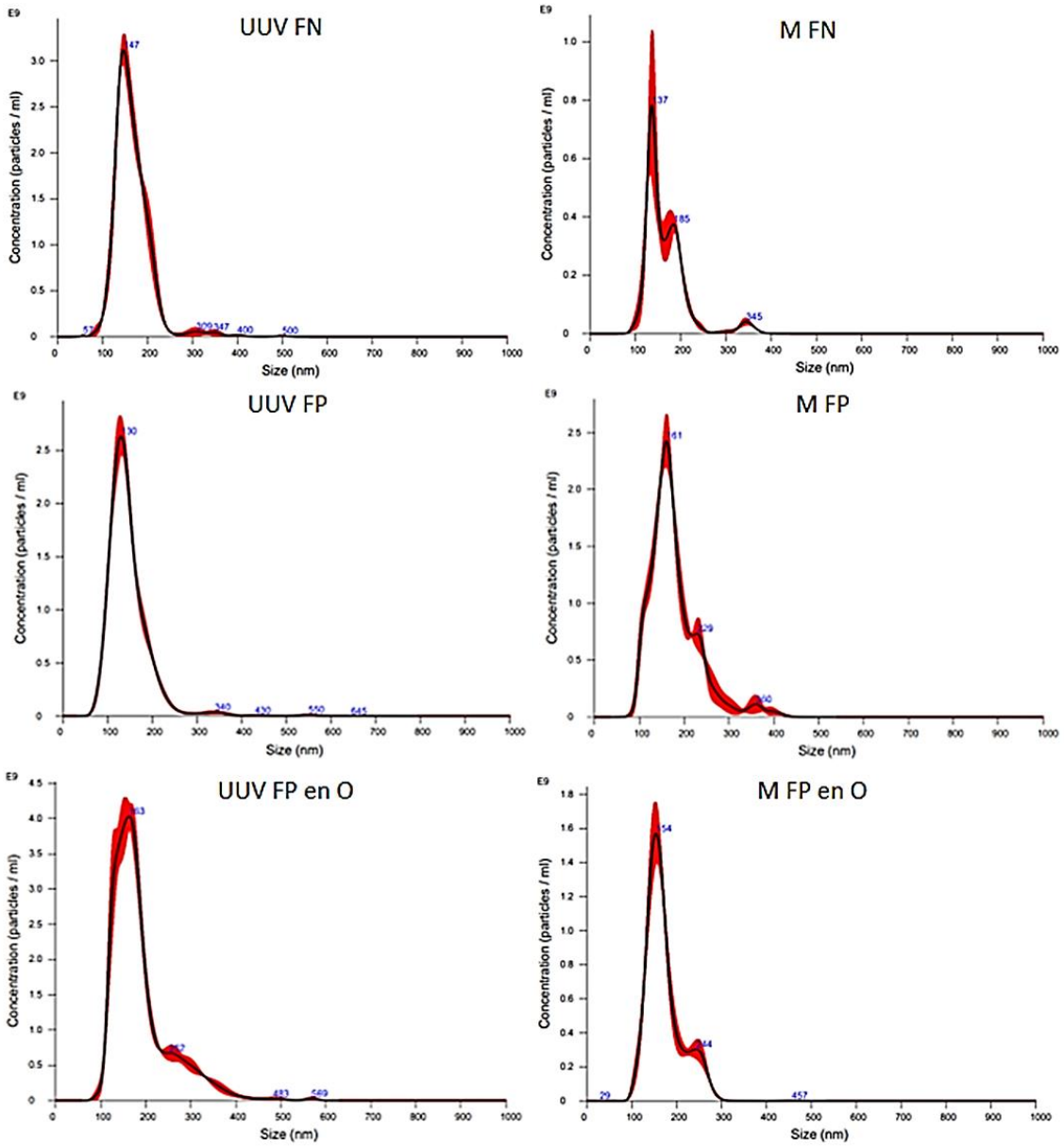

Figura 12. Histogramas de dispersión de partículas asociadas a vesículas extracelulares, obtenidos mediante la técnica de NTA, a partir de las muestras de la unión útero vaginal (UUV) y el magnum (M), en fotoperiodo negativo (FN), fotoperiodo positivo (FP) y fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), de muestras colectadas *in vivo* (lavado) del oviducto de hembras de pavo (*Meleagris gallopavo*).

2.1.1. Tamaño de partículas

La variable tamaño de partícula (Figura 13) muestra diferencias estadísticas ($p < 0,05$) de acuerdo al estado reproductivo de la hembra, donde pavas en FP en O poseen menor tamaño (161,38 nm) al compararse con hembras en FP (187,67 nm), sin embargo, hembras en FN (176,65 nm) no poseen diferencias ($p \geq 0,05$) al compararse con FP en O y FP. Respecto al tejido a partir del cual se colectó la muestra (Figura 13), no existen diferencias ($p \geq 0,05$) entre el tamaño de partícula de M (172,46 nm) y la UUV (178,01 nm). Al efectuar una evaluación del efecto combinado de factores sobre la variable tamaño (Figura 13), se puede apreciar que no existen diferencias estadísticas ($p \geq 0,05$), sin embargo, se observa una tendencia en la que los menores valores se asocian a hembras en FP en O y los mayores valores a hembras en FP, donde el M tiende a mostrar menores tamañas de partícula que la UUV en cada estado reproductivo.

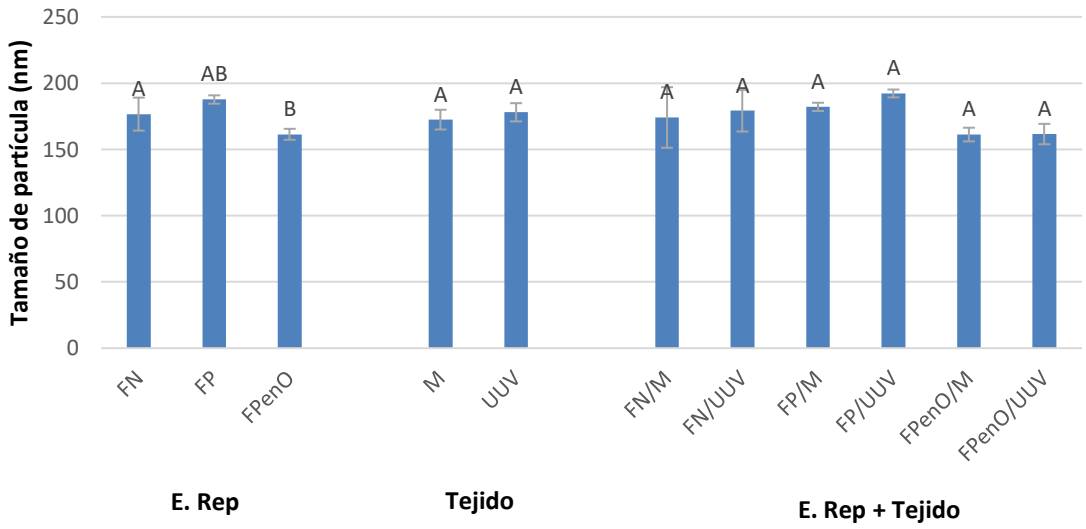

Figura 13. Determinación del tamaño de partícula, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas a partir del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos. E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vagina. LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

2.1.2. Concentración de partículas.

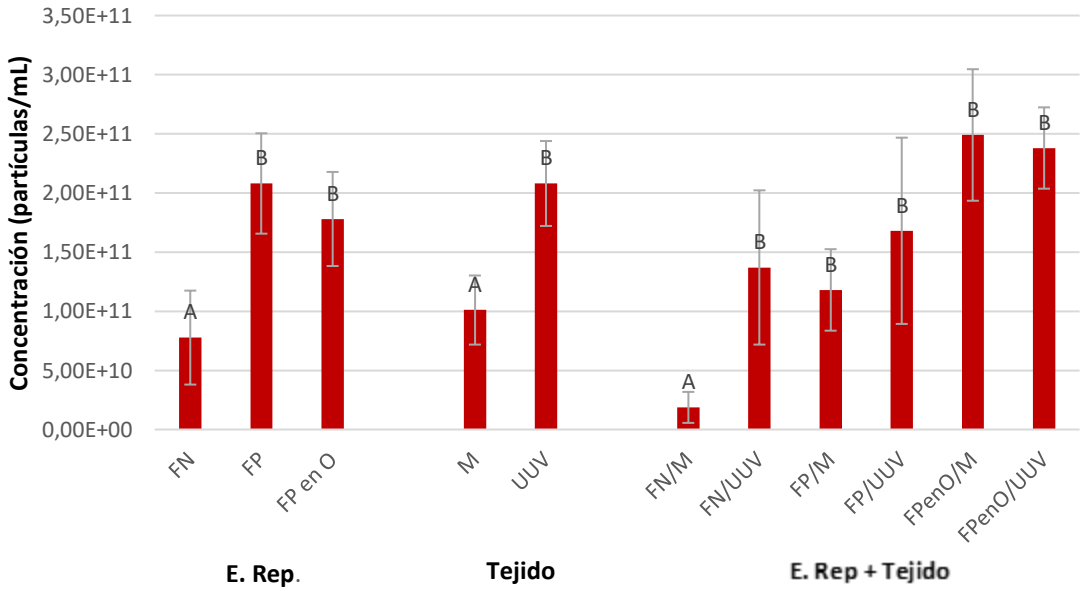

Figura 14. Determinación de la concentración de partículas, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas a partir del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos. E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

En cuanto a la variable concentración de partículas (Figura 14), se pueden observar diferencias asociadas al estado reproductivo de la hembra y al tipo de tejido a partir del cual se recolectó la muestra. De este modo hembras en FN muestran menor concentración (7,77E+10 partículas/mL) de partículas, al compararse con FP en O (1,78E+11 partículas/mL) y FP (2,08E+11 partículas/mL), estados reproductivos que no presentan diferencias ($p \geq 0,05$) de concentración entre sí. Respecto a la concentración de partículas de acuerdo a los tipos de tejido, se puede establecer que la sección del M posee menor concentración de partículas (1,01E+11 partículas/mL), al compararse con la sección de la UUV (2,08E+11 partículas/mL). Al efectuar un análisis del efecto combinado del factor estado reproductivo y tipo de tejido (Figura 14), se pueden observar diferencias significativas ($p < 0,05$) con concentraciones inferiores para el grupo de hembras en FN con muestras de M (1,87E+10 partículas/mL), versus las demás combinaciones de factores, las cuales no presentan diferencias ($p \geq 0,05$) entre sí. En

relación a los resultados asociados a la combinación de factores que no muestran diferencias (p ≥ 0,05), es posible distinguir una ligera tendencia de concentración asociada al factor tipo de tejido, en muestras en FP y FP en O, donde el M presenta menor concentración que la UUV.

2.1.2.1. Concentración de partículas pequeñas ≤120 nm.

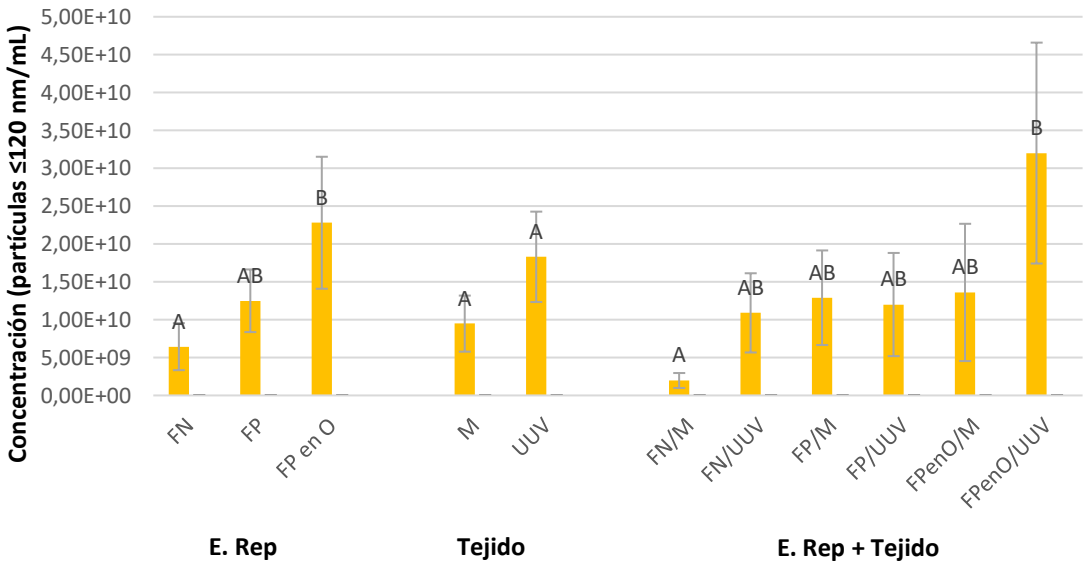

Figura 15. Determinación de la concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos. E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

De especial interés para esta investigación son las partículas más pequeñas, del rango menor o igual a 120 nm, que representarían con mayor probabilidad a los exosomas. Respecto a la variable concentración de partículas pequeñas (Figura 15), se evidencian diferencias (p < 0,05) de acuerdo al estado reproductivo de la hembra, con menor concentración de partículas pequeñas (≤120 nm) en hembras en FN (6,44E+09 partículas/mL) y mayor en hembras en FP en O (2,28E+10 partículas/mL), sin diferencias (p ≥ 0,05) con las hembras en FP (1,25E+10 partículas/mL). Mientras que la

concentración de partículas pequeñas (≤120 nm), relacionadas al tejido a partir del cual se extrajeron las muestras, no evidencia diferencias (p ≥ 0,05). En cuanto a la evaluación del efecto combinado de factores (Figura 15), sólo se observan diferencias (p < 0,05) entre hembras en FN en la región del M, con menor concentración de partículas pequeñas (1,97E+09 partículas/mL), y hembras en FP en O en la región de la UUV, con mayor concentración (3,20E+10 partículas/mL).

2.1.2.2. Concentración de partículas grandes >120 nm

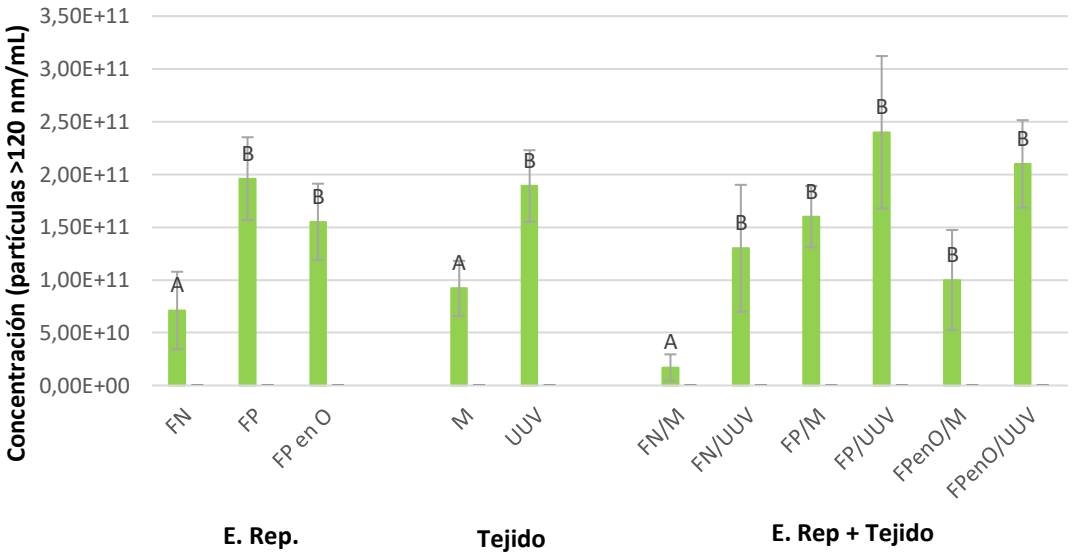

Figura 16. Determinación de la concentración de partícula grandes (> 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos. E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

La concentración de las partículas grandes, con tamaños mayores a 120 nm (Figura 16), presentan diferencias (p < 0,05) de acuerdo al estado reproductivo de la hembra, con menor concentración en hembras en FN (7,11E+10 partículas/mL) al compararse con hembras en FP (1,96E+11 partículas/mL) y FP en O (1,55E+11 partículas/mL), estados que no muestran diferencias entre sí. En cuanto al tipo de tejido, también se encontraron diferencias (p < 0,05), con menor concentración de partículas grandes (>120 nm) en el

M (9,20E+10 partículas/mL) y mayor concentración en la UUV (1,89E+11 partículas/mL). En relación al efecto combinado entre el estado reproductivo de la hembra y el tejido del cual se origina la muestra (Figura 16), se puede observar que las hembras en FN con muestras de M presentan la menor ($p < 0,05$) concentración de partículas grandes (>120 nm) (1,7E+10 partículas/mL), al compararse con las demás combinaciones de factores, las que no muestran diferencias entre sí ($p \geq 0,05$), presentando un promedio general de 1,8E+11 partículas/mL. Con una tendencia ($p \geq 0,05$) en que las muestras en FP y FP en O tienden a presentar menor concentración de partículas grandes (>120 nm) de M versus la UUV.

2.1.3. Resumen del conjunto de datos

El conjunto de datos obtenido permite señalar que el tamaño de las partículas es independiente ($p \geq 0,05$) del tejido oviductal (M y UUV), sin embargo, es dependiente ($p < 0,05$) del estado ovulatorio de la hembra (FN y FP en O), con partículas más grandes en hembras en fotoperiodo positivo, que aún no inician la postura de huevos de la temporada reproductiva (FN), y partículas más pequeñas en aquellas hembras que han iniciado la postura de huevos (FP en O). Respecto a la concentración, se puede determinar que es dependiente ($p < 0,05$) del fotoperiodo al cual está expuesta la hembra (FN v/s FP - FP en O), aunque independiente ($p \geq 0,05$) de si ésta ya inició su ciclo ovulatorio (FP y FP en O), con mayor concentración de partículas para hembras en fotoperiodo positivo (FP y FP en O). También se puede señalar que la concentración de partículas depende ($p < 0,05$) del origen del tejido (M y UUV), a diferencia ($p \geq 0,05$) del tamaño, con mayores concentraciones para la zona de la UUV, donde se encuentran los TAE. Respecto a la concentración de partículas pequeñas y grandes, se puede señalar que la concentración de partículas grandes (>120 nm) es dependiente ($p < 0,05$) del tejido (M y UUV), a diferencia ($p \geq 0,05$) de lo que ocurre con las partículas pequeñas (≤120 nm), con mayor concentración de partículas grandes (>120 nm) en la UUV, donde están los TAE.

2.2. TEM

Las muestras de EVs de cada grupo experimental fueron analizadas mediante TEM, para su evaluación morfológica, luego de los análisis biométricos. Distinguiéndose EVs desde las muestras *in vivo*, del M y la UUV de hembras en FN, FP y FP en O (Figura 17). De este modo, las imágenes de TEM confirman la presencia de las EVs en todos los grupos experimentales, mediante la observación de estructuras en forma de copa.

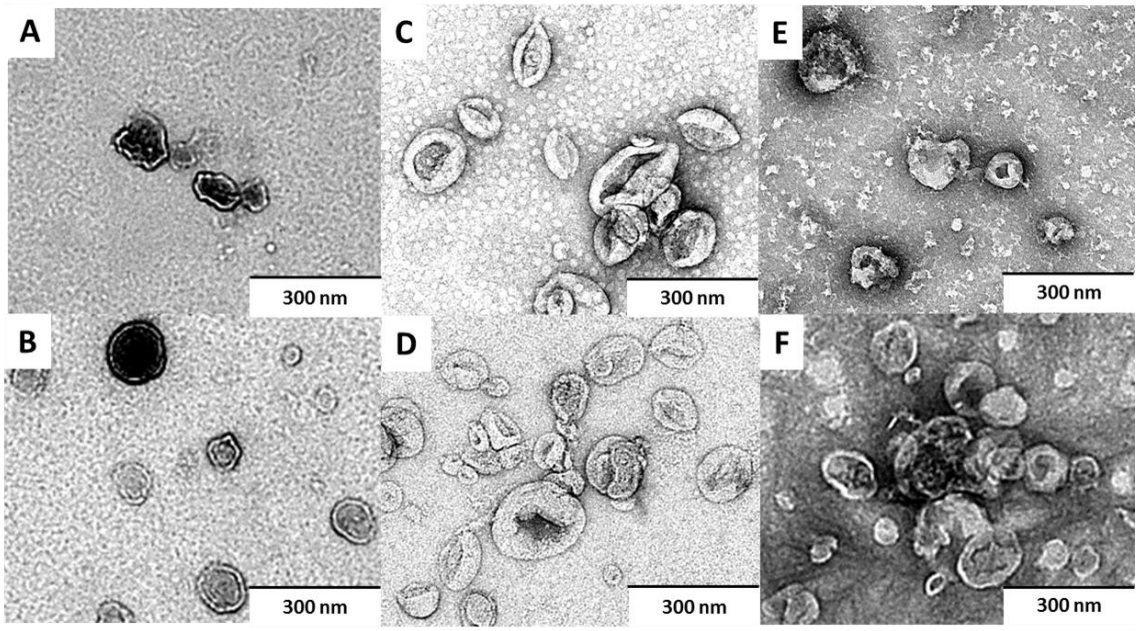

Figura 17. Microscopía electrónica de transmisión de muestras *in vivo* de EVs colectadas del oviducto de hembras de pavo (*Meleagris gallopavo*), desde las regiones del magnum y la unión útero vaginal, en distintos fotoperiodos y estados ovulatorios. A: muestras de EVs de hembras en fotoperiodo negativo colectadas de la región del magnum. B: Muestras de EVs en fotoperiodo negativo colectadas desde la unión útero vaginal. C: Muestras de EVs de hembras en fotoperiodo positivo, previo al inicio del estado ovulatorio, colectadas desde el magnum. D: Muestras de EVs en fotoperiodo positivo, previo al inicio del estado ovulatorio, colectadas desde el magnum. E: Muestras de EVs de hembras en fotoperiodo positivo en estado ovulatorio, colectadas desde el magnum. F: Muestras de EVs en fotoperiodo positivo en estado ovulatorio, colectadas desde la unión útero vaginal.

OBJETIVO 3. Evaluar la influencia de la fuente de recolección de la muestra, fluido oviductal (*in vivo*) y cultivo celular (*in vitro*), en hembras en fotoperiodo positivo, con y sin ovulación, sobre la secreción y las características de EVs del objetivo 2.

Se emplearon muestras de origen "*in vivo"* de lavado oviductal e "*in vitro"* de sobrenadante de cultivo celular, contemplando a hembras en estado reproductivo de fotoperiodo positivo sin ovulación (FP) y hembras en fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), a partir de tejido obtenido de la sección del magnum (M) y la unión útero vaginal (UUV), donde están los túbulos de almacenamiento espermático (TAE). A partir de ellas, se aislaron vesículas extracelulares y se realizó el análisis de seguimiento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis-NTA) y la visualización por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

3.1. Cultivos celulares

Debido a las dificultades asociadas a la obtención de EVs a partir de lavado oviductal *in vivo*, que implican el sacrificio de las hembras y una baja replicabilidad de la técnica de recolección de fluidos, se obtuvo EVs de sobrenadante de cultivos celulares, a partir de los tejidos oviductales (M y UUV), de las mismas muestras desde donde se obtuvieron las EVs de lavado *in vivo*, de hembras en FP (6 hembras) y FP en O (6 hembras), obteniendo un total de 6 muestras de M y 6 muestras de la UUV por cada estado reproductivo.

A partir de cada muestra de tejido se obtuvo un promedio de 10 cultivos celulares en placas de 60 x 15 mm, seleccionando 6 cultivos por muestra, de acuerdo al porcentaje de confluencia, el que se contempló desde el 70 %, y el tipo celular, considerando un 70 % de células de carácter epitelial por cultivo, detectadas por su morfología y disposición característica, como se aprecia en la figura 16, de acuerdo a lo descrito en literatura (Huang *et al*., 2017). De éste modo, cada muestra de tejido permitió la recolección de 6 sobrenadantes de cultivos celulares, correspondiendo al 50% de cada uno de los 3 pool que constituyeron cada grupo experimental de muestras *in vitro*.

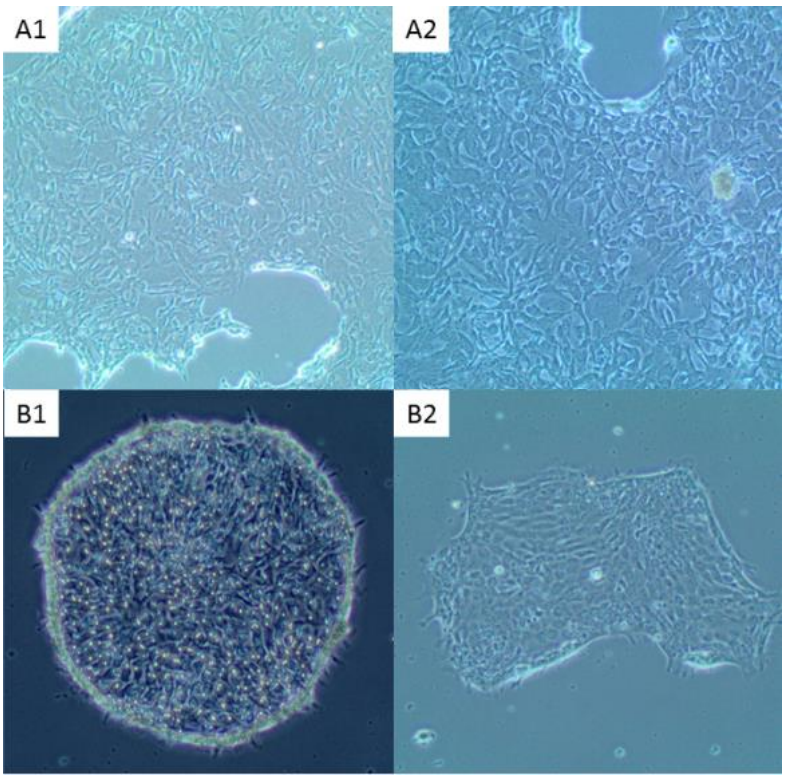

Figura 18. Microfotografía del cultivo de células epiteliales de las secciones del magnum y la unión útero vaginal del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*). A1 y A2: magnum; B1 y B2: unión útero vaginal. Magnificación en aumento de 20X.

Las muestras presentaron destacados índices de viabilidad, adherencia a las placas y proliferación celular al incorporar un 2 % de suero de pava en el medio de cultivo, teniendo la precaución de que los sueros incorporados tuviesen los mismos orígenes fisiológicos, respecto al fotoperiodo y estado ovulatorio de las hembras. En cuanto a la adherencia celular en las placas, que fue el factor más crítico de controlar, los resultados fueron mejores para las células de magnum, ya que las células de la UUV tendían a desarrollar estructuras tridimensionales, lo que hacía que perdieran fácilmente la adherencia desde la placa. Como medidas preventivas, para evitar que las células se desprendieran de las placas, se evitó el lavado con PBS entre cambios de medio de cultivo, sólo empleándose PBS previo a la aplicación del medio depletado, adicionalmente se evitó el retiro de medio con bomba de vacío, y se efectuaron pases sólo a partir de células que se encontraban en el sobrenadante centrifugado, ya que al desprender las células de las placas para efectuar un pase convencional éstas no volvían a adherirse en las placas. Adicionalmente se tuvo más precauciones con los tejidos de

M, de hembras en FP en O, ya que el exceso de material proteico, propio del tejido en estado ovulatorio al secretar y almacenar *in situ* el albumen para la formación del huevo, impedía que las células se adhiriesen a las placas debido al precipitado proteico que se adhería a estas (impidiendo que las células se lograran adherir), debiendo efectuar múltiples siembras sucesivas a partir de los sobrenadantes celulares. Los manejos de siembras sucesivas, a partir de los sobrenadantes, colaboraron en la purificación de los cultivos de células epiteliales, al adherirse después que las células estromales.

3.2. Análisis de NTA

Los análisis estadísticos fueron efectuados tras la transformación de los datos en logaritmo en base 10 (Log_{10}).

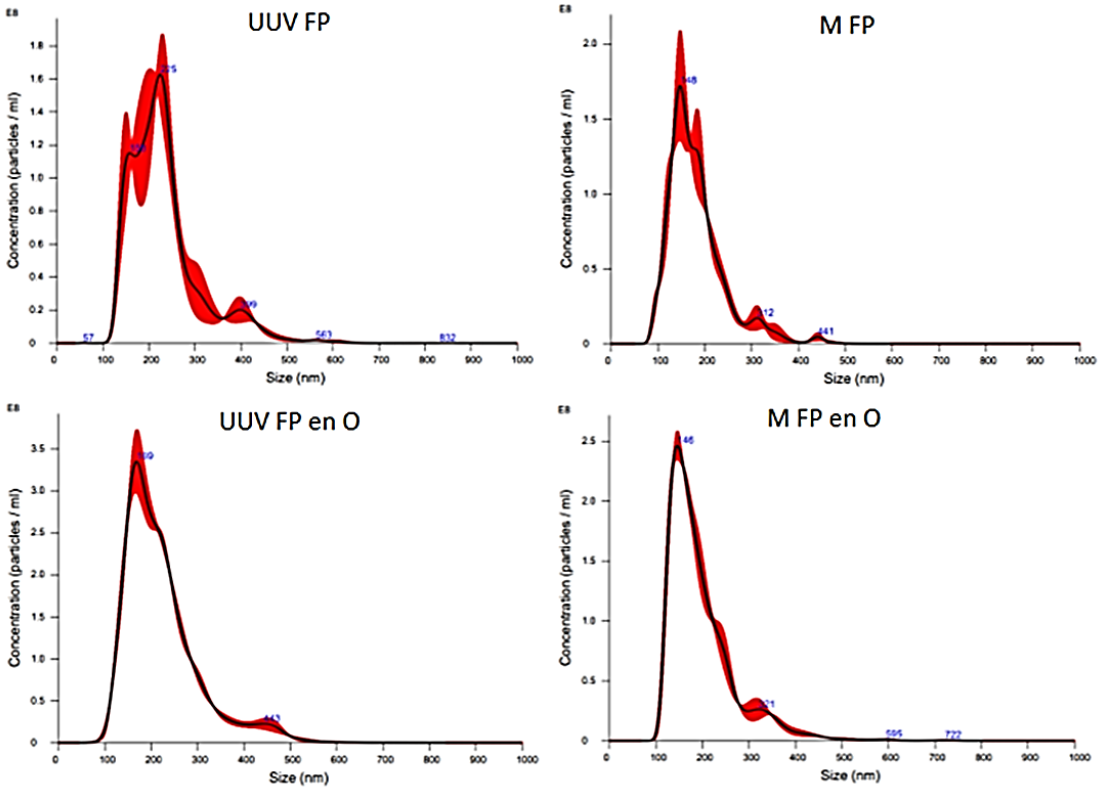

Figura 19. Histogramas de dispersión de partículas asociadas a vesículas extracelulares, obtenidos mediante la técnica de NTA, a partir de las muestras de la unión útero vaginal (UUV) y el magnum (M), fotoperiodo positivo (FP) y fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), de muestras colectadas *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del oviducto de hembras de pavo (*Meleagris gallopavo*).

3.2.1. Tamaño de partícula

Para la variable tamaño de partícula (Figura 20), se pudo establecer que existen diferencias ($p < 0,05$) de acuerdo al estado reproductivo de la hembra, con menor promedio de tamaño para hembras en FP en O (181,12 nm), y mayor tamaño en hembras en FP (208,28 nm). Adicionalmente se detectaron diferencias ($p < 0,05$) de acuerdo al origen de la muestra, con menor tamaño de partícula para muestras obtenidas "*in vivo*" (174,53 nm), y mayor en muestras obtenidas "*in vitro*" (214,88 nm). En cuanto al tipo de tejido, no se observaron diferencias en los tamaños de partícula entre M y la UUV.

Respecto al efecto combinado de factores (Figura 20) para la variable tamaño, la comparación conjunta del estado reproductivo de la hembra y el tipo de tejido sólo mostró diferencias ($p < 0,05$) entre hembras en FP en O con muestras del M, con medias inferiores (179,28 nm), y hembras en FP con muestras de la UUV, con tamaños superiores (215,87 nm), sin embargo, no hay diferencias asociadas con las combinaciones de hembras en FP en O con muestras de la UUV, ni hembras en FP con muestras de M.

En cuanto a la comparación del efecto combinado del estado reproductivo de la hembra y el origen de la muestra (Figura 20), se pudo establecer diferencias ($p < 0,05$) con menor tamaño de partícula para hembras en FP en O en muestras "*in vivo*" (161,38 nm), diferencias ($p < 0,05$) con valores intermedios para hembras en FP en muestras "*in vivo*" y hembras en FP en O en muestras "*in vitro*", y diferencias ($p < 0,05$) con mayor tamaño de partícula para hembras en FP en muestras "*in vitro*" (228,90 nm).

La comparación del efecto combinado del factor tejido y origen de la muestra, sobre la variable tamaño (Figura 20), presenta diferencias ($p < 0,05$) con menor tamaño de partícula para muestras "*in vivo*", tanto para el M (171,63 nm) como para la UUV (177,42 nm), mientras que la muestras "*in vitro*", para el M (208,35 nm) como para la UUV (221,40 nm), muestran mayor diámetro promedio.

En cuanto al efecto combinado de todos los factores sobre la variable tamaño (Figura 20), se logran establecer diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las combinaciones de hembras en FP en O de muestras "*in vivo*", tanto en M como en la UUV, con valores inferiores, y hembras en FP de muestras "*in vitro*" de la UUV, con tamaños superiores. A pesar de la ausencia de diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las demás combinaciones de factores, se observa una tendencia general en la que las muestras "*in vivo*" poseen partículas de menor tamaño, tendencia similar que se podría asociar a las muestras de hembras en FP en O y el tejido del M.

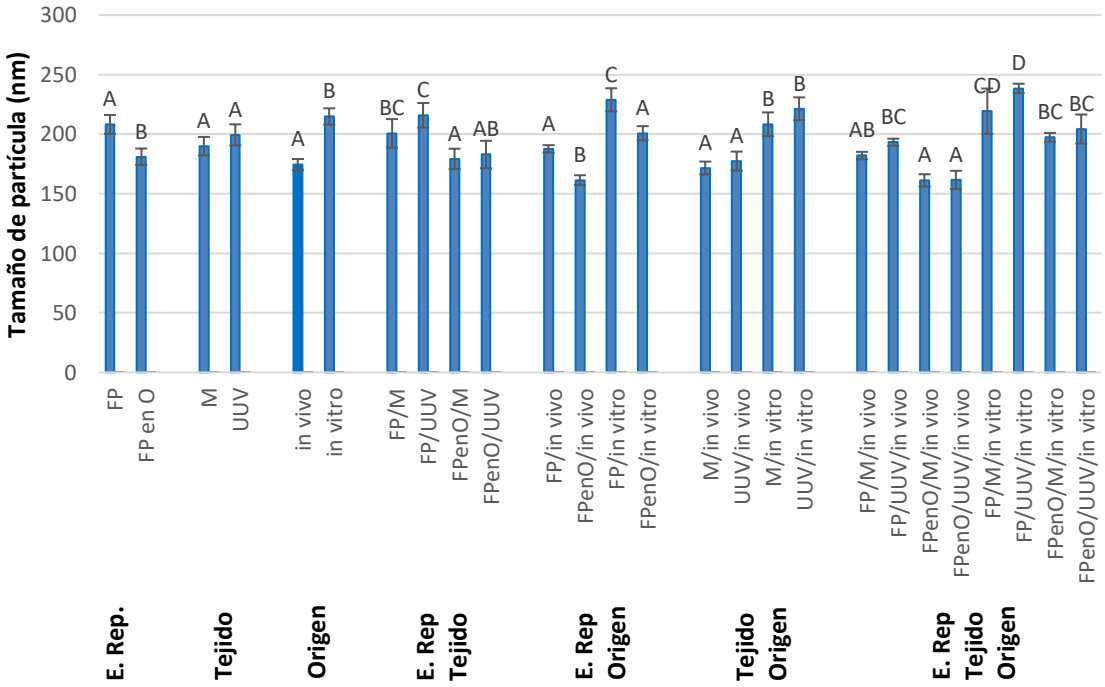

Figura 20. Determinación del tamaño de partículas, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos. E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

3.2.2. Concentración de partículas

En cuanto a la variable concentración de partículas por mL (Figura 21), no se encontraron diferencias ($p \geq 0,05$) asociadas al estado reproductivo de la hembra, así como tampoco al tipo de tejido del cual se obtuvo la muestra, sin embargo, se detectaron

diferencias ($p < 0,05$) en relación al origen de las muestras, con menor concentración para muestras de origen "*in vitro*" (1,66E+10 partículas/mL) y mayor para muestras de origen "*in vivo*" (1,93E+11 partículas/mL).

En cuanto al efecto combinado de los factores sobre la variable concentración (Figura 21), no se establecen diferencias ($p \geq 0,05$) en relación al estado reproductivo de la hembra y el tejido de la muestra. Sin embargo, la combinación del origen de la muestra con el estado reproductivo de la hembra, como del origen con el tejido, muestran diferencias ($p < 0,05$) con menores concentraciones para las muestras asociadas al origen "*in vitro*", mientras que las muestras asociadas al origen "*in vivo*" presentaron concentraciones superiores ($p < 0,05$).

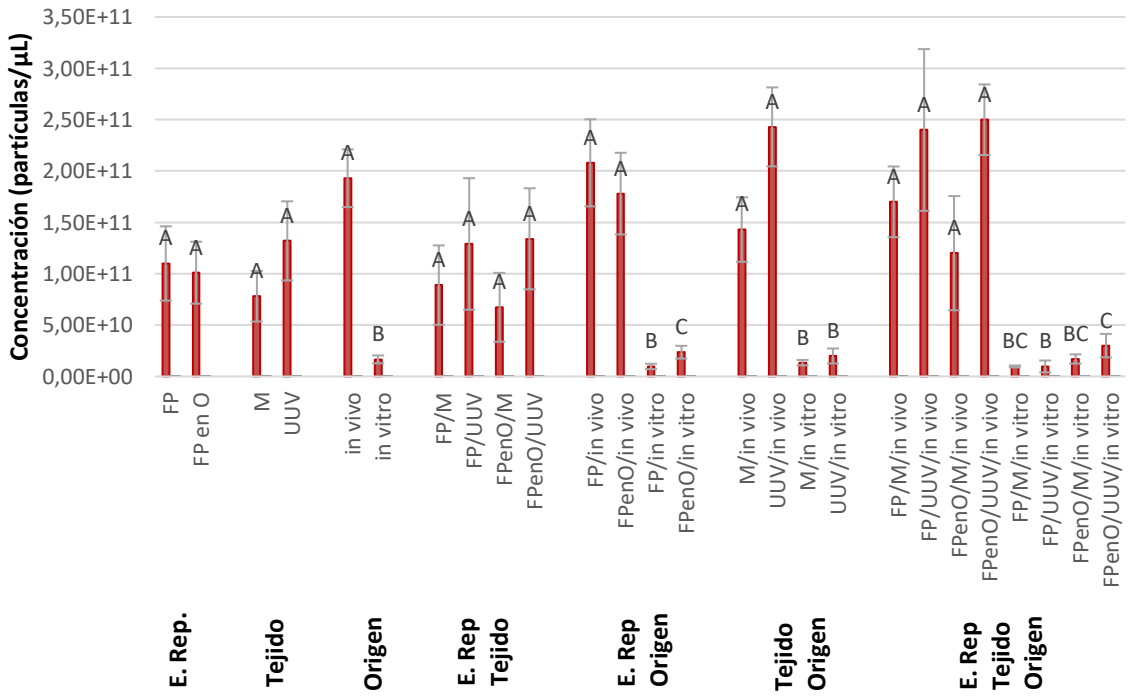

Figura 21. Determinación de la concentración de partículas, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos. E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

Al establecer un análisis del efecto combinado de todos los factores (Figura 21), se pudo observar una tendencia similar a lo anteriormente expuesto, donde el factor origen genera un efecto dominante sobre los demás factores, estableciéndose concentraciones significativamente inferiores ($p < 0,05$) para todas las combinaciones con el factor "*in vitro*". Donde muestras de hembras en FP de la UUV, con menor concentración (9,7E+09 partículas/mL), y muestras en FP en O de la UUV, con mayor concentración (3E+10 partículas/mL), son significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre sí, estableciéndose una influencia respecto al estado reproductivo de la hembra sobre el tejido de la UUV. Por otra parte, se pudo establecer la existencia de concentraciones significativamente superiores ($p < 0,05$), para todas las combinaciones del factor origen en muestras "*in vivo*", con una media global de 1,93E+11 partículas/mL.

3.2.2.1. Concentración de partículas pequeñas ≤ 120 nm. La concentración de partículas pequeñas, con tamaño menor o igual a 120 nm (Figura 22), presenta diferencias ($p < 0,05$) relacionadas al factor estado reproductivo, con menor concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm) para hembras en FP (6,35E+09 partículas/mL) y mayor para hembras en FP en O (1,20E+10 partículas/mL), y el factor origen ($p < 0,05$), con menor concentración para muestras "*in vitro*" (7,78E+08 partículas/mL) y mayor en muestras "*in vivo*" (1,76E+10 partículas/mL). Mientras que el factor tejido, no muestra diferencias ($p \geq 0,05$) en la concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm) entre el M (7,06E+09 partículas/mL) y la UUV (1,13E+10 partículas/mL).

En cuanto al efecto combinado de los factores sobre la variable concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm) (Figura 22), se evidencian diferencias ($p < 0,05$) en relación al estado reproductivo y el tejido, donde hembras en FP con muestras de la UUV muestran la menor concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm) (6,05E+09 partículas/mL), al compararse con hembras en FP en O, mientras que las muestras de hembras en FP en O de la UUV son las que poseen mayor concentración (1,66E+10 partículas/mL), al compararse con muestras de FP. En relación al efecto combinado de los factores estado reproductivo y origen, y tejido y origen, se observan marcadas diferencias ($p < 0,05$) relacionadas al factor origen, donde las muestras de estado reproductivo y tejido son menores en muestras "*in vitro*" y mayores en muestras "*in vivo*".

Respecto al efecto conjunto de la combinación de todos los factores sobre la variable concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm) (Figura 22), se aprecian diferencias ($p < 0,05$) con valores inferiores para los grupos de hembras en FP de muestras "*in vitro*", valores intermedios para hembras en FP en O de muestras "*in vitro*" y valores superiores para todas las muestras "*in vitro*", que no poseen diferencias entre sí ($p \geq 0,05$).

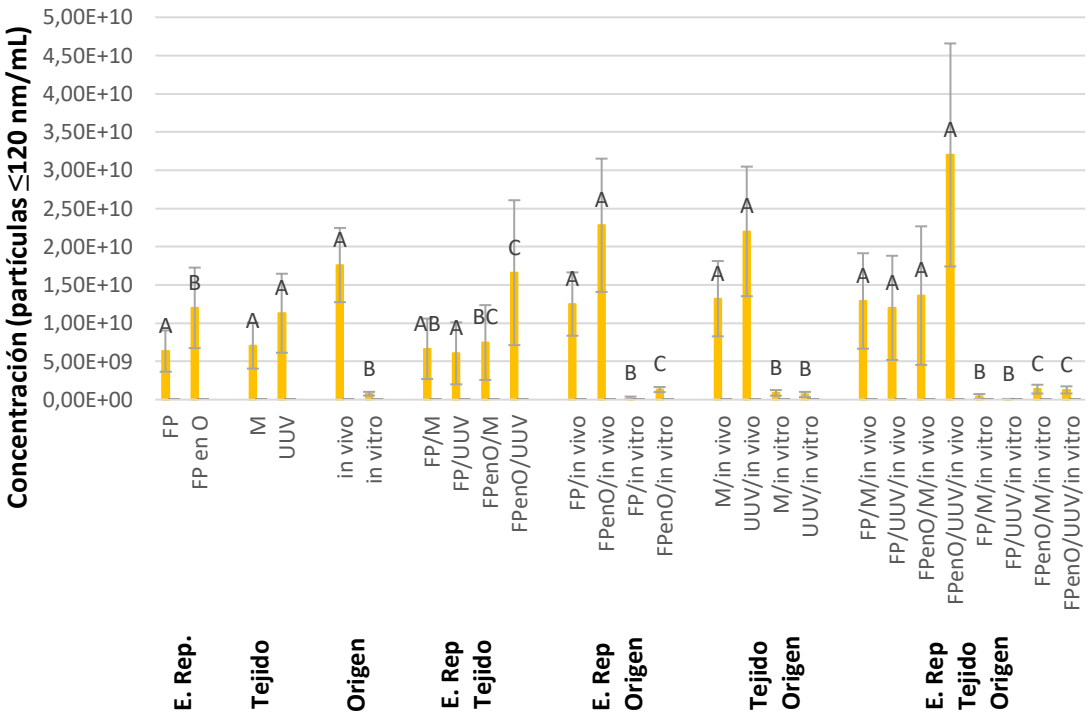

Figura 22. Determinación de la concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos. E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

3.2.2.2. Concentración de partículas grandes > 120 nm

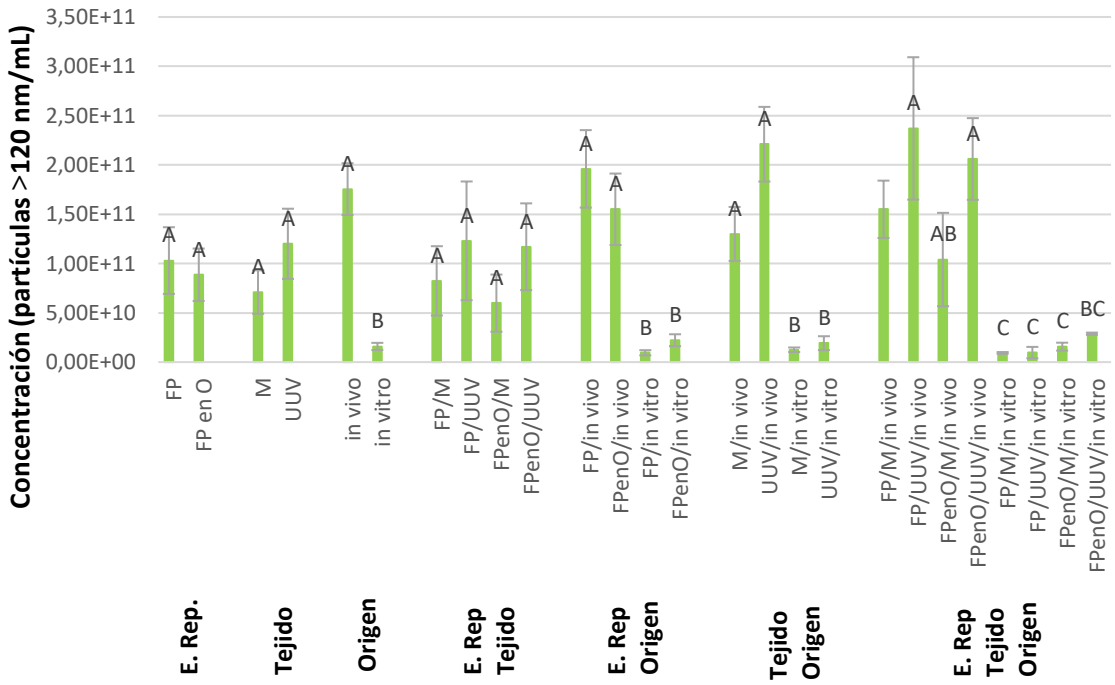

Figura 23. Determinación de la concentración de partículas grandes (> 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos. E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

En cuanto a la concentración de partículas grandes, mayores a 120 nm (Figura 23), no se observan diferencias ($p \geq 0,05$) de acuerdo al estado reproductivo de la hembra, así como tampoco de acuerdo al tejido a partir del cual se obtuvo la muestra, no obstante, hay diferencias ($p < 0,05$) de acuerdo al origen de la muestra, con menor promedio de concentración de partículas grandes (> 120 nm) en muestras de origen "*in vitro*" (1,59E+10 partículas/mL) y mayor para muestras "*in vivo*" (1,75E+11 partículas/mL).

El efecto combinado de los factores sobre la concentración de partículas grandes (> 120 nm) (Figura 23) no evidencia diferencias ($p \geq 0,05$) respecto al estado reproductivo de la

hembra y el tipo de tejido de la muestra. Sin embargo, en cuanto al estado reproductivo y el origen, y el tejido y origen de la muestra, se aprecian diferencias ($p < 0,05$) con concentraciones inferiores para todas las muestras "*in vitro*" y superiores para todas las muestras "*in vivo*", con una evidente influencia del factor origen.

En relación al efecto combinado de todos los factores sobre la concentración de partículas grandes (> 120 nm) (Figura 23), se puede observar que nuevamente es el factor origen quien predomina en la influencia de resultados, con promedios superiores para todos los grupos que incorporan el origen "*in vivo*", sin diferencias entre sí ($p \geq 0,05$), al compararse con los grupos FP y FP en O de la UUV, y promedios superiores para todos los grupos que incorporan el origen "*in vitro*", sin diferencias entre sí ($p \geq 0,05$), al compararse entre los grupos FP y FP en O del M.

3.2.3. Resumen de conjunto de datos

El conjunto de datos nos permite establecer que el tamaño de las partículas es independiente ($p \geq 0,05$) del tejido (M y UUV), sin embargo, se ve influenciado ($p < 0,05$) por el estado reproductivo de la hembra (FP y FP en O), con partículas de menor tamaño en hembras que han iniciado su etapa reproductiva con la postura de huevos, siendo también dependiente ($p < 0,05$) del origen de la muestra (*in vivo* e *in vitro*), con partículas de menor tamaño en muestras recogidas *in vivo*, a partir del lavo oviductal. Respecto a la concentración de partículas, podemos establecer que es independiente del tejido de origen oviductal (M y UUV) ($p \geq 0,05$) y el estado reproductivo de la hembra (FP y FP en O) ($p \geq 0,05$), sin embargo, debido a las diferencias experimentales entre muestras de distinto origen (*in vivo* e *in vitro*), se puede asociar a las muestras *in vitro* con menor concentración de partículas ($p < 0,05$), condición que se repite de acuerdo a las diversas combinaciones de factores (estado reproductivo, tejido y origen de la muestra) a evaluar. Mismo patrón de concentración es detectado en partículas categorizadas como grandes (> 120 nm), mientras que la concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm), a diferencia de las demás concentraciones, es dependiente del estado reproductivo (FP y FP en O) de la hembra, con mayor proporción de partículas pequeñas (≤ 120 nm) cuando la hembra a iniciado sus ciclos ovulatorios con la postura de huevos.

3.3. TEM

Las muestras de EVs de cada grupo experimental fueron analizadas mediante TEM, para su evaluación morfológica, luego de los análisis biométricos. Distinguiéndose EVs desde las muestras *in vivo*, del M y la UUV de hembras en FP y FPP en O (Figura 17), y muestras *in vitro*, del M y la UUV de hembras en FP y FP en O (Figura 24). De este modo, las imágenes de TEM confirman la presencia de las EVs en todos los grupos experimentales, mediante la observación de estructuras en forma de copa.

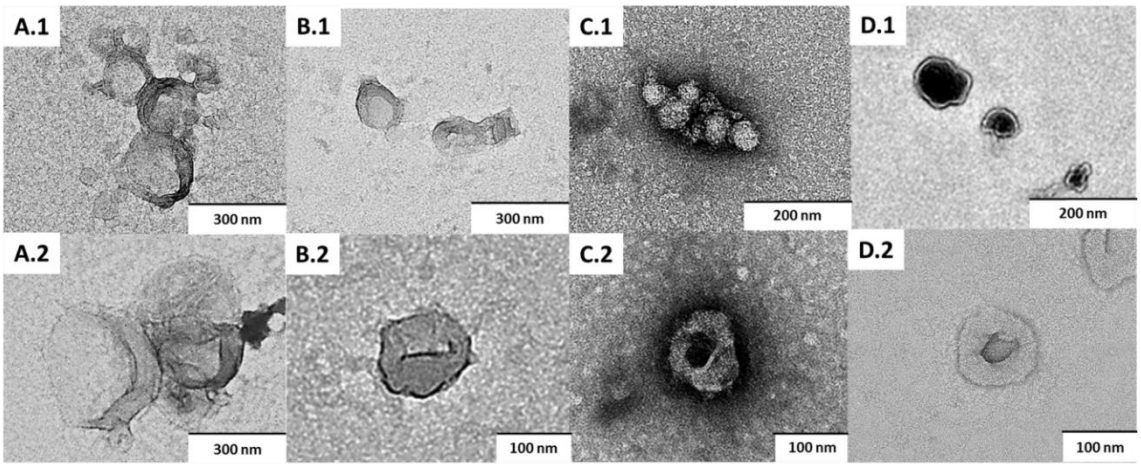

Figura 24. Microscopía electrónica de transmisión de muestras *in vitro* de EVs colectadas del sobrenadante de cultivos celulares del oviducto de hembras de pavo (*Meleagris gallopavo*), de las regiones del magnum y la unión útero vaginal, en ausencia y presencia de ovulación. A1 y A2: muestras de EVs de células de la región del magnum, provenientes de hembras en fotoperiodo positivo previo al inicio del estado ovulatorio. B1 y B2: muestras de EVs de células de la región de la unión útero vaginal, provenientes de hembras en fotoperiodo positivo previo al inicio del estado ovulatorio. C1 y C2: muestras de EVs de células de la región del magnum, provenientes de hembras en fotoperiodo positivo en estado ovulatorio. D1 y D2: muestras de EVs de células de la región de la unión útero vaginal, provenientes de hembras en fotoperiodo positivo en estado ovulatorio.

OBJETIVO 4. Determinar el contenido proteico de EVs obtenidas del oviducto de hembras de pavo criollo a partir de los grupos experimentales definidos en los objetivos 2 y 3.

La identificación molecular de biomarcadores, para identificar la presencia de EVs en las muestras, se efectuó mediante el análisis de proteómica. Dicho análisis arrojó la presencia de 9 “proteínas específicas” para EVs, dentro de las cuales, 5 ya habían sido reprotadas en el ovidcuto de pavas (*Meleagris gallopavo*). Dichas proteínas corresponden a: CD63 – CD81 – EPCAM – HSP70 – HSP90AA1- HSPA8 - ANXA4 – ANXA5 – VCP.

4.1. Identificación y cuantificación de proteínas, análisis general en base al origen de la muestra (*in vivo* e *in vitro*)

Tabla 1. Cuantificación de proteínas secretables, por cada grupo experimental, de acuerdo a los factores tejido, origen y estado reproductivo de muestras de EVs de *Meleagris gallopavo.*

ID	Tejido	Origen	Estado Reproductivo	Proteínas totales *Meleagris gallopavo*
1	M	*In vivo*	FN	819
2	UUV	*In vivo*	FN	1211
3	M	*In vivo*	FP	1890
4	UUV	*In vivo*	FP	2340
5	M	*In vitro*	FP	2572
6	UUV	*In vitro*	FP	1813
7	M	*In vivo*	FP en O	1776
8	UUV	*In vivo*	FP en O	2221
9	M	*In vitro*	FP en O	1440
10	UUV	*In vitro*	FP en O	1208

M: magnum; UUV: unión útero vaginal; FN: fotoperiodo negativo; FP; fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación.

La cuantificación de las proteínas detectadas, mediante el análisis de espectrometría de masas (Tabla 1) arrojó una sumatoria de 3.733 proteínas para los 10 grupos experimentales, excluyendo a aquellas proteínas identificadas como contaminantes comunes. La cuantificación individual de cada grupo experimental, se muestra en la tabla 1. Se evaluaron las cuantificaciones de proteínas de acuerdo al estado reproductivo (FP v/s FP en O), tejido (M v/s UUV de FP y FP en O) y origen (*in vivo* v/s *in vitro* de FP y FP en O), determinándose que no existen diferencias estadísticas (p = 0,193 / 0,943 / 0,397 respectivamente) entre las cuantificaciones proteicas por cada factor. Sin embargo, al efectuar una evaluación del factor tejido, de los tres estados reproductivos (M v/s UUV en FN, FP y FP en O), se puede establecer que el promedio de proteínas detectadas, asociadas al tejido del M, es significativamente menor (p = 0,001) al promedio de proteínas detectadas en la UUV.

Se determinó el número de proteínas secretadas de forma individual y compartida (Figura 25), entre las comparaciones de las variables del factor “tejido” (M v/s UUV), de acuerdo al “estado reproductivo” (FP y FP en O) y el “origen” (*in vivo* e *in vitro*), y las comparaciones de las variables del factor “estado reproductivo” (FP v/s FP en O) de acuerdo al “tejido” (M y UUV) y “origen” (*in vivo* e *in vitro*). Detectándose proteínas compartidas e individuales en todas las combinaciones comparativas del número de proteínas detectadas, siendo de mayor relevancia aquellas identificadas como exclusivas. De éste modo, de acuerdo a lo observado en la figura 25, se puede establecer que las comparaciones de acuerdo al “tejido” (M v/s UUV) muestran una tendencia similar de proteínas compartidas y proteínas exclusivas (p = 0,163). En cuanto a las comparaciones de acuerdo al “estado reproductivo” (FP v/s FP en O) se observaron diferencias significativas (p = 0,004) en el modelo de evaluación, por lo que se empleó el test de Fisher de comparaciones múltiples, pudiendo establecer mayor número de proteínas compartidas entre FP y FP en O, mientras que el número de proteínas exclusivas para cada estado reproductivo resultó similar entre variables.

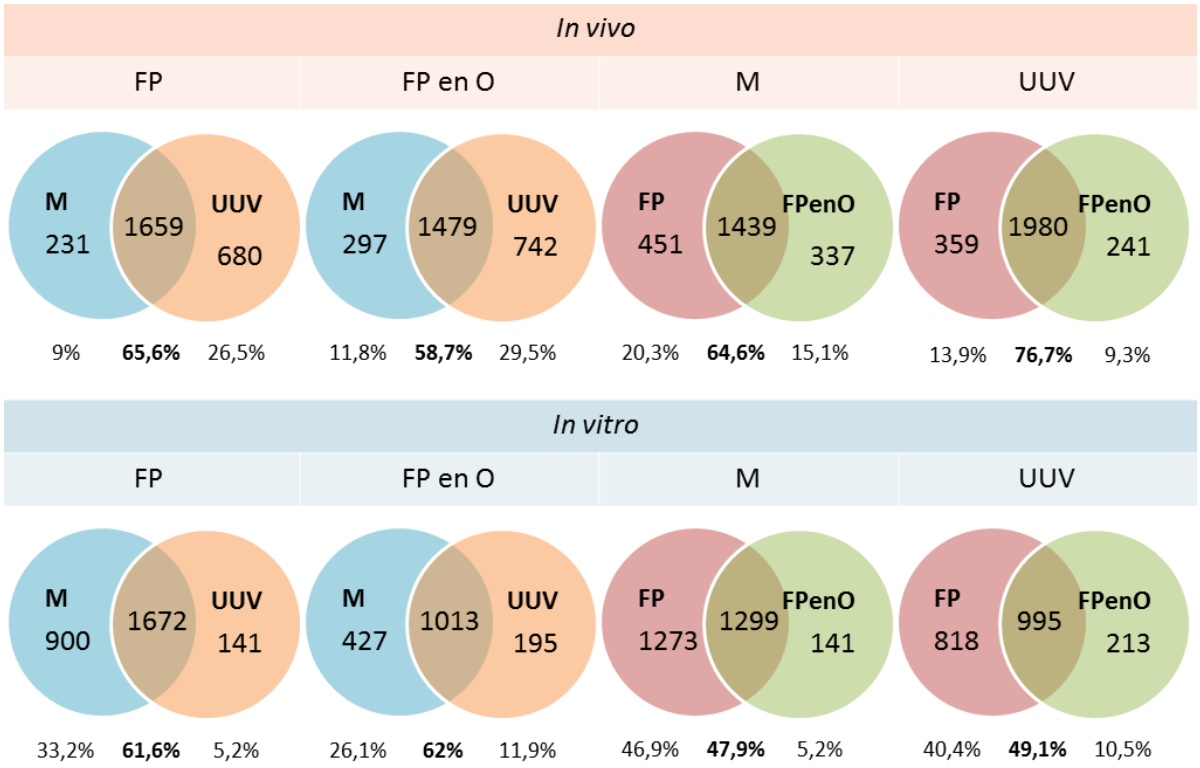

Figura 25. Diagrama de Venn con el número de proteínas que se secretan de forma individual y compartida, en las comparaciones entre tratamientos, de acuerdo al factor "tejido" (M v/s UUV) y el "estado reproductivo" (FP v/s FP en O). M: magnum; UUV: unión útero vaginal; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación.

Tabla 2. Perfil cuantitativo del proteoma mediante LFQ, de acuerdo a las comparaciones del factor origen (*in vivo* v/s *in vitro*) y tipo de tejido (M v/s UUV), en el estado reproductivo de fotoperiodo positivo con y sin ovulación (FP y FP en O) de muestras de EVs de *Meleagris gallopavo*.

	FP y FP en O	
	In vivo v/s *in vitro*	M v/s UUV
Total de proteínas cuantificables	764	764
Proteínas diferencialmente expresadas ($p < 0,05$)	272	0

M: magnum; UUV: unión útero vaginal; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación.

Se desarrolló un análisis del perfil cuantitativo de las proteínas, en base a la matriz de intensidades generada en FragPipe, mediante cuantificación proteica diferencial sin marcaje (LFQ) por medio del software Persus. Se estableció una comparación entre las variables de los factores “origen” (*in vivo* v/s *in vitro*) y “tejido” (M v/s UUV), de muestras de las variables en fotoperiodo positivo (FP y FP en O) del factor “estado reproductivo”. A partir de aquello se determinó el total de proteínas cuantificadas, valores presentes en la tabla 2. De éste modo, se identificó un total de 272 proteínas diferencialmente expresadas (DEPs) ($p < 0,05$), respecto a la comparación de las variables *in vivo* e *in vitro* en torno al factor “origen”, mientras que la comparación entre las variables M y UUV del factor “tejido” no arrojaron DEPs.

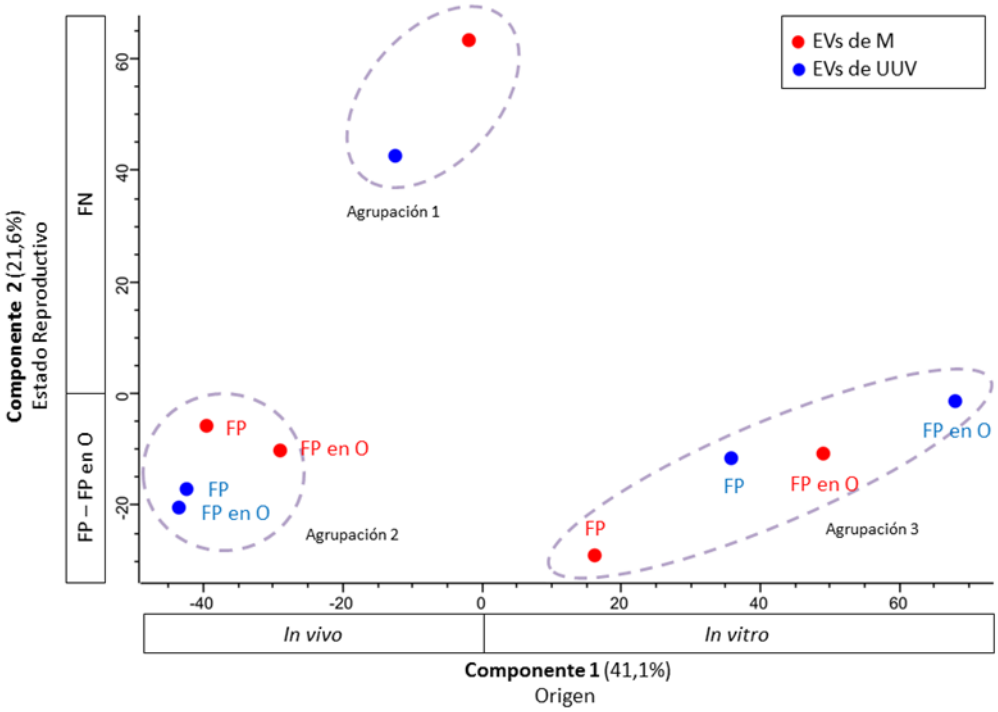

Figura 26. Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas identificadas en las muestras de EVs obtenidas a partir de condiciones *in vivo* e *in vitro*, en fotoperiodo negativo (FN), fotoperiodo positivo (FP) y fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), de las regiones del magnum (M) y la unión útero vaginal (UUV), a partir del oviducto de hembras de pavo criollo (*Meleagris gallopavo*).

Se efectuó un análisis de componenetes principales (PCA) (Figura 26), con la finalidad de comprender y determinar de mejor forma las EVs con características comunes en el patrón de secreción proteico, de acuerdo a la variacion en la abundancia proteica de las muestras, previa normalización de las intensidades. Se determinó un número de 3 agrupaciones (clusters), donde el factor de identificación para diferenciar las distintas observaciones fue el "tejido" a partir del cual se obtuvieron las muestras de EVs, con la variable M en rojo y la variable UUV en azul. La "agrupación 1" contiene a las proteínas de los grupos identificados como M y UUV *in vivo* de muestras en FN, con la menor proporción de abundancia proteica, la "agrupación 2" contiene a los grupos de M y UUV *in vivo* en FP y FP en O, asociada con la mayor abundancia proteica, mientras que la "agrupación 3" corresponde a las muestras de M y UUV *in vitro* en FP y FP en O.

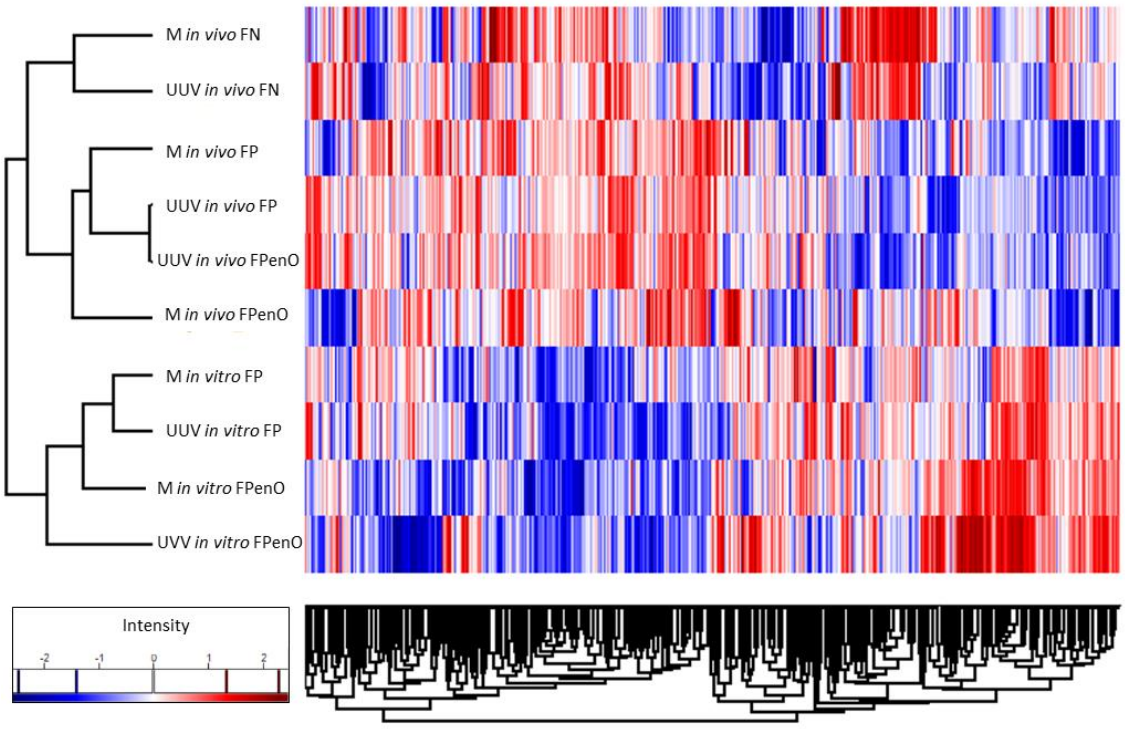

Figura 27. Mapa de calor (Heatmap) con la representación del perfil de expresión de proteínas de EVs de muestras *in vivo* (lavado) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del M y la UUV del oviducto pavas criollas (*Meleagris gallopavo*), de acuerdo al fotoperiodo y estado reproductivo de las hembras. M: magnum; UUV: unión útero vaginal; FN: fotoperiodo negativo; FP; fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación.

Se desarrolló un mapa de calor (heatmap) (Figura 27) con clustering jerárquico no supervisado, para efectuar un análisis cualitativo del perfil de expresión proteica, a partir de las proteínas cuantificables del contenido de EVs de las muestras, *in vivo* e *in vitro,* de las secciones del M y la UUV, de hembras en FN, FP y FP en O. Se emplearon colores cálidos y fríos, en tonos rojos y azules, para representar e identificar los cambios, patrones y magnitudes de la expresión proteica de las muestras, en el eje X, de acuerdo a las categorías en que se clasificó a los grupos experimentales, en el eje Y. Los resultados permiten identificar patrones comunes en el perfil de expresión proteica asociados a 3 grandes grupos (cluster), similar a lo visualizado en los 3 cluster del PCA de la figura 26.

De éste modo, la figura 27 permite apreciar una asociación muy marcada entre los patrones de color de los grupos de muestras *in vitro,* incluyendo las muestras de M y la UUV, de hembras en FP y FP en O, con perfiles de expresión semejantes. Se aprecian además patrones comunes de expresión entre las muestras *in vivo,* donde las proteínas de EVs de M y la UUV en FP y FP en O poseen destacadas similitudes entre sí, diametralmente opuestas al perfil de las muestras *in vitro* y medianamente diferentes a las muestras *in vivo* de M y la UUV de hembras en FN. Respecto a las proteínas de las EVs del M y la UUV en FP y FP en O, se logran observar leves diferencias en el perfil de expresión entre el M y la UUV, asociadas sólo a muestras *in vivo.*

Se presenta un volcano plot (Figura 28) en base a las 272 proteínas diferencialmente expresadas ($p < 0,05$), encontradas a partir de las EVs de muestras *in vivo* (lavado) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular), en el M y la UUV de hembras en FP y FP en O. La gráfica muestra las proteínas con expresión diferencial estadísticamente significativa ($p < 0,05$), donde las proteínas sub-expresadas (down-regulated) se representan con puntos en color azul, mientras que las proteínas diferencialmente sobre-expresadas (up-regulated) con puntos en color rojo. Encontrándose 272 proteínas diferencialmente expresadas y 492 proteínas sin diferencias significativas.

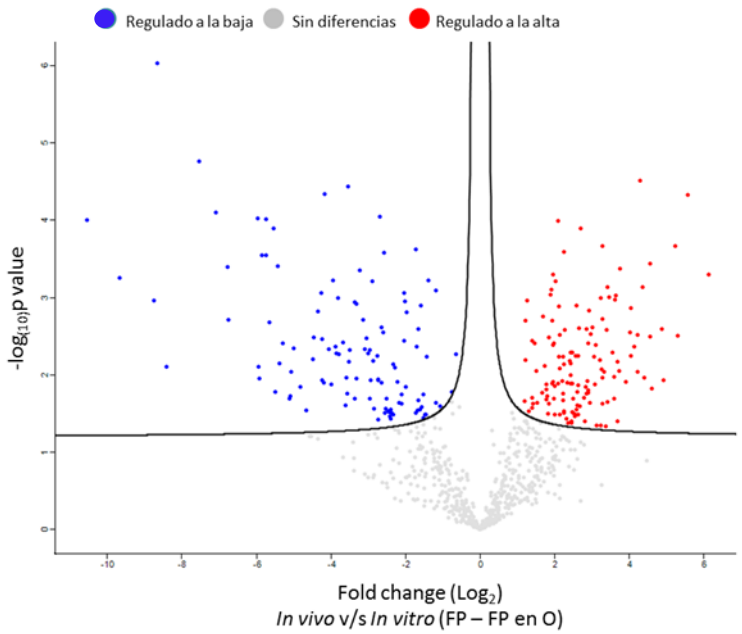

Figura 28. Volcano plot del perfil de expresión proteica de EVs de muestras *in vivo* (lavado) versus *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular), en FP (fotoperiodo positivo) y FP en O (fotoperiodo positivo en ovulación) del M y la UUV del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*).

El análisis anterior permitió establecer claramente que existen diferencias significativas en el contenido de las EVs en dependencia del origen de las mismas, entendiéndose por ello, origen técnico (*in vitro* o *in vivo*), no así del origen anatómico (M v/s UUV). Dado que es vital para este trabajo entender las potenciales diferencias en la proteómica de las EVs según su origen anatómico, se llevó a cabo un análisis de identificación y cuantificación basado no en expresión diferencial, sino en base a las funciones biológicas de las proteínas encontradas en el M y la UUV.

4.2. Identificación y cuantificación de proteínas en base a las funciones biológicas de las diferentes secciones anatómicas (M v/s UUV)

Se compararon las funciones biológicas de las proteínas halladas en las distintas secciones oviductales de la UUV (UUV *in vivo* FP, UUV *in vivo* FP en O, UUV *in vitro* FP y UUV *in vitro* FP en O) y el M (M *in vivo* FP, M *in vivo* FP en O, M *in vitro* FP y M *in vitro* FP en O), considerando aquellas proteínas que cumplieron con los siguientes criterios: conteo espectral >1 y valor p < 0,05. A partir de lo cual se encontró un total de 77 proteínas diferenciadas.

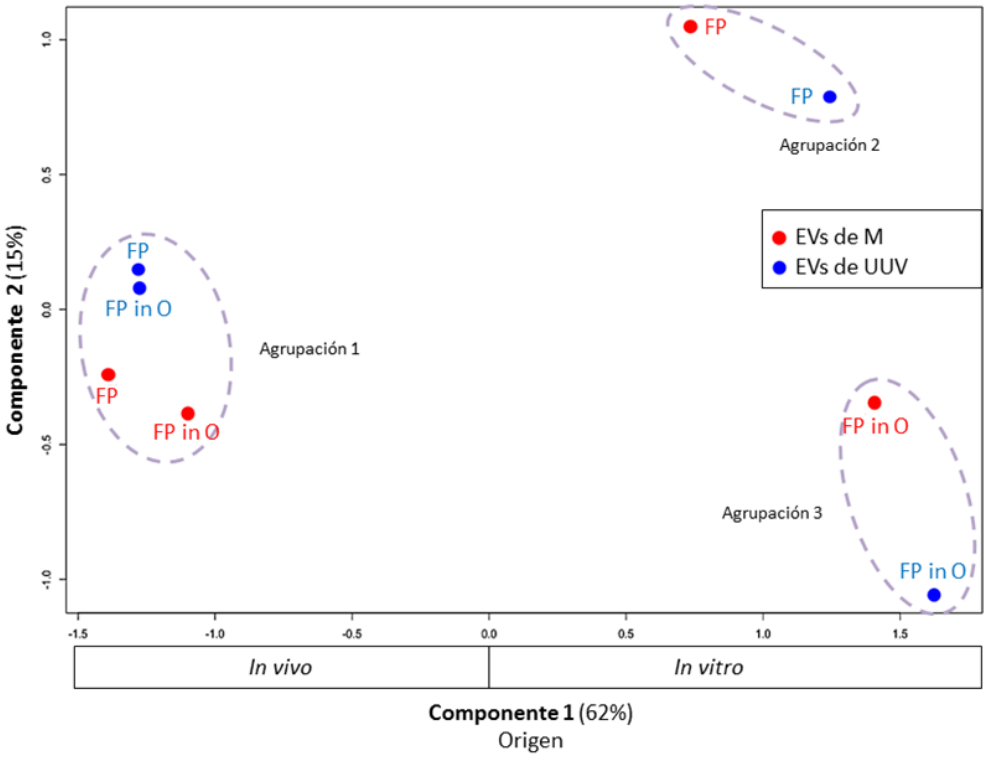

Figura 29. Análisis de componentes principales (PCA) de las proteínas identificadas en las muestras de EVs obtenidas a partir de condiciones *in vivo* e *in vitro*, fotoperiodo positivo (FP) y fotoperiodo positivo en ovulación (FP en O), de las regiones del magnum (M) y la unión útero vaginal (UUV), a partir del oviducto de hembras de pavo criollo (*Meleagris gallopavo*).

El análisis de componentes principales (Figura 29) mostró dos agrupaciones (cluster) mayoritarias, constituidas por las proteínas de las EVs obtenidas de muestras *in vivo*, correspondientes a la “agrupación 1”, asociadas independiente del estado reproductivo (FP y FP en O), y las proteínas de EVs obtenidas *in vitro*, en la “agupación 2” y “agrupación 3”, segregadas de acuerdo al estado ovulatorio de la hembra (FP y FP en O).

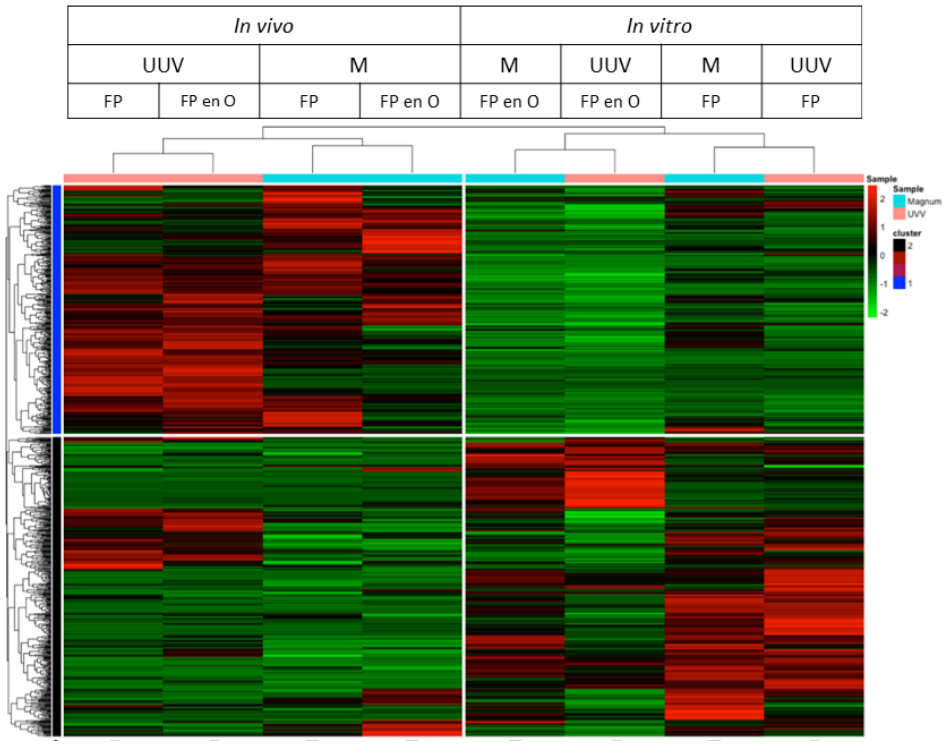

Figura 30. Mapa de calor (Heatmap) con la representación del perfil de expresión de proteínas de EVs de muestras *in vivo* (lavado) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del M y la UUV del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*). M: magnum; UUV: unión útero vaginal; FP; fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación.

El mapa de calor con clustering jerárquico no supervisado, realizado a partir de los datos utilizados para el PCA, arrojó resultados similares (Figura 30), en donde se observan dos grandes grupos (cluster), con patrones comunes en el perfil de expresión proteica, segregados de acuerdo al origen de la muestra (*in vivo* e *in vitro*). Al efectuar un análisis más exhaustivo, dentro de los dos grandes grupos (cluster), es posible asociar mayor similitud en el patrón de expresión proteica de acuerdo al tejido (UUV y M), con una agrupación para las muestras de la UUV y otra para las muestras de M, en las muestras

in vivo. Mientras que las muestras *in vitro*, permiten observar mayor similitud de acuerdo al estado ovulatorio de la hembra (FP y FP en O), con sub-agrupaciones para las muestras de FP y FP en O.

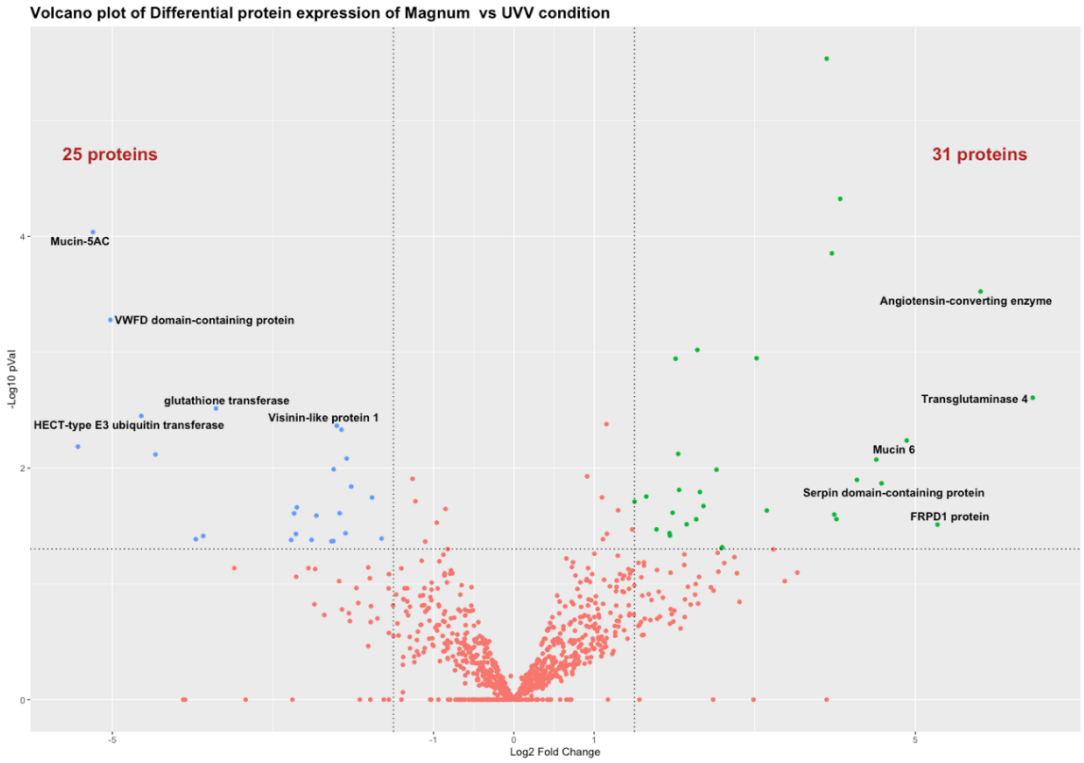

Figura 31. Volcano plot del perfil de expresión proteica de EVs de muestras del magnum versus la unión útero vaginal, en FP (fotoperiodo positivo) y FP en O (fotoperiodo positivo en ovulación) de muestras *in vivo* (lavado oviductal) e *in vitro* (de sobrenadante de cultivo celular) del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*). El valor de significancia para asignar a un grupo u otro fue de $p < 0,05$.

Se creó un volcano plot (Figura 31) empleando criterios altamente estringentes de expresión diferencial: logaritmo del fold change superior a -1.5 ó + 1.5 (para las proteínas sub y sobre expresadas respectivamente) y un valor $p < 0,05$. Las proteínas sub-expresadas (down-regulated) se representan con puntos en color azul, las proteínas diferencialmente sobre-expresadas (up-regulated) con puntos en color verde y las proteínas igualmente expresadas ($p \geq 0,05$) se colorean en rojo.

4.3. Ontología de genes

Basados en los resultados obtenidos, se estudió cuáles proteínas con posible impacto sobre la función de los espermatozoides, incluyendo la motilidad espermática, estaban sobre o subrepresentadas entre las proteínas diferencialmente expresadas. Para ello se efectuó un análisis bioinformático de Ontología de Genes (Gene Ontology) de los genes diferencialmente expresados, de las muestras de EVs de los 8 grupos experimentales en fotoperiodo positivo (M *in vivo* en FP; UUV *in vivo* en FP; M *in vitro* en FP; UUV *in vitro* en FP; M *in vivo* en FP en O; UUV *in vivo* en FP en O; M *in vitro* en FP en O; UUV *in vitro* en FP en O), con la finalidad de identificar los genes y sus productos génicos en base a procesos biológicos. Bajo esa premisa se efectuaron dos mapas de calor (Heatmap) utilizando términos específicos de ontología génica, extrayendo el conjunto de genes de la base de datos internacional MGI (Mouse genome informatics), que proporciona datos genéticos, genómicos y biológicos integrados. Los criterios de búsqueda y sus resultados se muestran a continuación en forma de mapas de calor.

Los términos buscados fueron: movilidad espermática (GO:0097722 Biological process “Sperm motility”) y reacción acrosomal (GO:0007340 Biological process “Acrosome Reaction”), este subset es identificado en las bases de GO, como “sperm related gene ontology” e incluye motilidad espermática con 187 genes candidatos y reacción acrosómica con 40 genes candidatos. Se encontraron 8 genes cuyas proteínas están involucradas en los GO mencionados, de un total de 227 proteínas totales interrogadas (Figura 32).

El análisis del mapa de calor indica una correlación inversa entre las proteínas sobreexpresadas en el sistema *in vivo* comparado con el *in vitro*. Las dos grandes agrupaciones (cluster) muestran una clara diferencia en la expresión proteica de acuerdo al origen de la muestra (*in vivo* e *in vitro*) e indican que la expresión es inversa para los genes encontrados.

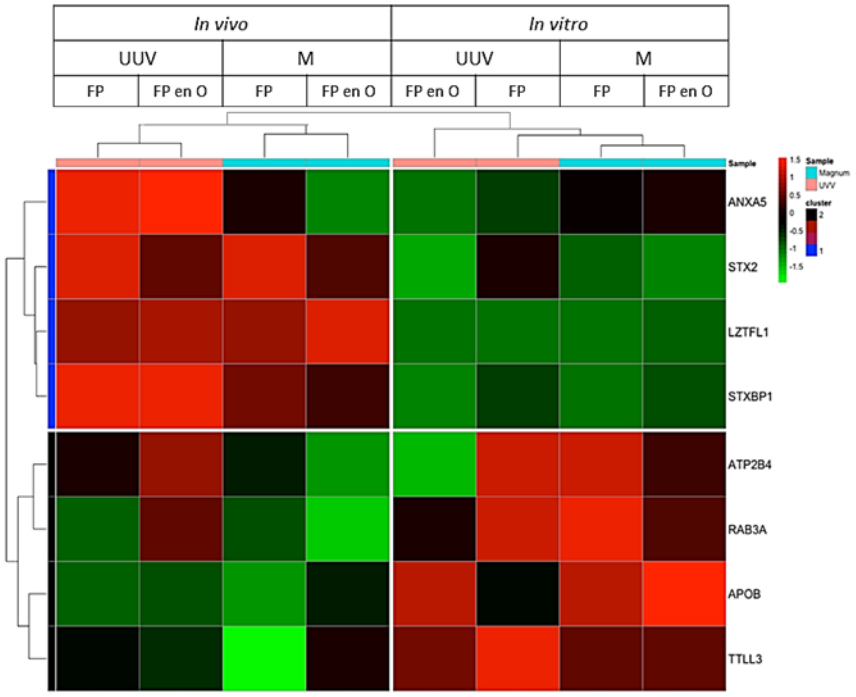

Figura 32. Mapa de calor (Heatmap) del perfil de expresión de proteínas de EVs de muestras *in vivo* (lavado) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del M y la UUV del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*), utilizando términos específicos de ontología genética, relacionada con procesos biológicos relacionados con los espermatozoides, respecto a aptitudes de movilidad y reacción acrosomal. M: magnum; UUV: unión útero vaginal; FP; fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación.

En la figura 33 se muestra el mapa de calor de las mismas muestras, basado en un set de genes de ontología génica relacionados con la fertilización (GO:0009566 Biological process 211 genes), a partir de los cuales se encontraron 18 proteínas asociadas, donde se conservó esencialmente el mismo patrón del mapa de calor de la figura 32.

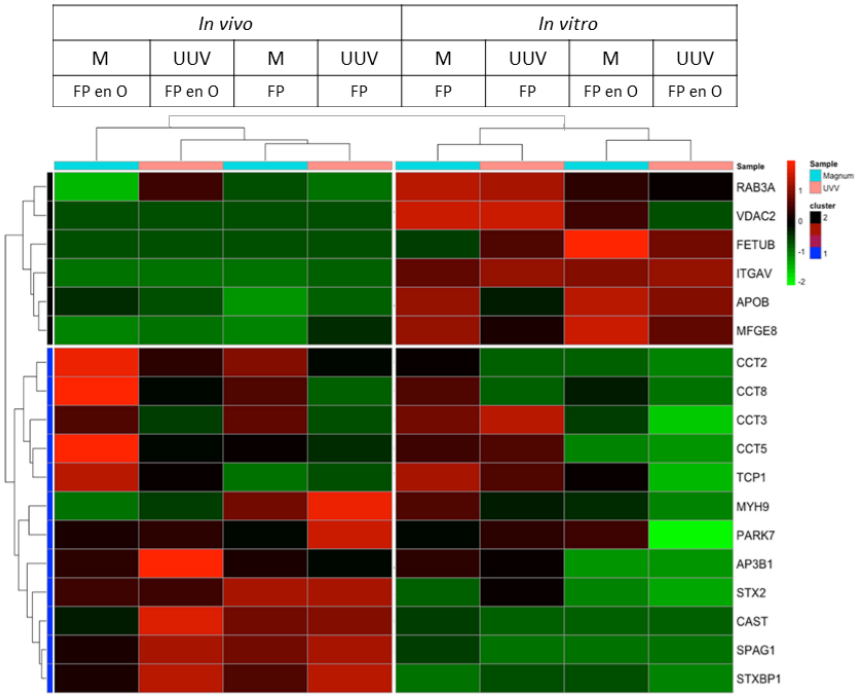

Figura 33. Mapa de calor (Heatmap) del perfil de expresión de proteínas de EVs de muestras *in vivo* (lavado) e *in vitro* (sobrenadante de cultivo celular) del M y la UUV del oviducto de pavas criollas (*Meleagris gallopavo*), utilizando términos específicos de ontología genética, relacionada con procesos biológicos ligados a la fertilización. M: magnum; UUV: unión útero vaginal; FP; fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación.

EFECTO E INTERACCION DE LAS VESÍCULAS EXTRACEULARES SOBRE ESPERMATOZOIDES *IN VITRO*

OBJETIVO 5. Analizar el efecto de los aislados de EVs de fluido oviductal (*in vivo*) de gallinas (con y sin TAE), sobre los patrones de unión, viabilidad y movilidad de espermatozoides de gallo criollo, de acuerdo al tiempo de incubación y la concentración de EVs.

Para evaluar el posible rol de las EVs sobre los espermatozoides de pavo, se llevaron a cabo experimentos que evaluaron la internalización de éstos por EVs previamente marcadas, así como el desarrollo de experimentos que permitieron analizar el efecto de las EVs sobre la motilidad y viabilidad espermática. De éste modo, para poner a punto la metodología, se emplearon en primera instancia espermatozoides de gallos y EVs de gallina, considerando la mayor aptitud respecto a la temporada reproductiva de la especie *Gallus gallus* respecto a *Meleagris gallopavo*, facilitando la disponibilidad de semen por un mayor periodo de tiempo, favoreciendo el desarrollo de las evaluaciones de los distintos grupos experimentales y variables a evaluar.

5.1. Internalización de EVs en espermatozoides

La evaluación de la internalización de EVs (Figura 34), extraídas del lavado de la UUV de gallinas, por espermatozoides de gallo, durante su incubación conjunta (38.5 °C y 5 % de CO_2 hasta por 6 hrs), evidencia internalización leve a partir de las 2 hrs de evaluación durante la co-incubación, observándose un mayor porcentaje de internalización a partir de las 4 horas de co-incubación. En cuanto al patrón de unión de las EVs respecto a la anatomía espermática, se aprecia que existe interacción a nivel de la cabeza del espermatozoide, no logrando observar internalización en la cola de éste.

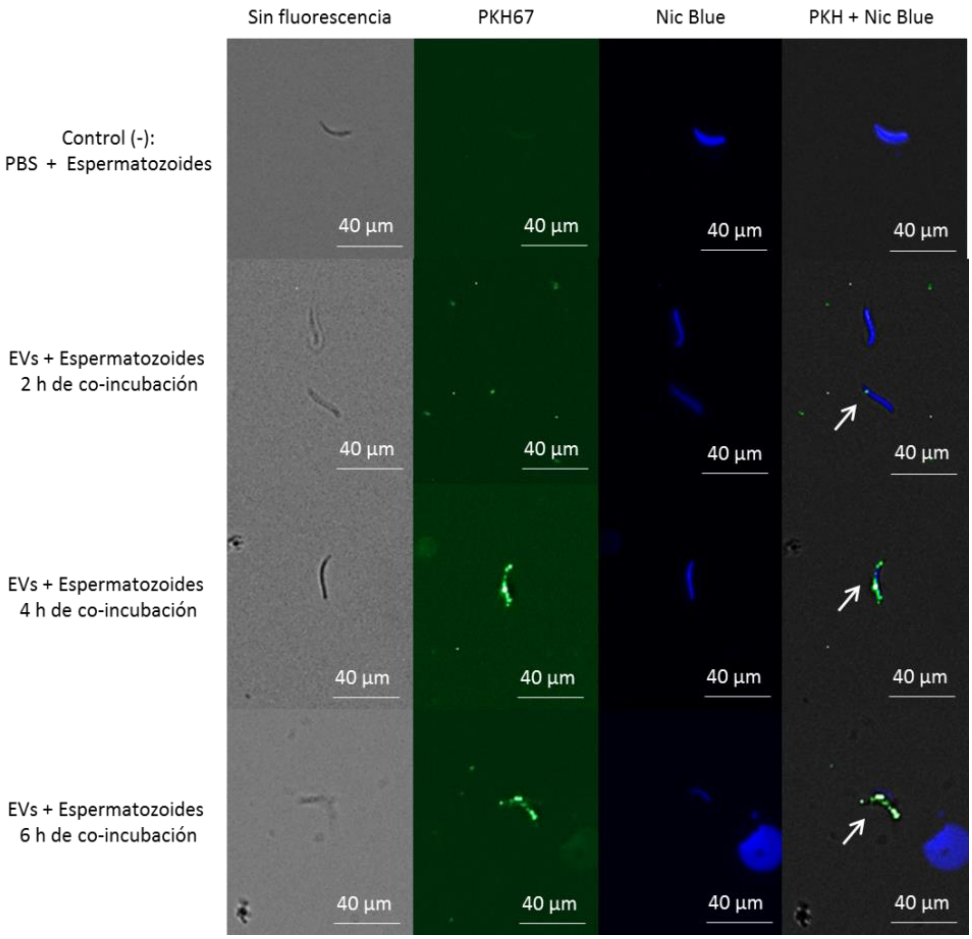

Figura 34. Internalización de EVs, del lavado de la unión útero vaginal del oviducto de gallinas, efectuada por espermatozoides de gallo. EVs marcadas con PKH67, y control negativo de PBS con PKH67, se evaluaron a las 2, 4 y 6 horas de co-incubación con espermatozoides marcados con Nic Blue, indicándose la internalización con una flecha en las imágenes que muestran la fluorescencia de PKH67 + Nic Blue.

5.2. Viabilidad espermática en co-incubación con EVs

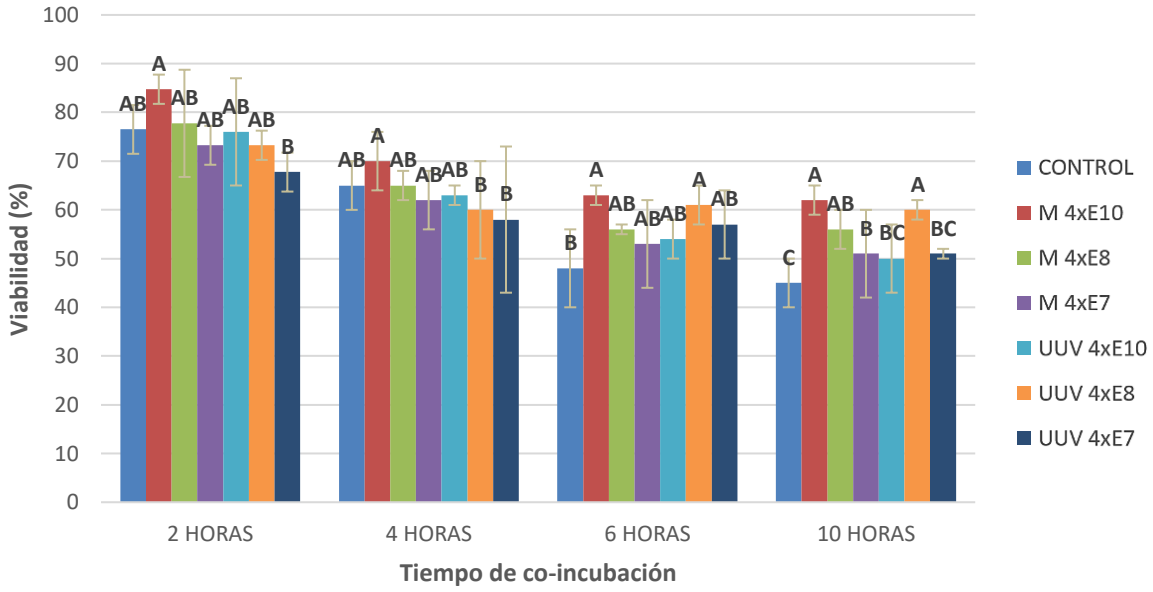

Figura 35. Análisis de la viabilidad espermática, de espermatozoides de gallo, co-incubados con EVs oviductales de magnum y la unión útero vaginal de gallinas, en distintas concentraciones. CONTROL: muestras de espermatozoides sin EVs; M 4xE10: espermatozoides co-incubados con EVs de magnum a una concentración de 4 x 10^{10} partículas/mL; M 4xE8: espermatozoides co-incubados con EVs de magnum a una concentración de 4 x 10^{8} partículas/mL; M 4xE7: espermatozoides co-incubados con EVs de magnum a una concentración de 4 x 10^{7} partículas/mL; UUV 4xE10: espermatozoides co-incubados con EVs de la unión útero vaginal a una concentración de 4 x 10^{10} partículas/mL; UUV 4xE8: espermatozoides co-incubados con EVs de la unión útero vaginal a una concentración de 4 x 10^{8} partículas/mL; UUV 4xE7: espermatozoides co-incubados con EVs de la unión útero vaginal a una concentración de 4 x 10^{7} partículas/mL. Test LSD Fisher, donde medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

La viabilidad de los espermatozoides se evaluó de acuerdo a dos diseños de análisis estadístico, por una parte un análisis de varianza de acuerdo a cada tiempo de co-incubación, permitiendo comparar las diferencias entre todas las muestras de EVs por cada tiempo de evaluación (2, 4, 6 y 10 horas) (Figura 35), y un análisis de varianza de acuerdo al origen y concentración de EVs (control sin EVs, M y la UUV, a 4 x 1010, 4 x 108 y 4 x 107) (Anexo 10. Tabla 10), permitiendo evaluar las diferencias de cada muestra a lo largo del tiempo.

De éste modo, el análisis de varianza de acuerdo a cada tiempo de co-incubación (Figura 35) arrojó que a las 2 horas de co-incubación las muestras de espermatozoides co-incubados con la mayor concentración de EVs de M (4 x 10^{10} partículas/mL), poseen una viabilidad (85 %) significativamente superior ($p < 0,05$) al compararse con la viabilidad de las muestras que se co-incubaron con la menor concentración de EVs de la UUV (4 x 10^7 partículas/mL) (68 %). A las 4 horas de co-incubación se observa un comportamiento similar en la viabilidad espermática, donde el grupo con la mayor concentración de EVs de M posee una viabilidad superior ($p < 0,05$) (70 %) a la viabilidad de los espermatozoides en las muestras con EVs de la UUV de las concentraciones de 4 x 10^8 y 4 x 10^7 partículas/mL (60 y 58 % respectivamente). Sin embargo, a las 6 horas de co-incubación, las muestras comienzan a mostrar un comportamiento diferente, con mayor viabilidad ($p < 0,05$) en los espermatozoides de las muestras co-incubadas con EVs de M a la mayor concentración (4 x 10^{10} partículas/mL) (63 %) y EVs de la UUV a concentración intermedia (4 x 10^8 partículas/ml) (61 %), al compararse con los espermatozoides del grupo control sin EVs (48 %). A las 10 horas de co-incubación se acentúan las diferencias, con mayor viabilidad ($p < 0,05$) para los espermatozoides de las muestras con EVs del M a mayor concentración (4 x 10^{10} partículas/mL) (62 %) y muestras con EVs de la UUV a concentración intermedia (4 x 10^8 partículas/ml) (60 %), al compararse con el grupo control sin EVs (45 %), con la menor viabilidad, y los grupos con EVs de M a menor concentración (4 x 10^7 partículas/ml) (51 %) y EVs de la UUV con mayor y menor concentración (4 x 10^{10} y 4 x 10^7 partículas/ml) (50 y 51 % respectivamente), con viabilidad intermedia.

Por otra parte, al realizar un análisis de varianza de acuerdo a las muestras de EVs (Anexo 10. Tabla 10), se detectó que el grupo control sin EVs desarrolló un patrón de viabilidad superior ($p < 0,05$) dentro de los primeros tiempos de co-incubación (2 y 4 horas con 76 y 65 %), para luego descender significativamente a partir de las 6 horas de co-incubación (58 %). En el caso de las muestras con EVs de M, las muestras con mayor concentración (4×10^{10} partículas/ml) presentan un patrón de viabilidad descendente ($p < 0,05$) desde las 2 a las 6 horas de evaluación (con 85 y 75 % respectivamente), para luego estabilizarse ($p \geq 0,05$) en las evaluaciones de las 6 y 10 horas (con 63 y 62 % respectivamente). En el caso de las muestras con una concentración intermedia de EVs de M (4×10^{8} partículas/mL), se observan patrones inicialmente diferentes ($p < 0,05$) (con 78 % a las 2 hrs), para luego estabilizarse ($p \geq 0,05$) en una viabilidad promedio de 59 % entre las 4 y 10 horas de evaluación. Mientras que las muestras de EVs de M con menor concentración (4×10^{7} partículas/mL) presentan mayor viabilidad ($p < 0,05$) a las 2 h (73 %) y menor viabilidad a las 10 horas de evaluación (51 %). Respecto a las muestras con mayor concentración de EVs de la UUV (4×10^{10} partículas/mL), posee un comportamiento de viabilidad espermática similar a las muestras con menor concentración de EVs de M (4×10^{7} partículas/mL), con mayor ($p < 0,05$) viabilidad a las 2 h (76 %) y menor a las 10 horas (50 %), sin diferencias ($p \geq 0,05$) a las 4 y 6 horas (con 63 y 54 % respectivamente). Mientras que las muestras con EVs de la UUV con concentraciones intermedias (4×10^{8} partículas/mL) e inferiores (4×10^{7} partículas/mL), al igual que las muestras con concentraciones intermedias de EVs del M (4×10^{8} partículas/mL), inician con porcentajes de viabilidad superior ($p < 0,05$) a las 2 horas de evaluación (con 73 y 68 % respectivamente), para luego estabilizarse ($p \geq 0,05$) en promedios de 60 % (EVs de la UUV con 4×10^{8} partículas/mL) y 55 % (EVs de la UUV con $4x10^{8}$ partículas/mL) respectivamente, a las 4, 6 y 10 horas de co-incubación.

5.3. Movilidad espermática en co-incubación con EVs

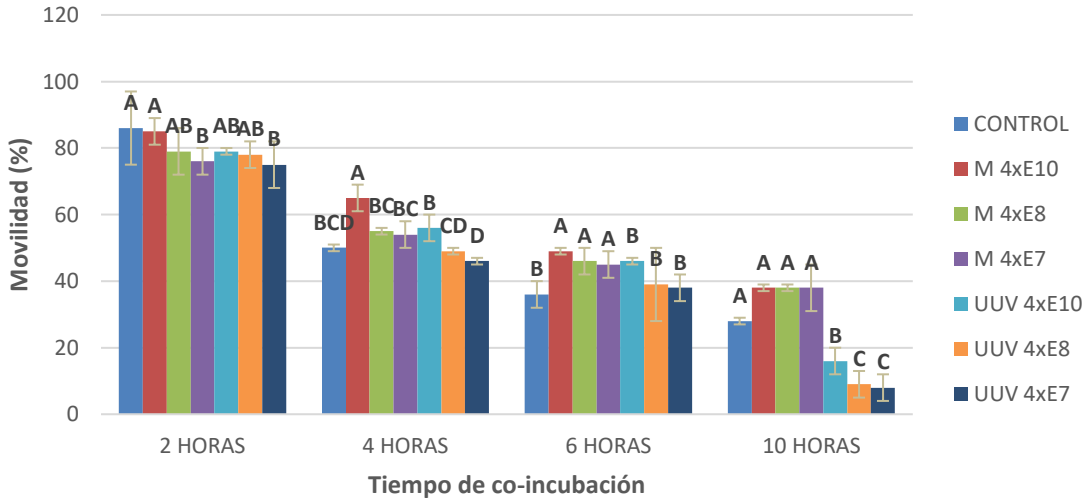

Figura 36. Análisis de la movilidad espermática, de espermatozoides de gallo, co-incubados con EVs oviductales de M y la UUV de gallinas, en distintas concentraciones. CONTROL: muestras de espermatozoides sin EVs; M 4xE10: espermatozoides co-incubados con EVs de magnum a una concentración de $4x10^{10}$ partículas/mL; M 4xE8: espermatozoides co-incubados con EVs de magnum a una concentración de $4x10^{8}$ partículas/mL; M $4x10^{7}$: espermatozoides co-incubados con EVs de magnum a una concentración de $4x10^{7}$ partículas/mL; UUV $4x10^{10}$: espermatozoides co-incubados con EVs de la unión útero vaginal a una concentración de $4x10^{10}$ partículas/mL; UUV 4xE8: espermatozoides co-incubados con EVs de la unión útero vaginal a una concentración de 4×10^{8} partículas/mL; UUV 4xE7: espermatozoides co-incubados con EVs de la unión útero vaginal a una concentración de 4×10^{7} partículas/mL. Test LSD Fisher, donde medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

Al igual que en el experimento de viabilidad, los análisis de los datos de movilidad fueron evaluados de acuerdo a dos diseños de análisis estadístico, con un análisis de varianza con el tiempo de co-incubación (2, 4, 6 y 10 horas) como la variable independiente (Figura 36), para evaluar la movilidad espermática de todos los grupos por cada instante de tiempo, y un análisis de varianza con el tipo de muestra de EVs (control sin EVs, M y la UUV, a 4×10^{10}, 4×10^{8} y 4×10^{7} partículas/mL) como variable independiente (Anexo 11. Tabla 11), evaluando la movilidad espermática de cada muestra a lo largo del tiempo de muestreo.

La evaluación de la movilidad a las 2 horas (Figura 36) mostró mayor porcentaje ($p < 0,05$) para el grupo control y el grupo con mayor concentración (4×10^{10} partículas/mL) de EVs del M, al compararse con los grupos con menor concentración (4×10^{7} partículas/mL). A las 6 horas todos los grupos con EVs del M superan ($p < 0,05$) la movilidad de los grupos con EVs de la UUV y el grupo control. Mientras que a las 10 horas los grupos con menores concentraciones de EVs de la UUV (4×10^{8} y 4×10^{7} partículas/mL) descienden drásticamente la movilidad ($p < 0,05$), diferenciándose de todos los grupos con EVs del M, el grupo control y el grupo con mayor concentración de EVs de la UUV (4×10^{10} partículas/mL).

La evaluación de los resultados de movilidad por cada grupo experimental, durante el transcurso de tiempo en que se desarrolla el muestreo (Figura 36), indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cada punto de tiempo (2, 4, 6 y 10 horas) para las muestras control sin EVs y todas las muestras con EVs de M (4×10^{10}, 4×10^{8} y 4×10^{7} partículas/mL). Sin embargo, las muestras con EVs de la UUV muestran sus mayores diferencias ($p < 0,05$) entre los extremos del periodo de muestreo (2 y 10 horas), tendiendo a estabilizar e igualar ($p \geq 0,05$) los porcentajes de movilidad espermática durante los periodos centrales del muestreo (4 y 6 horas).

IV. DISCUSIÓN

PATRONES SÉRICOS DE HORMONAS SEXUALES

Los machos inician la producción diferencial de testosterona durante el mes de agosto, cuando se supera un umbral de fotosensibilidad mayor a 9,5 horas de luz (Noirault *et al*., 2006). Mientras que la hembra aumenta la producción de estradiol y progesterona en septiembre, relacionándose con el inicio de la postura de huevos. Los desfases reproductivos podrían explicarse por la capacidad de almacenamiento espermático que posee la hembra (Bakst y Vinyard, 2002; Bakst *et al*., 2010), siendo receptivas a la monta previo al inicio de la ovulación, período en que los TAE son más eficientes respecto a la velocidad y volumen de carga espermática (Brillard y Bakst, 1990). Los picos hormonales para ambos sexos se normalizan entre fines de invierno e inicios de primavera, relacionándose con el incremento de las horas de luz diarias y coincidiendo con el inicio de la postura de huevos en la hembra y el comportamiento de cortejo y apareamiento en el macho (Parker, 1947; Muñoz, 2019).

Posterior al pico de testosterona en el macho y al pico de estradiol y progesterona en la hembra durante, el mes de noviembre el macho va finalizando su actividad de apareamiento a medida que la hembra reduce su receptividad estacional debido a los períodos de incubación y crianza (Tamai y Yoshimura, 2017), el aumento de las temperaturas ambientales (Sauveur, 1992) y la consecuente reducción en la calidad espermática (Noirault, *et al*., 2006a). Posteriormente la hembra presenta un nuevo pico de progesterona y aumento de estradiol, reiniciando su actividad ovulatoria y capacidad de conservación espermática (Bakst *et al*., 1994; Bakst y Vinyard, 2002; Bakst *et al*., 2010), eventos necesarios para asegurar la fertilidad de la siguiente etapa de incubación y crianza, para el segundo lote de pavipollos (Muñoz, 2019). Cambios estacionales en la actividad reproductiva que tienen como propósito biológico la maximización de la supervivencia de la descendencia, para que las crías se desarrollen en condiciones ambientales donde el clima y la disponibilidad de alimentos sean favorables.

Los antecedentes recopilados permitieron delimitar las temporadas de muestreo, para la recolección de EVs a partir de fluidos y cultivo celular de tejido oviductal, necesarios para dar respuesta a los siguientes objetivos del estudio, de acurdo a la estacionalidad reproductiva en el lugar de muestreo con el modelo animal *in situ*. De éste modo, se logró categorizar a las hembras de acuerdo al fotoperiodo estacional al cual estaban expuestas, considerando además su estado ovulatorio. Permitiendo categorizar a hembras en FN, con sus órganos reproductores inmaduros o involucionados, previos a la maduración estacional, hembras en FP sin ovulación, con aumento de tamaño y grosor considerables del oviducto e inicio del desarrollo folicular, y hembras en FP iniciada la ovulación, con un huevo en el útero y folículos en fase terminal de maduración.

CARACTERIZACION DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES OVIDUCLALES

1. Biometría de las EVs

En nuestro estudio se encontraron diferencias en el tamaño de partículas, influenciado por el estado reproductivo (menor tamaño en FP en O) y el origen de las muestras (menor tamaño *in vivo*). El tamaño de partículas extracelulares dice relación con el tipo de EVs, siendo aquellas de un diámetro mayor a 120-150 nm consideradas microvesículas, y las de menor diámetro exosomas (Lakkaraju y Rodriguez-Boulan, 2008; Colimbo *et al*., 2014). Respecto a la concentración, se pudo establecer diferencias de acuerdo al estado reproductivo (mayor concentración en FP en O), el tejido oviductal (mayor concentración de microvesículas en la UUV), y el origen de la muestra (mayor concentración de exosomas *in vivo*).

De relevancia para la hipótesis de esta tesis son las EVs oviductales. Encontrando en las muestras provenientes de lavado (*in vivo*) de la UUV un aumento en la concentración de microvesículas (mayor diámetro). Esto se condice con los reportes de Bakst y Bauchan en 2015, quienes describen ampollas redondeadas microvellosas al interior de los TAE de *Melagris gallopavo* en la UUV, con diámetros de entre 100-250 nm. De igual modo, se han detectado exosomas y microvesículas en el líquido uterino y oviductal de especies como *Equus caballus, Canis familiaris* y *Felis Catus* (De Ferraz *et al*., 2020; Lange-Consiglio *et al*., 2023).

Respecto a la caracterización de EVs *in vitro*, a partir de cúmulos esferoides multicelulares de células oviductales de la especie *Canis familiaris*, se han reportado tamaños promedio de 234 nm, y concentraciones de 5,4 x 10^8 partículas/mL, asociándose la mayor concentración con partículas del tamaño de la categoría de microvesículas (Lange-Consiglio *et al*., 2017). Resultados similares se obtuvieron en la caracterización de EVs provenientes de cultivos de células endometriales de la especie *Equus caballus*, con promedios de 257,7 nm y concentraciones de 1,2 x 10^{11} partículas/mL, categorizándose gran parte de la composición de las EVs como microvesículas (Lange-Consiglio *et al*., 2023). Dichos resultados coinciden con el mayor tamaño de partículas, asociado a EVs de la categoría de microvesículas, obtenidos de

muestras *in vitro* a partir de los cultivos de células oviductales de M y la UUV, pudiendo asociar a las EVs provenientes de cultivos celulares *in vitro* con partículas de mayor tamaño, que eventualmente pudiesen diferir con la secreción oviductal *in vivo*.

En estudios basados en el análisis de EVs extraídas a partir de muestras *in vivo*, se han caracterizado tamaños promedio de 158,90 y 140,53 nm, y concentraciones de 4,5 × 10^{10} y 3,1 × 10^{10} partículas/mL, para Evs oviductales de *Canis familiaris* y *Felis Catus* respectivamente (De Ferraz *et al*., 2020). Resultados semejantes a los obtenidos en nuestro estudio, respecto al tamaño y concentraciones de partículas, obtenidos de muestras de lavado oviductal *in vivo* de las regiones del M y la UUV en pavas criollas. Otros estudios, de EVs extraídas de lavado oviductal de la especie *Bos taurus*, han reportado mayor proporción de EVs pequeñas en el istmo, sin diferencias de tamaño en el ámpula (Lopera-Vazquez *et al*., 2017). Mientras que en la especie *Sus scrofa*, no se reportaron diferencias de diámetro entre las partículas del itsmo y ámpula (Jamaludin *et al*., 2019). Adicionalmente se han reportado diferencias de acuerdo al estado reproductivo en *Canis familiaris* y *Felis Catus*, con mayor concentración de EVs en fluidos recolectados durante el período periovulatorio (De Ferraz *et al*., 2020). Estos disímiles patrones entre especies y subsecciones anatómicas del oviducto podrían ser indicativos del efecto de las EVs del fluido oviductal sobre la función espermática en función del estado del ciclo estral (Coy *et al*., 2008; Burns *et al*., 2018; Bognar *et al*., 2019).

2. Proteómica de las EVs

Los análisis de espectrometría de masas se concentraron en las muestras de FP (con y sin ovulación), debido a que no fue posible procesar los resultados de las muestras de FN en la totalidad de los análisis efectuados, considerando que solo se disponía de muestras *in vivo,* producto de la imposibilidad de efectuar cultivos celulares de la región del M, debido a la involución anatómica que sufre dicha estructura cuando las hembras se encuentran bajo un fotoperiodo restrictivo (Sturkie, 2015). De éste modo, las evaluaciones se concentraron en la búsqueda de diferencias de acuerdo al origen de las muestras (*in vivo* v/s *in vitro*), permitiendo validar el método de lavado o flushing (*in vivo*) como el método más fiable, a pesar de lo complejo del proceso de recolección producto

de la implicancia del sacrificio de los animales. Sin embargo, los cultivos celulares (*in vitro*), de las distintas regiones del oviducto (M y la UUV), no lograron reflejar la realidad de la secretómica de los biofluidos en el medio circundante del oviducto.

Posteriormente se realizó un análisis más profundo, en base a las diferencias en las funciones biológicas de las distintas secciones anatómicas, evaluando un perfil de proteínas diferencialmente expresadas, asociadas a procesos biológicos de fertilidad, y movilidad espermática junto a reacción acrosomal. Se evaluaron con mayor profundidad los resultados de procesos biológicos asociados a movilidad espermática y reacción acrosomal, considerando las funciones de los TAE, encontrando 8 proteínas diferencialmente expresadas. De éste modo, se detectó la sobreexpresión del gen ANXA5 en muestras de EVs *in vivo* de la UUV. Dichos resultados coinciden con la presencia de ANXA5 en líneas celulares de los TAE de *Meleagris gallopavo* (Talbot *et al*., 2018). Asociación que se puede explicar por la relación biológica de ANXA5 con la adhesión y liberación de espermatozoides en células del reservorio espermático oviductal en otras especies especie, como es el caso de *Bos Taurus* (Ignotz *et al.*, 2007). Describiéndose su presencia asociada a la fracción de la membrana plasmática apical del epitelio mucoso, donde se ha observado con mayor frecuencia la unión espermática en el oviducto bovino (Lefebvre *et al*., 1995; Ignotz *et al.*, 2007). Vinculando la presencia de ANXA5 a las secciones oviductales relacionadas con el reservorio de espermatozoides, tanto en pavos como en bovinos.

También se observó la sobreexpresión de STX2 en muestras *in vivo*, con mayor intensidad en hembras que no estaban ovulando. La proteína STX2 se relaciona con la focalización y fusión de vesículas de transporte intracelular, encontrándose asociada a los acrosomas de los espermatozoides, mediando la fusión de membranas que inducen la reacción acrosómica de exocitosis durante la fertilización (Katafuchi *et al*., 2000; Hutt *et al*, 2005). STX2 es uno de los miembros de la familia SNARE (receptor de proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble), grupo de proteínas cuyo papel principal es facilitar la fusión de las vesículas a la membrana de la célula receptora (Fujiwara *et al*., 2013). Además, se ha descrito su relación en la formación de puentes intercelulares, colaborando en la constricción de espermatocitos vecinos durante la espermatogénesis (Fujiwara *et al*., 2013). Comportamiento similar al adquirido por los

espermatozoides al interior de los TAE, donde se cree que agentes estabilizadores del plasmalema (Bakst y Bauchan, 2015) permiten la asociación grupal, mediante un contacto estrecho entre sus cabezas, manteniéndose íntimamente asociados de forma paralela al plasmalema de los espermatozoides adyacentes (King *et al*., 1999; Wishart y Horrocks, 2000). Dichos antecedentes permiten señalar una asociación directa entre STX2 y la presencia de espermatozoides circulantes y residentes, dando una explicación a su sobreexpresión en las muestras *in vivo*, y la reducción en el nivel de expresión en hembras en estado ovulatorio, potencialmente debido a la liberación espermática desde el interior de los TAE.

El gen LZTFL1 se encuentra sobre expresado en las muestras de EVs de lavado oviductal, asociándose con el control de la función espermática y la fertilidad en el macho, mediante la formación estructural y regulación del movimiento flagelar (Huang *et al*., 2021). Las mutaciones en el gen LZTFL1 generan ciliopatías hereditarias (síndrome de Bardet-Biedl) en humanos y ratas (Marion *et al*., 2012; Schaefer *et al*., 2014) provocando fertilidad reducida, defectos en la espermatogénesis, formación anormal del flagelo y alteración de la función de la cola del espermatozoide (Huang *et al*., 2021). Antecedentes que pueden asociarse con un mayor nivel de sobreexpresión del gen en muestras de M cuando la hembra está ovulando, considerando una región de alto tránsito espermático durante el proceso de fertilización.

El gen STXBP1 presentó una sobreexpresión en las muestras de EVs recolectadas *in vivo*, con mayor énfasis en la región de la UUV. Éste gen participa en el metabolismo energético y la regulación del acoplamiento y fusión de vesículas sinápticas, participando en la liberación de neurotransmisores neuronales y desempeñando un papel en la determinación de la especificidad de las reacciones de fusión intracelular, al unirse a las sintaxinas, un componente proteico de la maquinaria de transporte y fusión vesicular (Teng *et al*., 2001). Pudiendo interpretarse una mayor expresión en la UUV debido a las funciones biológicas de dicha región, relacionadas con la regulación del metabolismo energético de los espermatozoides en los TAE (Bakst y Richards, 1985; Sasanami *et al*., 2013), la interacción y fusión de EVs con los espermatozoides al interior de los TAE (Bakst y Bauchan, 2015; Huang *et al*., 2017), y la salida de los espermatozoides desde el interior de los TAE (Freedman *et al*., 2001; Bakst y Akuffo, 2008a), considerando la

presencia de neuronas y ganglios pequeños bajo las microvellocidades apicales de los túbulos (Freedman *et al*., 2001).

El gen ATP2B4 se encuentra sobre expresado en las EVs de muestras *in vivo* de la UUV en FP en O, y sub expresado en las muestras de M. Mientras que en muestras *in vitro* se observa una sobreexpresión asociada a muestras en FP. Éste gen codifica la isoforma 4 de la ATPasa cálcica de la membrana plasmática, efectuando un papel fundamental en la homeostasis del calcio intracelular, pudiendo desempeñar funciones internas críticas respecto a la viabilidad celular (Stauffer *et al*., 1993; Okunade *et al*., 2004), induciendo deficiencia fisiológica o apoptosis celular (Okunade *et al*., 2004), además de una motilidad gravemente afectada en las células espermáticas (Schuh *et al*., 2004), en caso de ausencia o defectos de la isoforma (Okunade *et al*., 2004). ATP2B4 es la principal isoforma presente en la cola de los espermatozoides, desempeñando un rol crucial en la movilidad y fertilidad masculina (Okunade *et al*., 2004; Schuh *et al*., 2004), al asociarse con la movilidad de espermatozoides hiperactivos (Ren *et al*., 2001). De éste modo, se ha asociado con un papel crucial en la homeostasis del calcio en el esperma de ratón, al mantener un nivel bajo de calcio citosólico en reposo y un gradiente de calcio a través de la membrana plasmática del espermatozoide (Wildt *et al*., 1997). Por lo que una sobreexpresión del gen en la UUV de hembras en estado ovulatorio podría vincularse con el control de la motilidad en reposo, de los espermatozoides residentes al interior de los TAE, y su estimulación para su ingreso y salida de los túbulos, permitiendo que se reactive su capacidad motriz (Bakst, 1985; Bakst y Richards, 1985) y así se concrete su llegada hasta el sitio de fertilización.

El gen RAB3A se presenta sobreexpresado en las muestras de la UUV en FP en O de muestras *in vivo*. Se ha descrito su implicancia en la exocitosis de vesículas acrosómicas y secreción regulada, ciclo de liberación de neurotransmisores, sistema inmunológico innato, localización de lisosomas y reparación de la membrana plasmática (Bello *et al*., 2012; Encarnação *et al*., 2016; Quevedo *et al*., 2019). Dichas funciones biológicas tienen relación con las funciones de los TAE en la UUV, relacionadas con el resguardo y conservación espermática (Sasanami *et al*., 2013; Bakst y Bauchan, 2015), su posterior liberación hacia el canal oviductal (Freedman *et al*., 2001; Bakst y Akuffo, 2008a), y la concreción efectiva de la fertilización en la base infundibular (Sauveur, 1992).

Se detectó una sobeexpresión de APOB en las muestras de EVs colectadas *in vitro*. Se ha descrito la presencia de APOB en la "corona de proteínas" dispuesta alrededor de las EVs, corona que puede desarrollarse universalmente en biofluidos de acuerdo a las características de la matriz circundante (Palviainen *et al*., 2020; Tóth *et al*., 2021). Demostrándose que, aunque son componentes moleculares inevitables dispuestos en la superficie externa de las EVs (Tóth *et al*., 2021), no son solo "contaminantes", ya que se asocian con diversas interacciones moleculares (Palviainen *et al*., 2020; Tóth *et al*., 2021; Buzás et al., 2018). De éste modo la sobreexpresión de APOB en las muestras *in vitro* podría asociarse con la corona proteica formada en las EVs de los medios de cultivo, debido a la suplementación con SFB y suero de pava, tal como describen los hallazgos de Tóth *et al*. (2021), considerando además que no existe ninguna técnica que produzca preparaciones de EVs puras (Théry *et al*., 2018).

Al igual que APOB, se detectó sobreexpresión del gen TTLL3 en todas las muestras *in vitro.* Dicho gen se encuentra asociado al axonema, citoesqueleto de microtúbulos y flagelo del espermatozoide, mediando la glicilación de microtúbulos de cilios primarios y móviles, promoviendo su estabilidad y mantenimiento, regulando el ensamblaje de los cilios, la movilidad espermática (Wloga *et al*., 2009) y la proliferación celular de las células epiteliales de los cilios primarios en mamíferos (Rocha *et al*., 2014). Sin embargo, no fue posible asociarlo con los tejidos oviductales *in vivo*.

Al efectuar un análisis global de la expresión génica de acuerdo a los procesos biológicos de movilidad y reacción acrosomal, muy similar a los resultados de los procesos biológicos de fertilización, se observa claramente una expresión opuesta entre los grupos *in vivo* e *in vitro*, lo que nuevamente refuerza que el origen *in vitro* de las muestras no refleja la realidad biológica de los fluidos oviductales. Dicha situación puede deberse a que las células de los cultivos permanecieron en ambientes muy alejados a lo que las acompaña en su ambiente real, desde la imposibilidad de desarrollar estructuras tridimensionales, como los túbulos, criptas y pliegues, la carencia de células de tejidos de soporte, como el tejido conectivo y muscular, considerando que los cultivos se constituían de un 70% de células de origen epitelial (Sauveur, 1992; Sturkie, 2015; Illanes *et al*., 2018), y la presencia de proteínas suplementadas a partir de otra especie y origen biológico, como es el SFB, suplemento con gran cantidad de proteínas

plasmáticas, que aunque esté reducido en EVs, genera influencia en la “corona proteica” de las EVs extraídas (Tóth *et al*., 2021).

Sin embargo, al efectuar un análisis global de los resultados de análisis proteico de las muestras *in vivo*, es posible señalar que las EVs del oviducto de pavas criollas transportan proteínas importantes para la función espermática, incluidas proteínas que tienen el potencial de conservar la viabilidad y potenciar la movilidad. Promoviendo la base de los conocimientos, que colaboren en la comprensión de la conservación espermática prolongada, al interior de los TAE de las hembras aviares.

Adicionalmente se debe considerar que además de proteínas, las EVs también contienen lípidos, como colesterol, esfingomielina, glicoesfingolípidos y fosfatidilserina (Skotland *et al*., 2019), y ARN, que pueden contribuir de forma sinérgica frente a los efectos protectores de viabilidad y movilidad espermática (De Ferraz *et al*., 2020). Modulando las propiedades de la membrana plasmática de los espermatozoides, como la permeabilidad y la fluidez, previniendo daños prematuros (Mocé *et al*., 2010; Salmon *et al*., 2016). Sin embargo, hay poca información respecto a la composición lipídica de las EVs de los biofluidos de origen oviductal, por lo que futuros análisis en dicha área potenciarían los resultados señalados.

EFECTO E INTERACCION DE LAS VESÍCULAS EXTRACEULARES SOBRE ESPERMATOZOIDES *IN VITRO*

1. Internalización de EVs en espermatozoides

Nuestros estudios muestran que a partir de las dos horas de co-incubación comienza la internalización de las EVs por los espermatozoides. Similar a lo obtenido en este trabajo se ha reportado en la interacción de espermatozoides y EVs a partir de las 2 horas de co-incubación en análisis *in vitro* en cerdos (Alcântara-Neto *et al*., 2020). Los estudios de este tipo de interacción son escasos, de este modo Bakst y Bauchan, 2015, señalan la interacción de cuerpos multivesiculares en la cabeza y pieza media de los espermatozoides al interior de los TAE del oviducto de hembras de la especie *Meleagris gallopavo*, lo que podría indicar la liberación del contenido de las ampollas a la luz tubular o la fusión directa con el plasmalema de los espermatozoides. Otros autores han reportado la presencia del marcador de EVs CD63, mediante inmuno detección en el epitelio de los TAE de gallinas no inseminadas, la señal de positividad a CD63 se traslada a la luz tubular de hembras inseminadas, sugiriendo que las EVs producidas por los TAE son liberadas a la luz tubular en presencia de espermatozoides (Huang *et al*., 2017).

1. Viabilidad espermática en co-incubación con EVs

En los análisis de viabilidad de espermatozoides co-incubados con EVs, el estudio muestra un fenómeno global de mayor viabilidad inicial asociada a la co-incubación con EVs de M v/s los grupos con menor concentración de EVs de la UUV. Luego se genera un fenómeno en que los grupos con mayor concentración de EVs de M y la UUV muestran los mayores porcentajes de viabilidad, significativamente diferentes al grupo control, observándose finalmente al grupo con mayor concentración de EVs del M y al grupo con concentración intermedia de EVs de la UUV como los grupos con mayor viabilidad v/s el grupo control, las menores concentraciones de EVs de M y la mayor y menor concentración de EVs de la UUV.

La co-incubación de los espermatozoides con EVs por hasta 10 horas no afecta la viabilidad espermática, sino que la potencia cuando se compara el efecto de mayores concentraciones de EVs provenientes del M o la UUV v/s el control, en función del tiempo de co-incubación. Curiosamente en la UUV la mayor viabilidad se produce con concentraciones intermedias de EVs, no así en el M, donde la mayor viabilidad está asociada con la mayor concentración de EVs. Nuestros experimentos establecieron las concentraciones fisiológicas normales de EVs del M y la UUV de las hembras de *Meleagris gallopavo*, durante FP en O, utilizando concentraciones experimentales similares a las fisiológicas (máxima) y diluciones empleadas exitosamente en otras especies. El patrón de viabilidad espermático encontrado al co-incubar espermatozoides con EVs de ambas secciones del tracto reproductivo podría ser reflejo de la dinámica de la viabilidad espermática en pavos. Considerando que al llegar el espermatozoide a la UUV, en la parte distal del tracto reproductivo, probablemente se requieran menores concentraciones de EVs para mantener la viabilidad, mientras que más proximalmente en el M, se requeriría mayor presencia de dichas partículas. Esto no ha sido reportado con anterioridad y pudiera tener impacto en el diseño de nuevos diluyentes espermáticos para la especie.

Adicionalmente, la alta viabilidad asociada a las EVs de la región del M, podría relacionarse con la abundante presencia de albúmina en dicha región anatómica del oviducto (Mine 2002; Nys y Guyot, 2011). Las EVs poseen exceso de albúminas asociadas a su membrana externa, siendo esta proteína la que mayores conteos espectrales arrojó en los estudios de proteómica de esta tesis. Se ha descrito que la albúmina aporta beneficios para la conservación de espermatozoides de distintas especies (Sauveur, 1992; Akhter *et al*., 2014; Diogo *et al*., 2019). Estos beneficios están asociados con su capacidad para proteger a las células de los efectos nocivos de los radicales libres en el estrés oxidativo (Fukuzawa *et al*., 2005; Roche *et al*., 2008), mejorando la viabilidad, movilidad e integridad de la membrana de los espermatozoides (Akhter *et al*., 2014), protegiéndolos además frente a los efectos de la dilución durante la conservación *in vitro* (Suter *et al*., 1979). De éste modo, el albumen es utilizado en el formato de albúmina sérica bovina (BSA) u ovoalbúmina, como ingrediente en las recetas de diversos diluyentes y crioprotectores espermáticos, para la mantención de

espermatozoides *in vitro* (Sauveur, 1992; Akhter *et al*., 2014). En el caso del oviducto de hembras aviares, participa como una secreción natural que potencia el ascenso de los espermatozoides a través del oviducto para su llegada al sitio de fertilización (Blesbois and Mauger, 1987; Sturkie, 2015).

En la UUV, se encuentran los TAE, con conocido potencial para resguardar la viabilidad espermática (Bakst y Vinyard, 2002). Huang *et al*., 2017 además describió la presencia de EVs en la región luminar de dichos TAE con espermatozoides residentes.

Desde el punto de vista fisiológico, en los procesos de fecundación en pavos, es inevitable la contaminación de la luz de la UUV con EVs provenientes de la región vaginal, debido a la movilidad de los fluidos internos; producto de los movimientos peristálticos y antiperistálticos de la musculatura del oviducto y la movilidad que generan los cilios de la mucosa luminar que colaboran en el transporte espermático y el movimiento del huevo en formación (Sauveur, 1992; Wishart y Horrocks, 2000; Bakst y Akuffo, 2008a). Es por ello que concentraciones muy elevadas de EVs, similares a las concentraciones biológicas colectadas en la luz de la UUV, podrían no ser tan beneficiosos para la viabilidad, considerando la función biológica que posee la vagina respecto a la regulación del transporte espermático (Bakst *et al*.1994), asociado con una intensa selección respecto a su capacidad motriz (Bakst y Akuffo, 2008a) e inmunoreacción antiespermática mediante leucocitos, linfocitos y polimorfonucleares (Higaki *et al*., 1995; Sasanami *et al*., 2013)

Se ha propuesto que la presencia de exosomas que pudiesen acumular factores citotóxicos, como el inhibidor de la proliferación celular y promotor de apoptosis (GAS5) (Koldemir *et al*., 2017), pueden generar una reducción significativa en el porcentaje de espermatozoides que ingresan y logran atravesar la barrera vaginal (Bakst y Akuffo, 2008a; Bakst *et al*., 2010). Dichas aseveraciones podrían respaldarse con los resultados obtenidos por Huang *et al*., 2017, donde la co-incubación de espermatozoides con EVs de sobrenadante de cultivos de células de la vagina generan menor viabilidad que las EVs de los sobrenadantes de los cultivos celulares de la UUV y medios control sin EVs, en la especie *Gallus gallus*.

Por el contrario, concentraciones muy bajas de EVs de la UUV podrían no tener la cantidad suficiente de EVs provenientes de los TAE, que permitan resguardar de forma más eficiente la viabilidad, mediante la reducción en la respuesta a enzimas hidrolíticas e inmunogenicidad reprimida (Bakst, 1985; Bakst y Richards, 1985), posiblemente debido a la presencia del factor de crecimiento transformante β (TGFb) (Mouri *et al*., 2002), reportado en las células de los TAE y espermatozoides de la especie *Gallus gallus*, (Chowdhury *et al*., 2003; Chowdhury *et al*., 2004). Adicionalmente se ha señalado la presencia de vacuolas con lípidos y ácidos grasos al interior de las células de los TAE (Bakst *et al*., 2010; Bakst y Bauchan, 2015), los que pudiesen estar involucrados en el soporte nutricional, integridad del plasmalema y protección oxidativa de los espermatozoides (Bakst *et al*., 1994; King *et al*., 1999). Dichos lípidos podrían eventualmente ser transferidos a los espermatozoides mediante su incorporación en los exosomas liberados a la luz tubular, de acuerdo a los antecedentes que señalan el transporte de moléculas lipídicas mediado por EVs (Huang *et al.*, 2017; Skotland *et al*., 2019). De éste modo, pudiera ser que una concentración intermedia eventualmente propicie un equilibrio más eficiente de las EVs con potencial protector en la conservación espermática a más largo plazo.

Otros autores han propuesto que ambientes ricos en EVs, proporcionados por entornos reproductivos óptimos, colaboran en la capacitación, reacción acrosomal, viabilidad y movilidad espermática en diversas especies (Leese *et al*., 2008; Aviles *et al*., 2010; Al-Dossary *et al*. 2013; Huang *et al*., 2017; Alcântara-Neto *et al*., 2020). De éste modo, los resultados coinciden con los aumentos de viabilidad en espermatozoides de cerdo, co-incubados con EVs de origen oviductal (Alcântara-Neto *et al*., 2020), y la conservación en la integridad acrosomal, asociada a la viabilidad espermática, en espermatozoides co-incubados con EVs de gatos (Ferraz *et al*., 2019).

3. Movilidad espermática en co-incubación con EVs

De vital importancia para la hipótesis de esta tesis, es entender como además de la viabilidad, las EVs influyen sobre la motilidad espermática. En los análisis de movilidad de espermatozoides co-incubados con EVs oviductales, se aprecia una movilidad inicial mayor en el grupo control sin EVs y en el grupo de mayor concentración de EVs

provenientes de la región del M. Posteriormente, a partir de las 6 horas de co-incubación, todos los grupos con EVs del M presentan mayor porcentaje de movilidad v/s todos los grupos con muestras de la UUV, incluido el grupo control a las 10 horas de co-incubación.

Tal como se discutió para la función de viabilidad, en el caso de muestras de EVs del M, probablemente la albúmina contenida en las EVs pudiese colaborar en la mejor movilidad inicial (Akhter *et al*., 2014) de los grupos experimentales con EVs de M. Lo que concuerda con los resultados de co-incubación de espermatozoides con EVs de origen oviductal de otras especies, de éste modo se ha descrito un aumentando en la velocidad en línea recta y curvilínea a las 2 y 20 horas en la especie *Sus Scrofa Domesticus* (Alcântara-Neto *et al*., 2020), mientras que en la especie *Felis catus* se ha reportado un aumento en la movilidad, con mayor porcentaje de espermatozoides móviles y aumento en la movilidad hiperactiva al compararse con medios sin EVs (De Ferraz *et al*., 2019).

En el caso de las muestras de espermatozoides co-incubados con EVs de la UUV, se observa un drástico descenso en la movilidad a medida que aumenta el tiempo de co-incubación, a pesar de que la viabilidad de estas muestras es muy alta, como se discutió anteriormente. Estas evidencian apuntan a un potencial rol de las EVs de los TAE sobre la conservación espermática. De éste modo, se ha asegurado que los espermatozoides al interior de los TAE reducen su capacidad motriz y reprimen su metabolismo de forma reversible (Bakst, 1985; Bakst y Richards, 1985), resguardándose del daño oxidativo mediante un estado de quiescencia espermática (Bakst *et al*., 1994; Wishart y Horrocks, 2000), que ha sido catalogado como un estado de incapacitación espermática (Bakst y Bauchan, 2015). Se ha especulado que dicho proceso pudiese estar influenciado por la presencia de las ampollas microvellosas presentes en los TAE, quienes servirían como fuente de componentes bioactivos que aporten como sustrato metabólico, inhibidores de la capacitación, estabilizadores del plasmalema y protectores del estrés oxidativo de los espermatozoides residentes (Bakst y Bauchan, 2015). Al comparar los resultados del estudio con análisis efectuados por otros autores, coinciden los resultados obtenidos con los análisis efectuados en la especie *Coturnix japónica*, donde se observa una reducción en la movilidad espermática al efectuar la co-incubación de espermatozoides con extractos de tejido oviductal de la UUV, observando un movimiento flagelar casi inactivo

y disminución en la velocidad de avance (Sasanami *et al*., 2013). Sin embargo, Huang *et al*, 2017, no encontró diferencias en la movilidad espermática entre espermatozoides sin EVs y espermatozoides co-incubados con EVs del sobrenadante de cultivo de células de vagina y la UUV, a las 36 horas de evaluación, en la especie *Gallus gallus*. Dichos resultados podrían explicarse por los reportes de Lange Consiglio *et al*., 2023, quien efectuó una curva dosis-respuesta durante la co-incubación de espermatozoides con EVs de sobrenadante de cultivo de células endometriales, de la especie *Equus ferus caballus*, señalando que el aumento de las concentraciones de EVs y los tiempos de prueba no generan un aumento lineal en los efectos de movilidad espermática, dejando en claro que es necesario probar distintas concentraciones de EVs antes de concluir respecto a los efectos que se pudiesen generar en la movilidad de los espermatozoides. Además, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible señalar que el uso de EVs *in vitro*, como se empleó en los experimentos de Huang *et al*., 2017, no refleja el contenido de componentes bioactivos contenidos en las EVs de origen *in vivo*, impidiendo extrapolar los resultados *in vitro* a la biología reproductiva natural.

De éste modo, el uso de las EVs resulta una herramienta valiosa frente a la conservación espermática de especies aviares, promoviendo el éxito de la inseminación y conservación espermática prolongada, colaborando en la investigación para la conservación de especies aviares amenazadas y recursos zoogenético de alto valor productivo, colaborando y promoviendo la biodiversidad, así como la seguridad y soberanía alimentaria.

V. CONCLUSIONES

1. El fotoperiodo estacional influye en los perfiles séricos de hormonas sexuales de machos y hembras, con picos entre fines de invierno e inicios de primavera.
2. El tamaño de las EVs *in vivo* depende del estado ovulatorio, con menor tamaño en hembras en postura de huevos, e independiente del fotoperiodo y el tejido, mientras que la concentración de las EVs es dependiente del fotoperiodo y el tejido, con mayor concentración en FP y la UUV.
3. El tamaño de las EVs de muestras *in vivo* e *in vitro* en FP y FP en O, es dependiente del estado ovulatorio y el origen de la muestra, con menor tamaño en hembras en postura de huevos y muestras de sobrenadante de cultivo celular, e independiente del tejido, mientras que la concentración sólo depende del origen de la muestra, siendo mayor en muestras de lavado oviductal.
4. El contenido proteico de las EVs depende del origen de las muestras, validándose el método de lavado oviductal (*in vivo*) por sobre el método *in vitro*, observándose un diferencial de expresión, respecto a las funciones biológicas de movilidad espermática y reacción acrosomal, de acuerdo al origen de la muestra (*in vivo* v/s *in vitro*) y la región anatómica de muestreo (M v/s UUV).
5. Las EVs de la UUV en co-incubación con espermatozoides *in vitro* se internalizan en la cabeza de los espermatozoides a partir de las 2 horas de co-incubación, conservando la viabilidad a medida que reducen la movilidad espermática a lo largo del tiempo.

VI. ANEXO

Anexo 1. Tabla 1. Tamaño de partícula, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas a partir del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.

Factor		N	Media	E.E.	Media	LSD	Valor
E. Rep.			Log10	Log10	nm	Fisher	p
FP en O		6	2,21		161,38	A	
FN		6	2,24	0,02	176,65	A B	0,12
FP		6	2,27		187,67	B	
Tejido							
M		9	2,23	0,02	172,46	A	0,56
UUV		9	2,25		178,01	A	
E. Rep.	Tejido						
FP en O	M	3	2,21		161,20	A	
FP en O	UUV	3	2,21		161,57	A	
FN	M	3	2,23	0,03	174,10	A	0,90
FN	UUV	3	2,25		179,20	A	
FP	M	3	2,26		182,07	A	
FP	UUV	3	2,29		192,21	A	

E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal; N: repeticiones; Log10: logaritmo en base 10; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher. Fuente: elaboración propia.

Anexo 2. Tabla 2. Concentración de partícula, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas a partir del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.

Factor		N	Media	E.E.	Media	LSD	Valor
E. Rep.			Log10	Log10	Evs/mL	Fisher	p
FN		6	10,46		7,77E+10	A	
FP en O		6	11,15	0,18	1,78E+11	B	0,01
FP		6	11,28		2,08E+11	B	
Tejido							
M		9	10,73	0,15	1,01E+11	A	0,03
UUV		9	11,20		2,08E+11	B	
E. Rep.	Tejido						
FN	M	3	10,05		1,87E+10	A	
FN	UUV	3	10,86		1,37E+11	B	
FP en O	M	3	10,93	0,25	1,18E+11	B	0,44
FP	M	3	11,20		1,68E+11	B	
FP	UUV	3	11,35		2,49E+11	B	
FP en O	UUV	3	11,37		2,38E+11	B	

E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal; N: repeticiones; Log10: logaritmo en base 10; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher. Fuente: elaboración propia.

Anexo 3. Tabla 3. Concentración de partícula pequeñas (≤ 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" de EVs obtenidas del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos.

Factor		N	Media	E.E.	Media	LSD	Valor
E. Rep.			Log10	Log10	EVs/mL	Fisher	p
FN		6	9,20		6,44E+09	A	
FP		6	9,97	0,3	1,25E+10	A B	0,09
FP en O		6	10,17		2,28E+10	B	
Tejido							
M		9	9,55	0,24	9,48E+09	A	0,19
UUV		9	10,02		1,83E+10	A	
E. Rep.	Tejido						
FN	M	3	8,72		1,97E+09	A	
FN	UUV	3	9,69		1,09E+10	A B	
FP en O	M	3	9,93	0,42	1,36E+10	A B	0,50
FP	UUV	3	9,95		1,20E+10	A B	
FP	M	3	9,99		1,29E+10	A B	
FP en O	UUV	3	10,41		3,20E+10	B	

E.Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal; N repeticiones; Log10: logaritmo en base 10; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher. Fuente: elaboración propia.

Anexo 4. Tabla 4. Concentración de partícula grandes (> 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.

Factor		N	Media	E.E.	Media	LSD	Valor
E. Rep.			Log10	Log10	Evs/µl	Fisher	p
FN		6	10,4		7,11E+10	A	
FP en O		6	11,09	0,18	1,55E+11	B	0,01
FP		6	11,25		1,96E+11	B	
Tejido							
M		9	10,67	0,15	9,20E+10	A	0,04
UUV		9	11,15		1,89E+11	B	
E. Rep.	Tejido						
FN	M	3	9,96		1,7E+10	A	
FN	UUV	3	10,83		1,3E+11	B	
FP en O	M	3	10,88	0,26	1,0E+11	B	0,40
FP	M	3	11,17		1,6E+11	B	
FP en O	UUV	3	11,30		2,1E+11	B	
FP	UUV	3	11,33		2,4E+11	B	

E. Rep.: estado reproductivo; FN: fotoperiodo negativo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal; N: repeticiones; Log10: logaritmo en base 10; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher. Fuente: elaboración propia.

Anexo 5. Tabla 5. Tamaño de partículas, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos.

Factor			N	Media Log10	E.E. Log10	Media nm	LSD Fisher	Valor p
Estado Reproductivo								
FP en O			12	2,25	0,01	181,12	A	0,0005
FP			12	2,32		208,28	B	
Tejido								
M			12	2,27	0,01	189,99	A	0,17
UUV			12	2,29		199,41	A	
Origen								
in vivo			12	2,24	0,01	174,53	A	<0,0001
in vitro			12	2,33		214,88	B	
E. Rep.	Tejido							
FP en O	M		6	2,25	0,01	179,28	A	0,36
FP en O	UUV		6	2,26		182,95	A B	
FP	M		6	2,3		200,70	B C	
FP	UUV		6	2,33		215,87	C	
E. Rep.	Origen							
FP en O	*in vivo*		6	2,21	0,01	161,38	A	0,71
FP	*in vivo*		6	2,27		187,67	B	
FP en O	*in vitro*		6	2,3		200,85	B	
FP	*in vitro*		6	2,36		228,90	C	
Tejido	Origen							
M	*in vivo*		6	2,23	0,01	171,63	A	0,63
UUV	*in vivo*		6	2,25		177,42	A	
M	*in vitro*		6	2,32		208,35	B	
UUV	*in vitro*		6	2,34		221,40	B	
E. Rep.	Tejido	Origen						
FP en O	M	*in vivo*	3	2,21	0,02	161,20	A	0,99
FP en O	UUV	*in vivo*	3	2,21		161,57	A	
FP	M	*in vivo*	3	2,26		182,07	A B	
FP	UUV	*in vivo*	3	2,29		193,27	B C	
FP en O	M	*in vitro*	3	2,3		197,37	B C	
FP en O	UUV	*in vitro*	3	2,31		204,33	B C	
FP	M	*in vitro*	3	2,34		219,33	C D	
FP	UUV	*in vitro*	3	2,38		238,47	D	

E. Rep.: estado reproductivo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal; N repeticiones; Log10: logaritmo en base 10; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher. Fuente: elaboración propia.

Anexo 6. Tabla 6. Concentración de partículas, mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.

Factor		N	Media	E.E. Log10	Media	LSD	Valor p
Estado Reproductivo			Log10		EVs/mL	Fisher	
FP		12	10,59	0,09	1,1E+11	A	0,33
FP en O		12	10,72		1,01E+11	A	
Tejido							
M		12	10,58	0,09	7,81E+10	A	0,22
UUV		12	10,73		1,32E+11	A	
Origen							
in vitro		12	10,10	0,09	1,66E+10	A	<0,0001
in vivo		12	11,21		1,93E+11	B	
E. Rep.	Tejido						
FP en O	M	6	10,56	0,12	6,73E+10	A	0,23
FP	M	6	10,59		8,89E+10	A	
FP	UUV	6	10,6		1,29E+11	A	
FP en O	UUV	6	10,87		1,34E+11	A	
E. Rep.	Origen						
FP	*in vitro*	6	9,91	0,12	9,71E+09	A	0,05
FP en O	*in vitro*	6	10,29		2,36E+10	B	
FP en O	*in vivo*	6	11,15		1,78E+11	C	
FP	*in vivo*	6	11,28		2,08E+11	C	
Tejido	Origen						
M	in vitro	6	10,09	0,12	1,34E+10	A	0,27
UUV	in vitro	6	10,11		1,99E+10	A	
M	in vivo	6	11,07		1,43E+11	B	
UUV	in vivo	6	11,36		2,43E+11	B	
E. Rep.	Tejido	Origen					
FP	UUV	*in vitro*	3	9,84	0,17	9,7E+09	A	0,95
FP	M	*in vitro*	3	9,98		9,7E+09	A B	
FP en O	M	*in vitro*	3	10,2		1,7E+10	A B	
FP en O	UUV	*in vitro*	3	10,37		3E+10	B	
FP en O	M	*in vivo*	3	10,93		1,2E+11	C	
FP	M	*in vivo*	3	11,2		1,7E+11	C	
FP	UUV	*in vivo*	3	11,37		2,4E+11	C	
FP en O	UUV	*in vivo*	3	11,35		2,5E+11	C	

E. Rep.: estado reproductivo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal; N repeticiones; Log10: logaritmo en base 10; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

Fuente: elaboración propia.

Anexo 7. Tabla 7. Concentración de partículas pequeñas (≤ 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo en diferentes estados reproductivos.

Factor			N	Media Log10	E.E. Log10	Media Evs/µl	LSD Fisher	Valor p
Estado Reproductivo								
FP			12	8,98	0,13	6,35E+09	A	0,003
FP en O			12	9,61		1,20E+10	B	
Tejido								
M			12	9,28	0,13	7,06E+09	A	0,85
UUV			12	9,31		1,13E+10	A	
Origen								
in vitro			12	8,52	0,13	7,78E+08	A	0,0001
in vivo			12	10,07		1,76E+10	B	
E. Rep.	Tejido							
FP	UUV		6	8,9	0,18	6,05E+09	A	0,3
FP	M		6	9,06		6,65E+09	A B	
FP en O	M		6	9,5		7,47E+09	B C	
FP en O	UUV		6	9,72		1,66E+10	C	
E. Rep.	Origen							
FP	*in vitro*		6	7,99	0,18	2,34E+08	A	0,03
FP en O	*in vitro*		6	9,05		1,32E+09	B	
FP	*in vivo*		6	9,97		1,25E+10	C	
FP en O	*in vivo*		6	10,17		2,28E+10	C	
Tejido	Origen							
UUV	*in vitro*		6	8,44	0,18	6,73E+08	A	0,31
M	*in vitro*		6	8,6		8,83E+08	A	
M	*in vivo*		6	9,96		1,32E+10	B	
UUV	*in vivo*		6	10,18		2,20E+10	B	
E. Rep.	Tejido	Origen						
FP	UUV	*in vitro*	3	7,85	0,26	7,57E+07	A	0,7
FP	M	*in vitro*	3	8,13		3,93E+08	A	
FP en O	UUV	*in vitro*	3	9,03		1,27E+09	B	
FP en O	M	*in vitro*	3	9,07		1,37E+09	B	
FP en O	M	*in vivo*	3	9,93		1,36E+10	C	
FP	UUV	*in vivo*	3	9,95		1,2E+10	C	
FP	M	*in vivo*	3	9,99		1,29E+10	C	
FP en O	UUV	*in vivo*	3	10,41		3,2E+11	C	

E. Rep.: estado reproductivo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal; N: repeticiones; Log10: logaritmo en base 10; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

Fuente: elaboración propia.

Anexo 8. Tabla 8. Concentración de partículas grandes (> 120 nm), mediante la técnica de NTA, en muestras "*in vivo*" e *"in vitro"* del oviducto de hembras de pavo criollo, en diferentes estados reproductivos.

Factor		N	Media	E.E. Log10	Media	LSD	Valor p
Estado Reproductivo			Log10		Evs/µl	Fisher	
FP en O		12	10,59	0,09	8,86E+10	A	0,45
FP		12	10,71		1,03E+11	A	
Tejido							
M		12	10,54	0,09	7,11E+10	A	0,21
UVJ		12	10,7		1,2E+11	A	
Origen							
in vitro		12	10,08	0,09	1,59E+10	A	<0,0001
in vivo		12	11,17		1,75E+11	B	
E. Rep.	Tejido						
FP en O	M	6	10,52	0,12	5,98E+10	A	0,25
FP	M	6	10,57		8,24E+10	A	
FP	UUV	6	10,58		1,17E+11	A	
FP en O	UUV	6	10,82		1,23E+11	A	
E. Rep.	Origen						
FP	*in vitro*	6	9,9	0,12	9,48E+09	A	0,04
FP en O	*in vitro*	6	10,26		2,22E+10	A	
FP en O	*in vivo*	6	11,09		1,55E+11	B	
FP	*in vivo*	6	11,25		1,96E+11	B	
Tejido	Origen						
M	*in vitro*	6	10,07	0,12	1,25E+10	A	0,30
UUV	*in vitro*	6	10,09		1,92E+10	A	
M	*in vivo*	6	11,02		1,3E+11	B	
UUV	*in vivo*	6	11,32		2,21E+11	B	
E. Rep.	Tejido	Origen					
FP	UUV	*in vitro*	3	9,83	0,18	9,64E+09	A	0,90
FP	M	*in vitro*	3	9,97		9,32E+09	A	
FP en O	M	*in vitro*	3	10,16		1,57E+10	A	
FP en O	UUV	*in vitro*	3	10,35		2,88E+10	A B	
FP en O	M	*in vivo*	3	10,88		1,04E+11	B C	
FP	M	*in vivo*	3	11,17		1,55E+11	C	
FP en O	UUV	*in vivo*	3	11,3		2,06E+11	C	
FP	UUV	*in vivo*	3	11,33		2,37E+11	C	

E. Rep.: estado reproductivo; FP: fotoperiodo positivo; FP en O: fotoperiodo positivo en ovulación; M: magnum; UUV: unión útero vaginal; N: repeticiones; Log10: logaritmo en base 10; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher.

Fuente: elaboración propia.

Anexo 9. Tabla 9. Viabilidad espermática, de espermatozoides de gallo, en distintos tiempos de co-incubación con EVs de origen oviductal de gallinas. Análisis de varianza de acuerdo a los tiempos de co-incubación.

Concentración de EVs (partículas/mL)	Tiempo de coincubación	Media (%)	Log10	E.E.	LSD Fisher	Valor-p
		0 HORAS				
CONTROL	0	90				
		2 HORAS				
CONTROL	0	77	1,88		AB	
	$4x10^{10}$	85	1,93		A	
M	$4x10^{8}$	78	1,89		AB	
	$4x10^{7}$	73	1,86	0,02	AB	0,19
	$4x10^{10}$	76	1,88		AB	
UUV	$4x10^{8}$	73	1,86		AB	
	$4x10^{7}$	68	1,83		B	
		4 HORAS				
CONTROL	0	65	1,81		AB	
	$4x10^{10}$	70	1,84		A	
M	$4x10^{8}$	65	1,81		AB	
	$4x10^{7}$	62	1,79	0,02	AB	0,25
	$4x10^{10}$	63	1,8		AB	
UUV	$4x10^{8}$	60	1,77		B	
	$4x10^{7}$	58	1,76		B	
		6 HORAS				
CONTROL	0	48	1,68		B	
	$4x10^{10}$	63	1,8		A	
M	$4x10^{8}$	56	1,74		AB	
	$4x10^{7}$	53	1,72	0,03	AB	0,11
	$4x10^{10}$	54	1,73		AB	
UUV	$4x10^{8}$	61	1,79		A	
	$4x10^{7}$	57	1,75		AB	
		10 HORAS				
CONTROL	0	45	1,65		C	
	$4x10^{10}$	62	1,79		A	
M	$4x10^{8}$	56	1,75		AB	
	$4x10^{7}$	51	1,71	0,02	B	0,0006
	$4x10^{10}$	50	1,69		BC	
UUV	$4x10^{8}$	60	1,78		A	
	$4x10^{7}$	51	1,71		BC	

EVs: vesículas extracelulares; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher; M: magnum; UUV: unión útero vaginal.

Fuente: elaboración propia.

Anexo 10. Tabla 10. Viabilidad espermática, de espermatozoides de gallo, co-incubados con EVs oviductales de M y la UUV de gallinas, en distintas concentraciones. Análisis de varianza de acuerdo a las muestras de EVs.

Concentración de EVs (partículas/mL)	Tiempo de coincubación	Media (%)	Log10	E.E.	LSD Fisher	Valor-p
CONTROL						
0	2h	76	1,88	0,03	A	0,001
	4h	65	1,81		A	
	6h	48	1,68		B	
	10h	45	1,65		B	
MAGNUM						
$4x10^{10}$	2h	85	1,93	0,01	A	0,0001
	4h	70	1,84		B	
	6h	63	1,8		C	
	10h	62	1,79		C	
$4x10^{8}$	2h	78	1,89	0,02	A	0,002
	4h	65	1,81		B	
	6h	56	1,74		B	
	10h	56	1,75		B	
$4x10^{7}$	2h	73	1,86	0,02	A	0,002
	4h	62	1,79		AB	
	6h	53	1,72		BC	
	10h	51	1,71		C	
UNIÓN ÚTERO VAGINAL						
$4x10^{10}$	2h	76	1,88	0,03	A	0,005
	4h	63	1,8		AB	
	6h	54	1,73		BC	
	10h	50	1,69		C	
$4x10^{8}$	2h	73	1,86	0,02	A	0,028
	4h	60	1,77		B	
	6h	61	1,79		B	
	10h	60	1,78		B	
$4x10^{7}$	2h	68	1,83	0,02	A	0,008
	4h	57	1,76		B	
	6h	56	1,76		B	
	10h	51	1,7		B	

EVs: vesículas extracelulares; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. Fuente: elaboración propia.

Anexo 11. Tabla 11. Movilidad espermática, de espermatozoides de gallo, en distintos tiempos de co-incubación con EVs de origen oviductal de gallinas. Análisis de varianza de acuerdo a los tiempos de coincubación.

Concentración de EVs (partículas/mL)	Tiempo de coincubación	Media (%)	Log10	E.E.	LSD Fisher	Valor-p
		0 HORAS				
CONTROL	0	93				
		2 HORAS				
CONTROL	0	86	1,93		A	
	$4x10^{10}$	85	1,93		A	
M	$4x10^{8}$	79	1,9		AB	
	$4x10^{7}$	76	1,9	0,02	B	0,1
	$4x10^{10}$	79	1,9		AB	
UUV	$4x10^{8}$	78	1,89		AB	
	$4x10^{7}$	75	1,87		B	
		4 HORAS				
CONTROL	0	50	1,7		BCD	
	$4x10^{10}$	65	1,81		A	
M	$4x10^{8}$	55	1,74		BC	
	$4x10^{7}$	54	1,73	0,02	BC	0,0008
	$4x10^{10}$	56	1,75		B	
UUV	$4x10^{8}$	49	1,69		CD	
	$4x10^{7}$	46	1,66		D	
		6 HORAS				
CONTROL	0	36	1,56		B	
	$4x10^{10}$	49	1,69		A	
M	$4x10^{8}$	46	1,66		A	
	$4x10^{7}$	45	1,65	0,02	A	0,0007
	$4x10^{10}$	46	1,66		B	
UUV	$4x10^{8}$	39	1,58		B	
	$4x10^{7}$	38	1,57		B	
		10 HORAS				
CONTROL	0	28	1,44		A	
	$4x10^{10}$	38	1,57		A	
M	$4x10^{8}$	38	1,57		A	
	$4x10^{7}$	38	1,57	0,06	A	0,0001
	$4x10^{10}$	16	1,17		B	
UUV	$4x10^{8}$	9	0,92		C	
	$4x10^{7}$	8	0,9		C	

EVs: vesículas extracelulares; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. Fuente: elaboración propia.

Anexo 12. Tabla 12. Movilidad espermática, de espermatozoides de gallo, co-incubados con EVs oviductales de M y la UUV de gallinas, en distintas concentraciones. Análisis de varianza de acuerdo a las muestras de EVs.

Concentración de EVs (partículas/mL)	Tiempo de coincubación	Media (%)	Log10	E.E.	LSD Fisher	Valor-p
CONTROL						
0	2h	86	1,93	0,02	A	0,0001
	4h	50	1,7		B	
	6h	36	1,56		C	
	10h	28	1,44		D	
MAGNUM						
$4x10^{10}$	2h	85	1,93	0,01	A	0,0001
	4h	65	1,81		B	
	6h	49	1,69		C	
	10h	38	1,57		D	
$4x10^{8}$	2h	79	1,9	0,02	A	0,0001
	4h	55	1,74		B	
	6h	46	1,66		C	
	10h	38	1,57		D	
$4x10^{7}$	2h	76	1,88	0,02	A	0,0001
	4h	54	1,73		B	
	6h	45	1,65		C	
	10h	38	1,57		D	
UNIÓN ÚTERO VAGINAL						
$4x10^{10}$	2h	79	1,9	0,05	A	0,0001
	4h	56	1,75		AB	
	6h	46	1,66		BC	
	10h	16	1,17		C	
$4x10^{8}$	2h	78	1,89	0,04	A	0,0001
	4h	49	1,69		B	
	6h	39	1,58		B	
	10h	9	0,92		C	
$4x10^{7}$	2h	75	1,87	0,04	A	0,0001
	4h	46	1,66		B	
	6h	37	1,57		B	
	10h	8	0,9		C	

EVs: vesículas extracelulares; E.E.: error estándar; LSD Fisher: diferencia menos significativa de Fisher; M: magnum; UUV: unión útero vaginal. Fuente: elaboración propia.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abou-haila, A., D. R. P. Tulsiani. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. Arch Biochem Biophys. 485(1):72–81.
2. Ahammad, M. U., C. Nishino, H. Tatemoto, N. Okura, Y. Kawamoto, S. Okamoto, and T. Nakada. 2011a. Maturational changes in motility, acrosomal proteolytic activity, and penetrability of the inner perivitelline layer of fowl sperm, during their passage through the male genital tract. Theriogenology. 76(6):1100–9.
3. Ahammad, M. U., C. Nishino, H. Tatemoto, N. Okura, Y. Kawamoto, S. Okamoto, and T. Nakada. 2011b. Maturational changes in the survivability and fertility of fowl sperm during their passage through the male reproductive tract. Anim Reprod Sci. 128(1–4):129–36.
4. Aire, T. A. 2014. Spermiogenesis in birds. Spermatogenesis. 4(3):e959392.
5. Akhter, S., B. A. Rakha, R. Iqbal and M. S. Ansari. 2014. Effect of Bovine Serum Albumin on Motility, Plasmalemma, Viability and Chromatin Integrity of Buffalo Bull Spermatozoa. Pakistan J. Zool., vol. 46(1), pp. 115-120.
6. Alcântara-Neto, A. S., M. Fernandez-Rufete, E. Corbin, G. Tsikis, R. Uzbekov, A. S. Garanina, P. Coy, C. Almiñana, and P. Mermillod. 2019. Oviduct fluid extracellular vesicles regulate polyspermy during porcine invitro fertilisation. Reproduction, Fertility and Development.
7. Alcântara-Neto, A. S., L. Schmaltz, E. Caldas, M.-C. Blache, P. Mermillod, and C. Almiñana. 2020. Porcine oviductal extracellular vesicles interact with gametes and regulate sperm motility and survival. Theriogenology.
8. Al-Dossary, A., P. Bathala, J. L. Caplan, P. A. Martin-DeLeon. 2015. Oviductosome-sperm membrane interaction in cargo delivery: detection OF FUSION and underlying molecular players using three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM). J Biol Chem;290:17710e23.
9. Al-Dossary, A. A., E. E. Strehler, and P. A. Martin-Deleon. 2013. Expression and secretion of plasma membrane Ca2+ - ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: Association with oviductal exosomes and uptake in sperm. PLoS ONE. 8(11)e80181.
10. Allen, T. E., and G. W. Grigg. 1958. Sperm transport in the fowl. Aust. J. Agric. Res. 8:788–799.

11. Almiñana, C., and S. Bauersachs. 2019. Extracellular Vesicles in the Oviduct: Progress, Challenges and Implications for the Reproductive Success. Bioengineering, 6(2):32.
12. Almiñana, C., E. Corbin, G. Tsikis, A.S. Alcântara-Neto, V. Labas, K. Reynaud, L. Galio, R. Uzbekov, A. S. Garanina, X. Druart, and P. Mermillod. 2017. Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. Reproduction. 154(3):153-168.
13. Almiñana, C., G. Tsikis, V. Labas, R. Uzbekov, J. C. da Silveira, and S. Bauersachs. 2018. Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: implications for the gametes oviduct interactions and the environment of the potential embryo. BMC Genomics. 19.
14. Ammar, H., and J. L. Closset. 2008. Clusterin activates survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. J. Biol. Chem. 283:12851–12861.
15. Arab, T., A. Raffo-Romero, C. Van Camp, Q. Lemaire, F. Le Marrec-Croq, F. Drago, P. Sautière, P.-E. 2019. Proteomic characterisation of leech microglia extracellular vesicles (EVs): comparison between differential ultracentrifugation and Optiprep™ density gradient isolation. Journal of Extracellular Vesicles, 8(1), 1603048.
16. Asano, A., and A. Tajima. 2017. Development and Preservation of Avian Sperm. Avian Reproduction, 59–73.
17. Ashizawa, K., H. Nishiyama, and T. Nagae. 1976. Effects of oviducal cells on the survival and fertilizing ability of fowl spermatozoa. J Reprod Fertil. 47:305e11.
18. Ashizawa, K., and R. Sano. 1990. Effects of temperature on the immobilization and the initiation of motility of spermatozoa in the male reproductive tract of the domestic fowl, Gallus domesticus. Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. 96, 297–301.
19. Ashizawa, K., G. J. Wishart, A. R. A. H. Ranasinghe, S. Katayama, and Y. Tsuzuki. 2004. Protein phosphatase-type 2B is involved in the regulation of the acrosome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa. Reproduction. 128(6):783–7.
20. Ashizawa, K., G. J. Wishart, S. Katayama, D. Takano, A. R. Ranasinghe, K. Narumi, and Y. Tsuzuki. 2006. Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or -type 2A. Reproduction. 131(6):1017–24.

21. Austin C. R. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. Aust J Sci Res B. 4:581–96.
22. Aviles, M., A. Gutierrez-Adan, and P. Coy. 2010. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? Mol Hum Reprod.16:896e906.
23. Bakst, M. R. 1980. Chicken and turkey oviductal pH at known times postoviposition. Poult. Sci. 59: 2793–2796.
24. Bakst, M. R. 1981. Sperm recovery from oviducts of turkeys at known intervals after insemination and oviposition. J. Reprod. Fertil. 62:159–164.
25. Bakst, M. R. 1985. Zinc reduces turkey sperm oxygen uptake *in vitro*. Poult. Sci. 64:564–566
26. Bakst, M. R. 1987. Anatomical basis of sperm-storage in the avian oviduct. Scanning Microsc. 1:1257–1266.
27. Bakst, M. R. 1992. Observations on the turkey oviductal spermstorage tubule using differential interference contrast microscopy. Reproduction. 95: 877–883.
28. Bakst, M. R., 1993. Oviductal sperm storage in poultry: A review. Reprod. Fertil. Dev. 5:595–599.
29. Bakst, M. R. 1994. Fate of Fluorescent Stained Sperm following Insemination: New Light on Oviducal Sperm Transport and Storage in the Turkey. Biology of Reproduction. 50(5), 987–992.
30. Bakst, M. R. 1998. Structure of the avian oviduct with emphasis on sperm storage in poultry. J. Exp. Zool. 282:618–626.
31. Bakst, M. R. 2001. Oviducal sperm storage in turkeys (Meleagris gallopavo): the infundibulum as a secondary sperm storage site, or is it? In: Proceeding of the XVIIIth (New) International Congress of Zoology, Athens, Greece.
32. Bakst, M., and B. Howarth, 1975. SEM preparation and observations of the hen’s oviduct. Anat. Rec. 81, 211–225.
33. Bakst, M. R., and B. Jr. Howarth 1977. Hydrolysis of the hen's perivitelline layer by cock sperm. Biol Reprod 17:370-379
34. Bakst, M. R., and M. P. Richards. 1985. Concentrations of selected cations in turkey semen and oviductal mucosa. Poult. Sci. 64:555–563.

35. Bakst, M. R., and B. T. Vinyard. 2002. Oviductal sperm storage in turkeys: Spatial distribution of sperm within the uterovaginal junction sperm-storage tubules. J. Exp. Zool. 292:206–209.
36. Bakst, M. R., G. Wishart, and J. P. Brillard. 1994. Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. Poult. Sci. Rev. 5:117–143.
37. Bakst, M. R., and Akuffo, V. 2008a. Serotonin Localization in the Turkey Vaginal but not Sperm Storage Tubule Epithelia. Poultry Science, 87(2), 356–361.
38. Bakst, M.R., and Akuffo, V. 2008b. Turkey sperm reside in the tubular glands in the urodeum following artificial insemination. Poult. Sci. 87 (4), 790–792.
39. Bakst, M. R., A. M. Donoghue, D. E Yoho, J. R. Moyle, S. M. Whipple, M. J. Camp, G. Q. Liu, and R. K. Bramwell. 2010. Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation. Poultry Science, 89(5), 986–992.
40. Bakst, M. R., and G. Bauchan. 2015. Apical blebs on sperm storage tubule epithelial cell microvilli: their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. Theriogenology. 83:1438–1444.
41. Baibakov, B., N. A. Boggs, B. Yauger, G. Baibakov, J. Dean. 2012. Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. J Cell Biol. 197:897-905.
42. Balthazart, J. 1989. Steroid metabolism and the activation of social behavior. In: Advances in Comparitive and Environmental Physiology, 3, pp. 103–159.
43. Barioglio, C. F. 2001. Diccionario de producción animal. Editorial Burbujas. Córdoba, España.
44. Bathala, P., Z. Fereshteh, K. Li, A. Al-Dossary, D. S. Galileo, and P. A. Martin-DeLeon. 2018. Oviductal extracellular vesicles (oviductosomes, OVS) are conserved in humans: murine OVS play a pivotal role in sperm capacitation and fertility. Mol Hum Reprod.
45. Bemis, L., P. McCue, J. Hatzel, J. Bemis, R. Ferris. 2012. Evidence for production of early pregnancy factor (Hsp10), microRNAs and exosomes by day 8 equine embryos. J Equine Vet Sci:397e422.
46. Bello, O. D., M. N. Zanetti, L. S. Mayorga, M. A. Michaut. RIM, 2012. Munc13, and Rab3A interplay in acrosomal exocytosis. Exp Cell Res. 10;318(5):478-88.

47. Birkenmeier, G., E. Usbeck, A. Schäfer, A. Otto, and H. J. Glander. 1998. Prostate-specific antigen triggers transformation of seminal alpha2-macroglobulin (alpha2-M) and its binding to alpha2- macroglobulin receptor/low-density lipoprotein receptor-related protein (alpha2-M-R/LRP) on human spermatozoa. Prostate. 36:219–225.
48. Birkhead, T. R., and F. Fletcher. 1994. Numbers of spermatozoa attached to and penetrating perivitelline layers of Japanese quail eggs. Auk 136:101-104.
49. Birkhead, T. R., and A. P. Møller. 1992a. Sperm competition in birds, evolutionary causes and consequences. Academic Press, London.
50. Birkhead, T. R., and A. P. Møller. 1992b. Numbers and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: A comparative study. Biol. J. Linn. Soc. Lond. 45:363–372.
51. Björndahl, L., I. Söderlund, U. Kvist. 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Human Reproduction. 4,813–816.
52. Blair, C., y Tailor, R. 2008. Brioestadística. México, Pearson.
53. Blanch E., C. Tomás, L. Casares, E.A. Gómez, S. Sansano, I. Giménez and E. Mocé. 2014. Development of methods for cryopreservation of rooster sperm from the endangered breed “Gallina Valenciana de Chulilla” using low glycerol concentrations. Theriogenology, 81(9), 1174–1180.
54. Blesbois, E. and I. Mauger. 1987. Effects of ovalbumin on the motility and fertilising ability of fowl spermatozoa stored for 24 h at 4 °C. British Poultry Science, 28(3), 483–491.
55. Bobr, W. L., F. X. Ogasawara, F. W. Lorenz. 1964. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. II. Transport of spermatozoa in the fowl oviduct. J Reprod Fertil 8:49-58.
56. Bognar, Z., T. J. Csabai, E. Pallinger, T. Balassa, N. Farkas, J. Schmidt, E. Gorgey, G. Berta, J. Szekeres-Bartho, and J Bodis. 2019. The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of preimplantation murine embryos. J Reprod Immunol. 132:21e8.
57. Bramwell, R. K., H. L. Marks, and B. Howarth. 1995. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. Poult. Sci. 74:1875-1883.

58. Briceño, R. D., and W. G. Eberhard. 2009. Experimental modifications of male genitalia influence cryptic female choice mechanisms in two tsetse flies. Journal of Evolutionary Biology. 22, 1516–1525.
59. Brillard, J. P. 1993. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. Poult. Sci. 77:923-928.
60. Brillard, J. P., and M. R. Bakst. 1990. Quantification of spermatozoa in the sperm-storage tubules of turkey hens and the relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. Biol. Reprod. 43:169–275.
61. Bu, H., M. R. Schweiger, T. Manke, A. Wunderlich, B. Timmermann, M. Kerick, L. Pasqualini, E. Shehu, C. Fuchsberger, A. S. Cato, and H. Klocker. 2013. Anterior gradient 2 and 3–two prototype androgen-responsive genes transcriptionally upregulated by androgens and by oestrogens in prostate cancer cells. FEBS J. 280:1249–1266.
62. Burke, W. H., and F. X. Ogasawara. 1969. Presence of spermatozoa in uterovaginal fluids of the hen at various stages of the ovulatory cycle. Poultry Sci. 48:408–413.
63. Burns, G. W., K. E. Brooks, E. V. O'Neil, D. E. Hagen, S. K. Behura, and T. E. Spencer. 2018. Progesterone effects on extracellular vesicles in the sheep uterus. Biol Reprod.
64. Burrows, W.H., and J. P. Quinn. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poult Sci. 14:251–4.
65. Buzás, E. I., E. Á. Tóth, B. W.Sódar, & K. É. Szabó-Taylor. 2018. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. Seminars in Immunopathology, 40(5), 453–464.
66. Carli, C, P. Leclerc, C. N. Metz, and A. Akoum. 2007. Direct effect of macrophage migration inhibitory factor on sperm function: possible involvement in endometriosis-associated infertility. Fertil. Steril. 88:1240–1247.
67. Caruso, S., I. K. H. Poon. 2018. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: more than just debris, Front. Immunol. (9)1486.
68. Chailley, B., and L. A. Pradel. 1992. Immunodetection of annexins 1 and 2 in ciliated cells from quail oviduct. Biol. Cell. 75:45–54.
69. Chambon, P., A. Dierich, M. P. Gaub, S. Jakowlev, J. Jongstra, A. Krust, J. P. Lepennec, P. Oudet, and T. Reudelhuber. 1984. Promoter element of genes-coding

for proteins and modulation of transcription by estrogens and progesterone. Recent Progress in Hormone Research: (40)1–42.

70. Chang, M. C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature: 168(4277):697–8.
71. Chowdhury, V. S., M. Nishibori, Y. Yoshimura. 2003. Changes in the expression of TGFb-isoforms in the anterior pituitary during withdrawal and resumption of feeding in hens. Gen Comp Endocrinol. 133:1–7.
72. Chowdhury, V. S., M. Nishibori, and Y. Yoshimura. 2004. Changes in the mRNA expression of TGFb receptor types II and III in the anterior pituitary during induced molting in hens. J Poult Sci. 41:140–146.
73. Cocucci, E., G. Racchetti and J. Meldolesi. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends in Cell Biology 19:43–51.
74. Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. Annual Review of Cell and Developmental Biology 30:255–289.
75. Compton, M. M., H. P. Van Krey, and P. B. Siegel. 1978. The filling and emptying of the uterovaginal sperm-host glands in the domestic hen. Poultry Sci. 57:1696–1700.
76. Cornwall, G. A., and S. R. Hann. 1995. Specialized gene expression in the epididymis. J Androl. 16(5):379–83
77. Coy, P., S. Canovas, I. Mondejar, M. D. Saavedra, R. Romar, L. Grullon, C. Matas, and M. Aviles. 2008. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. Proc Natl Acad Sci USA; 105:15809e14.
78. Cross, N. L. 1999. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the acrosomal responsiveness of human sperm. Mol Reprod Dev. 53(1):92–8.
79. Dahm, D. D., U. Schramm, and W. Lange. 1980. Scanning and transmission electron microscopic observations of the cloacal epithelia of the domestic fowl. J. Cell Tissue Res. 211:83–93.
80. Da Silveira, J. C., D. N. R. Veeramachaneni, Q. A. Winger, E. M. Carnevale and G. J. Bouma. 2012. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. Biology of Reproduction. 86-71.

81. Das, S. C., N. Nagasaka, and Y. Yoshimura. 2006. Changes in the expression of estrogen receptor mRNA in the uterovaginal junction containing sperm storage tubules in laying hens after repeated artificial insemination. Theriogenology. 65:893–900.
82. Das, S. C., N. Isobe, M. Nishibori, and Y. Yoshimura. 2006. Expression of TGFb-isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of hen oviduct in presence or absence of resident sperm with reference to sperm storage. Reproduction. 132:781–790.
83. Davis, B. K. 1976. Influence of serum albumin on the fertilizing ability *in vitro* of rat spermatozoa. Proc Soc Exp Biol Med. 151(2):240–3.
84. De Ferraz, M., A. Carothers, R. Dahal, M. J. Noonan, and N. Songsasen. 2019. Oviductal extracellular vesicles interact with the spermatozoon's head and mid-piece and improves its motility and fertilizing ability in the domestic cat. Sci Rep. 9:9484.
85. De Ferraz, A. M. M. M., J. B. Nagashima, M. J. Noonan, A. E. Crosier, N. Songsasen. 2020. Oviductal Extracellular Vesicles Improve Post-Thaw Sperm Function in Red Wolves and Cheetahs. Int J Mol Sci. 21(10):3733.
86. De Reviers, M. 1975. Sperm transport and survival in male birds. In: Hafez, E.S.E., Thibault, C.G. (Eds.), The Biology of Spermatozoa, pp. 10–16.
87. Di Vizio, D., M. Morello, A. C. Dudley, P. W. Schow, R. M. Adam, S. Morley, D. Mulholland, M. Rotinen, M. H. Hager, L. Insabato, M. A. Moses, F. Demichelis, M. P. Lisanti, H. Wu, M. Klagsbrun, N. A. Bhowmick, M. A. Rubin, C. D'SouzaSchorey, M. R. Freeman. 2012. Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease, Am. J. Pathol. 181.
88. Diogo, P., G. Martins, R. Nogueira, A. Marreiros, P. J. Gavaia, E. Cabrita. 2019. Cryoprotectants synergy improve zebrafish sperm cryopreservation and offspring skeletogenesis. Cryobiology. Dec;91:115-127.
89. Dyce, K. M., W. O. Sack y C. J. G. Wensing. 2007. Anatomía veterinaria. (3a. ed.). El Manual Moderno. México D.F., México.
90. Encarnação, M., L. Espada, C. Escrevente, D. Mateus, J. Ramalho, X. Michelet, I. Santarino, V. W. Hsu, M. B. Brenner, D. C. Barral, O. V. Vieira. 2016. A Rab3a-dependent complex essential for lysosome positioning and plasma membrane repair. J Cell Biol. 20;213(6):631-40.

91. Etches, R. J. 1996. Reproduction in poultry. CAB International, Wallingford, Oxon, United Kingdom.
92. Fereshteh, Z., S. Schmidt, A. Al-Dossary, M. Accerbi, C. Arighi, J. Cowart, J. L. Song, P. J. Green, K. Choi, S. Yoo, and P. A. Martin-DeLeon. 2018. Murine Oviductosomes (OVS) microRNA profiling during the estrous cycle: delivery of OVS-borne micro-RNAs to sperm where miR-34c-5p localizes at the centrosome. Sci Rep. 8:16094.
93. Fernández, M. S., M. Araya, and J. L. Arias. 1997. Eggshell are shaped by a precise spatio-temporal of sequentially deposited macromolecules. Matrix Biol. 16: 13-20.
94. Fernández, M. S., A. Moya, L. Lopez, and J. L. Arias. 2000. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. Matrix Biol. (in press).
95. Foye-Jackson, O. T., Long, J. A., Bakst, M. R., Blomberg, L. A., Akuffo, V. G., Silva, M. V. B., Guthrie, H. D., McMurtry, and J. P. McMurtry. 2011. Oviductal expression of avidin, avidin-related protein-2, and progesterone receptor in turkey hens in relation to sperm storage: Effects of oviduct tissue type, sperm presence, and turkey line. Poultry Science. 90(7):1539–1547.
96. Freedman, S., V. Akuffo, and M. R. Bakst. 2001. Evidence for the innervation of sperm-storage tubules in the oviduct of the turkey (Meleagris gallopavo). Reproduction. 121:809–814.
97. Froman, D. 2003. Deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Biol. Reprod. 69:248–253.
98. Fujihara, N., K. Tanaka, and H. Nishiyama. 1973. *In vitro* fertilization of fowl ova. Jpn J Zootech Sci. 11:564-568.
99. Fujiwara, Y, N. Ogonuki, K. Inoue, A. Ogura, M. A. Handel, J. Noguchi, T. Kunieda. 2013. t-SNARE Syntaxin2 (STX2) is implicated in intracellular transport of sulfoglycolipids during meiotic prophase in mouse spermatogenesis. Biol Reprod. 6;88(6):141.
100. Fukuzawa, K., Y. Saitoh, K. Aki, K. Kogure, S. Ueno, A. Tokumura, M. Otagiri and A. Shibata. 2005. Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide. Biochim. Biophys. Acta, 1668: 145-155.

101. Galli, F. E., O. Irusta, and G. F. Wassermann. 1973. Androgen production by testes of Gallus domesticus during postem bryonic development. Gen. Comp. Endocrinol. 21, 262–266.
102. Greening, D. W., H. P. Nguyen, K. Elgass, R. J. Simpson, and L. A. Salamonsen. 2016. Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: insights into endometrial-embryo interactions. Biol Reprod. 94:38.
103. Georgiou, A. S., A. P. Snijders, E. Sostaric, R. Aflatoonian, J. L. Vazquez, J. M. Vazquez, J. Roca, E. A. Martinez, P. C. Wright, and A. Fazeli. 2007. Modulation of the oviductal environment by gametes. Journal of Proteome Research. 6:4656–4666.
104. Gilbert, A. B. 1979. Female genital organs. In: King AS, McLelland J (eds) Form and function in birds, voll. Academic Press, New York, pp 237-360.
105. Goodrich-Smith, M., and B. J. Marquez. 1978. Estimation of the number of sperm storage tubules located at the uterovaginal junction in turkey oviduct. Poult. Sci. 57(Suppl. 1):1139. (Abstr.)
106. Gordon, I. 2005. Reproductive technologies in farm animals. CABI Publishing UK. Chapter. 1, 16-28.
107. Govindaraju, A., A. Uzun, L. Robertson, M. O. Atli, A. Kaya, E. Topper. 2012. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E 10: 82±82.
108. Gunawardana, V. K., and M. G. Scott. 1977. Ultrastructural studies on the differentiation of spermatids in the domestic fowl. J Anat. 124(Pt 3):741–55.
109. Hermo, L., and D. Jacks. 2002. Nature's ingenuity: Bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. Mol. Reprod. Dev. 63:394-410.
110. Higaki, K., Y. Yoshimura, T. Tamura, and T. Okamoto. 1995. Localization of spermatozoa and leukocytes in vagina and uterovaginal junction after copulation in Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Jpn. Poult. Sci. 32:387e93.
111. Holt, W. V., and A. Fazeli. 2016. Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: hypotheses, mechanisms, and new opportunities. Theriogenology. 85:105–112.

112. Holm, L., and G. J. Wishart. 1998. The effect of pH on the motility of spermatozoa from chicken, turkey and quail. Anim. Reprod. Sci. 54:45–54.
113. Holm, L., and Y. Ridderstråle. 2002. Development of sperm storage tubules in the quail during sexual maturation. J. Exp. Zool. 292:200–205.
114. Holm, L., Y. Ridderstråle, and P-G. Knutsson. 1996. Localisation of carbonic anhydrase in the sperm storing regions of the domestic hen oviduct. Acta Anat (Basel). 156:253–260.
115. Howarth, B. Jr. 1971. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of turkey hens. Poult. Sci. 50:84–89.
116. Howarth, B. Jr. 1984. Maturation of spermatozoa and mechanism of fertilisation. In: Cunningham FI, Lake PE, Hewitt D (eds) Reproductive biology of poultry. Longham Group, Harlow. pp 161-174.
117. Howarth, B. 1995. Physiology of reproduction: the male. In: Hunton P (ed) Poultry production. World animal science sub series C, vol 9. Elsevier, Amsterdam, pp 243-270.
118. Howarth, B. Jr., and M. B. Palmer. 1972. An examination of the need for sperm capacitation in the turkey. J Reprod Fertil 16:445-455.
119. Huang, S. S., and J. S. Huang. 2005. TGF-b control of cell proliferation. J Cell Biochem. 96:447–462.
120. Huang, A., N. Isobe, and Y. Yoshimura. 2017. Changes in localization and density of CD63-positive exosome-like substances in the hen oviduct with artificial insemination and their effect on sperm viability. Theriogenology. 101:135–143.
121. Huang, Q., W. Li, Q. Zhou, P. Awasthi, C. Cazin, Y. Yap, L. Mladenovic-Lucas, B. Hu, P. Jeyasuria, L. Zhang, J. G. Granneman, R. A. Hess, P. F. Ray, Z. E. Kherraf, V. Natarajan, Z. Zhang. 2021. Leucine zipper transcription factor-like 1 (LZTFL1), an intraflagellar transporter protein 27 (IFT27) associated protein, is required for normal sperm function and male fertility. Dev Biol. Sep; 477:164-176.
122. Huang, S. Y., Y. H. Kuo, W. C. Lee, H. L. Tsou, Y. P. Lee, H. L. Chang, J. J. Wu, and P. C. Yang. 1999. Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. Theriogenology. 51:1007–1016.

123. Hutt, D. M., J. M. Baltz and J. K. Ngsee. 2005. Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction. J Biol Chem; 280:20197–20203.
124. Iborra, A., M. Companyo, P. Martinez, and A. Morros. 2000. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. Biol Reprod. 62(2):378–83.
125. Ignotz G., M. Y. Cho, S. S. Suarez. 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):906–13.
126. Illanes J., F. Matus, V. Leyton, F. Venegas, B. Fertilio & M. Castro. 2018. Descripción Histológica del Aparato Reproductor de Avestruz Hembra (Strutio camelus var. domesticus). International Journal of Morphology, 36(4), 1252-1261.
127. Ito, T., N. Yoshizaki, T. Tokumoto, H. Ono, T. Yoshimura, A. Tsukada, N. Kansaku, and T. Sasanami. 2011. Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds. Endocrinology. 152:3952–3962.
128. Jamaludin, N. A., L. M. Thurston, K. J. Witek, A. Meikle, S. Basatvat, S. Elliott, S. Hunt, A. Andronowska, and A. Fazeli. 2019. Efficient isolation, biophysical characterisation and molecular composition of extracellular vesicles secreted by primary and immortalised cells of reproductive origin. Theriogenology. 135:121e37.
129. Joensuu, T. K., T. J. Ylikomi, D. O. Toft, R. A. Keinanen, M. S. Kulomaa and P. J. Tuohimaa. 1990. Progesterone-induced avidin as a marker of cytodifferentiation in the oviduct – comparison to ovalbumin. Endocrinology: (126)1143–1155.
130. Johnson, A.L. 1986. Reproduction in the male. In: Sturkie, P.D. (Ed.), Avian Physiology, pp. 432–451.
131. Jones, J. L., S. Saraswati, A. S. Block, C. F. Lichti, M. Mahadevan, and A. B. Diekman. 2010. Galectin-3 is associated with prostasomes in human semen. Glycoconj. J. 27:227–236.
132. Katafuchi, K., T. Mori, K. Toshimori, and H. Iida. 2000. Localization of a syntaxin isoform, syntaxin 2, to the acrosomal region of rodent spermatozoa. Mol Reprod Dev; 57:375–383.
133. Kasperczyk, K., A. Bajek, R. Joachimiak, K. Walasik, A. Marszalek, T. Drewa, and M. Bednarczyk. 2012. *In vitro* optimization of the Gallus domesticus oviduct epithelial cells culture. Theriogenology 77:1834–1845.

134. Killian, G. J. 2004. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. Animal Reproduction Science. 82–83:141–53.
135. Kim, N. S., Y. N. Shen, T. Y. Kim, S. J. Byun, I. S. Jeon, and S. H. Kim. 2007. Expression of AGR-2 in chicken oviduct during laying period. J. Biochem. Mol. Biol. 40:212–217.
136. King, R. S., S. H. Anderson, and G. J. Killian. 1994. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. J Androl. 15:468–78.
137. King, L. M., J. P. Brillard, M. R. Bakst, and A. M. Donoghue. 1999. Isolation of sperm storage tubules from the uterovaginal junction mucosa of the turkey. Poult. Sci. 78:1044–1047.
138. Koldemir, O., E. Özgür, and U. Gezer. 2017. Accumulation of GAS5 in exosomes is a marker of apoptosis induction. Biomedical Reports. 6(3):358–362.
139. Kong, A. T., F. V. Leprevost, D. M. Avtonomov, D. Mellacheruvu, & A. I. Nesvizhskii. 2017. MSFragger: Ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry– based proteomics. Nature Methods, 14(5), 513–520.
140. Kuenzel, W. J. 1993. The search for deep encephalic photoreceptors within the avian brain, using gonadal development as a primary indicator. Poult. Sci. 72, 959–967.
141. Kuo, W. P., and S. Jia (Eds.). 2017. Extracellular Vesicles. Methods in Molecular Biology.
142. Lake, P. 1981. Male genital organs. Pages 1–61. in Form and Function in Birds. Vol. 2. A. S. King and J. McLelland, ed. Acad. Press, New York, NY.
143. Lamy, J., P. Nogues, L. Combes-Soia, G. Tsikis, V. Labas, P. Mermillod. 2018. Identification by proteomics of oviductal sperm-interacting proteins. Reproduction. 155:457–66.
144. Lange-Consiglio, A., G. Gaspari, F. Funghi, E. Capra, M. Cretich, R. Frigerio, G. Bosi, and F. Cremonesi. 2023. Amniotic Mesenchymal-Derived Extracellular Vesicles and Their Role in the Prevention of Persistent Post-Breeding Induced Endometritis. International Journal of Molecular Sciences; 24(6):5166.
145. Lange-Consiglio, A., C. Perrini, G. Albini, S. Modina, V. Lodde, E. Orsini, P. Esposti, F. Cremonesi. 2017. Oviductal microvesicles and their effect on *in vitro* maturation of canine oocytes. Reproduction. 154:167e80.

146. Law, G. L., and M. D. Griswold. 1994. Activity and form of sulfated glycoprotein 2 (Clusterin) from cultured sertoli cells, testis, and epididymis of the rat. Biol. Reprod. 50:669–679.
147. Lea, I. A., P. Sivashanmugam, and M. G. O'Rand. 2001. Zonadhesin: characterization, localization, and zona pellucida binding. Biol. Reprod. 65:1691–1700.
148. Leese, H. J. 1988. The formation and function of oviduct fluid. J Reprod Fertil. 82:843–56.
149. Leese, H. J., S. A. Hugentobler, S. M. Gray, D. G. Morris, R. G. Sturmey, S. L. Whitear, J. M. Sreenan. 2008. Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. Reprod Fertil Dev. 20:1e8.
150. Lefebvre R., P. J. Chenoweth, M. Drost, C. T. LeClear, M. MacCubbin, J. T. Dutton and S. S. Suarez. 1995. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. Biol Reprod; 53:1066–1074.
151. Lemoine, M., I. Grasseau, J. P. Brillard, and E. Blesbois. 2008. A reappraisal of the factors involved in in-vitro initiation of the acrosome reaction in chicken spermatozoa. Reproduction. 136(4):391–9.
152. Leśniak-Walentyn, A., and A. Hrabia. 2016. Involvement of matrix metalloproteinases (MMP-2,-7,-9) and their tissue inhibitors (TIMP-2,-3) in the chicken oviduct regression and recrudescence. Cell Tissue Res. 366:443–454.
153. Leśniak-Walentyn, A., and A. Hrabia. 2017. Expression and localization of matrix metalloproteinases (MMP-2, -7, -9) and their tissue inhibitors (TIMP-2, -3) in the chicken oviduct during pause in laying induced by tamoxifen. Theriogenology. 88:50–60.
154. Lin, M., and R. C. Jones. 1992. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail, Coturnix coturnix japonica. Cell Tissue Res.; 267(3):591–601.
155. Li, S., Y. Wang, Y. Zhang, M. M. Lu, F. J. DeMayo, J. D. Dekker, P. W. Tucker, and E. E. Morrisey. 2012a. Foxp1/4 control epithelial cell fate during lung development and regeneration through regulation of anterior gradient 2. Development. 139: 2500–2509.

156. Li, W., D. Sahu, and F. Tsen. 2012b. Secreted heat shock protein-90 (Hsp90) in wound healing and cancer. Biochim. Biophys. Acta. 1823:730–741.
157. Lopera-Vasquez, R., M. Hamdi, V. Maillo, A. Gutierrez-Adan, P. Bermejo-Alvarez, M. Á. Ramírez, M. Yáñez-Móand and D. Rizos. 2017. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality *in vitro*. Reproduction. 153(4):461–470.
158. Łukaszewicz, E., A. Jerysz, A. Partyka and A. Siudzińska. 2008. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. Res. Vet. Sci. 85(3): 583-588.
159. Maillo, V., M. J. Sánchez-Calabuig, R. Lopera-Vasquez, M. Hamdi, A. Gutierrez-Adan, P. Lonergan, and D. Rizos. 2016. Oviductal response to gametes and early embryos in mammals. Reproduction 152(4): R127–R141.
160. Makkar, S., R. Liyanage, L. Kannan, B. Packialakshmi, J. O. Lay, Jr, and N. C. Rath. 2015. Chicken egg shell membrane associated proteins and peptides. J. Agric. Food Chem. 63:9888–9898.
161. Marion, V., *et al*. 2012. Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1, a BBSome and smoothened trafficking regulator, in a family with Bardet–Biedl syndrome with situs inversus and insertional polydactyly. Journal of medical genetics. 49(5): p. 317–321.
162. Matsuzaki, M., S, Mizushima, G. Hiyama, N. Hirohashi, K. Shiba, K. Inaba, *et al*. 2015. Lactic acid is a sperm motility inactivation factor in the sperm storage tubules. Sci. Rep. 5.
163. McDaniel, C. D., R. K. Bramwell, and B. J. Howarth. 1997. Development of a new fluorescence technique for quantifying the total number of spermatozoa stored in the uterovaginal junction of hens. J Reprod Fertil. 109: 173-179.
164. METEOGRAM. 2022. Hora de salida y puesta de sol. Disponible en https://meteogram.es/sol/chile/chillan/ (Consultado 21 diciembre 2022].
165. Miller, D.J. 2015. Regulation of sperm function by oviduct fluid and the epithelium: insight into the role of glycans. Reproduction in Domestic Animals 50 (Supplement 2) 31–39.
166. Mine, Y. 2002. Recent advances in egg protein functionality in the food system. World is Poultry Science Journal, 58(01), 31-39.

167. Mocé E., E. Blanch, C. Tomás, J. Graham. 2010. Use of Cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. Reprod. Domest. Anim.;45:57–66.
168. Moll, R., W. W. Franke, and D. L. Schiller. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell. 31:11–24.
169. Mouri, H., K. Sakaguchi, T. Sawayama, T. Senoh, T. Ohta, M. Nishimura, A. Fujiwara, M. Terao, Y. Shiratori, T. Tsuji. 2002. Suppressive effects of transforming growth factor-b1 produced by hepatocellular carcinoma cell lines on interferon-c production by peripheral blood mononuclear cells. Acta Med Okayama. 56:309–315.
170. Muñoz O., F. 2019. Caracterización de producción de pavos (Meleagris gallopavo) en la agricultura familiar campesina en la región de Ñuble, Chile. Tesis Medicina Veterinaria. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Chillán, Chile. Disponible en: http://repositorio.udec.cl/handle/11594/9294
171. Muramatsu, T., K. Hiramoto, and J. Okumura. 1991. Changes in ovalbumin and protein synthesis *in vivo* in the magnum of laying hens during the egg formation cycle. Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology: (99)141–146.
172. Nakano, S., S. Yamamoto, A. Okada, T. Nakajima, M. Sato, T. Takagi, and Y. Tomooka. 2017. Role of extracellular vesicles in the interaction between epithelial and mesenchymal cells during oviductal ciliogenesis. Biochem Biophys Res Commun. 483:245e51.
173. Nio-Kobayashi, J. 2017. Tissue- and cell-specific localization of galectins, β-galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. Anat. Sci. Int. 92:25–36.
174. Nixon, B., K. A. Ewen, K. M. Krivanek, J. Clulow, G. Kidd, H. Ecroyd, and R. C. Jones. 2014. Post-testicular sperm maturation and identification of an epididymal protein in the Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Reproduction. 147(3):265–77.
175. Ng, Y. H., S. Rome, A. Jalabert, A. Forterre, H. Singh, C. L. Hincks and L. A. Salamonsen. 2013. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. PLoS ONE. 8:e58502.

176. Noirault J., Brillard J-P., Bakst M.R. 2006. Spermatogenesis in the turkey (Meleagris gallopavo): Quantitative approach in immature and adult males subjected to various photoperiods. Theriogenology, 65(4), 0–859.
177. Nordstrom, L. A., D. M. Dean, and M. M. Sanders. 1993. A complex array of double-stranded and single-stranded dna-binding proteins mediates induction of the ovalbumin gene by steroid hormones. Journal of Biological Chemistry: (268)13193–13202.
178. North, M. O., y D. D. Bell. 1993. Manual de producción avícola. (3a. ed.). El Manual Moderno. México D.F., México.
179. Nys, Y., and N. Guyot. 2011. Egg formation and chemistry. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products, 83–132.
180. Okunade, G. W., M. L. Miller, G. J. Pyne, R. L. Sutliff, K. T. O'Connor, J. C. Neumann, … G. E. Shull. 2004. Targeted Ablation of Plasma Membrane Ca2+-ATPase (PMCA) 1 and 4 Indicates a Major Housekeeping Function for PMCA1 and a Critical Role in Hyperactivated Sperm Motility and Male Fertility for PMCA4. Journal of Biological Chemistry, 279(32), 33742–33750.
181. Olsen, M. W. 1952. Intra-ovarian insemination in the domestic fowl. J Exp Zool. 119:461–81.
182. Olsen, M. W., and R. M. Fraps. 1944. Maturation, fertilization, and early cleavage of the egg of the domestic turkey. J Morphol. 74:297–309.
183. Ottinger, M. A., 1983. Hormonal control of reproductive behavior in the avian male. Poult. Sci. 62, 1690–1699.
184. Palmiter, R. D., and J. T. Wrenn. 1971. Interaction of estrogen and progesterone in chick oviduct development. 3. Tubular gland cell cytodifferentiation. J. Cell Biol. 50:598–615.
185. Palviainen, M., M. Saraswat, Z. Varga, D. Kitka, M. Neuvonen, M.Puhka, S. Joenväärä, R. Renkonen, R. Nieuwland, M. Takatalo, & P. R. M. Siljander. 2020. Extracellular vesicles from human plasma and serum are carriers of extravesicular cargo-Implications for biomarker discovery. Plos One, 15(8), e0236439.
186. Park, S. W., G. Zhen, C. Verhaeghe, Y. Nakagami, L. T. Nguyenvu, A. J. Barczak, N. Killeen, and D. J. Erle. 2009. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106:6950–6955.

187. Parker, J. E. 1947. The Influence of Season on Reproduction in Turkeys. Poult. Sci. 26(2):118–121.
188. Pescatore, A. J., and B. J. Marquez. 1977. Sperm storage tubule development in immature turkeys injected with female sex steroids. Poult. Sci. 56:1746–1747.
189. Pisitkun, T., R. F. Shen, and M. A. Knepper. 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 101:13368e73.
190. Pons-Rejraji, H., C. Artonne, B. Sion, F. Brugnon, M. Canis, L. Janny and G. Grizard. 2010. Prostasomes: inhibitors of capacitation and modulators of cellular signaling in human sperm. Internat J Androl. 34:568–580.
191. Qu, P., Y. Zhao, R. Wang, Y. Zhang, L. Li, J. Fan, and E. Liu. 2018. Extracellular vesicles derived from donor oviduct fluid improved birth rates after embryo transfer in mice. Reprod Fertil Dev.
192. Quere, P., and G. J. Thorbecke. 1990. Multiple suppressive effects of transforming growth factor-b1 on the immune response in chickens. Cell Immunol. 129:468– 477.
193. Quevedo, M.F., M.A. Bustos, D. Masone, C. M. Roggero, D. M. Bustos, C. N. Tomes. 2019. Grab recruitment by Rab27A-Rabphilin3a triggers Rab3A activation in human sperm exocytosis. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 1866(4):612-622.
194. Raposo, G., and W. Stoorvogel. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol. 200(4):373-83.
195. Rejraji, H., B. Sion, G. Prensier, M. Carreras, C. Motta, J. M. Frenoux, E. Vericel, G. Grizard, P. Vernet, and J. R. Drevet. 2006. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. Biol. Reprod. 74:1104–1113.
196. Ren, D., B. Navarro, G. Perez, A. C. Jackson, S. Hsu, Q. Shi, J. L.Tilly, and D. E. Clapham. 2001. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature 413, 603–6 09.
197. Renoir, J. M., A. Pahl, U. Keller, and E. E. Baulieu. 1993. Immunological identification of a 50 kDa Mr FK506-binding immunophilin as a component of the non-DNA binding, hsp90 and hsp70 containing, heterooligomeric form of the chick oviduct progesterone receptor. C. R. Acad. Sci. III. 316:1410–1416.
198. Robertson, L., A. J. Horrocks, G. J. Wishart. 1997. Perivitelline N-linked glycans initiate sperm:egg interaction in the chicken. Biochem Soc Trans. 25:S655.

199. Rocha, C., L. Papon, W. Cacheux, P. Marques Sousa, V. Lascano, O. Tort, T. Giordano, S. Vacher, B. Lemmers, P. Mariani, D. Meseure, J. P. Medema, I. Bièche, M. Hahne, C. Janke. 2014. Tubulin glycylases are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon. EMBO J. 1;33(19):2247-60.
200. Roche, M., P. Rondeau, N.R. Singh, E. Tarnus and E. Bourdon. 2008. The antioxidant properties of serum albumin. FEBS Lett., 582: 1783-1787.
201. Rothwell, B., and M. D. Tingari. 1973. The ultrastructure of the boundary tissue of the seminiferous tubule in the testis of the domestic fowl (Gallus domesticus). J. Anat. 114, 321–328.
202. Rosenbluth, E. M., D. N. Shelton, L. M. Wells, A. E. Sparks, and B. J. Van Voorhis. 2014. Human embryos secrete microRNAs into culture media–a potential biomarker for implantation. Fertil Steril. 101:1493e500.
203. Saldanha, C. J., A. J. Silverman, and R. Silver. 2001. Direct innervation of GnRH neurons by encephalic photoreceptors in birds. J. Biol. Rhythms 16, 39–49.
204. Salevsky, E., and R. M. Leach. 1980. Studies on the organic components of shell gland fluid and the hen's egg shell. Poult. Sci. 59, 438–443.
205. Salmon, V.M., P. Leclerc, J.L. Bailey. 2016. Cholesterol-loaded cyclodextrin increases the cholesterol content of goat sperm to improve cold and osmotic resistance and maintain sperm function after cryopreservation1. Biol. Reprod. 94:1–12.
206. Sasanami, T., M. Matsuzaki, S. Mizushima, and G. Hiyama. 2013. Sperm storage in the female reproductive tract in birds. J. Reprod. Dev. 59:334–338.
207. Sauveur, B. 1992. Reproducción de las aves. Ediciones Mundi-Prensa / Aedos. Madrid. España.
208. Sauveur, B. 1993. El huevo para consumo: bases productivas. Ediciones Mundi-Prensa / Aedos. Madrid, España.
209. Schaefer, E., *et al*. 2014. Mesoaxial polydactyly is a major feature in Bardet–Biedl syndrome patients with LZTFL1 (BBS17) mutations. Clinical genetics, 85(5): p. 476–481.
210. Schuh, K., E.J.Cartwright, E. Jankevics, K. Bundschu, J. Liebermann, J.C. Williams, A.L. Armesilla, M. Emerson, D. Oceandy, K.-P. Knobeloch, *et al*. 2004. Plasma

membrane Ca2+ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. J. Biol. Chem.;279:28220–28226.

211. Schuppin, G. T., H. P. Van Krey, D. M. Denbow, M. R. Bakst, and G. B. Meyer. 1984. Ultrastructural analyses of uterovaginal sperm storage glands in fertile and infertile turkey breeder hens. Poult. Sci. 63:1872–1882.
212. Sharp, P. J., J. Culbert, and J. W. Wells. 1977. Variations in stored and plasma concentrations of androgens and luteinizing hormone during sexual development in the cockerel. J. Endocrinol. 74, 467–476.
213. Sharpe, R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: second ed. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), The Physiology of Reproduction, 1, pp. 1363–1434.
214. Simon, C., D. W. Greening, D. Bolumar, N. Balaguer, L. A. Salamonsen, and F. Vilella. 2018. Extracellular Vesicles in Human Reproduction in Health and Disease. Endocr. Rev. 39:292–332.
215. Simons, M., and G. Raposo. 2009. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. Current Opinion in Cell Biology 21 575–581.
216. Skotland, T., N.P. Hessvik, K. Sandvig, A. Llorente. 2019. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. J. Lipid Res. 60:9–18.
217. Sporn, M. B., A. B. Roberts, L. M. Wakefield, and R. K. Assoian. 1986. Transforming growth factor-b: biological function and chemical nature. Science; 233:532–534.
218. Sprando, R. L., and Russell, L. D. 1988. Spermiogenesis in the red-ear turtle (Pseudemys scripta) and the domestic fowl (Gallus domesticus): a study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. J. Morphol. 198, 95–118.
219. Stauffer, T. P., H. Hilfiker, E. Carafoli, and E. E. Strehler. 1993. J. Biol. Chem. 268, 25993–26003.
220. Steele, M. G., and G. J. Wishart. 1992. Characterisation of a mechanism impeding sperm transport through the vagina of the chicken. In: Proc 12th Int Congr Anim Reprod, The Hague. 1593-1595.
221. Steele, M. G., and G. J. Wishart. 1996a. Demonstration that the removal of neuraminic acid from the surface of chicken spermatozoa impedes their transvaginal migration. Theriogenology. 46:1037-1044.

222. Steele, M. G., and G. J. Wishart. 1996b. Effect of removing surface-associated protein from viable chicken spermatozoa on sperm function *in vivo* and *in vitro*. Anim Reprod Sci. 45:139-147.
223. Sturkie, P.D. 1968. Fisiología Aviar. (2a. ed.) Acribia. Zaragoza, España.
224. Sturkie, P.D. 2015. Avian Physiology. (6a. ed.). Elsevier. Wisconsin, USA.
225. Subra, C., D. Grand, K. Laulagnier, A. Stella, G. Lambeau, M. Paillasse, *et al*. 2010. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. J Lipid Res. 51:2105e20.
226. Sullivan, R. 2015. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. Asian J Androl.;17(5):726–9.
227. Sullivan, R., and F. Saez. 2013. Epididysomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian reproductive physiology. Reproduction. 146: R21-R35.
228. Sunkara, V., C. J. Kim, J. Park, H. K. Woo, D. Kim, H. Ha, M. Kim, Y. Son, J. R. Kim, Y. K. Cho. 2019. Fully Automated, Label-Free Isolation of Extracellular Vesicles from Whole Blood for Cancer Diagnosis and Monitoring. Theranostics, 9(7), 1851–1863.
229. Suter, D., P. Y. W. Chow and I. C. A. Martin. 1979. Maintenance of motility in human spermatozoa by energy derived through oxidative phosphorylation and addition of albumin. Biology of Reproduction, 20: 505-510.
230. Takeda, A. 1974. The transport of spermatozoa in the vagina of the hen. Jpn. Poult. Sci. 11:45e54.
231. Takeuchi, T., M. Suzuki, N. Fujikake, H. A. Popiel, H. Kikuchi, S. Futaki, K. Wada, and Y. Nagai. 2015. Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112: E2497–E2506.
232. Talbot, N. C., K. V. Krasnec, W. M. Garrett, A. E. Shannon, and J. A. Long. 2018. Finite cell lines of turkey sperm storage tubule cells: ultrastructure and protein analysis. Poultry Science.
233. Talevi, R., and R. Gualtieri. 2010. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. Theriogenology. 73:796–801.

234. Tallamy, D. W., B. E. Powell, and J. A. McClafferty. 2002. Male traits under cryptic female choice in the spotted cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Behavioral Ecology 13, 511–518.
235. Tamai, T. K., and T. Yoshimura. 2017. Molecular and neuroendocrine mechanisms of avian seasonal reproduction. Avian Reproduction 125-136.
236. Tauber, P. 1875. Om h0nsereggets befrugtning I reggelederen. Naturhist Tidskr (Copenh) 10:63-106.
237. Teng, F. Y. H., Y. Wang, & B. L. Tang. 2001. The syntaxins. Genome Biol 2, reviews 3012.1.
238. Thornhill, R., 1983. Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly Harpobittacus nigriceps. American Naturalist 122, 765–788.
239. Thippabhotla, S., C. Zhong, and M. He. 2019. 3D cell culture stimulates the secretion of *in vivo* like extracellular vesicles. Sci. Rep. 9:13012.
240. Tingari, M. D., and Lake, P. E. 1973. Ultrastructural studies on the uterovaginal sperm host glands of the domestic hen, Gallus domesticus. J. Reprod. Fert. 34, 423–431.
241. Théry, C., S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr. Protoc. Cell. Biol.: 3.22(1e3):9.
242. Théry, C., K. W. Witwer, E. Aikawa, M. J.Alcaraz,J. D. Anderson, … E. K. Zuba-Surma. 2018. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. Journal of Extracellular Vesicles,(1), 1535750.
243. Thurston, R. J., and R. A. Hess. 1987. Ultrastructure of spermatozoa from domesticated birds: comparative study of turkey, chicken and guinea fowl. Scanning Microsc. 1, 1829–1838.
244. Tóth, E. Á., L. Turiák, T. Visnovitz, C. Cserép, A. Mázló, B. W.Sódar, … E. I. Buzás. 2021. Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma. Journal of Extracellular Vesicles, 10(11).

245. Tuohimaa, P., Joensuu, T., Isola, J., Keinanen, R., Kunnas, T., Niemala, A., Pekki, A., Wallen, M., Ylikomi, T., and Kulomaa, M. 1989. Development of progestin-specific response in the chicken oviduct. Int. J. Dev. Biol. 33, 125–134.
246. Tyanova, S., T. Temu, P. Sinitcyn, *et al*. 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. Nat Methods 13, 731–740.
247. Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nature Cell Biology. 9:654–659.
248. Van der Pol, E., A. N. Boing, P. Harrison, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2012. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. Pharmacol Rev. 64(3): 676-705.
249. Van Krey, H. P., R. J. Balander, and M. M. Compton. 1981. Storage and evacuation of spermatozoa from the uterovaginal sperm-host glands in domestic fowl. Poultry Sci. 60:871-877.
250. Van Krey, H. P., F. X. Ogasawara, J. Pangborn. 1967. Light and electron microscopic studies of possible sperm gland emptying mechanisms. Poult. Sci. 46:69e78.
251. Van Niel, G., G. D'Angelo, and G. 2018. Raposo. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 19:213–228
252. Vanderlaag, K. E., S. Hudak, L. Bald, L. Fayadat-Dilman, M. Sathe, J. Grein, and M. J. Janatpour. 2010. Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-α and survivin. Breast Cancer Res. 12:R32.
253. Visconti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf. 1995a. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. Development. 121(4):1129–37.
254. Visconti, P. E., G. D. Moore, J. L. Bailey, P. Leclerc, S. A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf. 1995b. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. Development. 121(4):1139–50.
255. Vizcarra, J. A., D. L. Kreider, y J. D. Kirby. 2004. Episodic gonadotropin secretion in the mature fowl: serial blood sampling from unrestrained male broiler breeders (Gallus domesticus). Biol. Reprod. 70, 1798–1805.

256. Vizcarra, J. A., J. D. Kirby, and D. L. Kreider. 2010. Testis development and gonadotropin secretion in broiler breeder males. Poult. Sci. 89, 328–334.
257. Walker, W. H., and J. Cheng. 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. Reproduction 130, 15–28.
258. Wall, K. A. 1975. Factors affecting fertility in turkeys. Ph.D. thesis, Clemson University, Clemson, SC.
259. Wang, P., Y. F. Wang, H. Wang, C. W. Wang, L. S. Zan, J. H. Hu, Q. W. Li, Y. H. Jia, and G. J. Ma. 2014. HSP90 expression correlation with the freezing resistance of bull sperm. Zygote. 22:239–245.
260. Wildt, D.E., W.F. Rall, J.K. Critser, S.L. Monfort, U.S. Seal. 1997. Living collections for biodiversity conservation. Bioscience; 47:1–20.
261. Wingfield, J. C., T. P. Hahn, R. Levin, P. Honey. 1992. Environmental predictability and control of gonadal cycles in birds. J. Exp. Zool. 261, 214–231.
262. Wishart, G. J. 1987. Regulation of the length of the fertile period in the domestic fowl by numbers of oviducal spermatozoa. J Reprod Fertil. 80:493-498.
263. Wishart, G. J. 1994. Vaginal sperm transport and sperm selection. In: Proc 9th Eur Poult Conf, Glasgow, pp 161-164.
264. Wishart, G. J. 1995. New approaches to evaluating male and female fertility. In: Bakst MR, Wishart GJ (eds) Proc 1 st Int Symp AI Poult, Poult Sci Assoc, Savoy, Illinois, pp 207 -223.
265. Wishart, G. J., and A. J. Horrocks. 2000. Fertilization in birds. Pages 193–222 in Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals. J. J. Tarin and A. Caro, ed. Springer, New York, NY.
266. Wishart, G. J., and H. J. Staines. 1999. Measuring sperm:egg interaction to assess breeding efficiency in chickens and turkeys. Poult Sci. 78:428-436.
267. Wloga, D., D. M. Webster, K.Rogowski, M.-H. Bré, N. Levilliers, M. Jerka-Dziadosz, … J. Gaertig. 2009. TTLL3 Is a Tubulin Glycine Ligase that Regulates the Assembly of Cilia. Developmental Cell, 16(6), 867–876.
268. Wodziak, D., A. Dong, M. F. Basin, and A. W. Lowe. 2016. Anterior gradient 2 (AGR2) induced epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling is essential for murine pancreatitis-associated tissue regeneration. PLoS One. 11:e0164968.

269. Wolford, J. H., R. K. Ringer, and T. H. Coleman. 1964. Ovulation and Egg Formation in the Beltsville Small White Turkey. Poultry Science. 43(1), 187–189.
270. Wyburn, G. M., H. S. Johnston, M. H. Draper, and M. F. Davidson. 1970. The fine structure of the infundibulum and magnum of the oviduct of gallus domesticus. Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences; 55(3), 213–232.
271. Xu, L., Q. Guo, G. Chang, L. Qiu, X. Liu, Y. Bi, Y. Zhang, H. Wang, W. Lu, L. Ren, Y. Chen, Y. Zhang, Q, Xu, and G. Chen. 2017. Discovery of microRNAs during early spermatogenesis in chicken. PLOS ONE. 12(5), e0177098.
272. Yang, K. T., C. Y. Lin, J. S. Liou, Y. H. Fan, S. H. Chiou, C. W. Huang, C. P. Wu, E. C. Lin, C. F. Chen, Y. P. Lee, W. C. Lee, S. T. Ding, W. T. Cheng, and M. C. Huang. 2007. Differentially expressed transcripts in shell glands from low and high egg production strains of chickens using cDNA microarrays. Anim. Reprod. Sci. 101:113–124.
273. Yañez-Mó M., P. R. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec, F. E. Borras, E. I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, *et al*. 2015 Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Journal of Extracellular Vesicles 4(1):27066.
274. Yasuo, S., and T. Yoshimura. 2009. Comparative analysis of the molecular basis of photoperiodic signal transduction in vertebrates. Integr. Comp. Biol. 49, 507–518.
275. Yoshimura, Y., K. Koike, and T. Okamoto. 2000. Immunolocalization of progesterone and estrogen receptors in the sperm storage tubules of laying and diethylstilbestrol-injected immature hens. Poult. Sci. 79:94–98.
276. Yoshimura, T. 2006. Molecular mechanism of the photoperiodic response of gonads in birds and mammals. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 144, 345–350.
277. Yoshimura, T. 2010. Neuroendocrine mechanism of seasonal reproduction in birds and mammals. Anim. Sci. J. 81, 403–410.
278. Zaniboni, L., and Bakst, M. R. 2004. Localization of Aquaporins in the Sperm Storage Tubules in the Turkey Oviduct. Poultry Science, 83(7), 1209–1212.
279. Zhan, R., X. Leng, X. Liu, X. Wang, J. Gong, L. Yan, L. Wang, Y. Wang, and L. J. Qian. 2009. Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-

classical pathway involving exosomes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 387(2), 229–233.

280. Zheng, W. M., M. Nishibori, N. Isobe, and Y. Yoshimura. 2001. An in situ hybridization study of the effect of artificial insemination on the localization of cells expressing MHC class II mRNA in the chicken oviduct. Reproduction. 122:581–586.
281. Zhu, Q., H. B. Mangukiya, D. S. Mashausi, H. Guo, H. Negi, S. B. Merugu, Z. Wu, and D. Li. 2017. Anterior gradient 2 is induced in cutaneous wound and promotes wound healing through its adhesion domain. FEBS J. 284:2856–2869.