



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

El oviducto:  
Análisis transcriptómico,  
identificación de proteínas secretadas  
y aplicaciones en reproducción artificial

**D. Leopoldo González Brusi**  
**2021**

PARTE I: SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS EN BASE A INTERACCIÓN CON AZÚCARES PRESENTES EN EL EPITELIO OVIDUCTAL

1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1.- EL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA CERDA.....	2
1.2.- CICLO REPRODUCTIVO DE LA CERDA.....	3
1.3.- EL OVIDUCTO PORCINO.....	7
1.3.1.- HISTOLOGÍA DEL OVIDUCTO.....	9
1.4.- EL SISTEMA REPRODUCTOR DEL CERDO.....	11
1.5.1- EL ESPERMATOZOIDE PORCINO.....	13
1.5.2- ESPERMATOGÉNESIS.....	14
1.4.3.- MADURACIÓN EN EL EPIDÍDIMO.....	15
1.4.4.- EYACULACIÓN Y PLASMA SEMINAL.....	16
1.4.5.- CAPACITACIÓN.....	17
1.4.5.1- Introducción.....	17
1.4.5.2- Modificaciones en la membrana plasmática.....	18
1.4.5.3- ROS y capacitación.....	20
1.4.5.4- Fosforilación de tirosinas.....	21
1.4.5.5- Hiperactivación.....	22
1.5.- EL RESERVORIO ESPERMÁTICO.....	23
1.5.1.- INTRODUCCIÓN.....	23
1.5.2.- PAPEL DE LOS AZÚCARES EN LA FORMACIÓN DEL RESERVORIO ESPERMÁTICO.....	25
1.5.2.1.- Oligomanosa.....	25
1.5.2.2.- N-Acetil-lactosamina 6 sialilada.....	26
1.5.2.3.- Lewis <sup>x</sup> .....	29

1.6.- PECULIARIDADES DEL CERDO COMO MODELO REPRODUCTIVO Y RETOS DE LA FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> PORCINA.....	30
1.7.- SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES.....	32
1.7.1.- INTRODUCCIÓN.....	32
1.7.2.- SORTING PARA SEXADO DE ESPERMATOZOIDES.....	33
1.7.3.- TÉCNICAS DE SELECCIÓN NEGATIVA.....	34
2.- HIPÓTESIS INICIAL.....	35
3.- OBJETIVOS.....	36
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1.- COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS.....	36
4.1.1.- MEDIO DE CONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES.....	36
4.1.2.- MEDIO NO CAPACITANTE.....	36
4.1.3.- MEDIO TTG-EY 2%.....	37
4.1.4.- MEDIO DE FIV.....	37
4.2.- CONJUGACIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS CON FITC.....	37
4.3.- OBTENCIÓN DE OVOCITOS INMADUROS Y SELECCIÓN.....	38
4.4.- OBTENCIÓN DE ZONAS PELÚCIDAS.....	39
4.5.- PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES.....	39
4.6.- COINCUBACIÓN CON LAS GLICOPROTEÍNAS FLUORESCENTES.....	39
4.7.- CITOMETRÍA DE FLUJO Y SORTING.....	40
4.8.- EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA.....	40
4.9.- ENSAYO DE COINCUBACIÓN CON LA ZONA PELÚCIDA.....	41
5.- RESULTADOS.....	41
5.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	41

5.2.- SEPARACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS MEDIANTE SORTING.....	42
5.2.1. VIABILIDAD.....	42
5.2.2. AFINIDAD POR LA ZONA PELÚCIDA.....	43
6.- DISCUSIÓN.....	46
6.1.- OVALBÚMINA, INTEGRIDAD ESPERMÁTICA Y UNIÓN A LA ZP.....	46
6.2.- LEWIS <sup>a</sup> , INTEGRIDAD ESPERMÁTICA Y UNIÓN A LA ZP.....	48
6.3.- ANÁLISIS CRÍTICO Y POSIBLES EXPERIMENTOS FUTUROS.....	48
PARTE II: MODIFICACIONES EN EL OVIDUCTO DE CONEJA DURANTE LA OVULACIÓN Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO PRE-IMPLANTACIONAL	
1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	52
1.1.- EL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA CONEJA.....	52
1.1.1.- GENERALIDADES.....	52
1.1.2.- EL OVIDUCTO DE LA CONEJA.....	53
1.2.- CICLO REPRODUCTIVO DE LA CONEJA.....	56
1.3.- LA FECUNDACIÓN EN EL OVIDUCTO.....	58
1.3.1.- TRANSPORTE ESPERMÁTICO.....	58
1.3.2.- TRANSPORTE OVOCITARIO.....	59
1.4.- EL FLUIDO OVIDUCTAL.....	60
1.4.1.- INTRODUCCIÓN.....	60
1.4.2.- PROPIEDADES FÍSICAS.....	60
1.4.2.1.- pH.....	60
1.4.2.2.- Temperatura.....	61
1.4.2.3.- Viscosidad.....	61
1.4.3.- COMPOSICIÓN.....	62

1.4.3.1.- Electrolitos.....	62
1.4.3.2.- Sustratos energéticos.....	63
1.4.3.3.- Aminoácidos.....	65
1.4.3.4.- Lípidos.....	65
1.4.3.5.- Hormonas.....	67
1.4.3.6.- Proteínas.....	69
1.4.3.7.- Vesículas extracelulares en el oviducto.....	76
1.5.- ESTUDIOS PREVIOS DE TRANSCRIPTÓMICA EN OTROS MAMÍFEROS..	78
1.5.1.- TRANSCRIPTÓMICA OVIDUCTAL ANTES Y DESPUÉS DE LA FECUNDACIÓN.....	80
1.5.2.- TRANSCRIPTÓMICA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN EL OVIDUCTO.....	81
2.- OBJETIVO.....	83
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
3.1.- ÉTICA.....	83
3.2.- MANTENIMIENTO DE LOS CONEJOS.....	84
3.3.- ESTIMULACIÓN OVÁRICA.....	84
3.4.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	84
3.5.- EXTRACCIÓN DE ARN.....	85
3.5.- CALIDAD DE LAS MUESTRAS.....	86
3.6.- ANÁLISIS DE MICROMATRICES.....	86
3.7.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	86
3.8.- RETROTRANSCRIPCIÓN.....	87
3.9.- PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.....	88
3.9.1.- INTRODUCCIÓN.....	88
3.9.2.- DISEÑO DE CEBADORES.....	88

3.9.3.- CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS ARNm.....	89
3.10.- INMUNOHISTOQUÍMICA.....	91
3.10.1.- FIJACIÓN DE MUESTRAS.....	91
3.10.2.- INCLUSIÓN Y CORTE DE LAS MUESTRAS.....	91
3.10.3.- INMUNOCITOQUÍMICA.....	91
3.10.4.- VISUALIZACIÓN.....	93
3.11.- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE BRADFORD.....	93
3.12.- ELECTROFORESIS EN GEL DE TRIS GLICINA.....	94
3.13.- WESTERN BLOT.....	94
3.14.- INMUNODETECCIÓN EN MEMBRANA.....	95
3.15.- REVELADO.....	96
3.16.- PROTEÓMICA.....	96
3.16.1.- Pre-procesado.....	96
3.16.2.- Cromatografía líquida.....	97
3.16.3.- Espectrometría de masas.....	97
4.- RESULTADOS.....	98
4.1.- ANÁLISIS DE MICROARRAYS.....	98
4.1.1.- CALIDAD DE LAS MUESTRAS.....	98
4.1.2.- EXPRESIÓN DIFERENCIAL DESDE PRE-OVULATORIO HASTA LA FASE DE BLASTOCISTO EN EL OVIDUCTO EN EL ISTMO.....	99
4.1.2.1.- Genes pertenecientes al grupo SOTA3.....	101
4.1.2.2.- Genes pertenecientes al grupo SOTA4.....	102
4.1.3.- COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN DOS REGIONES DEL OVIDUCTO ENTRE LAS FASES PRE-OVULATORIA Y POST-OVULATORIA.....	103
4.1.3.1.- En el istmo.....	103
4.1.3.2.- En la ampolla.....	109

4.1.4.- COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN ISTMO ENTRE LA ETAPA POST-OVULATORIA Y EN PRESENCIA DE EMBRIONES DE 8 CÉLULAS.....	111
4.1.5.- COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN ISTMO ENTRE LA ETAPA EMBRIONARIA DE 8 CÉLULAS Y LA DE MÓRULA.....	118
4.1.6.- GENES CARACTERÍSTICOS DE CADA FASE.....	120
4.1.7.- COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE EL ISTMO Y LA AMPOLLA EN LAS FASES PRE Y POST-OVULATORIA.....	121
4.2.- VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS MEDIANTE RT-PCR.....	124
4.3.- PROTEÓMICA Y COMPARACIÓN CON EXPERIMENTOS DE PROTEÓMICA DE OTROS AUTORES.....	126
4.4.- EXPRESIÓN DE DIFERENTES PROTEÍNAS OVIDUCTALES.....	127
4.4.1.- OVIDUCTINA.....	127
4.4.2.- OSTEOPONTINA.....	129
4.4.3.- NEUROPEPTIDO Y.....	134
4.4.4.- METALLOPEPTIDASA 7 (MATRILISINA).....	136
5.- DISCUSIÓN.....	137
5.1.- CAMBIOS EN EL OVIDUCTO DURANTE LA OVULACIÓN Y FECUNDACIÓN.....	137
5.1.1.- EFECTO DE LA OVULACIÓN EN LA AMPOLLA: MODULACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA.....	137
5.1.2.- EL ISTMO ANTES DE LA OVULACIÓN .....	139
5.1.3.- EL ISTMO TRAS LA OVULACIÓN.....	143
5.1.4.- EFECTOS DE LA OVULACIÓN COMUNES A LA AMPOLLA Y EL ISTMO.....	144
5.1.4.1.- Genes sobreexpresados antes de la ovulación.....	144
5.1.4.2.- Genes sobreexpresados tras la ovulación.....	145

5.1.5.- DIFERENCIAS REGIONALES EN LA EXPRESIÓN DE GENES....	147
5.2.- CAMBIOS EN EL OVIDUCTO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO.....	148
5.2.1.- CAMBIOS DURANTE LA TRANSICIÓN DE ZIGOTO A EMBRIÓN DE 8 CÉLULAS.....	148
5.2.2.- CAMBIOS DURANTE EL FINAL DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN EL OVIDUCTO.....	150
5.2.3.- LA EXPRESIÓN DE OVGP1 DURANTE LA OVULACIÓN Y DESARROLLO TEMPRANO PRE-IMPLANTACIONAL.....	151
5.3.- COMPARATIVA ENTRE ESPECIES.....	152
5.3.1.- SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE ESTUDIOS DE TRANSCRIPTÓMICA.....	152
5.3.1.1.- Pre-ovulatorio vs post-ovulatorio.....	152
5.3.1.2.- Post-ovulatorio vs fase luteal temprana.....	153
5.3.1.3.- Presencia vs ausencia de embriones.....	155
5.3.2.- SIMILITUDES ENTRE ESTUDIOS DE PROTEÓMICA.....	156
5.3.2.1.- Permeabilidad del oviducto a las proteínas plasmáticas...	157
5.4.- IMPACTO DEL EMBRIÓN SOBRE LA TRANSCRIPTÓMICA OVIDUCTAL: ¿CUÁL ES SU DIMENSIÓN REAL?.....	158
CONCLUSIONES.....	162
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	164
ABREVIATURAS, LECTINAS Y GENES.....	167
BIBLIOGRAFÍA.....	169
AGRADECIMIENTOS.....	222



# PARTE I: SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS EN BASE A INTERACCIÓN CON AZÚCARES PRESENTES EN EL EPITELIO OVIDUCTAL

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 EL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA CERDA

El sistema reproductor de la cerda (*Sus scrofa*) está compuesto por diferentes estructuras: la vulva, el vestíbulo vaginal, la vagina, el útero, los oviductos y los ovarios (Fig. 1). La vulva permite la entrada del pene durante la cópula y la expulsión de las crías durante el nacimiento. El vestíbulo vaginal, situado entre la vagina y la vulva, contiene el orificio externo de la uretra (Hafez et al., 2013). La vagina, que mide unos 10-12 cm, forma la apertura al exterior del tracto genital y forma parte del canal del parto, su aspecto varía dependiendo de la etapa del ciclo estral (Edström, 2009). El útero consta de dos cuernos de 60-90 cm en cerdas no gestantes y un cuerpo de 6 cm, comunicándose con la vagina a través del cérvix o cuello uterino, que mide aproximadamente 25 cm (Yeste y Castillo-Martín, 2013). El útero es el lugar en el que el embrión se implanta y desarrolla hasta el parto. Además, en la cerda es el sitio donde se deposita el semen. El oviducto, del que hablaremos con detalle más adelante, es un conducto sinuoso que mide aproximadamente 25-30 cm (Coy et al., 2018) y que conecta el útero con los ovarios. Por último, los ovarios son las gónadas femeninas, donde se sintetizan distintas hormonas femeninas (principalmente estrógenos y progesterona) y el órgano en el que se forman los gametos femeninos conocidos como ovocitos en el interior de los folículos ováricos. Cada ovario mide 5 cm y pesa unos 10 gramos aproximadamente y su forma irregular y lobulada recuerda a un racimo de uvas, con múltiples folículos y cuerpos lúteos en la superficie (Edström, 2009), pero su apariencia varía notablemente a lo largo del ciclo estral.

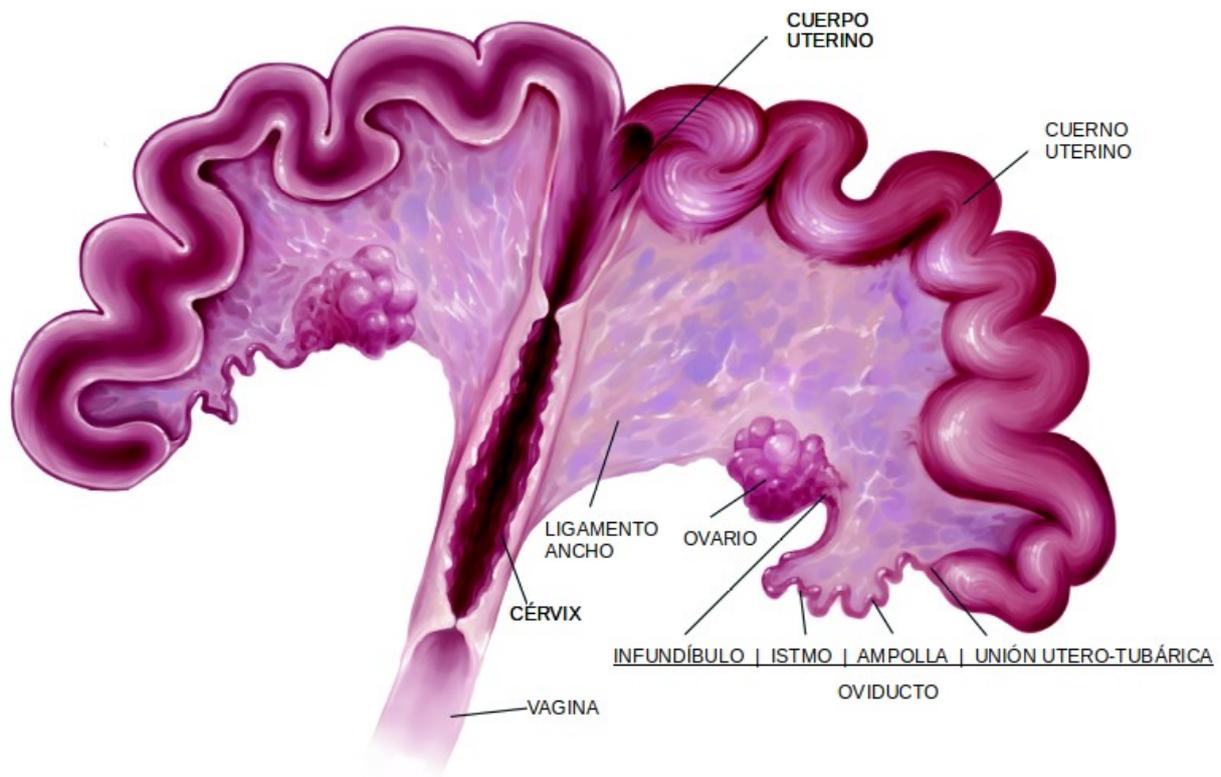


Figura 1. Esquema del sistema reproductor de la cerda. Imagen modificada de Soriano-Úbeda et al, 2013.

## 1.2. CICLO REPRODUCTIVO DE LA CERDA

La cerda es una hembra poliéstrica no estacional, por lo que tiene celo durante todo el año en intervalos regulares. Su vida reproductiva empieza cuando alcanza la pubertad con su primer celo, entre los 150-220 días de vida, dependiendo de factores variados, incluyendo la raza, el estado de nutrición del animal y el contacto con machos (Anderson, 2000). Tras la pubertad, la cerda comienza su vida reproductiva donde el ciclo estral, la gestación y lactancia estarán regulados por las concentraciones de diversas hormonas reproductivas generadas en diferentes órganos (Tabla 1).

Tabla 1. Hormonas relacionadas con el ciclo reproductivo en la especie porcina.

<b>Órgano</b>	<b>Hormonas</b>
Hipotálamo	Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).
Glándula pituitaria	Hormona estimulante de folículos (FSH), hormona luteinizante (LH), oxitocina, prolactina.
Ovarios	Progesterona (P4), 17 $\beta$ -estradiol (E2), inhibina, relaxina.
Útero	Prostaglandina F2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ ).

Cada ciclo estral, que en la cerda dura de 18 a 24 días consta de 4 fases: estro, metaestro, diestro y proestro. En otra posible nomenclatura, proestro y estro conforman la fase folicular del ciclo, mientras que metaestro y diestro equivalen a la fase luteal.

Teniendo como referencia un ciclo de 21 días y siendo el día 0 la ovulación, el estro o período de máxima receptividad sexual dura unas 40-60 horas en presencia de machos. Durante este período se observan cambios en el comportamiento del animal y a nivel fisiológico (vulva enrojecida, aumento del mucus vaginal) y es cuando se produce la cópula.

Inmediatamente después de la ovulación empieza la fase luteal temprana: la concentración de P4 está en el mínimo y se ha reducido drásticamente el número de folículos de Graaf en los ovarios. Al aumentar la concentración de FSH en los días 1 y 2 tras la ovulación, se inicia una oleada de crecimiento folicular sincronizado y aumenta el número de folículos antrales de pequeño (2.5-3 mm) y mediano tamaño (4 mm). La producción de inhibina por estos folículos aumenta, lo que reduce la concentración periférica de FSH (Noguchi et al., 2010). Mientras, la formación del cuerpo lúteo va incrementando gradualmente la concentración de P4, que alcanza su máximo nivel en torno al día 8-9 e inhibe la secreción de gonadotropinas (Soede et al., 2011). Los niveles de estrógeno se mantienen bajos mientras tanto. Durante la fase luteal de la cerda, las

oleadas de crecimiento folicular no llegan hasta una etapa de dominancia de un folículo como sucede en la vaca, sino que hay un desarrollo sincronizado de folículos antrales pequeños hasta un tamaño de 3-4 mm (Hazeleger et al., 2005).

Nueve días antes de la ovulación, empieza la degeneración del cuerpo lúteo (fase luteal tardía) y con ello caen los niveles de P4, lo que conlleva un incremento del número de folículos antrales pequeños que empiezan a sintetizar más inhibina, lo que conducirá dos días más tarde a un descenso en la liberación de FSH (Soede et al., 2011). Mientras tanto, la concentración de P4 ha llegado al mínimo y la de E2 se incrementa rápidamente, inhibiendo la liberación de GnRH por el hipotálamo y reduciendo tanto la liberación de LH como de FSH (en colaboración con inhibina A) (Noguchi et al., 2010). Al disminuir la concentración de FSH, los folículos más pequeños pierden el estímulo de esta hormona y sufren atresia (Lucy et al., 2001). En este momento de reducción de LH y FSH es cuando empieza el proceso de selección de los folículos, que durará hasta la ovulación (Soede et al., 2011).

La fase folicular viene a continuación y dura unos 4-6 días: los folículos antrales de mayor tamaño (de hasta 6 mm), de acuerdo con Knox y colaboradores (2005), que se habían desarrollado durante el final de la fase luteal, conforman el llamado pool de folículos antrales. Su reclutamiento comienza cuando la frecuencia de pulsos de liberación de GnRH aumenta de forma considerable, induciendo la liberación de LH y FSH por la glándula pituitaria. La hormona FSH es importante para que se incremente el número de folículos que van a ser reclutados (cerdas con mayores concentraciones de FSH muestran ratios de ovulación mayores; Knox et al., 2003), mientras que la hormona LH es necesaria para que crezcan hasta el tamaño de folículo preovulatorio (7-9 mm; Knox et

al., 2005). Una vez que la LH ha estimulado el crecimiento de los folículos, estos empiezan a producir E2, incrementando su concentración (Soede et al., 2011).

La ovulación se produce unas  $30 \pm 3$  horas tras el pico de LH y aproximadamente 48 horas tras el pico de E2 (Soede et al., 1994). Dura de 1 a 3 horas si es espontánea y hasta 6 horas si es inducida (Soede et al., 1998). La cerda posee una capacidad reproductiva superior al resto de animales domésticos debido a una elevada fertilidad: en cada ciclo ovula 15-30 ovocitos por ciclo estral, de los cuales 13-16 darán lugar a lechones (Peltoniemi et al., 2019). Las hormonas regulan con precisión el desarrollo de los folículos, determinando su número y calidad. La relación entre las concentraciones de las hormonas E2, P4, LH, FSH con la morfología ovárica y las fases puede consultarse en la figura 2.

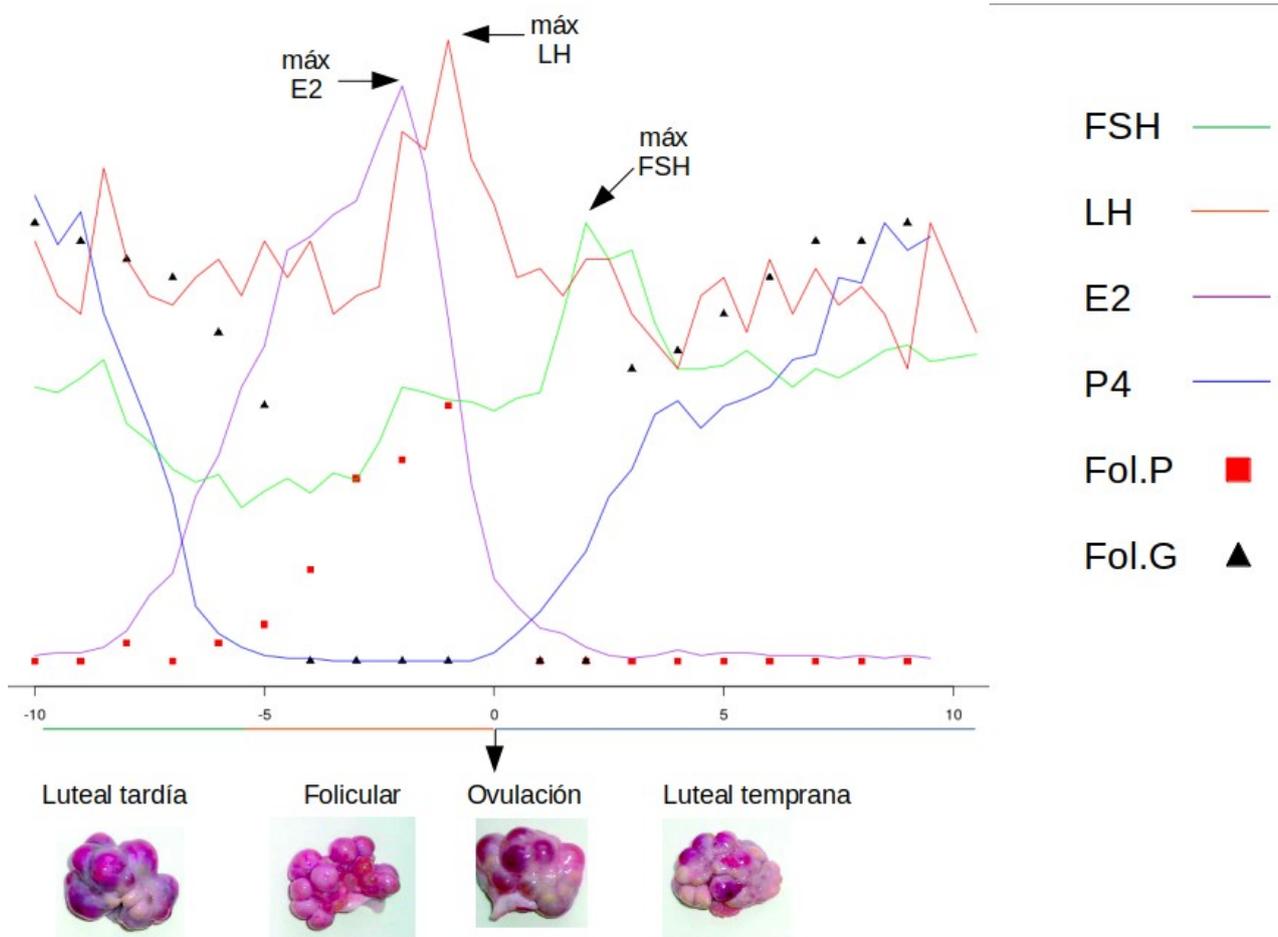


Figura 2. Concentraciones de hormonales vs los días del ciclo estral porcino, con las fases correspondientes y la morfología ovárica (a partir de datos de concentración en plasma de Noguchi y colaboradores, 2010; las fotos de los ovarios porcinos han sido tomadas de Carrasco y colaboradores, 2008). Se considera el día 0 el de la ovulación. Fol.P: folículos de 3-6 mm; Fol.G: folículos > 6 mm.

### 1.3.-EL OVIDUCTO

En 1561, Gabrielle Fallopius publicó la primera descripción anatómica de un oviducto de mamífero (Woodruff y Pauerstein, 1969). Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX, con las observaciones de Barry (1844) y Bischoff (1845) de ovocitos penetrados por espermatozoides que habían sido recuperados de un oviducto, cuando se empezó a conocer más sobre su significado funcional. Durante los últimos años de ese siglo se fue descubriendo más sobre la presencia de células ciliadas en el epitelio oviductal y se sugirió su función secretora (Gould et al., 1974).

En los mamíferos, el oviducto (también conocido como trompa uterina o trompa de Falopio en la especie humana) es la región anatómica del tracto genital femenino involucrada en varios procesos reproductivos de gran interés. El oviducto juega un papel importante en el transporte de gametos y su almacenamiento (Suarez et al., 2015), incluyendo la formación del reservorio espermático (Suarez et al., 2016). En el oviducto tienen lugar las últimas etapas de la maduración de gametos y la fecundación (Avilés et al., 2010; Hunter 2011). Componentes del fluido oviductal (FO), juegan un papel secundario en el bloqueo de la polispermia produciendo un endurecimiento de la zona pelúcida (ZP) antes de la fecundación (Coy et al., 2008; Avilés et al., 2010). Las primeras

fases del desarrollo embrionario temprano tienen lugar en el oviducto (Yang y Yanagimachi, 1989; Hunter 1991).

El oviducto es fundamentalmente una estructura tubular con múltiples pliegues en su interior que conecta los ovarios con el útero. Posee cuatro regiones principales que, enumeradas yendo desde el ovario hasta el útero son: el infundíbulo, la ampolla, el istmo y la unión utero-tubárica (Menezo y Guerin., 1997; Coy et al., 2018), (Fig. 3).



Figura 3. Oviducto porcino. Barra 1 cm. Modificado de Avilés et al., 2010.

El infundíbulo es una estructura con forma de embudo que posee unas prolongaciones conocidas como fimbrias que median el transporte del ovocito desde el ovario hasta la ampolla (Hafez et al., 2013). La ampolla ocupa casi la mitad de la longitud total del oviducto. La unión ampular-ístmica separa la ampolla del istmo y es donde tiene lugar la fecundación en la cerda.

El istmo es el lugar en el que se produce la formación del reservorio espermático, donde los espermatozoides se almacenan hasta que se produce la ovulación (Miller 2018), y también donde continúa la capacitación espermática, que les permite adquirir la habilidad para sufrir la reacción acrosómica (RA) y poder fecundar al ovocito. Además, en él tendrá lugar el desarrollo embrionario preimplantacional tras la fecundación (Yang y Yanagimachi, 1989; Hunter et al., 1991).

Por último, la unión utero-tubárica, separa el istmo del útero, siendo una de las barreras físicas más importantes de selección espermática en el tracto genital femenino (Pérez-

Cerezales et al., 2018). El eyaculado de cerdo, consiste en 500 ml con 50-60 billones de espermatozoides que son directamente depositados en los cuernos uterinos (Yeste y Castillo-Martín, 2013). Varios millones podrán mantenerse en el cuello uterino y no serán eliminados por el sistema inmune (Rodríguez-Martínez et al., 2010) o debido al reflujo (Soriano-Úbeda et al., 2013). Sin embargo, solo unos pocos miles llegarán al istmo antes de la ovulación y formarán el reservorio espermático (First et al., 1968; Sumransap et al., 2007).

### 1.3.1- HISTOLOGÍA DEL OVIDUCTO

El oviducto y el útero se forman a partir de los conductos Müllerianos durante el desarrollo embrionario. Mientras que los segmentos craneales de los conductos Müllerianos se transforman en los oviductos, los segmentos caudales dan lugar a los cuernos uterinos (Cuhna et al., 2017).

Un corte histológico del oviducto presenta una túnica mucosa con un epitelio cilíndrico simple con células secretoras y ciliadas, y una lámina propia de tejido conjuntivo laxo (Budna-Tukan et al., 2019). Rodeando a la mucosa se pueden observar dos capas de músculo liso que se entremezclan conformando una túnica muscular de arquitectura plexiforme (Coy et al., 2018). La capa más externa es la túnica serosa, que contacta con el peritoneo por medio del ligamento ancho, está formada por mesotelio y una delgada capa de tejido conjuntivo (Foley y Johnson, 1974).

La histología del oviducto varía según la región (Fig. 4). De esta forma, podemos observar como el grosor de la túnica muscular disminuye desde el istmo hasta el infundíbulo, mientras que el número, la longitud y la complejidad de los pliegues de la mucosa

aumentan considerablemente. La mucosa del istmo presenta pliegues longitudinales, de altura media y sin ramificar. En el istmo, Yaniz et al. (2006), diferencia pliegues primarios de mayor altura y grosor y otros secundarios de menor altura que dan lugar a un sistema de “bolsillos” que discurre paralelo a los pliegues primarios. Por otra parte, la mucosa de la ampolla y el infundíbulo presenta fundamentalmente pliegues longitudinales, de altura elevada y muy ramificados en la cerda (Foley y Johnson 1974). La luz estrecha del oviducto, permite que, primero el complejo cúmulo-ovocito, y luego el embrión estén en contacto íntimo con el epitelio (Yaniz et al., 2006).



Figura 4. Tinción hematoxilina-eosina de cortes histológicos de diferentes regiones del oviducto porcino: infundíbulo (A), ampolla (B) e istmo (C). 1: pliegues de la mucosa. 2: capa muscular. 3: capa serosa. Imagen modificada de Budna-Tukan et al., 2019.

El epitelio oviductal tiene dos tipos de células principales: células secretoras y células ciliadas. Las células secretoras del oviducto tienen forma cilíndrica, con un núcleo grande, basófilo y esférico y un citoplasma eosinófilo. Estas células presentan microvellosidades en su extremo apical, sintetizan proteínas activamente y poseen numerosos gránulos de secreción positivos al ácido periódico de Schiff (PAS), (Foley y Johnson, 1974). Las células secretoras son además las encargadas del mantenimiento del epitelio oviductal, dividiéndose para dar lugar a más células secretoras y diferenciándose a células ciliadas (Ghosh et al., 2017). Las células ciliadas también tienen forma cilíndrica y poseen cilios de

tubulina que se mueven en dirección al útero, participando en el movimiento de ovocitos y embriones en dicha dirección (Coy et al., 2018).

La proporción entre células secretoras y ciliadas varía en función de la región del oviducto, siendo en el istmo más frecuentes las células secretoras con respecto a ampolla e infundíbulo, donde podemos observar que las fimbrias están compuestas casi en su totalidad por células ciliadas (Coy et al., 2018), (Fig. 5).

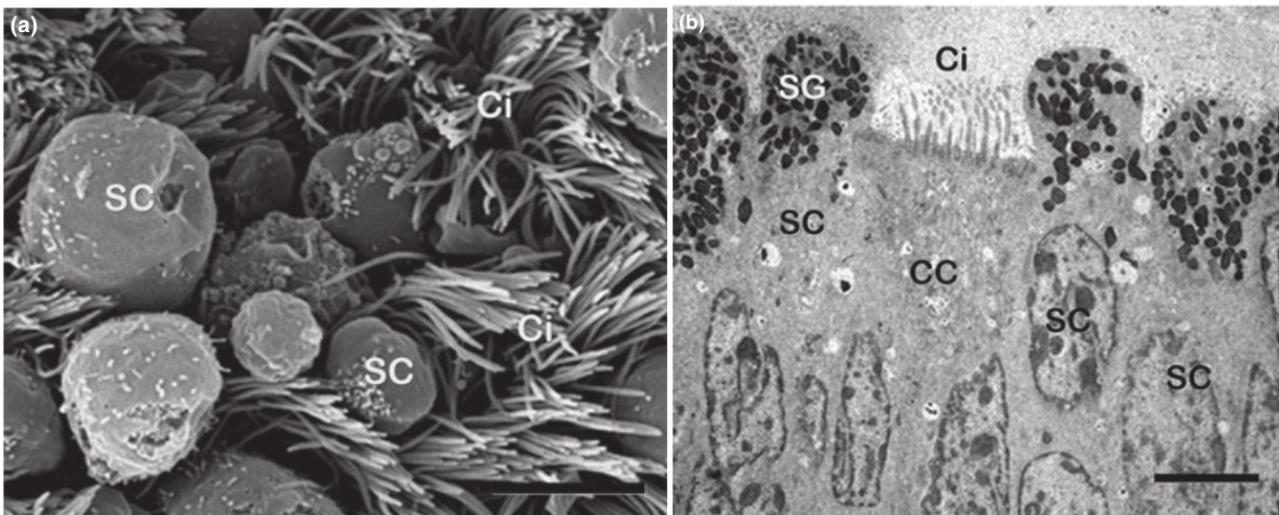


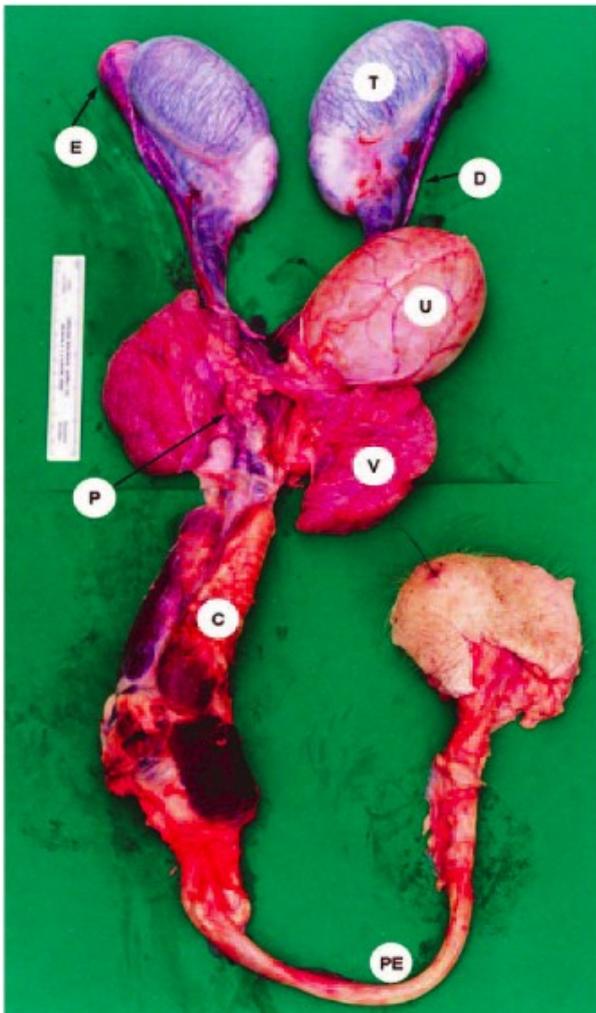
Figura 5. Microscopía electrónica de barrido (SEM, a) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, b) de oviducto bovino. SC: células secretoras, CC: células ciliadas, SG: gránulos de secreción, Ci: cilios. Imagen tomada de Mondéjar et al., 2012.

#### 1.4.- EL SISTEMA REPRODUCTOR DEL CERDO

Los espermatozoides de mamífero se producen en los testículos, un órgano de forma elíptica protegido por la túnica albugínea que contiene los túbulos seminíferos donde se lleva a cabo la espermatogénesis. Además, el testículo es un importante órgano endocrino, contribuyendo a las características sexuales del macho gracias a la secreción

de andrógenos por las células de Leydig y de activina e inhibina por las células de Sertoli (Bonet et al., 2013).

Los espermatozoides maduran en el epidídimo (Dacheux et al., 1998), una estructura tubular enrollada y muy empaquetada de unos 54 m de longitud (Hafez et al., 2013), a donde pasan desde la *rete testis*. Está constituido por tres regiones: cabeza (*caput*), cuerpo y cola (*cauda*). El epidídimo desemboca en el vaso deferente, que transporta los espermatozoides hasta la uretra, donde se unen a las secreciones de las glándulas sexuales accesorias. Las glándulas sexuales accesorias producen la mayor parte del eyaculado, e incluyen las vesículas seminales (también llamadas glándulas vesiculares,



que producen un 15-20% del volumen), la próstata (que genera un 55-75% del volumen) y las glándulas bulbouretrales (o glándulas de Cowper, que contribuyen con un 15-20% del volumen del eyaculado) (Badia et al., 2003). La uretra conduce el semen del animal hacia el exterior a través del pene, un órgano copulatorio de 17-18 cm de longitud, de forma cilíndrica y con un glande en forma de S (Hafez et al., 2013)(Fig. 6).

Figura 6. Sistema reproductor del cerdo. T: testículo, E: epidídimo, D: conducto deferente, U: vejiga, V: vesículas seminales, P: próstata, C: glándulas bulbouretrales, PE: pene. De Bonet et al., 2013. Regla = 15 cm.

#### 1.4.1- EL ESPERMATOZOIDE PORCINO

El espermatozoide porcino está constituido por cabeza y cola (Fig. 7). En un espermatozoide de cerdo maduro, la cabeza tiene forma aplanada y ovalada, con una longitud de 7  $\mu\text{m}$ , un ancho máximo de 3.7  $\mu\text{m}$  y un grosor de 0.4  $\mu\text{m}$ . La cola mide 37.4  $\mu\text{m}$ , siendo la longitud total del espermatozoide de unos 43-35  $\mu\text{m}$  (Holt et al., 2010).

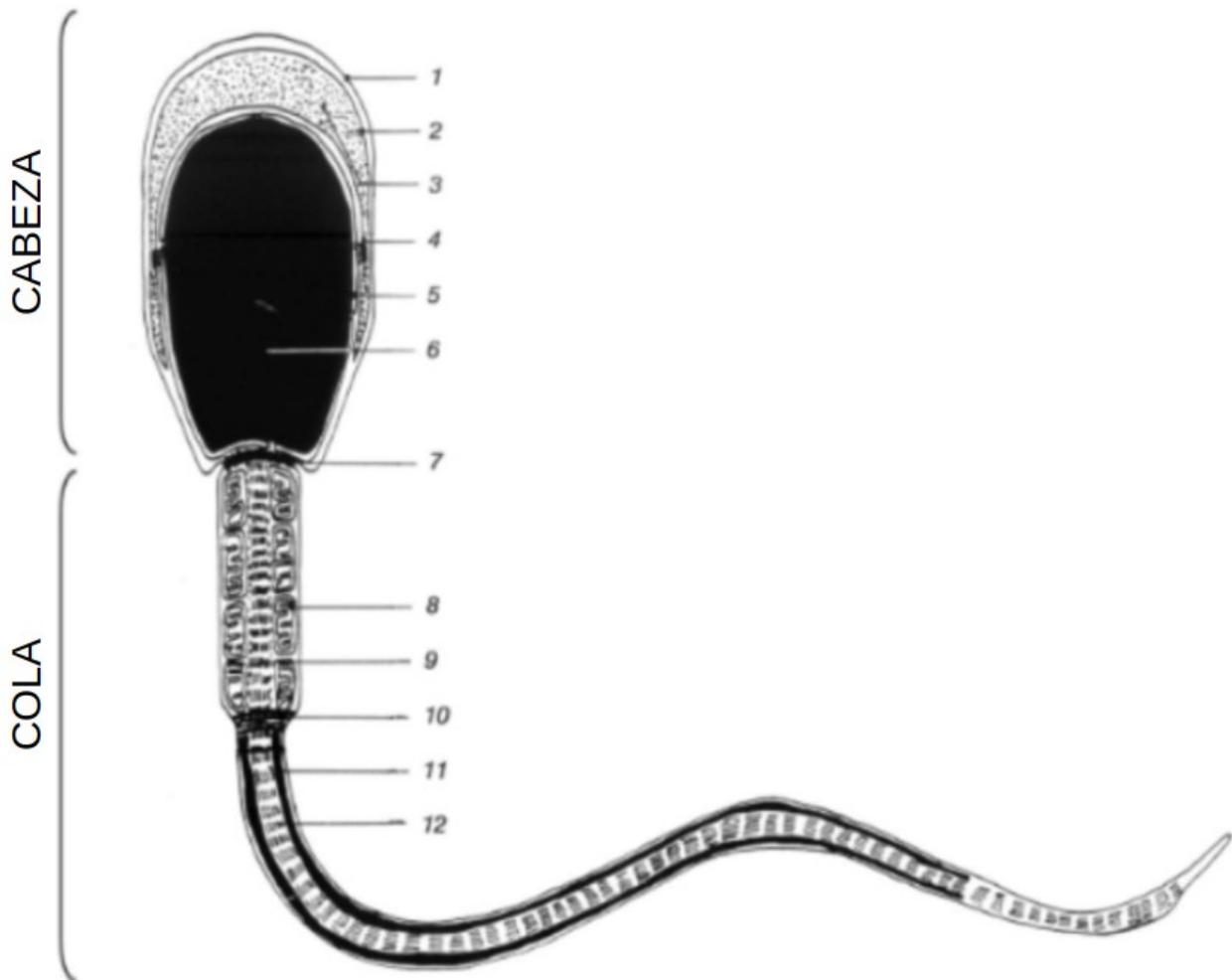


Figura 7. Esquema del espermatozoide porcino. 1: membrana plasmática, 2: membrana acrosomal externa, 3: acrosoma, 4: membrana acrosomal interna, 5: envoltura nuclear, 6: núcleo, 7: cuello, 8: mitocondria, 9: flagelo, parte proximal, 10: anillo anular, 11: lámina fibrosa, 12: axonema y fibras exteriores densas (ODFs). (imagen modificada de Brewis et al., 2004).

Como en el resto de mamíferos, la cabeza incluye el núcleo, con ADN muy empaquetado y un orgánulo exocítico especializado llamado acrosoma derivado del aparato de Golgi (Khawar et al., 2019) y que contiene enzimas como hialuronidasas (SPAM1 y HYAL5),  $\beta$ -galactosidasa, arilsulfatasa A, las fosfolipasas C y A<sub>2</sub> y multitud de enzimas proteolíticas, entre las que destaca la acrosina (Toshimori y Eddy, 2015).

Desde el cuello hasta el final del flagelo se localizan: la pieza intermedia (que incluye la porción proximal del axonema y las mitocondrias del espermatozoide, y que mide 9  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro), la pieza principal (que incluye la mayor parte del axonema rodeado por las fibras exteriores densas, de 26.2  $\mu\text{m}$  de largo y 0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro) y la pieza terminal (que incluye la porción terminal del axonema sin fibras exteriores densas, con 2.2  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Briz et al., 2013). El axonema está formado por nueve dobletes de microtúbulos formando una circunferencia que rodea a un par de microtúbulos centrales, y es la base estructural de la movilidad espermática (Toshimori y Eddy, 2015).

#### 1.4.2- ESPERMATOGÉNESIS

Tras alcanzar la pubertad, que en el cerdo se alcanza a partir de los 5-6 meses de edad (Sancho y Vilagran et al., 2013), la espermatogénesis comienza a producirse como un proceso continuo. Dentro de los testículos, las células precursoras de los espermatozoides (espermatogonias), empiezan su maduración cerca de la pared de los túbulos seminíferos. Las espermatogonias se convierten en espermatocitos primarios mediante varias divisiones mitóticas. Los espermatocitos primarios se transforman en secundarios tras la primera división meiótica, y éstos, se convierten a su vez en

espermátidas tempranas tras la segunda división meiótica (Smith y Walker, 2015). Durante todo el proceso, las células germinales se encuentran rodeadas por las células de Sertoli, que les proporcionan nutrientes y sintetizan hormonas y factores de crecimiento (Garner y Hafez, 2000; Hai et al., 2014). La espermatogénesis finaliza cuando los espermatozoides se liberan al lumen del túbulo seminífero. Este proceso tiene una duración de 34 a 36 días en el cerdo (Bonet et al., 2013), pero la producción de espermatozoides inmaduros no está sincronizada en los túbulos como sucede con la ovulación en la hembra, por lo que se producen espermatozoides para su eyaculación diariamente.

#### 1.4.3- MADURACIÓN EN EL EPIDÍDIMO

Tras ser liberados al lumen de los túbulos seminíferos, los espermatozoides se desplazan por la *rete testis* pasando por los conductos eferentes hasta la cabeza del epidídimo, donde comienza su maduración. En la cabeza, los espermatozoides adquieren proteínas que serán importantes para adquirir la capacidad fecundante, como es el caso de la clusterina (Dacheux et al., 1998), GPX5 (Drevet et al., 2006) o la lactadherina (MFGE8), que además está involucrada en la transferencia de material de los exosomas epididimales al espermatozoide (Nixon et al., 2019). Posteriormente se irán desplazando desde la cabeza hasta la cola del epidídimo, adquiriendo en este tránsito motilidad de forma gradual debido a un incremento en los niveles de AMPc intracelular (Dacheux y Dacheux, 2014), aunque son incapaces de moverse debido a la elevada concentración de espermatozoides presentes. Finalmente, en la cola estarán almacenados hasta la eyaculación, y mientras tanto, se les irán añadiendo nuevas proteínas esenciales para su fertilidad, como PRDX5, y perderán otras como ACE y HSPA2 (Belleannee, 2011). El

tiempo que pasan los espermatozoides en el epidídimo porcino se ha estimado en 12-14 días (Knox, 2003).

#### 1.4.4.-EYACULACIÓN Y PLASMA SEMINAL

Con la eyaculación, los espermatozoides son diluidos en el plasma seminal, donde adquieren su motilidad completa y se modifica aún más su composición. El plasma seminal es un fluido biológico fruto de la mezcla de las secreciones de las glándulas accesorias del animal: la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales. La secreción de las glándulas accesorias aporta un mayor volumen al eyaculado, ácido cítrico y fructosa que actúan como fuente de energía, iones y tampones para mantener un pH de 6.9-7.9 en el semen (Sancho y Vilagran, 2013). El eyaculado porcino consta de tres fracciones: la pre-espermática, la rica en espermatozoides y la post-espermática.

La fracción pre-espermática está formada por secreciones de las glándulas accesorias, y no contiene espermatozoides. La fracción rica en espermatozoides tiene un volumen de 70-100 ml y presenta una concentración de  $0.5-1 \times 10^9$  espermatozoides/ml, junto a secreciones de la próstata y las vesículas seminales. Las glándulas bulbouretrales y la próstata producen una gelatina predominante en la fracción post-espermática cuya función es sellar el cérvix para evitar el reflujo del semen tras la cópula (Sancho y Vilagran, 2013).

Las proteínas del plasma seminal como las espermadhesinas (AWN-1 y 2, AQN-1, 2 y 3, DQH, PSPI y II), han demostrado tener un importante papel en reproducción, puesto que se unen a la superficie del espermatozoide y la modifican (Dostáltová et al., 1997; Töpfer-Petersen et al., 1998; Zigo et al., 2019). PSPI y PSPII preservan la viabilidad de los

espermatozoides eyaculados, previenen la respuesta inmune en el útero y evitan la aglutinación espermática (Ekhlasi-Hundrieser et al., 2002; Caballero et al., 2005), mientras que AQN-1 y DQH median la interacción del espermatozoide con el epitelio oviductal permitiendo la formación del reservorio espermático (Ekhlasi-Hundrieser et al., 2005; Mánasková et al., 2007; Talevi y Gualteri, 2010).

#### 1.4.5- CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

##### 1.4.5.1- Introducción

La capacitación espermática es un proceso fisiológico que prepara al espermatozoide para la fecundación. Las primeras observaciones y descripciones de este fenómeno las hicieron por separado Austin y Chang en 1951 (Austin, 1951; Chang, 1951), sobre espermatozoides introducidos en diferentes tiempos antes de la ovulación directamente en el oviducto de conejas. Demostraron por primera vez, que la estancia en el útero y/o el oviducto es necesaria para preparar al espermatozoide para la fecundación. Durante los años siguientes, se describió el proceso de capacitación en diversas especies de mamíferos, y se empezaron a hacer las primeras pruebas de capacitación *in vitro* que finalmente permitieron llevar a cabo la fecundación *in vitro* (FIV) en diferentes especies, incluyendo la humana (Whittingham et al., 1968; Mukherjee y Cohen, 1970; Edwards et al., 1970; Steptoe et al., 1971).

*In vivo*, los espermatozoides son introducidos en el tracto reproductor femenino (en la cerda, directamente en el útero), donde se producen los preliminares de la capacitación espermática, perdiéndose factores decapacitantes pertenecientes al plasma seminal y el fluido epididimario. Posteriormente, los espermatozoides sufren una selección en la unión utero-tubárica, una barrera compleja, consistente en un epitelio que forma numerosos

pliegues sinuosos en contacto. Este epitelio está recubierto de un mucus que durante el estro de la cerda disminuye en viscosidad. La unión utero-tubárica dificulta el paso de microorganismos patógenos y de espermatozoides con motilidad pobre o aberrante y/o anomalías morfológicas, mientras que los espermatozoides con motilidad lineal y progresiva tendrán mayor éxito a la hora de atravesar esta barrera (García-Vázquez et al., 2015; Suarez et al., 2015).

Los espermatozoides seleccionados llegan al istmo, donde algunos forman el reservorio espermático, donde se mantienen en un estado latente esperando la ovulación (Apichela et al., 2014). Señales endocrinas de la ovulación son las que provocan la entrada en el proceso de capacitación. La capacitación lleva a los espermatozoides a un estado de hiperactivación que contribuye a su liberación del epitelio del istmo y migran en dirección al complejo cúmulo-ovocito (Chang y Suarez, 2010). Tras sufrir la RA pueden fecundar el óvulo.

Entre los cambios observados en los espermatozoides durante la capacitación están: un aumento en la fluidez de la membrana plasmática asociado a pérdida de colesterol, un aumento del estrés oxidativo promovido por radicales libres de oxígeno (ROS), la fosforilación de tirosinas, y la adquisición de motilidad hiperactivada (Aitken y Nixon, 2013; Aitken et al., 2015). A continuación, se ofrecerá una información más detallada de cada uno de estos cambios.

#### 1.4.5.2- Modificaciones en la membrana plasmática

##### **Colesterol**

El colesterol es un lípido esteroideo hidrófobo, cuya presencia aumenta la rigidez de las membranas lipídicas. Durante la maduración en el epidídimo se incorpora a la membrana

plasmática y actúa como un potente factor decapacitante (Davis et al., 1980). Un 6% de este colesterol está sulfatado y presenta como consecuencia una unión más estable a la membrana plasmática (Langlais et al., 1981), pero conforme los espermatozoides van avanzando por el tracto reproductivo, las esterol-sulfatasas presentes hidrolizan el grupo sulfato y hacen posible su esterificación (Roberts, 1987). Los ácidos grasos necesarios para la esterificación provienen del corte enzimático de los fosfolípidos de la membrana plasmática por la fosfolipasa A, lo que además incrementa la proporción de fosfolípidos en la membrana y aumenta su fluidez y permeabilidad al calcio. La oxidación de los esteroides por ROS facilita su transferencia a la albúmina (Brouwers et al., 2011). Agentes extractores de colesterol como la albúmina (Visconti et al., 1995), la  $\beta$ -metil-ciclodextrina (Visconti et al., 1999) o la lipocalina 2 (Watanabe et al., 2014) tienen un efecto capacitante.

### **Fosfolípidos**

En especies como el cerdo, la capacitación induce una exposición de fosfolípidos en la cara externa de la membrana plasmática del espermatozoide entre los que se incluye la fosfatidilserina. Aunque la presencia de este fosfolípido esté clásicamente asociada con la apoptosis celular, en este caso, ambos sucesos no están relacionados (Gadella y Harrison, 2002; Rival et al., 2019).

Tanto la extracción de colesterol de la membrana plasmática, como la exposición de fosfolípidos como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina están relacionadas con un aumento en la fluidez de la membrana y un aumento de la permeabilidad al calcio (Harrison y Gadella, 2005).

### **Gangliósido G<sub>M1</sub>**

El monosialotetrahesoxilgangliósido (G<sub>M1</sub>), es un glicolípido de la membrana plasmática presente en los espermatozoides que sufre una relocalización durante la capacitación, en el cerdo, las balsas lipídicas con G<sub>M1</sub> se mueven desde la cola a la cabeza durante la capacitación (Shadan et al., 2004). Cardona y colaboradores (2017) diseñaron un sistema conocido como Cap-Score™ que evalúa los porcentajes de capacitación espermática basado en la relocalización de G<sub>M1</sub> en la especie humana y que está correlacionado con la capacidad reproductiva en esta especie (Cardona et al., 2017; Ostermeier et al., 2018).

#### 1.4.5.3- ROS y capacitación

Los espermatozoides de mamífero generan ROS como O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Inicialmente, se creía que el efecto de los ROS era puramente dañino sobre el espermatozoide, debido a la peroxidación lipídica de su membrana plasmática (Aitken et al., 2015). Sin embargo, los experimentos de inducción de ROS con xantina, xantina oxidasa y catalasa mostraron una hiperactivación y capacitación espermática al aumentar la concentración de ROS en el medio de forma controlada, mientras que la adición de superóxido dismutasa, restableciendo el equilibrio redox, inhibía la capacitación (de Lamirande y Gagnon 1992).

Aún se desconoce qué ROS en particular están involucrados en la capacitación *in vivo*, y algunos autores sugieren que al ser la interconversión de ROS y NOS (especies reactivas de nitrógeno) muy rápida, serán varias especies reactivas diferentes las que participen en eventos capacitantes (Aitken y Nixon 2013). *In vitro*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rivlin et al., 2004), ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> (de Lamirande y Gagnon, 1993), ·NO (Herrero et al., 2003) y ONOO<sup>-</sup> (Rodríguez y Beconi, 2009) estimulan la capacitación espermática.

Como fuentes productoras de radicales libres se han propuesto tres opciones: la actividad NADPH oxidasa en el espermatozoide (Musset et al. 2012), L-aminoácido oxidasas citosólicas (Aitken et al., 2015) y la mitocondria, que posiblemente sea la fuente principal de ROS en el espermatozoide (Koppers et al., 2008; Boguenet et al., 2021).

La presencia de ROS está también íntimamente relacionada con el estatus fosforilado de las tirosinas (Aitken et al., 2017), debido a que inhibe a las tirosinas fosfatasas (Hecht y Zick, 1992), estimula la actividad adenilato ciclasa (Rivlin et al., 2004), la proteína kinasa A (O'Flaherty et al., 2006) e induce la oxidación y eflujo de colesterol de la membrana plasmática (Boerke et al., 2013).

Puede concluirse que alcanzar ciertos niveles de ROS en el medio es esencial para la capacitación, aunque un estrés oxidativo mayor conllevará la entrada en apoptosis de los espermatozoides y su muerte, lo que determina la ventana temporal de la capacitación. Los espermatozoides sobrecapacitados presentan daño oxidativo en el ADN, peroxidación lipídica, motilidad reducida y activación de caspasas (Koppers et al., 2011; Aitken y Baker 2013). Todos estos daños son señales de senescencia celular e irreversibles, desembocando en la muerte espermática.

#### 1.4.5.4- Fosforilación de tirosinas

La fosforilación de tirosinas es un rasgo de capacitación común a todos los mamíferos estudiados. Este evento fue descrito por Visconti et al. (1995) en espermatozoides de ratón y se puede lograr *in vitro* en un medio con calcio, bicarbonato y albúmina, aunque experimentos posteriores han demostrado que no son esenciales (Baker et al., 2004).

Existen dos rutas conocidas que promueven la fosforilación de tirosinas en espermatozoides. La principal es la que implica la activación de la protein kinasa A (PKA) por adenosín monofosfato cíclico (AMPc), que a su vez activa a otras kinasas. Entre las kinasas candidatas aguas abajo de PKA están pp60cSRC y cABL (Baker et al., 2006), FAK y PYK2 (Battistone et al., 2014) y FERT (Alvau et al., 2016). En esta ruta principal y más estudiada, parece que la kinasa aguas abajo de PKA más importante es FERT, debido a que ha sido la única cuyo ratón KO no presentó un incremento en la fosforilación de tirosinas en medio capacitante *in vitro*, pero aun así es fértil (Alvau et al., 2016), mientras que en humano se ha explorado su función mediante inhibidores (Matamoros-Volante et al., 2018).

La ruta secundaria es la que implica la activación de kinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), dado que el espermatozoide posee estos receptores en su superficie, aparentemente a través de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK (Aitken, 2013).

#### 1.4.5.5.- Hiperactivación

La hiperactivación es un movimiento típico de espermatozoides recuperados del oviducto de mamíferos. Durante la capacitación se produce una transición en cierto porcentaje de la población espermática de un patrón de motilidad en el que el flagelo bate de forma simétrica, formando ondas de baja amplitud (típico movimiento progresivo) a un batir asimétrico formando ondas de alta amplitud (Yanagimachi et al. 1994). Se ha propuesto que este movimiento participa en el desprendimiento de los espermatozoides unidos al epitelio oviductal y confiere fuerza para ayudar a penetrar el cúmulo ovífero y la ZP (Suarez et al., 2008).

Los canales catiónicos de calcio CatSper son esenciales para el desarrollo de una motilidad hiperactivada en medio capacitante y es esencial para la fecundación, como demuestran Ren et al. (2001) con un ratón CatSper1 *-/-* y Quill et al. (2003) con un ratón CatSper2 *-/-*.

El proceso de hiperactivación depende de la presencia de AMPc, aunque no está claro que dependa de la fosforilación de tirosinas. El AMPc promueve la movilización de calcio intracelular en el flagelo (Ho y Suarez, 2003), mientras que CatSper facilita la entrada del calcio extracelular al espermatozoide (Alasmari et al., 2013). La progesterona es capaz de activar este canal *in vitro* (Smith et al., 2013), y dicha activación es parcialmente responsable de la liberación de los espermatozoides de las células del oviducto (Ho et al., 2009; Machado et al., 2019).

## 1.5.- EL RESERVORIO ESPERMÁTICO

### 1.5.1- INTRODUCCIÓN

El reservorio espermático funcional es la acumulación de espermatozoides en el istmo de los mamíferos (Fig. 8), a donde llegan tras atravesar la unión útero-tubárica (Hunter et al., 1980). En el reservorio espermático, los espermatozoides unidos a las células del epitelio del oviducto se encuentran en estado latente: presentan captación reducida de calcio (Dobrinski et al. 1997), la fosforilación de tirosinas se ve inhibida y se reduce al segmento ecuatorial a pesar de encontrarse en un medio capacitante (Luño et al., 2013, López-Úbeda et al., 2017) y el movimiento es limitado (Rodríguez-Martínez et al., 2005). Este almacenamiento es por tanto funcional, evita que todos los espermatozoides capaciten y lleguen al ovocito a la vez, lo que daría lugar a polispermia (Hunter y Leglise 1971; Suarez et al., 2016).

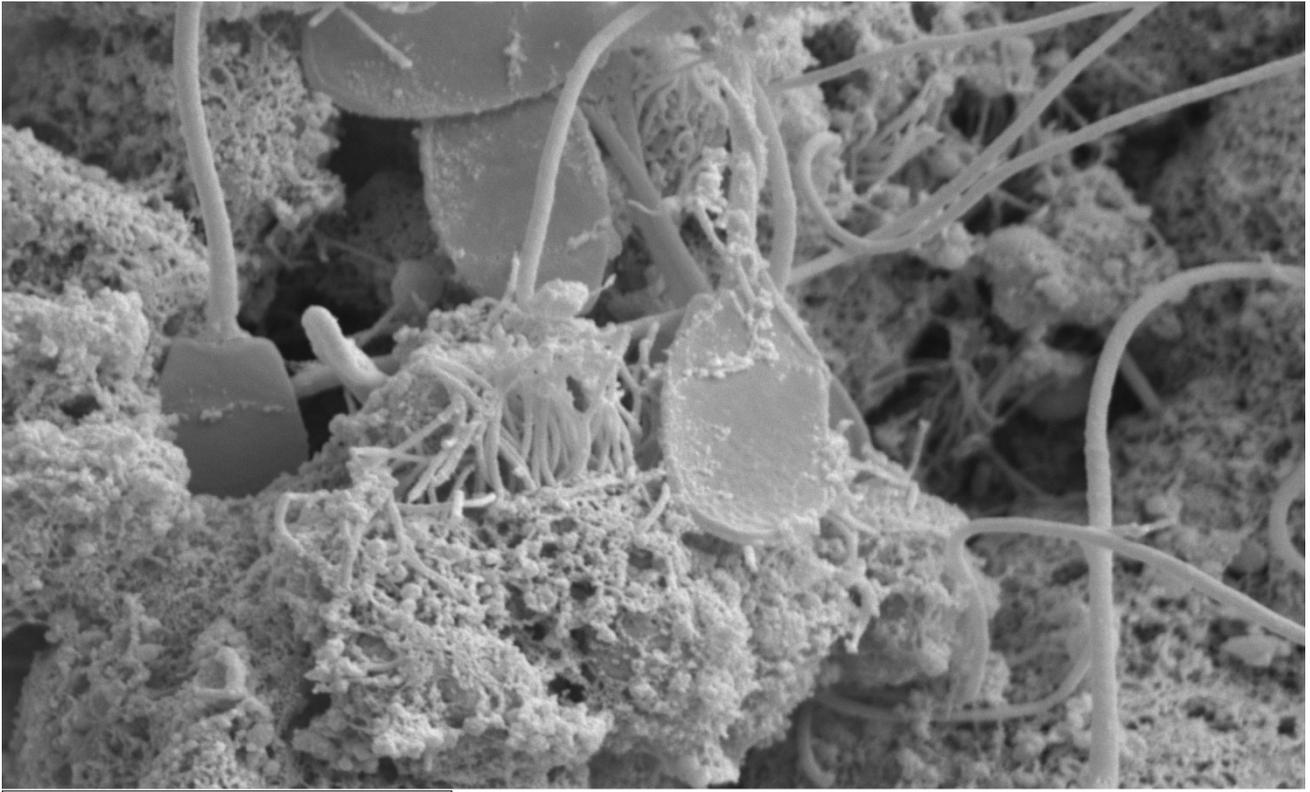


Figura 8. Foto de microscopía electrónica de barrido de espermatozoides porcinos unidos al epitelio oviductal (x4000). Barra de aumento = 10  $\mu$ m.

Además, recientemente se ha sugerido una selección de subpoblaciones espermáticas dentro del reservorio espermático, como puede ser el caso de los espermatozoides porcinos, donde se ha descrito selección negativa de los espermatozoides que se unen a DMBT1 (Teijeiro y Marini, 2012a). DMBT1 se une a una subpoblación de espermatozoides porcinos que presentan la proteína psoriasina en su superficie (S100A7) y mediante una ruta de señalización inducida por la fosforilación de AKAP4, genera una pérdida de motilidad e induce una RA prematura de estos espermatozoides (Teijeiro y Marini 2012b).

## 1.5.2- Papel de los azúcares en la formación del reservorio espermático

Entre las moléculas asociadas a la formación del reservorio espermático, la literatura científica apunta principalmente a la responsabilidad de los azúcares en múltiples especies de mamíferos. Los datos además apuntan a un código de reconocimiento especie-específico entre el espermatozoide y el epitelio oviductal dependiente de azúcares: en el hámster, se trata del ácido siálico (Demott et al., 1995), en la vaca es fucosa, concretamente el trisacárido Lewis<sup>a</sup> (Galβ1-3[Fucα1-4]GlcNAc) (Suarez et al., 1998) y en el caballo es galactosa (Dobrinski et al., 1996). En el cerdo, se han propuesto tres azúcares involucrados en la interacción del espermatozoide con el epitelio oviductal: O-glicanos con núcleo de oligomanosa, N-acetil-lactosamina 6-sialilada (Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAc) y el trisacárido Lewis<sup>x</sup> (Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAc). Este último trisacárido está presente tanto en glicoproteínas como en glicoesfingolípidos del epitelio oviductal porcino según Kadirvel y colaboradores (2012). A continuación, se hace un resumen de los experimentos y observaciones realizados por otros investigadores en la especie porcina.

### 1.5.2.1- Oligomanosa

Uno de los azúcares con un papel importante en la formación del reservorio espermático es la manosa. En ensayos de inhibición de la unión de espermatozoides de cerdo a agregados de células oviductales con azúcares simples, Green y colaboradores (2001) detectaron que este azúcar reduce notablemente la unión de los espermatozoides eyaculados de cerdo a agregados de células del epitelio oviductal. Wagner y colaboradores (2003) hicieron una serie de experimentos más precisos, al emplear la glicoproteína ovalbúmina, que posee una única N-glicosilación en la asparagina 292 con

un oligosacárido rico en manosa (Fig. 9), observándose una inhibición dosis dependiente y muy efectiva de la unión de espermatozoides eyaculados a agregados de células del epitelio oviductal ( $IC_{50}=1.3 \mu M$  de ovalbúmina).



Figura 9. Representación de la estructura del oligosacárido rico en manosa presente en la ovalbúmina. Los círculos verdes representan manosa y los cuadrados azules N-acetilglucosamina.

En un artículo posterior del mismo grupo de investigación, aislaron la espermadhesina AQN-1, que reconoce la estructura  $Man\alpha 1-3[Man\alpha 1-6]Man$ , y mostraron su papel en la unión del espermatozoide al oviducto con ensayos de inhibición preincubando las células oviductales con AQN-1 libre. Además, durante la capacitación *in vitro* detectaron una pérdida progresiva de la cantidad de AQN-1 de la superficie espermática desarrollando la hipótesis de que este cambio haría que los espermatozoides se liberasen gradualmente del epitelio oviductal (Ekhiasi-Hundrieser et al., 2005).

#### 1.5.2.2- 6-sialil-N-acetil-lactosamina

En unos experimentos con las glicoproteínas fetuina y asialofetuina, Mori y colaboradores (2000) determinaron que los espermatozoides tienen afinidad por glicoproteínas con N-glicanos ramificados con N-acetil-lactosamina terminal. En caso de que esta N-acetil-

lactosamina tuviese un ácido siálico unido a su extremo terminal, la afinidad del espermatozoide por la glicoproteína aumenta de forma drástica (de 25 a más de 100 espermatozoides unidos a bolas de agarosa con las glicoproteínas conjugadas). En el artículo describen que la interacción entre el azúcar y el espermatozoide es independiente de calcio y que se pierde tras reaccionar los espermatozoides, con lo que se propone la existencia de una lectina situada en la cara extracelular de la membrana plasmática del espermatozoide. Además, en ensayos de interacción con ovocitos fijados, observan una inhibición de la unión de los espermatozoides a la ZP dosis dependiente al emplear N-glicanos de la fetuina, sugiriendo que esta interacción puede ser importante en el reconocimiento de la ZP por el espermatozoide y, por tanto, para la fecundación.

Más adelante, Kadirvel y colaboradores (2012) llevaron a cabo un ensayo de afinidad de los espermatozoides de cerdo con una matriz de glicanos. Las sondas correspondientes a N-acetil-lactosamina biantenaria 6-sialilada (correspondiente a la porción glucídica mayoritaria en la glicoproteína fetuina) presentaron las mayores afinidades (Fig. 10), en un rango de 2068 a 11750 UFR (unidades de fluorescencia relativas). La inmunohistoquímica reveló tinción en las células del epitelio oviductal, tanto de células ciliadas como de secretoras, con independencia de la región o la fase del ciclo reproductivo de la cerda, estando presente el trisacárido 6-sialil-N-acetil-lactosamina incluso en el oviducto de cerdas prepúberes.

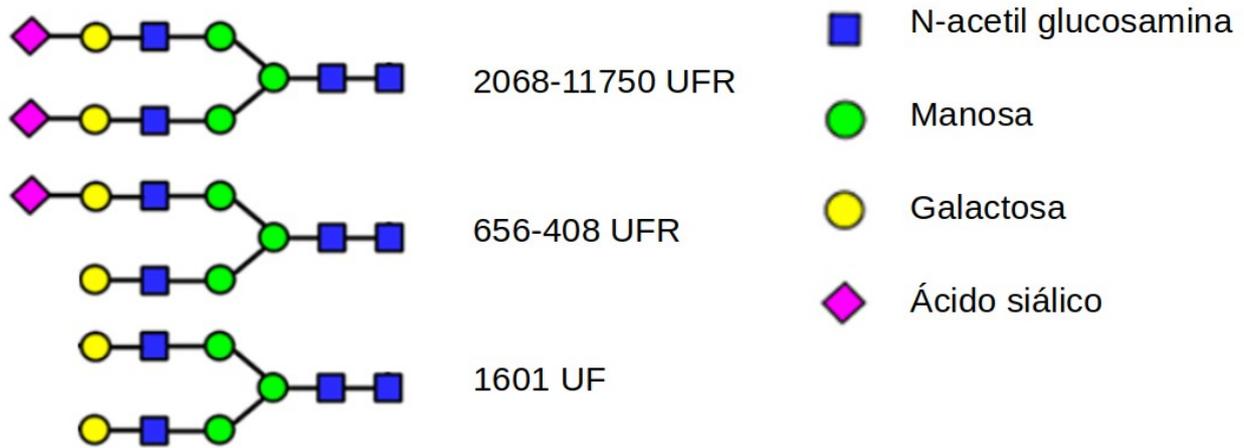


Figura 10. Estructuras con N-acetil-lactosamina y las UFR obtenidas en los experimentos de Kadirvel y colaboradores (2012).

Los ensayos de inhibición con la lectina I de *Sambucus nigra* (SNA), que reconoce ácido siálico con preferencia por la unión alfa-2,6 vs alfa-2,3 (Shibuya et al., 1987), y con anticuerpos contra la 6-sialil-N-acetil-lactosamina mostraron reducir sensiblemente la unión de espermatozoides a agregados de células de oviducto (Kadirvel et al., 2012). Por tanto, podemos concluir que la interacción con 6-sialil-N-acetil-lactosamina con el espermatozoide forma parte de los mecanismos de unión de esta célula tanto al epitelio oviductal como a la ZP en la especie porcina.

Mientras que Mori y colaboradores (2000) emplearon en sus experimentos espermatozoides de epidídimo, Kadirvel y colaboradores (2012) usaron espermatozoides de eyaculado, que han estado en presencia de plasma seminal. Sin embargo, ambos tienen afinidad por el oligosacárido, lo que sugiere que su afinidad se podría deber a una proteína presente en el espermatozoide epididimario. Además los ensayos de Kadirvel y colaboradores (2012), en los que se monitorizó la afinidad por N-acetil-lactosamina 6-sialilada durante la capacitación espermática mostraron dos cosas importantes: la

presencia de dos subpoblaciones espermáticas (una positiva para N-acetil-lactosamina 6-sialilada y otra negativa), y el descenso de la población con afinidad por el oligosacárido con la capacitación, lo que sería acorde con la hipótesis de liberación de los espermatozoides del reservorio espermático conforme avanza la capacitación.

#### 1.5.2.3- Lewis<sup>x</sup>

Mori y colaboradores (2000) detectaron otra interacción con el trisacárido Lewis<sup>x</sup> (Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc), aunque de menor afinidad que la obtenida para la N-acetil-lactosamina 6-sialilada en el mismo estudio (50 vs más de 100 espermatozoides unidos por bolas de agarosa). La interacción con Lewis<sup>x</sup> era independiente de la interacción con lactosamina 6-sialilada y además incompatible con la presencia de ácido siálico en la molécula (el reconocimiento de sialil-Lewis<sup>x</sup> por los espermatozoides de cerdo resultó ser casi nulo). Estos investigadores también observaron inhibición de la unión a ovocitos fijados usando lacto-N-fucopentaosa sugiriendo que el reconocimiento de Lewis<sup>x</sup> también es importante para la unión a la ZP.

Por otra parte, Kadirvel y colaboradores (2012), detectaron afinidad de los espermatozoides por sondas de la matriz de glicanos conteniendo dímeros y trímeros de Lewis<sup>x</sup> (Fig. 11). En este estudio la afinidad por Lewis<sup>x</sup> es también menor que la obtenida en la matriz para lactosamina 6-sialilada (de 2260 a 2741 URF), y de nuevo, la introducción de un ácido siálico en los mismos glicanos suponía un descenso de la afinidad claro (a 498 URF).

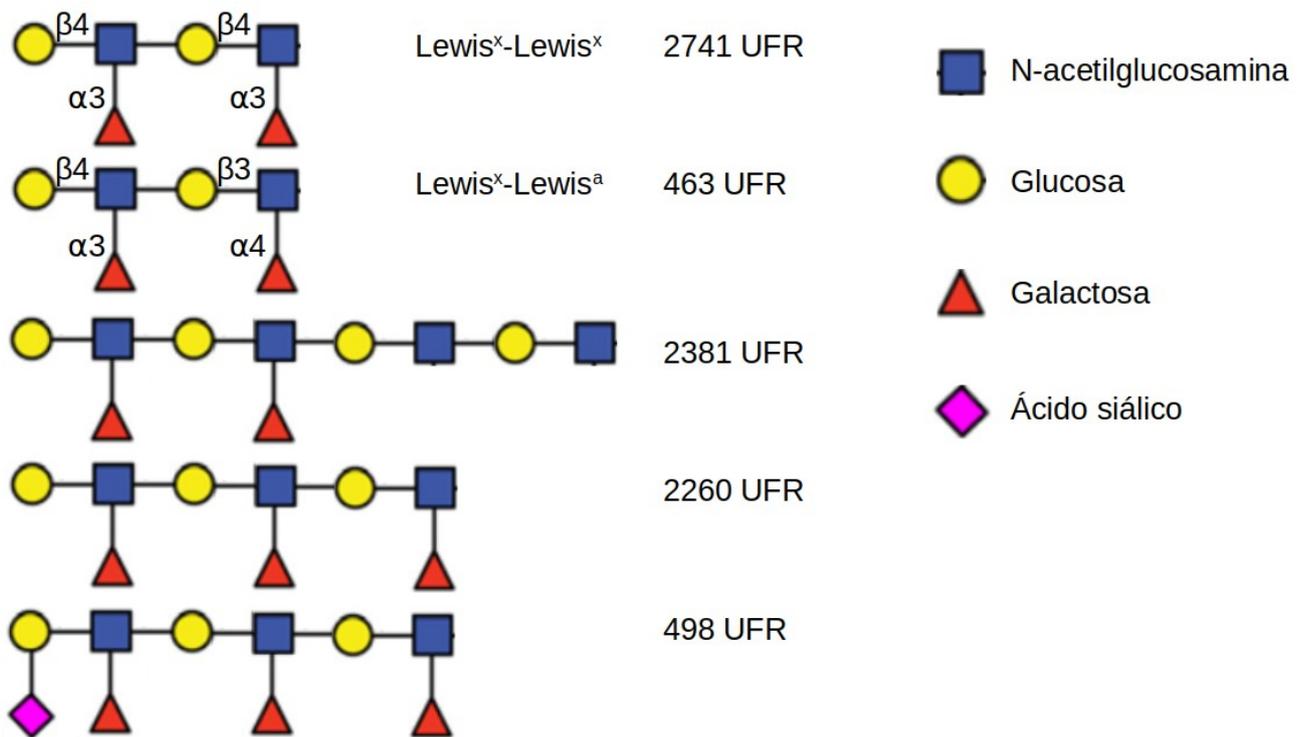


Figura 11. Estructuras con fucosa y las UFR obtenidas en los experimentos de Kadirvel y colaboradores (2012).

El mismo grupo de investigación prosiguió con el estudio de Lewis<sup>x</sup> en el artículo de Machado y colaboradores (2014), describiendo inhibición de la interacción entre el espermatozoide y agregados de células de oviducto cuando se añadía el oligosacárido o bien un anticuerpo contra él. Además, el porcentaje de espermatozoides positivos para Lewis<sup>x</sup> decayó bruscamente con la capacitación.

### 1.6.- PECULIARIDADES DEL CERDO COMO MODELO REPRODUCTIVO Y RETOS DE LA FECUNDACIÓN *IN VITRO* PORCINA

El principal reto de la FIV porcina sería reducir las elevadas tasas de polispermia, que en la práctica se traducen en tasas de fecundación monospérmica modestas, no superando el 45% (Romar et al., 2019), y en tasas de desarrollo hasta blastocisto en torno al 40-45% en las FIV más eficientes (Coy et al., 2008a; Batista et al., 2016). Se han propuesto varias

razones para explicar la elevada polispermia característica de la FIV porcina: maduración de los ovocitos subóptima (Coy y Avilés 2010), un exceso de espermatozoides reaccionados en el medio en el momento de la fecundación (Funahashi y Romar 2004) o que el uso de medios y materiales no emulan con fidelidad las condiciones *in vivo* necesarias para una fecundación óptima (Romar et al. 2016).

Para la mejora de la FIV se han desarrollado varias estrategias incluyendo el empleo de nuevos sistemas para las incubaciones, como el modelo rotativo, que eleva la monospermia de un 21.2% en cultivo convencional a un 48.3% (Kitaji et al., 2015) y la formación de blastocistos de un 20.8% a un 30.1%. En vez de realizarse la FIV en una placa de cultivo convencional, se coincubaron ovocitos madurados *in vitro* con espermatozoides en tubos de 200 µl que se mantuvieron en agitación lenta (1 rpm) en un agitador rotacional.

Por otra parte, se ha experimentado con la incubación con FO de la fase folicular (Coy et al., 2008a; Cánovas et al., 2017), proteínas oviductales como oviductina (OVGP1) (Kouba et al., 2000; McCauley et al., 2003), osteopontina (SPP1) (Hao et al., 2006), plasminógeno/plasmina (Mondéjar et al., 2012), DMBT1 (Ambruosi et al., 2013), o HSPA8 (Moein-Vaziri et al., 2014), e incluso con otras moléculas (sildenafil, relaxina o fosfopéptidos de caseína son algunas de las que mejor resultado han dado). No obstante, suplementar el medio con una sola molécula no parece la solución definitiva para mejorar la eficiencia de la FIV porcina, algo corroborado por el hecho de que los mejores resultados obtenidos hasta la fecha se han logrado suplementando el medio con un 1% de FO (Romar et al., 2019).

Tabla 2. Proteínas coincubadas con los gametos en FIV porcina. La eficiencia definida en base al número de cigotos monospermicos.

Proteína	Concentración	Origen del semen	Gametos coincubados	Eficiencia	Incremento de la eficiencia	Blastocistos	Referencia
OVGP1	10 µg/ml	Congelado	Ambos	44.6%	15.8%	28.4%	Kouba et al., 2000
OVGP1	10 µg/ml	Eyaculado	Ambos	47.2%	17.6%	34.7%	McCauley et al., 2003
SPP1	0.1 µg/ml	Congelado	Ambos	46.7	14.4%	N.D.	Hao et al., 2006
PLG (plasminógeno)	75 µg/ml	Eyaculado	Ambos	28.9%	10.9%	N.D.	Mondéjar et al., 2012
PLG (plasmína)	75 µg/ml	Eyaculado	Ambos	38.8%	28.1	N.D.	Mondéjar et al., 2012
HSPA8	1 µg/ml	Eyaculado	Espermatozoides	42.1%	20.6%	23.7%	Moein-Vaziri et al., 2014
DMBT1	1 µg/ml	Eyaculado	Ovocitos	48%	23%	N.D.	Ambruosi et al., 2013
FO porcino	1%	Eyaculado	Ambos	52.3%	31.7%	44.50%	Cánovas et al., 2017

Otro enfoque novedoso, fue el endurecimiento artificial de la ZP mediante el uso de agentes reticulantes, que permitió reducir la polispermia, aumentando la eficiencia de una FIV con una alta concentración espermática desde un 5.1% del control a un 47.6% (Coy et al., 2008b).

Sin embargo, en la presente tesis doctoral, nos centraremos en seleccionar poblaciones espermáticas en base a un biomarcador de la superficie espermática mediante separación por citometría de flujo.

## 1.7.- SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

### 1.7.1.- INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida emplean rutinariamente protocolos de selección como la centrifugación de gradientes de Percoll (Lessley y Garner, 1983) o el procedimiento de *swim-up* (Holt et al., 2010) que permiten descartar espermatozoides

muertos, con motilidad pobre o con el ADN fragmentado (Pertorft, 2000). Otra técnica empleada en ganadería busca obtener descendencia de un solo sexo de interés, mediante citometría de flujo y sorting (“Separación celular mediante citometría de flujo”; Rath et al., 2015).

Entre las técnicas menos convencionales de selección, pero aplicadas en el laboratorio, están la selección por quimiotaxis (Li et al., 2018; Domínguez et al., 2018) y la realizada con anticuerpos o lectinas contra biomarcadores negativos presentes en la superficie del espermatozoide (Odhiambo et al., 2014). También se ha aplicado la selección celular mediante aptámeros de ADN para descartar espermatozoides dañados en bovino (Farini et al., 2016).

#### 1.7.2.- SORTING PARA SEXAJE DE ESPERMATOZOIDES

Para la industria ganadera, controlar el sexo de los animales de producción tiene especial importancia. En el caso de la especie porcina, podría suponer un importante beneficio económico la cría de un mayor número de hembras, al tener un crecimiento más rápido que los machos y evitar el empleo de la castración (Rath et al., 2015).

La primera separación de espermatozoides mediante citometría de flujo fue llevada a cabo por Pinkel et al. (1982) con espermatozoides del roedor *Microtus oregoni*. La técnica se refinó y fue usada con éxito por Johnson et al. (1989), que consiguieron descendencia viva con espermatozoides sexados e inseminación intrauterina en conejos. En 1991 el mismo investigador logró obtener lechones mediante inseminación en oviducto de cerda de espermatozoides sexados de verraco (Johnson, 1991). Nuevos estudios incluyeron su

aplicación con éxito en FIV porcina (Rath et al., 1999) e incluso en inseminación intrauterina profunda también en cerdo (Martínez et al., 2001).

La técnica de sorting tiene sus limitaciones en cuanto al número de espermatozoides que se pueden obtener por unidad de tiempo, lo que dificulta su aplicación comercial en IA (Rath et al, 2015). Sin embargo, se puede obtener un número suficiente de espermatozoides para otras aplicaciones como puede ser la FIV (Rath et al., 1999), lo que abre nuevas posibilidades al empleo de esta técnica para separar otro tipo de subpoblaciones espermáticas como han hecho Petelak y Krylov (2019) para seleccionar espermatozoides porcinos en base a su ubiquitinización, o De Geyter et al. (2019) para eliminar espermatozoides humanos con ADN fragmentado.

### 1.7.3.- TÉCNICAS DE SELECCIÓN NEGATIVA

La selección en base a biomarcadores de la superficie del espermatozoide ya ha sido empleada en varios trabajos científicos, llevándose además a cabo en ensayos de campo con animales de ganadería (Odhiambo et al., 2014), o incluso en las clínicas de fertilidad humana (Gil et al., 2013).

En la especie humana, la tecnología empleada se basa en el MACS (del inglés **M**agnetic **A**ctivated **C**ell **S**orting) y en que la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido que en condiciones normales se encuentra situado en la cara citosólica de la membrana plasmática, se transloca a la superficie extracelular en ausencia de actividad de la flipasa compuesta por ATP11C y TMEM30A (Segawa et al., 2014). La apoptosis conlleva la pérdida de actividad flipasa y la translocación de la fosfatidilserina, reconocible en la superficie por la proteína anexina V (Meers et al., 1991). Si se recubre de anexina V la superficie de unas bolas de

agarosa con núcleo magnético, pueden utilizarse para secuestrar los espermatozoides apoptóticos (Grunewald et al., 2001). Esta técnica no se puede aplicar a espermatozoides en medio capacitante de especies como la porcina debido a que durante la capacitación, el cambio en la permeabilidad de su membrana plasmática genera una translocación de los fosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE) y PS a la cara extracelular sin que esto comprometa su viabilidad (Harrison y Gadella, 2004).

En el toro, empleando la tecnología MACS asociada a la lectina de *Arachis hypogaea* (PNA, del inglés **PeaNut Agglutinin**), Odhiambo et al. (2014) consiguieron mejorar la IA, con un incremento del 10% en las tasas de concepción. La lectina PNA se une a los espermatozoides con el acrosoma dañado, por lo que la tecnología MACS permite eliminar estos espermatozoides de las dosis de inseminación en la vaca. En la FIV, la selección negativa con PNA o con anticuerpos contra ubiquitina dieron resultados aún mejores, puesto que los porcentajes de fecundación fueron un 20 y un 25% superiores a sus controles respectivamente.

## 2.- HIPÓTESIS INICIAL

Existen diferentes subpoblaciones espermáticas en el cerdo con afinidades distintas por cada azúcar involucrado en el reservorio espermático y/o la unión a la ZP. Una selección en base a la interacción con estos azúcares puede tener un efecto sobre el rendimiento de la FIV porcina.

### 3.- OBJETIVOS

- 1) Desarrollar una técnica que permita la separación de subpoblaciones espermáticas en base a su afinidad por azúcares.
- 2) Evaluar la capacidad de unión a la ZP porcina de las subpoblaciones espermáticas seleccionadas.

### 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1.- COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS

##### 4.1.1.- CONSERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

Los espermatozoides porcinos se conservaron en *Beltville Thawing Solution* (BTS) a 17 °C hasta su uso. Este medio se prepara siguiendo la formulación de Pursel y Johnson (1975): 0.2 M de glucosa, 3.36 mM de Na<sub>2</sub>-EDTA, 15 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM de citrato sódico y 5 mM de KCl.

##### 4.1.2.- MEDIO NO CAPACITANTE

Para coincubar los espermatozoides con las glicoproteínas ovalbúmina y fetuina conjugadas con fluorocromos, se empleó el medio ncTALP descrito por Kadirvel et al, 2012, compuesto por: 2.1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 3.1 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.29 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.36% ácido láctico, 0.6% PVA y 35 mM de HEPES, se equilibró el pH en 7.3 y se filtró. En el momento de su uso se suplementó con 1 mM de piruvato sódico.

#### 4.1.3.- MEDIO TTG-EY 2%

El medio TTG-EY consta de 158 mM de TES (ácido N-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetanosulfónico), 72 mM de Tris (tris[hidroximetil]aminometano) y 8 mM de glucosa equilibrada a pH 7.2 y suplementada con un 20% de yema de huevo. Tras suplementar se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos y se filtró el sobrenadante con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore).

#### 4.1.4.- MEDIO DE FIV

Se utilizó el medio TALP, según la formulación de Rath et al, 1999, compuesto por: 114.06 mM de NaCl, 25.07 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 3.20 mM de KCl, 0.35 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 8 mM de lactato cálcico, 10 mM de lactato sódico, 5 mM de glucosa, 2 mM de cafeína, 0.17 mM de sulfato de kanamicina, 1 mg/ml de PVA y 1  $\mu\text{g/ml}$  de rojo fenol. Se esterilizó pasando a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Merck Millipore) y conservó a 4°C.

El día de su uso se suplementó con 3 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, fracción V libre de ácidos grasos) y 0.12 mg/ml de piruvato sódico. El medio se equilibró incubando a 38.5 °C en atmósfera humidificada con 5%  $\text{CO}_2$  3 horas antes.

#### 4.2.- CONJUGACIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS CON FITC

Las glicoproteínas se conjugaron con 5(6)-isotiocianato de fluoresceína (FITC) siguiendo el protocolo descrito por Aspholm et al., 2006. La glicoproteína, a una concentración de 2 mg/ml se conjugó con el FITC (1 mg/ml, en DMSO) incubando en agitación lenta en 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  durante 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se bloquearon las

moléculas de FITC libres añadiendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hasta alcanzar una concentración de 0.55 mM y agitando suavemente durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, la proteína fluorescente se lavó usando un centrífugo con tamaño de poro de 10 kDa (Vivaspin 500, 10000 MWCO, Sartorius), una vez con 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5 M NaCl, y tres veces con tampón fosfato (0.0754 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.0246 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). La proteína fluorescente se preservó en tampón fosfato con un 5% de glicerol en alícuotas congeladas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.- OBTENCIÓN DE OVOCITOS INMADUROS Y SELECCIÓN

Los ovarios se obtuvieron en el matadero El Pozo en Alhama de Murcia. Los ovarios se separaron del resto del aparato reproductor femenino de cerdas prepúberes y se depositaron en solución salina (0.9g/l NaCl) en un termo a  $38.5\text{ }^\circ\text{C}$ . Se transportaron al laboratorio en los 30 minutos siguientes y se lavaron en solución de cetrimida (0.9g/l NaCl, 0.4% masa/volumen cetrimida).

Los ovocitos fueron obtenidos mediante la aspiración de folículos de 3-6 mm de diámetro con ayuda de una aguja de 18 G acoplada a una jeringuilla de 10 ml. El contenido folicular se deja decantar durante 10 minutos a  $38.5\text{ }^\circ\text{C}$ , se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en PBS ( $\text{NaCl}$  1.37 M, KCl 27 mM, 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 18 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) con 1% BSA y se transfiere a placas de Petri.

Con ayuda de una lupa binocular se seleccionan los complejos cúmulo-ovocito (CCOs) que posean 4-5 capas compactas de células del cúmulo que cubran el ovocito de forma uniforme y un citoplasma denso y homogéneo.

#### 4.4.- OBTENCIÓN DE ZONAS PELÚCIDAS

Los ovocitos fueron decumulados en una solución de 1 mg/ml de hialuronidasa (Sigma, ref. H2126) en PBS durante 15 minutos, utilizando como estímulo mecánico un pipeteo enérgico cada 3 minutos.

Los ovocitos decumulados se transfirieron a nuevos pocillos con PBS e inhibidor de proteasas de amplio espectro (contra serín y cisteín-peptidasas y metalopeptidasas, de Roche, ref. 11697498001, disolviendo una pastilla en 20 ml de PBS) y se desnudaron con ayuda de una pipeta con un diámetro de apertura inferior al de los ovocitos. Las zonas pelúcidas (ZP) así obtenidas se lavaron 3 veces en PBS para eliminar restos celulares.

#### 4.5.- PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

En primer lugar, se determina la concentración de espermatozoides en la muestra con una cámara Neubauer. La concentración final se ajusta a 20 millones de espermatozoides/ml en ncTALP y se centrifugan a 300 g durante 10 minutos, se recoge el sobrenadante y se centrifuga a 800 g durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspende en ncTALP.

#### 4.6.- COINCUBACIÓN CON LAS GLICOPROTEÍNAS FLUORESCENTES

Al tubo de 1.5 ml con 1 ml de medio ncTALP y 20 millones de espermatozoides/ml se le añaden 2 µl de la solución comercial de ovalbúmina fluorescente, o 5 µl de la solución de fetuina conjugada con FITC. Se deja también un control negativo sin marcaje. Las muestras se incuban a 37 °C en ausencia de CO<sub>2</sub> durante 45 minutos y se centrifugan a

800 g durante 10 minutos 2 veces para eliminar el exceso de glicoproteínas no unidas a los espermatozoides.

#### 4.7.- CITOMETRÍA DE FLUJO Y SORTING

La citometría de flujo y sorting de las muestras se lleva a cabo en un citómetro Cell Sorter SH800Z de SONY. Se empleó el láser de excitación de 488 nm y el filtro óptico FL1 (525/50) para la detección de la fluorescencia emitida por FITC en el caso del marcaje con fetuina, y el láser de excitación de 638 nm con el filtro óptico FL4 (665/30) para la detección de la fluorescencia emitida por Alexa Fluor 647 en el caso de la ovalbúmina.

Los espermatozoides pasaron a un caudal de entre 3000 y 8000 células/segundo por el aparato, separando la subpoblación negativa de la positiva en el caso de cada marcaje mediante el método de pureza: asegurando que todas las células de cada subpoblación tienen un porcentaje de contaminación por la otra subpoblación inferior al 5%.

Tras haber separado al menos 300000 espermatozoides de la subpoblación minoritaria, las muestras se recogen en tubos estériles de 15 ml con 200 µl de tampón TTG-EY y posteriormente se centrifugan a 800 g y resuspenden en medio TALP, haciendo los cálculos necesarios para depositar en los pocillos  $10^4$  espermatozoides/ml con 40-50 ZPs u ovocitos .

#### 4.8.- EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA

La viabilidad espermática se evalúa mediante tinción con yoduro de propidio (IP) coincubando con este reactivo durante 5 minutos antes de medir en un citómetro FC500

(Beckman Coulter) equipado con un láser de excitación de 488 nm y un filtro de 617/30. La población IP + determina el porcentaje de espermatozoides no viables. Se consideran los grupos experimentales correspondientes a cada subpoblación separada mediante el sorter, un control negativo incubado durante el mismo tiempo en ncTALP y un control de daños producidos por el sorter con espermatozoides no marcados.

#### 4.9.- ENSAYO DE AFINIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDEOS POR LAS ZP

Se incuban los espermatozoides ( $10^4$  espermatozoides/ml) con 50 ZPs en pocillos con 500  $\mu$ l de TALP durante 30 minutos a 37 ° C y 5 % CO<sub>2</sub>. Las ZPs se lavan 3 veces en PBS y se fijan en glutaraldehído al 0.5% durante 30 minutos. Después se tiñen con Hoechst 33342 (5  $\mu$ g/ml) para teñir el núcleo de los espermatozoides unidos a las ZPs y se incuban en oscuridad durante 1 hora, pudiéndose mantener a 4° C hasta su observación a 400x en un microscopio invertido ix70.

### 5.- RESULTADOS

#### 5.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

En cuanto a las poblaciones espermáticas caracterizadas mediante citometría de flujo nos encontramos dos poblaciones en los tres casos analizados. En el caso de la fetuína, los espermatozoides no capacitados muestran mayoritariamente marcaje positivo, mientras que para ovalbúmina y Le<sup>a</sup>, la subpoblación negativa predomina (figura 12). Ambas subpoblaciones en todos los casos se presentaron como dos picos en los histogramas con un área solapante, y esto se tuvo en cuenta para la separación mediante

sorting dejando un área entre medias de los dos grupos a separar para tener poblaciones más puras.

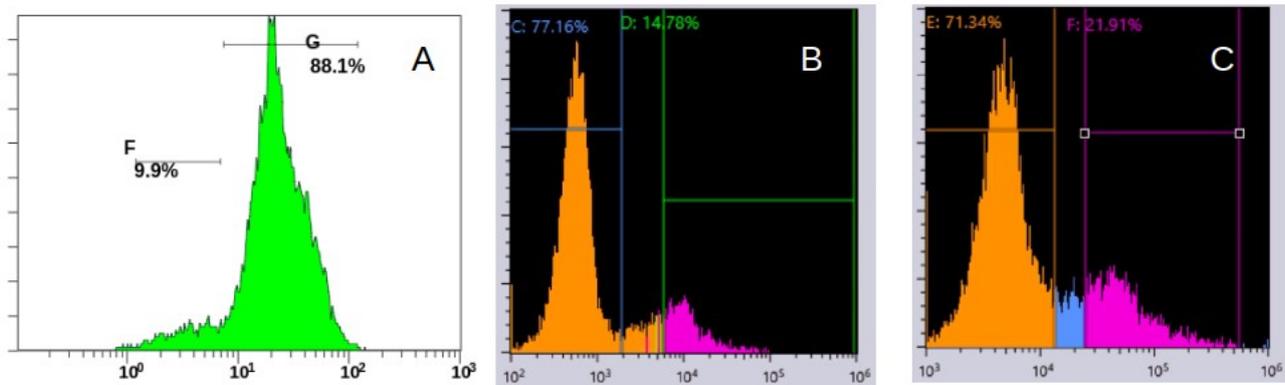


Figura 12. Histogramas representativos de espermatozoides porcinos no capacitados marcados con: A) fetuina (F subpoblación negativa, G subpoblación positiva), B) Le<sup>a</sup> (C población negativa, D población positiva), C) ovalbúmina (E población negativa, F población positiva).

## 5.2. SEPARACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS MEDIANTE SORTING

### 5.2.1. VIABILIDAD

La viabilidad de las subpoblaciones espermáticas sin capacitar evaluada mediante citometría de flujo con IP se puede consultar en la tabla 3. Como puede observarse, la viabilidad de las subpoblaciones negativas para ambos glicanos es superior que la de las subpoblaciones positivas (Fig. 13).

Tras un par de intentos de hacer sorting con espermatozoides incubados con las glicoproteínas en medio capacitante se tuvo que desistir: la viabilidad caía por debajo del 50% en todos los grupos, haciendo inviable esta metodología.

Tabla 3. Porcentaje de espermatozoides viables tras el sorting en cinco replicados con semen de cinco machos diferentes. El p-valor corresponde a un t-test pareado de doble cola.

Le <sup>a-</sup>	Le <sup>a+</sup>	OVA-	OVA+	Control
93.7	70.5	94.8	73.2	78.7
88.4	71	88.7	70.2	79.7
87.3	59.3	90.4	63.5	
86.3	51.8	89.3	56.3	79
90.6	46.5	88.4	53.7	82.2
89.3±3.0	59.9±11.0	90.3±2.6	63.4±8.5	79.9±1.6
p-value = 0.003		p-value = 0.001		

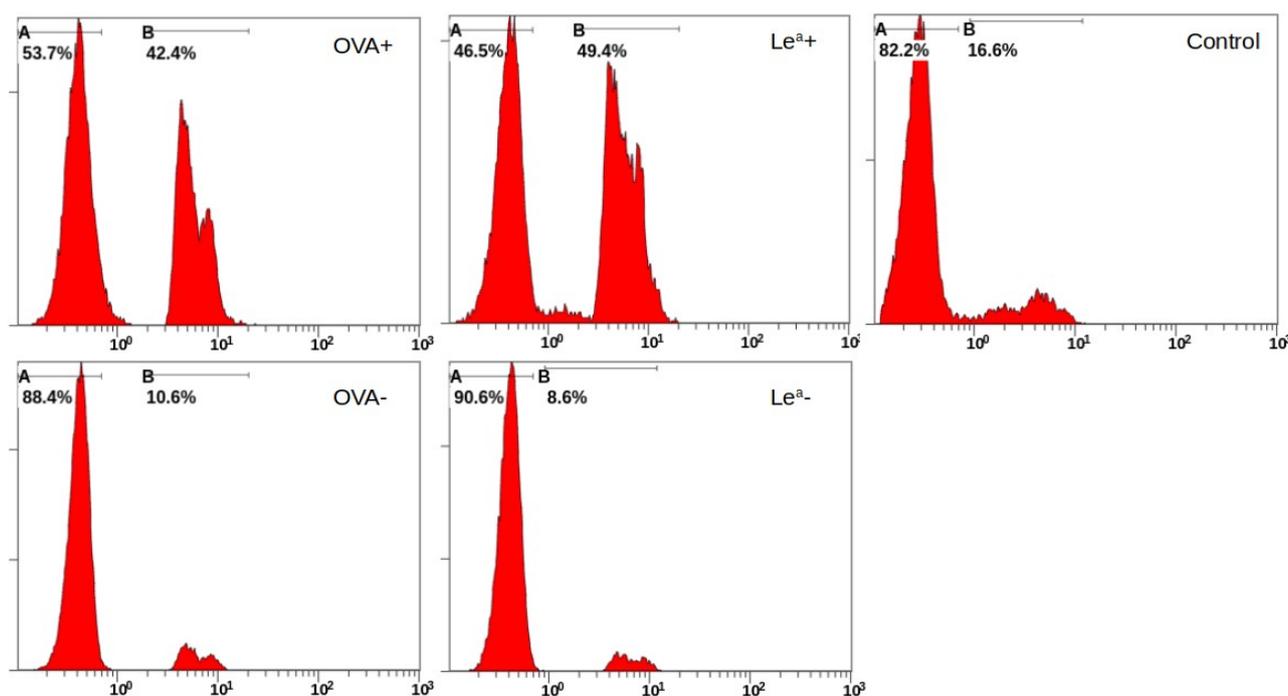


Figura 13. Histogramas de uno de los replicados de sorting evaluado con tinción con IP. La población A incluye los espermatozoides IP – (membrana intacta, viables), y la B los IP+ (membrana dañada, no viables).

### 5.2.2. AFINIDAD POR LA ZP PORCINA.

El sorting disminuye la afinidad de los espermatozoides por la ZP (control vs sorted, p-valor < 0.0001), pero las subpoblaciones Ova- y Le<sup>a-</sup> mantienen mejor la capacidad de adhesión que sus contrapartes positivas (Ova- vs Ova+ y Le<sup>a-</sup> vs Le<sup>a+</sup>, ambas con un p-valor < 0.0001). Además, ambas subpoblaciones negativas se unieron con mayor afinidad por la ZP que el control de espermatozoides pasados por el citómetro sin discernir entre subpoblaciones (p-valor <0.0001 para Le<sup>a-</sup> vs sorted, p-valor = 0.0003 para Ova- vs sorted). No obstante, los espermatozoides no metidos en el citómetro de flujo siguen uniéndose en mayor cantidad a las ZPs (control vs Le<sup>a-</sup> y vs Ova-, ambas con p-valor < 0.0001). Los datos numéricos de afinidad por la ZP evaluada mediante tinción con Hoescht 3342 se puede consultar en el gráfico de cajas de la figura 14.

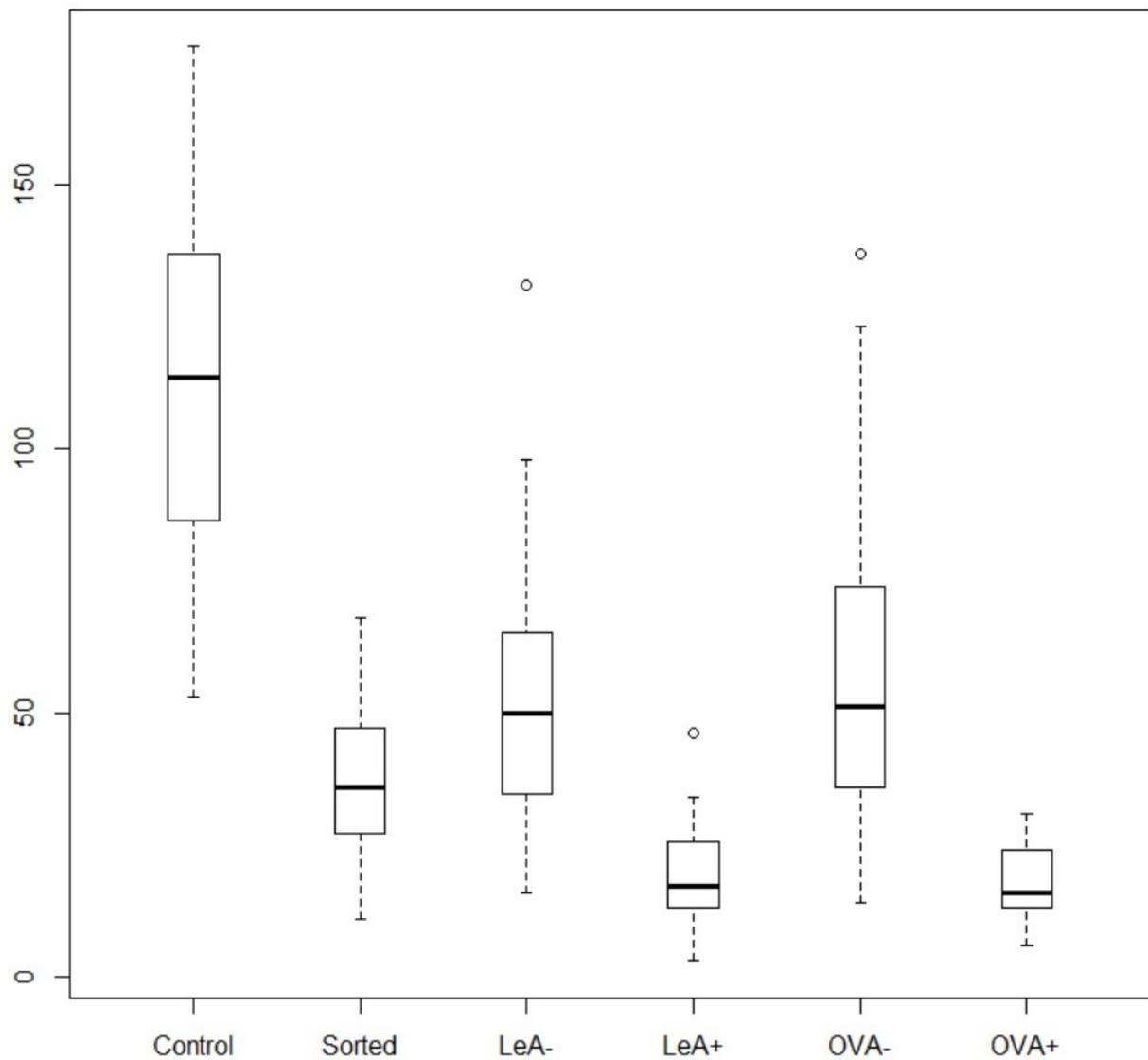


Figura 14. Número de espermatozoides unidos por ZP (tras 5 experimentos de afinidad por la ZP incluyendo 150 ZPs por grupo entre los cinco replicados). El grupo control incluye espermatozoides no introducidos en el citómetro de flujo. El grupo “sorted” incluye espermatozoides que se sometieron a sorting sin marcar ni separar.

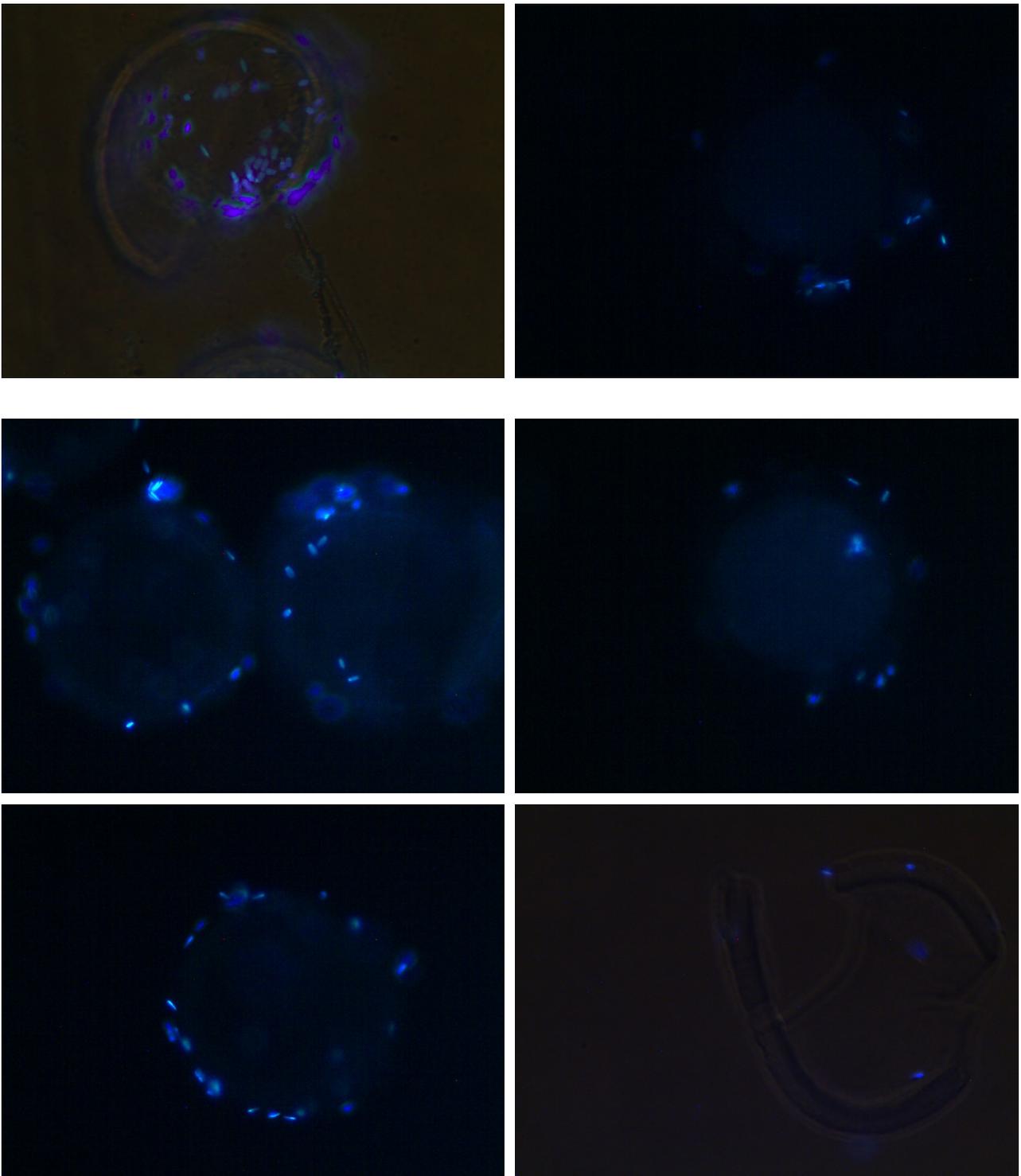


Figura 15. Fotografías de los espermatozoides marcados con Hoescht 3342. A: control. B: sorted. C: Le<sup>a-</sup>. D: Le<sup>a+</sup>. E: OVA-. F: OVA+

## 6.- DISCUSIÓN

La selección espermática en base a marcadores moleculares tiene una aplicación clara en clínicas de infertilidad actualmente: separando los espermatozoides apoptóticos con elevados niveles de fragmentación del ADN el rendimiento de la técnica de ICSI (del inglés **I**ntracytoplasmic **S**perm-**I**njection) (Pacheco et al., 2020). Por otra parte el sorting se ha empleado en muchas especies para seleccionar de forma muy eficiente los espermatozoides portadores de un cromosoma X o Y (Rath et al., 2015). En nuestro caso, la separación de subpoblaciones espermáticas en base a su afinidad por azúcares mediante sorting es posible como demuestran nuestros experimentos. Las subpoblaciones de espermatozoides no capacitados con marcaje negativo para ovalbúmina y Le<sup>a</sup> tienen una mayor afinidad por la ZP que las subpoblaciones positivas.

### 6.1.- OVALBÚMINA, INTEGRIDAD ESPERMÁTICA Y UNIÓN A LA ZP

Los ensayos de inhibición de la unión a células oviductales con ovalbúmina de Wagner y colaboradores (2003) se hicieron en condiciones capacitantes. En estas condiciones se desenmascaran proteínas que no se pueden detectar en la superficie de espermatozoides no capacitados (Zigo et al., 2013; Castillo et al., 2019). Entre ellas, podría estar la lectina que reconoce las estructuras ricas en manosa de la ovalbúmina. Nosotros no conseguimos hacer el sorting tras capacitar y manteniendo los espermatozoides en medio capacitante sin perder la viabilidad, probablemente debido al incremento excesivo de ROS en el medio. Este incremento en ROS es fruto de las condiciones capacitantes, que promueven estrés oxidativo como describen Aitken y colaboradores (2017), y del sorting en sí. Al hacer la incubación con ovalbúmina de espermatozoides no capacitados, esperaríamos un porcentaje alto de espermatozoides Ova- como reflejan los resultados,

debido a que son los espermatozoides capacitados los que presentan afinidad por la porción glicídica rica en manosa de la ovalbúmina de acuerdo con el trabajo de Wagner y colaboradores (2003). En contrapartida, gran parte de los espermatozoides no capacitados Ova+ son anómalos porque no han estado en contacto con medio capacitante para adquirir afinidad por manosa y probablemente no sean viables para fecundar un ovocito. Esto concuerda con unos porcentajes de marcaje con IP muy superiores en la subpoblación Ova+: su membrana plasmática está dañada.

## 6.2.- LEWIS<sup>a</sup>, INTEGRIDAD ESPERMÁTICA Y UNIÓN A LA ZP

Con Le<sup>a</sup> puede suceder algo similar a lo visto con la ovalbúmina puesto que Machado y colaboradores (2014) observaron que la afinidad por este trisacárido aumentaba un 25% en espermatozoides capacitados vs no capacitados. Si los espermatozoides no han estado expuestos a condiciones capacitantes, la presencia de la lectina que reconoce Le<sup>a</sup> en la superficie es aberrante.

## 6.3.- ANÁLISIS CRÍTICO Y POSIBLES EXPERIMENTOS FUTUROS

La utilidad práctica de seleccionar subpoblaciones espermáticas en base a marcadores de superficie de naturaleza glicídica combinada con el sorting parece limitada de acuerdo a nuestros resultados.

Mientras nuestro laboratorio realizaba los últimos replicados de ensayos de afinidad por la ZP, se publicó un artículo (Winters et al., 2019) del grupo del Dr. Miller en el que afirman que la unión a diferentes sondas glicídicas no tiene un valor pronóstico sobre las tasas de embarazo en inseminación artificial, mientras que la afinidad por células oviductales sí lo

tiene. Habiendo utilizado 30 verracos para hacer un total de 6789 inseminaciones en 15 granjas diferentes sus resultados parecen sólidos, y demuestran que no hay correlación entre la afinidad por las diferentes sondas glucídicas vs las tasas de embarazo, el tamaño de camada o la fecundidad de los verracos. Sin embargo, un análisis de regresión lineal múltiple que incluye la variable de unión a células de epitelio oviductal sí es útil para predecir la tasa de embarazo de los eyaculados porcinos, lo que confirma resultados previos de otros autores (Waberski et al., 2005; Daigneault et al., 2015). Esto sugiere que otros factores de naturaleza no glucídica juegan un papel más importante en la formación del reservorio espermático y por tanto la selección se debería hacer en base a la afinidad de los espermatozoides por ellos.

Para trabajos posteriores, podría ser interesante, por ejemplo, realizar una selección basada en otros factores de naturaleza no glicídica. Posibles candidatos son las anexinas, cuyo papel en la formación de los reservorios espermáticos bovino y porcino es conocida (Ignatz et al., 2007; Tejeiro et al., 2009) y la fibronectina, proteína de la superficie del epitelio oviductal reconocida por la integrina  $\alpha 5\beta 1$  del espermatozoide (Oszycka-Salut et al., 2017). Curiosamente, la fibronectina posee una porción glicídica con lactosamina 6-sialilada (Sharif et al., 2021), por lo que su afinidad por el espermatozoide porcino implicaría dos mecanismos moleculares diferentes: uno integrina-RGD y otro lectina-azúcar. Este detalle la convierte en un candidato importante para seleccionar a los espermatozoides porcinos en base a sus marcadores de superficie.

Por otra parte, el sorting produce alteraciones en los espermatozoides que disminuyen su capacidad para interactuar con la zona pelúcida. En otro trabajo anterior (Winters et al., 2018), habían observado que los espermatozoides porcinos sometidos a sorting para el sexado tenían una capacidad menguada para unirse a agregados de células oviductales,

en la línea de nuestro resultado que muestra una menor adhesión a la ZP debido al sorting. Para unirse tanto a la ZP como a las células oviductales, los espermatozoides deben conservar viabilidad y motilidad, mientras que para unirse a glicoproteínas presentes en la disolución no. La reducción tras el sorting en los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática explicaría por qué hay menos espermatozoides unidos a la ZP con respecto al grupo control (Winters et al., 2018).

Otro efecto detrimental del sorting (observado en la especie bovina) es una disminución de las tasas de blastocisto obtenidas a pesar de que los espermatozoides seleccionados mediante sorting por sexo carecen de ADN dañado y el porcentaje de embriones divididos en día 2 es superior a un control de FIV convencional (Blondin et al., 2009). Teniendo en cuenta ambas desventajas, sería preferible una alternativa que evitase la citometría de flujo como medio para separar y seleccionar subpoblaciones espermáticas.

Una alternativa al sorting sería el empleo de bolas de agarosa con los factores de selección conjugados de forma similar al sistema MACS ya empleado con anexina V (Grunewald et al., 2001) o con ubiquitina (Odhiambo et al., 2014). Sin embargo, al contrario de la anexina V o la ubiquitina que implican una selección negativa de los espermatozoides (los positivos se descartan), con moléculas involucradas en el reservorio espermático la selección es positiva. La liberación podría ser progresiva y espontánea como en el caso de utilizar bolas de agarosa recubiertas por ZP2 (Avella et al., 2016) o planificada. Este tipo de liberación debe ser eficiente y no dañina de los espermatozoides de su ligando de la superficie de las bolas de agarosa, y en la medida de lo posible sería preferible no emplear el ligando en disolución. Para ello, propongo emplear progesterona, que media la liberación de los espermatozoides porcinos del epitelio oviductal (Sharif et al., 2021). De esta forma, se podría incubar espermatozoides en medio no capacitante en

una columna con bolas de agarosa recubiertas de fibronectina, coger las bolas de agarosa y pasarlas a un medio capacitante con progesterona y los ovocitos para hacer una FIV o estudiar la afinidad de los espermatozoides seleccionados por la ZP. El grupo control serían aquellos espermatozoides sin afinidad por fibronectina, que se lavarían también y pondrían en medio de FIV con los ovocitos y la progesterona en la misma dosis.

Al intentar emular *in vitro* el reservorio espermático, podría minimizarse el problema principal de la FIV porcina: la polispermia. Hunter y Leglise (1971), llevaron a cabo una cirugía de resección del istmo seguida de anastomosis entre los dos extremos seccionados. Eliminando la localización del reservorio espermático porcino, se produjo polispermia en un 32.4% de los ovocitos *in vivo*. Este experimento demuestra la importancia del reservorio espermático *in vivo* para evitar la polispermia en la especie porcina. ¿Y si pudiésemos recrear el reservorio espermático *in vitro*? ¿Se podría evitar o reducir la polispermia de forma significativa?

## PARTE II: MODIFICACIONES EN EL OVIDUCTO DE CONEJA DURANTE LA OVULACIÓN Y EL DESARROLLO TEMPRANO PREIMPLANTACIONAL

Esta parte de la tesis pretende investigar el patrón de expresión de ARNm en el oviducto de coneja en diferentes etapas del ciclo estral y durante el desarrollo preimplantacional con el objetivo de identificar cambios claves relacionados con la presencia de gametos y embriones en dicho órgano reproductivo.

### 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1 EL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA CONEJA

El sistema reproductor de la coneja (*Oryctolagus cuniculus*) está compuesto por diferentes estructuras: la vulva, la vagina, el útero, los oviductos y los ovarios. La vulva permite la entrada del pene durante la cópula y la expulsión de las crías durante el nacimiento, está situada debajo de la cola del animal. La vagina, que mide unos 7 cm de largo y 1 cm de diámetro, forma la apertura al exterior del tracto genital y forma parte del canal del parto, en ella desemboca también la uretra (Scapinello et al., 2014). Los úteros son dos cuernos de aproximadamente 7-8 cm que se comunican con la vagina a través de dos cérvix diferentes (algo inusual en mamíferos) que cuál actúan como una barrera frente a los espermatozoides (Brewer, 2006). El útero es el lugar en el que el embrión se implanta y desarrolla durante la gestación que dura de 26 a 36 días según la estirpe (Wilson y Dudley, 1952). El oviducto, del que hablaremos con detalle más adelante, es un conducto sinuoso que mide de 8 a 13.5 cm (McComb et al., 1979) y que conecta el útero con los ovarios. Por último, los ovarios son las gónadas femeninas, donde se forman los ovocitos y se sintetizan diferentes hormonas. Los ovarios tienen un color blanco amarillento y una

forma arriñonada, midiendo 1-1.5 cm en su eje más largo (Scapinello et al., 2014). Cada ovario está rodeado por un pliegue del peritoneo conocido como bolsa ovárica.

## 1.2.- EL OVIDUCTO DE CONEJA

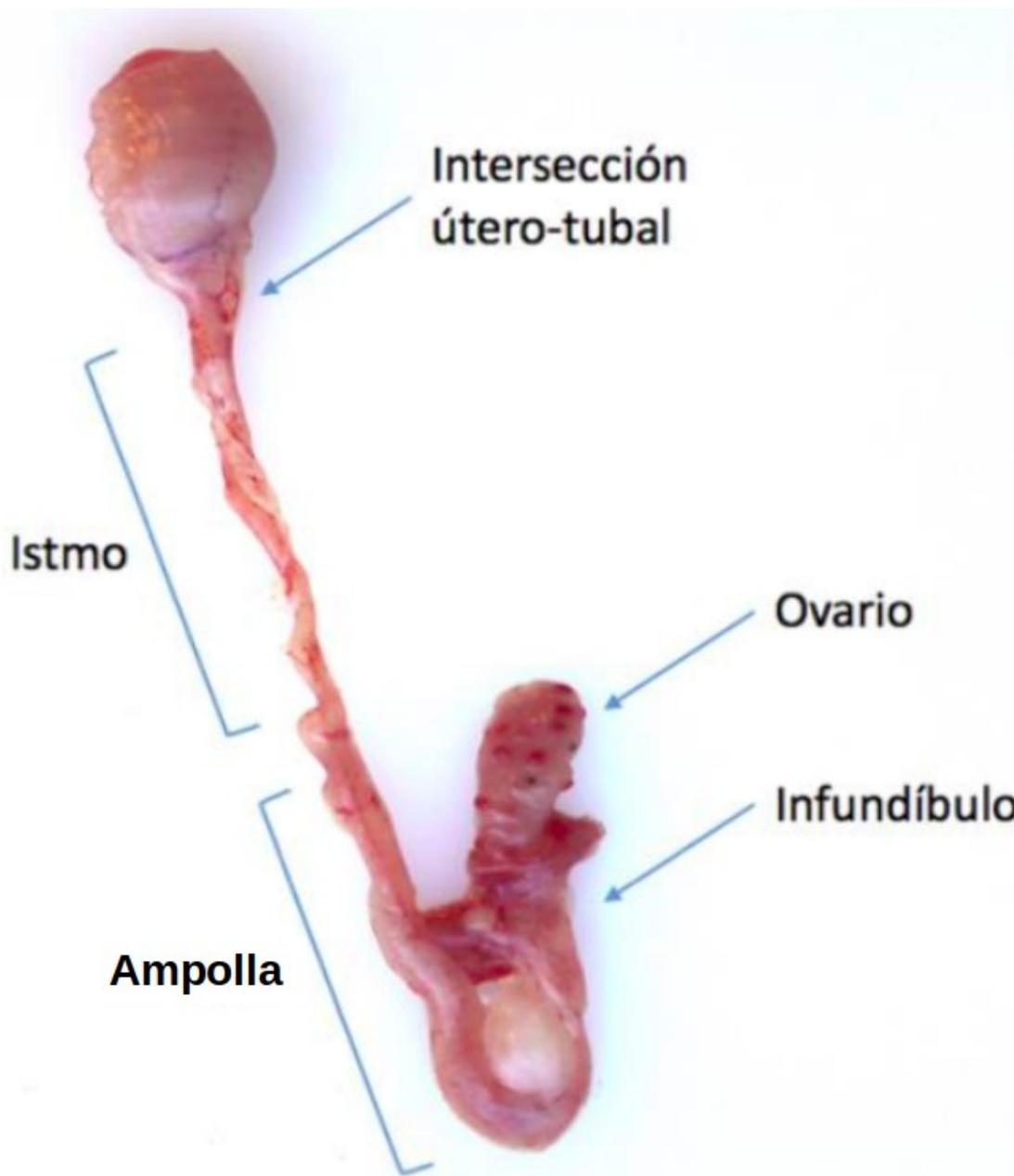


Figura 16. Oviducto de coneja. Modificado de Ruiz Estrada 2018.

A nivel histológico, el oviducto de coneja es similar al de cerda. Entre sus peculiaridades encontramos tres capas de músculo liso: las capas interna y externa son más finas y las fibras se disponen longitudinalmente, mientras que la central es gruesa y sus fibras se disponen de circularmente (Foley y Johnson, 1974). Además, la capa serosa está recubierta por una gran cantidad de tejido adiposo blanco.

Numerosos vasos sanguíneos irrigan el oviducto, provenientes de las arterias uterina y ovárica, y de las venas que siguen una red similar a la arterial. También se ha descrito la innervación en el oviducto de coneja (Brundin y Wirsén, 1964; Owman y Sjoberg, 1966): terminaciones nerviosas adrenérgicas (del sistema simpático) son abundantes en el istmo y en la gruesa capa muscular; mientras que, apenas se dan en ampolla e infundíbulo. Por otra parte, no se ha detectado innervación colinérgica (del sistema parasimpático, Owman y Sjoberg, 1966).

La histología del oviducto varía según la región. De esta forma, podemos observar como el grosor de la túnica muscular disminuye desde el istmo hacia el infundíbulo, mientras que el número, la longitud y la complejidad de los pliegues de la mucosa aumentan considerablemente. En la coneja, la mucosa del istmo presenta pliegues longitudinales, de altura media y sin ramificar. La mucosa de la ampolla y el infundíbulo presenta pliegues longitudinales, de altura elevada y sin ramificar (Foley y Johnson, 1974).

Las **células secretoras** del oviducto tienen forma cilíndrica, con un núcleo grande, basófilo y esférico y un citoplasma eosinófilo. Presentan microvellosidades en su extremo apical y poseen numerosos gránulos de secreción PAS positivos (Jansen y Bajpai, 1982). En la coneja, la síntesis de glicoproteínas durante el estro es considerablemente superior en el istmo con respecto a la que se da en la ampolla. Según Greenwald y colaboradores

(1958), la producción y almacenamiento de los gránulos de secreción está promovida por estrógenos, mientras que tras la ovulación se descarga su contenido al medio extracelular en respuesta a la progesterona. La mucina de los gránulos se une a la ZP de los ovocitos, modificando la superficie ovocitaria al generar una nueva capa de mucoproteína que es importante para la implantación del embrión en el útero (Murakami e Imai, 1996; Denker 2000).

Las **células ciliadas** poseen cilios que se mueven en dirección al útero, desplazando la capa de moco producida por las células secretoras y que cubre la superficie del epitelio (Mondéjar et al., 2012).

La fisiología del oviducto se ve expuesta a cambios cíclicos a lo largo del ciclo estral, bajo la influencia de estrógenos (estradiol, E2) y progesterona (P4). Estas hormonas modulan la proporción de células ciliadas y secretoras en el oviducto, y, por ende, afectan a la actividad biosintética del oviducto (Mondéjar et al., 2012). Tales modificaciones permiten generar un entorno óptimo para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Esto ha sido corroborado en múltiples especies al observarse cambios en la concentración de importantes proteínas como la oviductina (OVGP1, Buhi 2002), la proteína C3 del sistema complemento (C3, Buhi y Álvarez 2003), la osteopontina (SPP1, Liu et al., 2015) y los miembros 5 y 8 de las proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSPA5 y HSPA8, Mariani et al. 2000) a lo largo del ciclo estral.

Sin embargo, los mecanismos moleculares que hay tras la regulación del contenido del fluido oviductal (FO) no han sido completamente descritos en la coneja, y hasta la fecha no se han hecho estudios del patrón de la expresión génica en diferentes momentos de su ciclo reproductivo. En las diferentes especies en las que se ha llevado a cabo cultivo

embrionario *in vitro* con embriones obtenidos mediante FIV, el porcentaje de embriones obtenidos es más bajo que *in vivo*, y su calidad es inferior (Thompson, 1997). Para optimizar las técnicas de reproducción asistida (TRAs), es esencial conocer la composición del FO, con el objetivo de emular *in vitro* las mismas condiciones y mejorar los rendimientos de la FIV y la calidad de los embriones producidos *in vitro*.

## 1.2.- CICLO REPRODUCTIVO DE LA CONEJA

La edad de madurez sexual varía de forma considerable dependiendo de la raza, aunque siempre coincide con el momento en el que el crecimiento del animal es máximo. En el caso de los conejos de Nueva Zelanda, las hembras tendrán una vida reproductiva desde los 5 meses aproximadamente, hasta los 3 años, mientras que la de los machos va desde los 6-7 meses hasta los 5-6 años (Vella y Donnelly, 2011).

En condiciones naturales, la temporada reproductiva de los conejos va desde el inicio de la primavera hasta el otoño, siendo los ratios de concepción más elevados durante la primavera, por lo que sería una hembra poliéstrica estacional con ovulación inducida mediante cópula (Vella y Donnelly, 2011). Si se controlan las condiciones experimentalmente, se produce cópula durante todo el año (Scapinello, 2014).

El ciclo sexual de la coneja dura unos 16 días y se puede monitorizar mediante la observación de la coloración de la vulva del animal. Durante los primeros cuatro días (coloración vulvar blanca) tiene lugar la selección folicular, y la fertilidad es nula: las hembras no aceptarán al macho en un 80.5% de ocasiones y la tasa de fecundación es del 0%. Durante los días 5-9, la vulva de la coneja adquiere una coloración rosada y aumenta la receptividad de la hembra, debido a los niveles crecientes de estrógenos en

plasma como consecuencia del desarrollo folicular. En esta etapa un 63% de las hembras aceptan la monta y la tasa de fecundación es del 20%. En el día 10 u 11 se produce el estro, la etapa en la coneja cuando es más receptiva y fértil. La vulva tiene una coloración roja y el 97.5% de las conejas aceptan la monta, con tasas de fecundación que oscilan entre el 80 y el 90%. Por último, del día 12 al 16 la vulva adquiere una coloración violácea y las tasas de fecundación caen al 50%, con un 32.2% de las conejas que aún aceptan la monta (Scapinello, 2014) (Tabla 4). Durante esta fase tiene lugar la atresia folicular en caso de no haberse inducido la ovulación.

Tabla 4. Ciclo estral de la coneja (confeccionada a partir de los datos de Scapinello 2014).

<b>Días</b>	<b>1-4</b>	<b>5-9</b>	<b>10-11</b>	<b>12-16</b>
<b>Tasa de fecundación</b>	0%	20%	80-90%	50%
<b>Acepta monta</b>	19.5%	63%	97.5%	32.2%
<b>Coloración de la vulva</b>	Blanca	Rosada	Roja	Violácea

Cabe destacar que, aunque el celo definido en estos términos coincide con las tasas de fecundación más elevadas, las conejas presentan cierta fertilidad en los cinco días anteriores y posteriores, lo que sugiere que la maduración de los folículos no es homogénea: habrá folículos que hayan alcanzado suficiente madurez como para poder romperse con la cópula.

La ovulación es inducida por la cópula, por lo que el ciclo sexual de la coneja sólo es completo cuando se produce coito (Vella y Donnelly, 2011; Sánchez-Rodríguez et al., 2019). El resto de ciclos en los que no se produce ovulación son incompletos, ya que los folículos reclutados durante la fase folicular degeneran, sufriendo atresia folicular (Scapinello, 2014).

La inducción de la ovulación se ha explicado de forma clásica de la siguiente forma: el coito o una estimulación física del cérvix promueven la liberación de GnRH, y con ello un aumento de la concentración en plasma de LH que induce la continuación de la meiosis ovocitaria, la ovulación 10 horas después y la formación del cuerpo lúteo (García-García et al., 2020). En respuesta a la señal de LH, los ovarios empiezan a liberar el metabolito de P4, 20- $\alpha$ -dihidroprogesterona (Hilliard y Eaton, 1971), E2, P4 y testosterona que tienen un pico 4-6 horas tras la cópula (Hoffman et al., 2010). Después, la secreción de esteroides por los ovarios disminuye y permanece baja durante 3-4 días, momento en el que las concentraciones de P4 aumentan en sangre debido a su producción por el cuerpo lúteo y que tendrán su máximo entre los días 12-24 del embarazo (Hilliard y Eaton, 1971; Hoffman et al., 2010).

Recientemente, se ha descrito que el factor de crecimiento nervioso beta (NGF- $\beta$ ), una proteína presente en el plasma seminal de varias especies con ovulación inducida, tiene un efecto inductor de la ovulación. Sin embargo su mecanismo de acción no está claro (Sánchez-Rodríguez et al., 2019), porque en la coneja el plasma seminal por sí solo no tiene un efecto inductor de la ovulación (Silva et al., 2011; Masdeu et al., 2012), aunque la proteína recombinante en una dosis fisiológica sí ha demostrado tener este efecto (Sánchez-Rodríguez et al., 2019).

### 1.3.- LA FECUNDACIÓN EN EL OVIDUCTO

#### 1.3.1.- TRANSPORTE ESPERMÁTICO

Tras la cópula, los espermatozoides de coneja se transportan a lo largo del tracto reproductor femenino en dos fases temporales distintas (Overstreet y Cooper 1978a, Overstreet y Cooper 1978b). Durante la fase rápida, hasta 1000 espermatozoides son

detectados en las zonas más cercanas al ovario tras 15 minutos del coito. Sin embargo, estos espermatozoides carecen de movilidad y el 90% presentan daños en el acrosoma y son purgados al espacio peritoneal antes de las 4 horas post-coitus (pc), por lo que no van a fecundar ningún ovocito (Overstreet y Cooper 1978a). El resto del transporte espermático hasta el istmo es progresivo, teniendo lugar entre los 90 minutos y las 6 horas pc. Hasta ese momento, el 95% de los espermatozoides que atraviesan la unión utero-tubárica, permanecen en la zona del istmo más cercana a la unión utero-tubárica, formando el reservorio espermático (Overstreet y Cooper 1975). Durante las 2 horas siguientes, la viabilidad (y con ello la motilidad) de los espermatozoides del bajo istmo decae, mientras que se mantiene en los que han ido ascendiendo al alto istmo (Overstreet y Cooper 1978b). Para cuando se produce la ovulación (10h pc), ya se detecta la presencia de unos pocos espermatozoides en la ampolla cerca del sitio de la fecundación, que tiene lugar sobre las 12h pc, cuando este número de espermatozoides ha aumentado y se encuentran con los óvulos (Overstreet y Cooper 1978b).

### 1.3.2.- TRANSPORTE OVOCITARIO

Inicialmente se creyó que el transporte de los óvulos en la coneja dependía fundamentalmente de la contracción muscular segmentada y peristáltica (observadas *in vivo* por primera vez por Nakaso et al., 1954). Los óvulos se desplazan atrás y adelante llegando hasta la unión ampular-ístmica en un tiempo estimado de 4 a 6 minutos (Harper et al., 1961). Sin embargo, los cilios del epitelio del infundíbulo también juegan un papel importante, dado que sin su interacción con las células del cúmulo el transporte es más lento (Blandau et al., 1969). Además, tras inhibir las contracciones del músculo liso, los óvulos alcanzaron la unión ampular-ístmica sin que hubiese diferencias temporales significativas con respecto al control (Halbert et al., 1976).

## 1.4.- FLUIDO OVIDUCTAL

### 1.4.1.- INTRODUCCIÓN

El fluido oviductal es una mezcla compleja de iones, aminoácidos, glúcidos, proteínas y lípidos. Es principalmente una mezcla del trasudado de plasma sanguíneo y el producto de secreción de las células del epitelio oviductal (Coy et al., 2018; Saint-Dizier et al., 2019).

Como componentes minoritarios pueden estar presentes una pequeña fracción que proviene del fluido folicular tras la ovulación, procedente de la ruptura de los folículos ováricos. También pueden entrar cantidades simbólicas de fluido uterino en caso de reflujo a través de la unión útero-tubárica, e incluso fluido peritoneal en las especies con bolsa ovárica abierta (Leese 1988).

La producción del componente secretado es dependiente de hormonas en la coneja, siendo de 0.4-2 ml/día durante el estro y de 0.14 ml/día en animales ovariectomizados, recuperándose tras tratamiento con estradiol (Hamner y Fox, 1968).

### 1.4.2.- PROPIEDADES FÍSICAS

#### 1.4.2.1. pH

El pH del FO de coneja es ligeramente básico (7.8-8.2) (Hamner y Williams, 1965), y su osmolaridad es un poco mayor que la del plasma sanguíneo ( $310.3 \pm 3.7$  mOsm) (Foley y Johnson, 1974). Por otra parte, la tensión de  $O_2$  se encuentra en torno a 35 mm Hg según los resultados de Fischer y Bavister (1993) o a 60 mm Hg según Menezo y Guerin (1997).

#### 1.4.2.2.- Temperatura

En cuanto a la temperatura, a pesar de la existencia del dogma de que la temperatura interna del cuerpo de los mamíferos es uniforme, se han descritos pequeños gradientes de temperatura en los tejidos reproductivos de diferentes mamíferos incluyendo el oviducto de la coneja. Así, David y colaboradores (1972), recopilan diferencias en la temperatura de ampolla, unión ampular-ístmica, istmo y unión útero-tubárica en conejas durante el estro, la ovulación o castradas, llegando a observar la máxima diferencia (de casi 3° C) entre la unión ampular-ístmica y la unión útero-tubárica durante la ovulación. De sus datos llama la atención que la temperatura mínima se observa siempre en el istmo, mientras que la ampolla y la unión ampular-ístmica registran las máximas temperaturas. Además, Bahat y colaboradores (2005), describen un aumento tras la ovulación en la diferencia de temperatura entre la unión útero-tubárica y la unión ampular-ístmica. Debido a que en la unión útero-tubárica se encuentra el reservorio espermático y que en la unión ampular-ístmica tiene lugar la fecundación, este incremento en la diferencia de temperatura entre ambas regiones sugiere un mecanismo de termotaxis espermática que acercaría el espermatozoide al óvulo. Debido a que *in vitro* los espermatozoides de conejo y humano se comportan de forma análoga cuando se establece un gradiente de temperatura (Bahat et al., 2012), probablemente en la especie humana pase lo mismo que en el oviducto de coneja.

#### 1.4.2.3.- Viscosidad

Debido a los cambios inter-regionales y temporales en la temperatura del oviducto, y a los cambios promovidos por hormonas en la secreción de proteínas por el epitelio oviductal se forman gradientes de viscosidad en el período peri-ovulatorio, como recopilan los

trabajos del profesor Hunter en la cerda. Este hecho influiría en el movimiento del flagelo del espermatozoide y en su motilidad progresiva, dando lugar además a un entorno *in vivo* completamente diferente para la fecundación a las condiciones *in vitro*, en las que el medio posee una viscosidad homogénea (Hunter et al., 2011). La viscosidad promedio del FO es similar a la del plasma sanguíneo: 1.8 mPa/kg (Menezo y Guerin 1997).

### 1.4.3.- COMPOSICIÓN

#### 1.4.3.1.- Electrolitos

La permeabilidad iónica selectiva de la pared del oviducto da lugar a un medio con una composición de electrolitos que diverge de la del plasma sanguíneo: mientras que las concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  son similares, los niveles de  $\text{K}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  son significativamente superiores en el FO (Menezo y Guerin, 1997).

El  $\text{K}^+$  es esencial para la fecundación, pues un espermatozoide reaccionado es incapaz de fusionarse con el ovocito en ausencia de potasio (Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988). Además es esencial para el desarrollo embrionario pre-implantacional *in vitro* el mantener una concentración similar a la del FO en las especies humana, porcina, y en ratón (Quinn et al., 1985; Roblero y Riffo, 1986; Pogorelov et al., 2017).

El bicarbonato es un componente esencial (junto al calcio) promotor de la capacitación, a través de la activación de la adenilato ciclasa soluble, que genera el AMPc necesario para que los espermatozoides capaciten (Visconti et al. 1995; Buffone et al. 2014).

Por otra parte, se considera que la secreción transepitelial de  $\text{Cl}^-$  a la luz del oviducto es la responsable principal de la formación del FO (Dickens et al. 1996), y se debe a pequeños

cambios en la conductancia de los canales de potasio dependientes de calcio (Keating y Quinlan, 2012). Además, la presencia de  $\text{Cl}^-$  en el medio es esencial para que los espermatozoides capaciten, hiperactiven, puedan reaccionar y fecunden (Wertheimer et al. 2008).

#### 1.4.3.2.- Sustratos energéticos

Las concentraciones en general de los sustratos energéticos del FO son significativamente inferiores a las presentes en el plasma sanguíneo y tienen su origen en este fluido. La concentración de glucosa en el FO de coneja es de 1.46 mM (Leese y Barton, 1985). La concentración de lactato en el FO es de 3.67 mM, muy superior a la del plasma (0.6-3.1 mM): el 75% del lactato proviene del metabolismo de la glucosa del plasma por las células del oviducto, y el restante 25% proviene directamente del plasma sanguíneo (Leese 1980), la concentración de lactato es además superior en el istmo con respecto a la ampolla (David et al., 1969; ver tabla 6). La concentración de piruvato en el FO es de 0.37 mM (vs 0.29 mM en el plasma), aunque su concentración es muy superior en las inmediaciones del ovocito, puesto que las células del cúmulo transforman la glucosa del FO en piruvato (Biggers et al. 1967; Leese y Barton, 1985).

##### 1.4.3.2.1.- Sustratos energéticos y espermatozoides

La glucosa, el lactato y el piruvato son buenos sustratos energéticos para los espermatozoides. Sin embargo, su relevancia *in vivo* es discutida debido a que durante la mayor parte del tiempo que pasan en el oviducto, los espermatozoides se encuentran inmóviles en el istmo unidos al epitelio formando el reservorio espermático (Suarez 2016), y no existe hasta la fecha una demostración directa del consumo de  $\text{O}_2$  o de los sustratos

mencionados en condiciones *in vivo*. Estudios *in vitro* en espermatozoides de ratón capacitados y sin capacitar muestran una gran actividad glicolítica y de fosforilación oxidativa dependiente de glicólisis, con un consumo de oxígeno 20 veces superior en espermatozoides capacitados, mientras que la acidificación del medio en estas condiciones como consecuencia de una secreción de lactato por los mismos espermatozoides también es evidente pues el ritmo de acidificación extracelular se acelera 7 veces durante la capacitación espermática (Balbach et al., 2020). La evidencia *in vitro* es por tanto de una preferencia del espermatozoide por glucosa, aunque también puede usar piruvato para llevar a cabo la fermentación o la fosforilación oxidativa en su ausencia (Reynolds et al., 2017). No obstante, un experimento de Burkman y colaboradores (1984) indica un papel del piruvato como activador de la motilidad espermática de espermatozoides aislados del istmo de la coneja, mientras que la glucosa por sí misma no tiene esta capacidad.

#### 1.4.3.2.2.- Sustratos energéticos y embriones

La glucosa puede actuar como fuente única de energía para el embrión hasta la etapa de 8 células. En los medios de cultivo de embriones más habituales, la concentración de glucosa es tres veces superior a la del FO, aunque experimentos en la especie bovina han mostrado que concentraciones tan elevadas de glucosa son perjudiciales para los blastocistos, modificando sus perfiles transcriptómico y metabolómico (Cagnone et al., 2012; Uhde et al., 2018).

El lactato y el piruvato son empleados tanto por el ovocito como por el embrión. El piruvato que le llega al ovocito proviene del metabolismo de la glucosa por las células del cúmulo (Leese y Barton, 1985).

#### 1.4.3.3.- Aminoácidos

Los aminoácidos (Aa) mayoritarios en el FO son alanina (Ala), aspartato (Asp), glicina (Gly), glutamato (Glu), serina (Ser) y taurina. El Aa mayoritario es la Gly, que junto con la Ala está implicado en la protección del embrión frente al estrés osmótico (Moore y Bondioli, 1993; Steeves et al., 2003).

La arginina no es un componente mayoritario del FO de coneja. No obstante, un artículo reciente de metabolómica con FO bovino detectó un aumento en su concentración en presencia de embriones (Rodríguez-Alonso et al., 2020), lo que indica que podría ser importante para el desarrollo embrionario pre-implantacional en dicha especie.

Es posible cultivar embriones *in vitro* y completar su desarrollo hasta la eclosión en un medio sin aminoácidos suplementados (Whitten y Biggers, 1968), los de coneja en concreto poseen grandes reservas de energía endógena y no requieren aminoácidos ni albúmina como fuentes de nitrógeno (Kane, 1986). Sin embargo, una composición de aminoácidos *in vitro* similar a la del oviducto da lugar a una evolución temporal idéntica, los embriones obtenidos son de mayor calidad y poseen una masa celular interna más poblada, aumentando las tasas de viabilidad, implantación y desarrollo fetal (Gardner et al., 2008). Por tanto, estos estudios indican que los aminoácidos son un componente importante del medio para un desarrollo preimplantacional adecuado.

#### 1.4.3.4.- Lípidos

El contenido de lípidos del FO es bajo, aunque están presentes fosfolípidos, triglicéridos, colesterol libre y colesterol esterificado (Menezo y Guerin 1997). Entre los transportadores de lípidos tenemos proteínas que actúan como extractores de colesterol de superficie del

espermatozoide, promoviendo la capacitación. Son la lipoproteína de alta densidad (que además presenta niveles elevados en plasma en el período periovulatorio (Ehrenwald et al., 1990), albúmina y la lipocalina 2 (Watanabe et al. 2014).

Tabla 5. Concentraciones de varios componentes del fluido oviductal de la coneja (adaptado de Hamner y Williams 1965).

Componente	Media		Error estándar	n
	mg/ml	µg/ml		
Na <sup>+</sup>	2.94		0.044	12
Cl <sup>-</sup>	4.10		0.390	10
Ca <sup>2+</sup>	0.32		0.066	12
K <sup>+</sup>	0.22		0.006	12
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.76		0.102	10
Polisacáridos	0.37		0.029	7
Proteína total	2.73		0.293	10
Residuo seco	8.28		1.120	10
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>		5.98	1.298	10
Mg <sup>2+</sup>		3.43	0.338	10
Zn <sup>2+</sup>		6.48	0.180	10
Lactato		31.35	7.566	9

Tabla 6. Variación en la composición de fluido oviductal de coneja entre los segmentos del oviducto. Modificado de David et al. 1969.

	Ampolla		Istmo	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Volumen (ml)	1.15	0.53	0.32	0.10
Na <sup>+</sup> (mEq/l)	141.87	1.68	148.25	3.43
Cl <sup>-</sup> (mEq/l)	119.25	3.49	101.0	4.86
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mEq/l)	27.52	2.93	41.34	4.45
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mEq/l)	3.41	1.44	4.76	1.59
Lactato (µg/ml)	34.36	15.18	64.78	38.95
Proteína total (mg/ml)	0.779	0.426	1.357	0.265

#### 1.4.3.5.- Hormonas

Las hormonas esteroideas y las prostaglandinas son producidas en gran cantidad por los folículos ováricos y los cuerpos lúteos. Con su bajo peso molecular (en torno a 300 Da), pueden llegar al FO por transferencia inversa desde la vena ovárica a la rama oviductal de la arteria ovárica (Saint-Dizier et al., 2019). P4 y E2 se pueden detectar en cualquier momento del ciclo en el FO, y en la coneja, se pueden observar concentraciones similares a las presentes en el plasma sanguíneo durante el estro (0.5 ng/ml de P4 y 50-120 pg/ml de E2) (Richardson y Oliphant, 1981).

Además de P4 y E2, se han detectado en el FO bovino otras hormonas esteroideas mediante espectrometría de masas: testosterona, estrona, cortisol, cortisona y metabolitos de la P4 (Lamy et al., 2016). En yegua, se ha detectado además mediante inmunohistoquímica la presencia de enzimas esteroideogénicas como StAR, citocromo p450scc y aromatasa en el epitelio oviductal (Nelis et al., 2015).

P4 tiene numerosos efectos sobre el espermatozoide dependiendo de la dosis, es un quimioatrayente, promueve la capacitación y la hiperactivación, y en concentraciones más elevadas induce la RA en espermatozoides capacitados (Teves et al., 2006; Publicover 2013; Gimeno-Martos et al., 2017).

Recientemente, varios grupos han demostrado que un tratamiento con P4 puede liberar a los espermatozoides unidos a células del epitelio oviductal bovino y porcino (Lamy et al. 2017, Romero-Aguirregomez corta et al. 2019). Ramal-Sánchez et al. (2020) demostraron que este tratamiento genera cambios en la arquitectura de membrana del

espermatozoide, eliminando proteínas de superficie procedentes del plasma seminal, el perfil lipídico y con ello la fluidez de membrana.

En cuanto a las prostaglandinas, se han detectado PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> en FO de cerda (Martínez-Rodríguez et al., 1983), yegua (Pinto-Bravo et al., 2017), vaca (Kobayashi et al., 2013) y ratona (Huang et al., 2004). Además, las enzimas involucradas en la síntesis de prostaglandinas han sido detectadas en el oviducto de varios mamíferos, siendo en ratona COX-2 la principal enzima, encargada de la síntesis de PGI<sub>2</sub> (Huang et al. 2004). Las prostaglandinas tienen un papel inmunomodulador (Marey et al. 2014; Yousef et al. 2016), y pueden participar en el transporte de gametos y embriones en el oviducto al regular la contractibilidad de la musculatura lisa (Wånggren et al., 2008) y la frecuencia del batido ciliar (Weber et al., 1991; Hermoso et al., 2001; Ezzati et al., 2014).

En cuanto a las hormonas de naturaleza peptídica, hay poca información en la literatura relacionada con la presencia de gonadotropinas en el FO de mamíferos. No obstante, se ha detectado hCG en la mujer a lo largo del ciclo menstrual (Lei et al., 1993) y se ha documentado la expresión de receptores para LH y FSH en el epitelio oviductal de la ratona (Zhang et al., 2001), la mujer (Lei et al., 1993) y la cerda (Gawronska et al., 1999).

Aunque se desconoce el rol de las gonadotropinas en el oviducto, se han observado cambios en la expresión génica motivados por la estimulación con gonadotropinas exógenas (Saint-Dizier et al., 2019). De esta forma, el tratamiento de superovulación no solo afectaría a la función ovárica, sino que también altera procesos biológicos en el oviducto. Como consecuencia, se han observado cambios histológicos como variaciones en la altura del epitelio y disminución del número de células PAS + y de los gránulos de secreción en el oviducto porcino (Juárez-Mosqueda et al., 2015). También se inducen

cambios moleculares, como la sobreexpresión de receptores de prostaglandinas en el oviducto bovino (Fontes et al., 2014). Esto se traduce en cambios fisiológicos que son un problema para la reproducción, como el fallo en la captura del ovocito por el oviducto en búfalas superovuladas, lo que ocasiona que en hembras donantes de esta especie se obtengan números de embriones subóptimos para transferencia embrionaria (Salzano et al. 2018).

#### 1.4.3.6.- Proteínas

En la mayoría de estudios de FO se han identificado una o pocas proteínas utilizando métodos analíticos convencionales (Itze-Mayrhofer y Brem, 2020). Sin embargo, el uso de la electroforesis bidimensional (Buhi et al., 2000) y de diferentes técnicas de espectrometría de masas han permitido identificar un gran número de proteínas presentes en este fluido biológico en especies de interés ganadero como la oveja (Soleilhavoup et al., 2016), la yegua (Smits et al., 2017), la cerda (Georgiou et al., 2005; Mondéjar et al., 2012), la vaca (Pillai et al., 2017; Lamy et al., 2018), la perra (Reynaud et al., 2015) y la coneja (Yu et al., 2016; Yu et al., 2019).

En el caso de la coneja, Yu et al. (2016) detectaron unas 264 proteínas en el FO, de las cuales 130 son glicoproteínas que se unieron a bolas de agarosa conjugadas con las lectinas WGA (que se une a N-acetil-glucosamina y ácido siálico en posición terminal) y ConA (que se une a manosa en posición terminal). Yu et al. (2019), hicieron un estudio de proteómica en la que describieron diferencias en la composición proteica del FO en diferentes momentos tras la inseminación de las conejas con el objetivo de descubrir nuevas proteínas secretadas en presencia de espermatozoides en torno a la ovulación. Describieron 63 proteínas cuyos niveles se alteran en respuesta a la inseminación,

incluyendo chaperonas, oxidorreductasas y proteínas relacionadas con la respuesta inmune.

A nivel cuantitativo, en la coneja, según Oliphant et al. 1978, la albúmina es la proteína mayoritaria del FO y proviene del plasma sanguíneo ( $4.7 \pm 0.5$  mg/ml), mientras que la IgG es la segunda proteína de plasma más abundante en el FO ( $0.38 \pm 0.2$  mg/ml). Estas dos proteínas constituyen un 60-80% del contenido del FO y el 95% de la fracción de trasudado de plasma sanguíneo, pero se encuentran aproximadamente 10 veces más diluidas que en el plasma (Leese et al. 1988). Dentro de las proteínas más abundantes sintetizadas por el oviducto en la especie de interés ganadero más estudiada, la bovina, se encuentra la oviductina (OVGP1), las proteínas de choque térmico (HSP90AB1, HSP90AA1, HSPA8, HSPA1B, HSPA5 entre otras), las anexinas (ANXA1, ANXA2, ANXA4 y ANXA5), subunidades de tubulina (TUBB5, TUBA4A), complemento C3 (C3) y miosinas (MYH9 y MYH14) (Lamy et al., 2017). En la coneja, los datos de proteómica de Yu y colaboradores (2016, 2019) parecen sugerir que se cumple lo mismo para todas las proteínas mayoritarias producidas por el oviducto bovino excepto en el caso de MYH14.

Desde un punto de vista cualitativo, sólo un 13-27% de las proteínas del FO son proteínas secretadas de forma clásica, mientras que la mayoría son proteínas citoplásmicas (Mondéjar et al., 2012; Saint-Dizier et al., 2019). No está esclarecido cómo las proteínas intracitoplásmicas pueden ser exportadas en una proporción tan elevada al FO. Saint-Dizier y colaboradores (2019) consideran que la misma metodología de obtención del FO de oviductos mediante canulación, lavado de oviductos y raspado seguidos de centrifugaciones puede provocar daño celular y liberación de proteínas que serían contaminantes del FO. Sin embargo, el aislamiento de vesículas extracelulares del FO, muestra un enriquecimiento en muchas proteínas de retículo endoplásmico, citosol o

integrales de membrana (proteínas de choque térmico, anexinas, integrinas). Esto implica que una gran cantidad de las proteínas constituyentes del FO son liberadas como parte de las vesículas extracelulares u oviductosomas (Al-Dossary et al., 2015; Almiñana et al., 2018).

Siendo la proteína mayoritaria del FO, y teniendo afinidad por lípidos, péptidos y catecolaminas, se pensó que la albúmina tenía un papel importante a nivel reproductivo. Sin embargo, el modelo de rata con analbuminemia (ausencia de albúmina en plasma), tiene unas tasas de fertilidad *in vivo* similares a los controles (Nagase et al. 1979), el ratón KO también es fértil (Roopenian et al., 2015), e incluso hay documentados casos de mujeres analbuminémicas que han tenido descendencia (Caridi et al., 2019), por lo que hay otras proteínas en el FO que pueden suplir las funciones principales de la albúmina en cuanto a la reproducción.

La **oviductina** (OVGP1) es la proteína mayoritaria sintetizada por el epitelio oviductal. El modelo *knockout* (KO) de OVGP1 en el ratón descrito por Araki et al. en 2003 es fértil, y OVGP1 es un pseudogén en la rata (Tian et al., 2009) y en el gran zorro volador (Moros-Nicolás et al., 2018), por lo que hay autores que concluyen que OVGP1 es prescindible al menos en las especies murinas (Tian et al., 2009). Sin embargo, la OVGP1 de ratón es peculiar: su expresión predomina en ampolla (Lyng y Shur, 2009), y la mayor parte pasa al espacio perivitelino, con poca proteína unida a la ZP (Kapur y Johnson, 1986; Lyng y Shur, 2009). Por el contrario, la interacción con la ZP es importante en otras especies como la porcina (Algarra et al., 2016) o el hámster, donde un anticuerpo monoclonal contra la oviductina inhibe la fecundación (Sakai et al., 1988; Yang et al., 2015). Además, la asociación en la coneja de dos polimorfismos en el promotor de OVGP1 con mayor supervivencia embrionaria y un desarrollo preimplantacional más lento (Merchán et al.,

2007; García et al., 2010) sugieren un papel reproductivo importante de OVGP1 en esta especie.

Otras proteínas identificadas en el FO de coneja han sido previamente descritas en otras especies con funciones reproductivas importantes.

El **activador tisular de plasminógeno** (PLAT) es una proteasa que convierte el precursor inactivo plasminógeno en plasmina. Como propone en la especie porcina Coy et al. 2012, el plasminógeno presente en el FO se une a la ZP y la membrana plasmática del ovocito, y es convertido en plasmina cuando el espermatozoide contacta con el oolema, lo que previene la unión de nuevos espermatozoides. Curiosamente, en ratón, la fertilidad *in vitro* es muy baja cuando se emplean espermatozoides de un macho PLAT *-/-*, aunque se recupera *in vivo*, probablemente debido a la presencia de otra proteína que supla su función (García-Vázquez et al. 2019).

Artículos recientes han mostrado que la plasmina (forma activa del plasminógeno del ovocito) es el enzima encargado de convertir la pro-ovastacina (zimógeno) en ovastacina (Karmilin et al., 2019), que actúa como proteasa encargada de modificar la ZP2 tras la fecundación siendo responsable del bloqueo a nivel de la ZP (Burkart et al., 2012) y receptor del espermatozoide en el oolema (Sachdev et al., 2012). Al carecer el ovocito de un enzima que convierta el plasminógeno en plasmina, este sería el papel de enzimas como PLAT, presente en el FO.

La **lactotransferrina** (o lactoferrina, LTF) es una glicoproteína relacionada con respuesta inmune e inflamatoria, regulación del crecimiento y de la diferenciación celular (Ward et al. 2005). Esta proteína ha sido detectada en el oviducto de roedores y en la especie

humana. LTF se une tanto a la ZP como a la superficie de espermatozoides capacitados (Zumoffen et al. 2013), inhibiendo la unión entre gametos. Sin embargo, el modelo KO de ratón LTF *-/-* es fértil (Ward et al. 2003).

La proteína del sistema complemento 3 (**C3**) es otra proteína cuya secreción es dependiente de estrógenos en ratón, humano y oveja (Lee et al., 2009, Soleilhavoup et al., 2016). En humano, es transformado por las células oviductales en el factor embriotrófico iC3b (Lee et al., 2009) y ha sido propuesto además como ligando que permite la interacción entre CD46 del espermatozoide reaccionado y la integrina  $\alpha M\beta 2$  del ovocito (Fabryova y Simon, 2009). No obstante, los ratones macho CD46 *-/-* son más fértiles que sus homólogos (Inoue et al., 2003) y los ratones hembra knockouts de ITGAM (Coxon et al., 1996) e ITGB2 también son fértiles (Ding et al., 1999), lo que resta importancia al papel potencial de C3 en la fecundación. Probablemente, su papel en el desarrollo embrionario pre-implantacional y la implantación sea mucho más importante, como muestra el hecho de que la viabilidad de los conceptus se ve comprometida en los ratones hembra C3 *-/-* (Chow, et al. 2009).

La **fetuina B** (FETUB) es otra glicoproteína sintetizada en el hígado, y por tanto procedente de plasma sanguíneo presente en el FO de roedores y de la coneja. También está presente en el fluido folicular, lo que inhibe el endurecimiento prematuro de la ZP en ovocitos de ratón (Schroeder et al. 1990). El ratón hembra FETUB *-/-* es estéril, aunque su fertilidad se puede restaurar *in vitro* perforando la ZP (Dietzel et al., 2013).

La **lipocalina 2** (LCN2) es una proteína presente en el FO de coneja que en ratón se une a la fosfatidiletanolamina de la membrana plasmática del espermatozoide modificando las balsas lipídicas y modulando la capacitación espermática (Watanabe et al. 2014). *In vitro*,

se ha demostrado que elimina colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. Una concentración de lipocalina en el medio de FIV de 40 µg/ml tiene el mismo efecto sobre la membrana plasmática del espermatozoide que una concentración 100 veces superior de albúmina (4 mg/ml, en el rango de la empleada normalmente en medios de capacitación). También se ha empleado para mejorar los rendimientos de la FIV en ratón (Watanabe et al. 2014). Los espermatozoides presentes en el FO de una ratona LCN2 -/- apenas capacitan, lo que estaría relacionado con la subfertilidad de estos ratones: un 33-42% de las hembras sexualmente maduras no tuvieron crías tras dos meses con machos, en comparación con los controles en los que el 95% se quedaron preñadas (Berger et al. 2006; Watanabe et al., 2014). Las hembras no son estériles, presumiblemente debido a la existencia de otros factores remodeladores de la membrana plasmática del espermatozoide, siendo el más abundante la albúmina.

Las **anexinas** (ANXAs) son una familia de proteínas típicas de membrana. Aunque carecen de péptido señal, se ha descrito un mecanismo de liberación que incluye proteólisis, y además han sido descritas en más de 300 experimentos de proteómica de con vesículas extracelulares (Kalra et al., 2012). Además de en el FO de coneja (Yu et al., 2016), ha sido descrita su presencia en el oviducto de vaca (Ignotz et al., 2007) y cerda (Teijeiro et al., 2009), donde se ha estudiado su papel en la formación del reservorio espermático, y en el epitelio de oviducto de coneja (ANXA1 en concreto, Tsao et al., 1995).

La proteína **DMBT1** (eliminada en tumores cerebrales 1), como se comentó en la parte dedicada a la especie porcina, tiene un papel importante en la selección negativa de espermatozoides al menos en dicha especie, pues desencadena la RA prematura y muerte de los espermatozoides que presentan psoriasina en su superficie. El tarsero no

posee copias funcionales de DMBT1 (Moros-Nicolás et al. 2018), mientras que los ratones DMBT1 <sup>-/-</sup> son fértiles (Renner et al., 2007). Podría concluirse que no es una proteína esencial para la reproducción al menos en ratones.

La **osteopontina** (SPP1), es una proteína secretada detectada en el FO de bovino (Gabler et al., 2003), porcino (Hao et al., 2006) y ratón (Liu et al., 2015). Gonçalves et al., 2007 estudiaron su papel en la interacción del espermatozoide con el ovocito en bovino y su interacción mediante el dominio RGD que contiene con las integrinas del ovocito, viendo que anticuerpos contra el péptido RGD, la osteopontina o sus ligandos ITGA5 e ITGAV reducen de forma significativa el rendimiento de la FIV. Además, su adición al medio de FIV, aumentó el porcentaje de espermatozoides con RA inducida por lisofosfatidilcolina y los ratios de blastocistos obtenidos en bovino (56.4% vs 42% del control; Monaco et al., 2009). En porcino, su adición al medio disminuye la polispermia, aumentando la eficiencia de la FIV (44.6% vs 31.6% del control; Hae et al., 2006). A pesar de todas estas observaciones positivas, SPP1 parece ser una proteína prescindible para la fertilidad, pues los ratones SPP1 <sup>-/-</sup> son fértiles (Liaw et al., 1998; Rittling et al., 1998).

Las **glicosidasas** son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces glucosídicos. Su importancia en el FO está relacionada con el reconocimiento lectina-azúcar que media tanto la unión del espermatozoide al epitelio oviductal, como el reconocimiento entre gametos. Una N-acetil-neuraminidasa, por ejemplo, eliminaría un ácido siálico, impidiendo que células con una lectina con afinidad por siálico no pudiesen reconocer el glicano modificado, pero que otras células con una lectina con afinidad por galactosa que antes no podían reconocerla porque estaba enmascarada por el ácido siálico ahora sí que puedan reconocerla.

Carrasco y colaboradores (2008a; 2008b), estudiaron la actividad de múltiples glicosidasas ( $\alpha$ -L-fucosidasa,  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa,  $\alpha$ -D-mannosidasa, y  $\beta$ -N-acetyl-galactosaminidasa,  $\alpha$ -D-galactosidasa y N-acetil-neuraminidasa) en los fluidos oviductales porcino y bovino a lo largo del ciclo estral. En bovino, el aumento en actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa tras la ovulación (Carrasco et al., 2008a) eliminaría la fucosa del oligosacárido Lewis<sup>a</sup> que media la adhesión del espermatozoide al epitelio oviductal (Suarez et al., 1998) pudiendo estar relacionado con la liberación de los espermatozoides del reservorio espermático.

Otra mucina aún por identificar está relacionada con la formación de la neozona en la coneja (Denker 2000). La lectina DBA que se une a galactosil- $\beta$ (1,4)-N-acetyl-galactosamina marca el epitelio ístmico desde el momento de la fecundación hasta al menos 96 horas después, siendo probable que marque la mucina que se une a la zona pelucida (Marco-Jiménez y López-Béjar, 2013).

#### 1.4.3.7.- VESÍCULAS EXTRACELULARES EN EL OVIDUCTO

Según el origen de las vesículas extracelulares, pueden distinguirse dos tipos principales: exosomas y microvesículas. Los exosomas son vesículas extracelulares generadas por el endosoma de las células eucariotas que se libera al medio cuando un cuerpo multivesicular se fusiona con la membrana plasmática (van Niel et al., 2018). Tienen un tamaño típico de 50-150 nm y en su interior se han hallado proteínas, mRNAs y miRNAs (Kalra et al., 2012). Se pueden encontrar en los fluidos biológicos de mamíferos (plasma, orina) incluyendo los de naturaleza reproductiva, que han recibido nombres concretos en función de su procedencia (prostasomas, epididimosomas, uterosomas y oviductosomas). Las microvesículas son vesículas extracelulares de un tamaño de 50-500 nm, liberadas

por gemación hacia el medio extracelular y fisión de la membrana plasmática. El parecido en cierto rango de tamaño y su composición dificultan la distinción entre exosomas y microvesículas aisladas a partir de fluidos extracelulares (van Niel et al., 2018).

En las vesículas extracelulares se pueden encontrar proteínas de procedencias variadas: de retículo endoplásmico, membrana plasmática y citosol (Raposo et al., 2013; van Niel et al., 2018). La mayor parte de estas proteínas carecen de péptido señal y no siguen la ruta clásica de secreción (Kalra et al., 2012), por lo que acaban en el medio extracelular gracias a microvesículas y exosomas.

Los exosomas propios del FO, los oviductosomas, han sido recientemente caracterizados en el ratón (Al-Dossary et al., 2013) y la vaca (Lopera-Vásquez et al., 2016; Almiñana et al., 2018). Además, se están describiendo los mecanismos de fusión al espermatozoide y su rol como transportadores de elementos que modifican la superficie de espermatozoides y ovocitos pudiendo afectar a su habilidad reproductiva (Al-Dossary y Martín de León, 2016). Por otra parte, se ha descrito su internalización por embriones *in vitro* y su efecto positivo sobre el desarrollo embrionario preimplantacional, mejorando las tasas de blastocisto, su viabilidad y calidad (Almiñana et al., 2017).

Entre las proteínas propias de microvesículas y exosomas presentes en los experimentos de proteómica de FO de coneja (Yu et al., 2016; Yu et al., 2019) se encuentran las proteínas de choque térmico como HSPA5 y HSPA8. Estas dos proteínas se encuentran en el retículo endoplásmico y son marcadores de vesículas extracelulares, siendo además sobreexpresadas en presencia de espermatozoides en el oviducto (Yeste et al., 2014). La presencia de HSPA8 en el medio de capacitación aumenta la viabilidad de los espermatozoides de toro (Elliott et al., 2009), produciendo dos cambios claves en el

espermatozoide: un incremento en la fluidez de membrana (con pérdida de colesterol, asociado clásicamente con la capacitación) y un efecto protector disminuyendo la actividad mitocondrial. En cuanto a HSPA5, es capaz de modular la unión del espermatozoide a la ZP *in vitro* (Marín-Briggiler et al., 2010).

### 1.5.- ESTUDIOS PREVIOS DE TRANSCRIPTÓMICA EN OTROS MAMÍFEROS

El perfil de expresión génica en el oviducto de numerosas especies de mamíferos (bovina, equina, porcina, humana, ratón y rata) ha sido estudiado previamente mediante técnicas de transcriptómica, como micromatrices y RNAseq que permiten comparar simultáneamente variaciones en el transcriptoma completo.

La técnica de micromatrices de DNA que se emplea en esta tesis fue empleada por primera vez por Schena et al., 1995, que añadieron a una matriz de vidrio cDNAs de *Arabidopsis thaliana* para cuantificar la expresión de múltiples transcritos de esta planta en diversas condiciones experimentales. Entre 2000 y 2015, esta técnica de biología molecular fue adoptada por un gran número de laboratorios en el mundo, y aunque actualmente se haya visto desplazada en parte por la técnica más compleja de secuenciación de ARN (RNAseq), sigue empleándose debido a sus ventajas económicas.

A continuación, recopilamos en la tabla 7 los experimentos en función de la especie, técnica utilizada y condiciones experimentales utilizadas.

<b>Especie</b>	<b>Referencias</b>	<b>Técnica</b>	<b>Condiciones experimentales</b>
bovina	Bauersachs et al., 2003	micromatrices	Oviductos ipsilateral vs contralateral de fase post-ovulatoria
bovina	Bauersachs et al., 2004	micromatrices	Oviductos en estro vs en fase luteal tardía
ratón	Fazeli et al., 2004	micromatrices	Oviductos en fase pre-ovulatoria vs post-ovulatoria. Oviductos de inseminados por machos fértiles vs machos sin espermatozoides.
rata	Parada-Bustamante et al., 2007	micromatrices	Mucosa de oviducto en fase post-ovulatoria (6 h post-cópula) inseminados vs sin inseminar.
humana	George et al., 2011	micromatrices	Oviductos en fase folicular vs luteal. Oviductos de portadoras de mutación en BRCA1 vs controles.
porcina	Almiñana et al., 2012	micromatrices	Mucosa de oviducto inseminado vs no inseminado
humana	Hess et al., 2013	micromatrices	Oviductos en fase folicular vs luteal.
porcina	Almiñana et al., 2014	micromatrices	Oviducto inseminado con espermatozoides Y vs oviducto inseminado con espermatozoides X
bovina	Maillo et al., 2015	RNAseq	Oviducto con un embrión vs múltiples embriones (transferidos por endoscopia, muestra de día 3 post-estro)
porcina	López-Úbeda et al., 2015	micromatrices	Oviducto inseminado vs no inseminado (estro espontáneo, post-ovulatorio, unión ampular-ístmica)
bovina	Gonella-Díaza et al., 2016	RNAseq	Oviducto con ovarios con folículos grandes vs oviducto con ovarios con folículos pequeños (día 4 de ciclo estral). Ampolla vs istmo.
ratón	Cerny et al., 2016	micromatrices	Oviducto WT vs ESR1 -/- (48 h tras estimular desarrollo de folículos con PMSG)
porcina	López-Úbeda et al., 2016	micromatrices	Oviducto control vs oviducto ipsilateral (tras ovariectomía) durante el estro.
bovina	Maillo et al., 2016	micromatrices	Ampolla de oviducto vs istmo (oviducto ipsilateral con embriones de 2-4 células)
equina	Smits et al., 2016	RNAseq	Epitelio de la unión ampular-ístmica (oviducto ipsilateral vs contralateral, hembras preñadas vs cíclicas).
porcina	Acuña et al., 2017	micromatrices	Oviductos de las diferentes fases del ciclo reproductivo (prepúber, pre-ovulatoria, post-ovulatoria y luteal)
porcina	Kim et al., 2018	RNAseq	Ovarios, oviductos y endometrio recogidos a lo largo del ciclo estral.
porcina	Martyniak et al., 2018	micromatrices	Istmos en fase luteal temprana vs istmos con embriones de 2-4 células
bovina	Gonella-Díaza et al., 2018	RNAseq	Oviductos en período periovulatorio, con folículos más o menos desarrollados Ampolla vs istmo.
porcina	Atikuzzaman et al., 2018	micromatrices	Oviductos (unión útero-tubárica) en fase post-ovulatoria de hembras no inseminadas vs inseminadas con plasma seminal o montadas.
rata	Zúñiga et al., 2021	micromatrices	Mucosa de oviducto en fase post-ovulatoria (3 h post-cópula) inseminados vs sin inseminar.

Puede verse que las especies más empleadas en los experimentos son la bovina y la porcina (cada una 6 artículos), mientras que en ratón, rata y humano solo se han realizado dos estudios. Se han descartado estudios llevados a cabo con células epiteliales de oviducto cultivadas *in vitro*. Como puede observarse, hasta la fecha no se había realizado ningún estudio de transcriptómica mediante micromatrices o RNAseq del oviducto de la coneja.

#### 1.5.1.- TRANSCRIPTÓMICA OVIDUCTAL ANTES Y DESPUÉS DE LA FECUNDACIÓN

Entre los estudios que han comparado las fases pre-ovulatoria y post-ovulatoria se encuentran el de Fazeli et al. (2004) hecho en ratón, el de Acuña et al. (2017) en la cerda y el de Gonella-Díaz et al. (2018) en la vaca. También se han hecho otros experimentos, como el de López-Úbeda et al. (2015) que consideran el efecto de los espermatozoides sobre el perfil de expresión génica oviductal con muestras del período post-ovulatorio en cerdas inseminadas *versus* no inseminadas.

Fazeli y colaboradores (2004) describieron la sobreexpresión de varios genes (PTGS2, SPP1, SERPINE1 y ADM) en presencia de espermatozoides. López-Úbeda y colaboradores (2015) descubrieron 17 genes sobreexpresados y 9 cuya expresión se reprime en presencia de espermatozoides, entre ellos SERPINE1 y SPP1, que sugieren un mecanismo conservado en la formación del reservorio espermático. Por su parte, Acuña y colaboradores (2017), describen 89 genes sobreexpresados y 51 silenciados al comparar las fases pre y post-ovulatoria en cerdas no inseminadas.

Gonella-Diaza y colaboradores (2018), ilustran el papel de las hormonas esteroideas en la matriz extracelular oviductal al manipular el desarrollo folicular y evaluar el perfil de expresión del oviducto entre las fases pre y post-ovulatoria. Describen cambios en el patrón de expresión de múltiples componentes (principalmente colágenos y metalopeptidasas) que participan en la organización de la matriz extracelular.

Atikuzzaman y colaboradores (2018) describen dos mecanismos de respuesta de la unión utero-tubárica del oviducto porcino a los espermatozoides y al plasma seminal: uno de regulación del pH (en el que participan numerosos canales de membrana) y otro de inmunomodulación que involucra varios genes de la ruta del interferón y metalopeptidasas; en total recopilaron 1722 genes diferencialmente expresados tras la cópula y 1148 tras la infusión de plasma seminal en la cerda, siendo 592 genes los comunes a ambos experimentos.

#### 1.5.2.- TRANSCRIPTÓMICA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN EL OVIDUCTO

Existe un número inferior de estudios transcriptómicos del oviducto durante el desarrollo embrionario temprano en mamíferos que del resto del ciclo estral hechos *in vivo*. Entre ellos está la investigación de Maillo y colaboradores (2015) en la especie bovina, en la que se comparan oviductos de vaca sin embriones con vacas a las que se han transferido 50 cigotos (a las 36 horas post-ovulación) ambas en el día 3 post-ovulación. Se sobreexpresaban 123 genes y se reducía la expresión de 155, siendo la mayor parte de estos genes reprimidos genes del sistema inmune, incluyendo genes relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad y factores pro-inflamatorios como NFKB2, CXCL2 y CCL20.

En la especie equina, Smits y colaboradores (2016) hicieron un experimento comparando la expresión del epitelio oviductal de la unión ampular-ístmica (donde permanece el embrión equino durante el desarrollo embrionario temprano según Weber et al., 1996) de cuatro grupos experimentales: oviducto ipsilateral de hembras cíclicas, oviducto contralateral de hembras cíclicas, oviducto ipsilateral de hembras preñadas y oviducto contralateral de hembras preñadas. Al contrario que en el experimento de Maillo et al. (2015), en este estudio sólo se encontraba un embrión en el oviducto. La expresión de genes relacionados con la respuesta inmune es obvia teniendo en cuenta la sobreexpresión de genes relacionados con la “respuesta defensiva ante otros organismos”, “respuesta inmune” o “producción de interferón de tipo I” que aparecieron en la anotación biológica.

Por otra parte, Martyniak y colaboradores (2018) hicieron otro experimento parecido en la especie porcina, comparando los perfiles transcriptómicos del oviducto de istmos de cerdas con embriones de 2-4 células (3 días tras la cópula con el verraco) *versus* cerdas en fase luteal que ovularon en la misma fecha. De entre los 118 genes sobreexpresados en las cerdas preñadas y los 236 reprimidos, destacan 36 genes involucrados en la ruta de señalización por receptores del tipo Toll o NOD, señalando que la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune materna se reprime durante esta fase del desarrollo embrionario preimplantacional en el istmo de la cerda.

Sin embargo, desde el planteamiento de la presente tesis doctoral hasta su defensa, no tenemos constancia de ningún estudio de transcriptómica completa del istmo del oviducto en la que se haya intentado esclarecer un patrón temporal de expresión en este órgano durante el desarrollo embrionario temprano en mamíferos. Almiñana et al., 2012 hizo los

experimentos en cerdo, pero el artículo se centra en los cambios génicos a nivel de útero en los días posteriores y no en el oviducto, donde solo mencionan a TICAM2 como un biosensor del paso del embrión a través del tracto reproductor femenino. La coneja, una hembra politoca más cercana filogenéticamente a la mujer que las de los rumiantes o los suidos, y con un oviducto de mayor tamaño que el de la ratona, parece un modelo interesante para estudiar esta evolución temporal.

## 2.- OBJETIVO

Caracterizar la evolución en el perfil transcriptómico del oviducto desde la fase preovulatoria hasta el momento que coincide con la presencia de blastocisto, para conocer mejor los eventos moleculares asociados a la fecundación y al desarrollo embrionario preimplantacional en el oviducto de la coneja.

## 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.- ÉTICA

La manipulación y cuidado de los conejos de experimentación se llevó a cabo de acuerdo a los principios de cuidado animal publicados en el Real Decreto 1201/2005 (BOE, 2005: 252: 34367-91), la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y el Consejo del 22 de septiembre de 2010 sobre la protección de los animales usados con fines científicos (2010; 276: 33-79). El comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona aprobó este estudio (expediente interno nº 517).

### 3.2.- MANTENIMIENTO DE LOS CONEJOS

Para los experimentos se usaron dieciocho conejos de Nueva Zelanda, (6 machos y doce hembras) en edad fértil (entre 7 y 13 meses de edad) de la granja del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA-Torre Marimon, Caldes de Montbui, Barcelona). Cada animal se mantuvo en una caja (85 x 40 x 30 cm) con soportes para descanso podal, un dispensador de comida con 180 g/día de alimento completo para conejos y biberones para permitir acceso *ad libitum* al agua. El fotoperiodo empleado fue 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con rangos de temperatura de 15-20 °C en invierno y 20-26 °C en verano. La humedad relativa se mantuvo en un 60-75% mediante un sistema de ventilación forzada.

### 3.3.- ESTIMULACIÓN OVÁRICA Y MONTA

La ovulación se indujo mediante inyección intramuscular de 0.03 mg de GnRH (Fertagyl, Esteve Veterinaria, Barcelona). Cada una de las hembras fue montada en sucesión por dos machos diferentes escogidos al azar (para reducir el efecto individual) 10 h tras la inyección de GnRH.

### 3.4.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las conejas fueron sacrificadas en su tiempo correspondiente (Fig. 17) mediante administración intravenosa (vena marginal de la oreja) de 600 mg de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol, Madrid). Las muestras de oviducto, fueron congeladas a -80 °C en el reactivo RNAlater (Sigma, Saint Louis, USA) que posee inhibidores de RNAsas y permite la conservación del ARN de forma indefinida a esta temperatura. De cada par de

oviductos, el derecho se empleó para la extracción de RNA y el izquierdo para el estudio histológico.

El FO se obtuvo a partir del lavado de los oviductos desde el infundíbulo a la unión útero-tubárica con 2 ml de PBS y los embriones presentes se separaron y contabilizaron. El lavado se concentró 5-6 veces con centricones de 10 kDa para realizar análisis de proteómica y Western Blot y se conservó a -80 °C.

### 3.5.- EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el RNAqueous Total RNA Isolation kit (ref. AM1912, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se extrajo cada muestra del RNAlater, se le quitaron los restos de tejido adiposo y se pesó. Después se añadieron 10 µl de tampón de lisis por cada mg de muestra y se procedió a su disgregación en un homogenizador manual, manteniendo la muestra en todo momento a 4°C. El homogenizado resultante se hizo pasar por una jeringuilla de 25G varias veces y se centrifugó a 14000 g (el resto de centrifugaciones son idénticas) durante 2 minutos, descartándose el precipitado resultante. El sobrenadante se mezcló en proporción 1:1 con etanol al 64% y se transfirió a una columna del kit. Se centrifugó durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. El filtro fue lavado en varios pasos con el resto de tampones de lavado del kit en el orden correspondiente. Tras centrifugar con el último tampón de lavado se montó el filtro con un tubo colector y se incubó a 75°C con 40 µl del tampón de elución. Tras recuperar por centrifugación el eluido con el ARN, se procedió a una segunda elución con 15 µl de tampón de elución. El líquido resultante se guardó a -80° C hasta su uso. Cada muestra de ARN se extrajo en un ciclo diferente para minimizar el riesgo de contaminación cruzada de material genético entre las muestras.

### 3.5.- CALIDAD DE LAS MUESTRAS

La calidad de las muestras de ARN se analizó con un sistema electroforético capilar Bioanalyzer 2100 de Agilent, cargando 1  $\mu$ l de muestra en un chip Agilent RNA 6000 Pico. Se registraron sus RIN (**R**NA Integrity **N**umber, medida de la integridad del ARN en una muestra biológica), concentración de RNA y ratios de absorbancia a 260/280 y 260/230 que indican contaminación por proteínas y disolventes orgánicos, respectivamente. El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia.

### 3.6.- ANÁLISIS DE MICROMATRICES

El análisis de los micromatrices se llevó a cabo con ayuda de la plataforma GeneAtlas Microarray System de Affymetrix, empleando los chip Rabbit Gene 1.1 ST Array Strip, Affymetrix en las instalaciones del ACTI.

### 3.7.- ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

El estudio de los datos se hizo en la suite de Partek Genomics, donde se corrigieron los datos brutos de intensidades de señal con respecto a la señal de fondo y se normalizaron mediante el método RMA (**R**obust **M**icroarray **A**nalysis). Los genes diferencialmente expresados (DEGs) fueron filtrados mediante un script en R (v3.6.1), seleccionándose aquellos que tuviesen un ratio (fold change)  $> |1.5|$  y un FDR (**F**alse **D**iscovery **R**ate)  $< 0.05$ . El análisis de los datos se lleva a cabo usando los paquetes de *Bioconductor limma* (Ritchie et al., 2015) y *rankprod* (v2.0, Carratore et al., 2017) para llevar a cabo los test estadísticos (modelos lineales y “rank product”), permitiendo identificar los ARNs

diferencialmente expresados. El ratio fue obtenido mediante análisis de la varianza en las comparaciones entre diferentes fases (pre-ovulatorio vs post-ovulatorio) o mediante t-test pareado múltiple en el caso de comparaciones entre tejidos, dado que cada ampolla y cada istmo procedían del mismo oviducto del mismo animal. La anotación biológica de los transcritos de interés se hizo empleando DAVID (Huang et al., 2009).

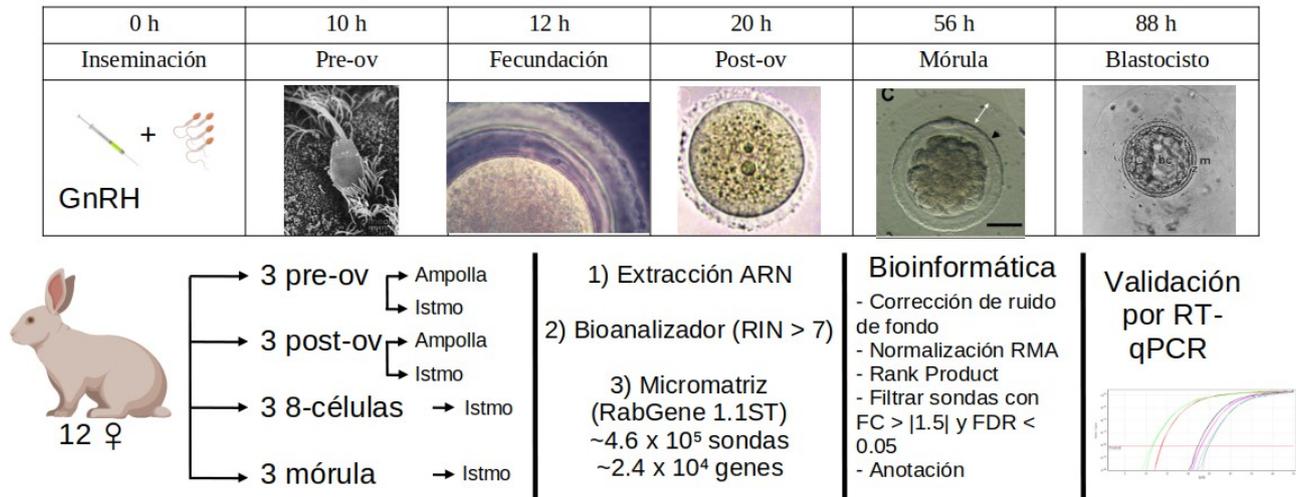


Figura 17. Esquema de la metodología y diseño experimental seguidos.

### 3.8.- RETROTRANSCRIPCIÓN

El RNA extraído se trató con el QuantiTect Reverse Transcription Kit de Qiagen (ref. 205311, Alemania). Este tratamiento consta de dos reacciones principales. En la primera, mediante una incubación de 3 minutos a 42°C con el tampón gDNA Wipeout se elimina el ADN genómico contaminante. En la segunda reacción, se incubó la muestra durante 30 minutos a 42°C con la retrotranscriptasa, nucleótidos y cebadores del kit para obtener el cDNA. Finalmente, la retrotranscriptasa se inactivó incubando la muestra durante 3 minutos a 95 °C y las muestras de cDNA se guardaron a -20 °C.

### 3.9.- PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

#### 3.9.1.- INTRODUCCIÓN

Para verificar los resultados obtenidos mediante el análisis con micromatrices, se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) con los siguientes genes: beta-actina (ACTB), oviductina (OVGP1), osteopontina (SPP1), metalopeptidasa 7 (MMMP7), factor neurotrófico derivado de astrocitos mesenquimales (MANF) e integrina alfa 5 (ITGA5). Para cada grupo experimental se usó cDNA proveniente de los tres replicados empleados en el experimento con micromatrices. Se seleccionaron proteínas relacionadas con la reproducción descritas previamente (SPP1, MMP7, e ITGA5), y aún no relacionadas pero detectadas en FO de coneja previamente (MANF). OVGP1 se incluyó en el grupo para confirmar que su expresión no varía en los diferentes tiempos en los que se recogieron muestras, mientras que ACTB actúa como control interno.

#### 3.9.2.- DISEÑO DE CEBADORES

Para el diseño de los cebadores se empleó la herramienta Primer-Blast del NCBI basada en el programa Primer3 (Köressaar et al., 2018) y se tomaron como referencia diferentes parámetros:

- Longitud del cebador: 18-21 pb.
- Contenido en G+C: 40-60%.
- Tm: 58-60°C.
- Longitud del amplicón: 50-90 bp.
- Máximo número de nucleótidos idénticos seguidos: 4.
- Los últimos 5 nucleótidos del extremo 3' no pueden incluir más de 2 G y/o C.

- Complementariedad en el extremo 3' inferior a 6.
- Estructura terciaria débil o nula.

Sólo se seleccionaron parejas de cebadores específicas de la secuencia diana tras comprobar que los cebadores no eran complementarios con otros loci del genoma de *Oryctolagus cuniculus*.

Tabla 8: cebadores usados en la validación mediante RT-qPCR.

Gen	Secuencias (5'→3')	Tm (°C)	Longitud del amplicón	Eficiencia de la PCR
ACTB	Fw: TGGCATCCTGACGCTCAA	58.9	57	90.6
	Rv: TCGTCCCAGTTGGTCACGAT	61.2		
OVGP1	Fw: GCTCTCCGCTGCTGTTTCTG	61.7	59	90.1
	Rv: GGCGCACGTCGTAAGATGTT	61.4		
SPP1	Fw: GCTCTGGCCACATGGCTAAA	60.7	61	106
	Rv: TCTGCGGTGTTAGGAGATTCTG	59.8		
MANF	Fw: CACCATATCCCCGTGGAGAA	58.9	62	104.7
	Rv: TCGCAGATCTGGCTGTCTTTC	60.4		
MMP7	Fw: CATCAGTGTTCCCAACCAAA	58.7	89	96.4
	Rv: AAACCCACTGCCATCCAAGA	59.5		
ITGA5	Fw: CCTGCGCATCCGTAACG	58.6	62	90.5
	Rv: CGTTCCTGAGGTAGATCTTCATCTC	60.3		
MUC4	Fw: AACGCACCCAGAATCAGTT	60.4	65	95
	Rv: ACGGAATCCACACGCTCTTC	60.0		

### 3.9.3.- CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS ARNm

Los diferentes experimentos de RT-qPCR se hicieron en la plataforma 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). Se empleó 1 µl de muestra de ADNc por pocillo de reacción, junto al reactivo SYBR Green Master Mix para PCR de Applied Biosystems (ref.

4309155) y los cebadores correspondientes a una concentración de 50 nM, para un volumen final de 10 µl por pocillo.

Para calcular la eficiencia de la PCR se emplearon cinco diluciones seriadas de la misma muestra de cDNA (factor de dilución 1/10) con tres replicados técnicos para cada dilución. Para la cuantificación relativa se emplearon dos replicados técnicos de cada muestra, estimando que la C<sub>T</sub> en cada pocillo estuviera en un rango de 20-30 ciclos.

El protocolo de los ciclos involucra una etapa inicial de 20 s a 50°C para la activación de la uracil-DNA glicosilasa; una segunda etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 min; 40 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 95°C de 15 s, una extensión a 60°C de 1 min, y una curva de melting continua entre 60 y 95°C.

El cálculo del ratio entre los diferentes grupos experimentales se calculó según el método descrito por Pfaffl (2001):

$$\text{ratio} = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{T\text{target}} (\text{condicion 1} - \text{condicion 2})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta C_{T\text{ref}} (\text{condicion 1} - \text{condicion 2})}$$

Donde E se refiere a la eficiencia de la PCR del gen de interés (target) o del de referencia (ref, ACTB en estos experimentos), y el incremento en la C<sub>T</sub> se estudia en dos condiciones experimentales distintas (el orden no es importante siempre y cuando se tenga en cuenta a la hora de interpretar los resultados que el ratio usando condición 1 – condición 2 será equivalente a 1 entre el ratio alterando el orden a condición 2 – condición 1).

El análisis estadístico incluyó el test normalidad de Shapiro-Wilks y la prueba de homoscedasticidad de Levene para finalmente hacer una prueba t de Student entre dos grupos de  $\Delta C_T$  correspondientes a 2 grupos experimentales diferentes.

### 3.10.- INMUNOHISTOQUÍMICA

#### 3.10.1.- FIJACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras se fijaron en formaldehído al 4% a temperatura ambiente toda la noche y después se guardaron a 4°C en PBS hasta su inclusión.

#### 3.10.2.- INCLUSIÓN Y CORTE DE LAS MUESTRAS

La inclusión de los tejidos se realizó en un procesador automático (histokinette), donde los tejidos fueron sometidos a una deshidratación progresiva en soluciones crecientes de etanol (desde 50% a absoluto), después se realizó el aclaramiento con tolueno. La inclusión se realizó colocando las muestras en los moldes y añadiendo Paraplast Plus líquido a 60°C (ref. P3683, Sigma). Una vez enfriado el bloque, fue cortado con un grosor de 5  $\mu\text{m}$  con ayuda de un microtomo de rotación y los cortes se montaron en portaobjetos SuperFrost Plus (ref. J1800AMNZ, Thermo Fisher) para evitar que se despegase el tejido oviductal.

#### 3.10.3.- INMUNOCITOQUÍMICA

Las muestras fueron en primer lugar sometidas a un desparafinado en un incubador a 55°C durante toda la noche. Después se procedió a su hidratación mediante incubación en una solución de sustituto de xileno durante 5 minutos y posteriormente en soluciones

decrecientes de etanol (desde absoluto a 70%), finalizando con la muestra en agua. El desenmascaramiento antigénico se realizó con tampón citrato a pH 6 incubando a 98°C durante 30 minutos en una olla a presión.

Tras tres lavados en tampón TBS de 5 minutos, se realizó un lavado con TBST. Como último paso antes de empezar las incubaciones con los anticuerpos se inhibió la peroxidasa endógena incubando en una solución de PBS con un 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos. Tras aclarar con TBS, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 10) toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

A continuación, las muestras se atemperaron a 37°C durante 10 minutos y se lavaron durante 3 minutos con TBST. Después se incubaron 30 minutos con el anticuerpo secundario a 37°C (ver tabla 10) conjugado con HRP y se realizaron dos lavados durante 2 minutos con TBST.

El revelado se hizo con una solución de 0.5 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en TBS. La DAB es un compuesto que se oxida en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> precipitando un producto de color pardo. Los portaobjetos se lavaron durante 5 minutos con agua de grifo y después con agua destilada.

Tras contrastar incubando en una solución de hematoxilina durante 30 segundos, los portaobjetos se lavaron 5 minutos en agua y se procedió a su deshidratación con incubaciones de 5 minutos soluciones crecientes de etanol (96% y dos veces en absoluto). Después de incubar en sustituto de xileno se le añadió medio de montaje DPX y un cubreobjetos.

### 3.10.4.- VISUALIZACIÓN

La visualización de los cortes histológicos se hizo en un microscopio Zeiss AxioPhot con óptica convencional y las fotos se realizaron con una cámara de fotos Leica DC500.

### 3.11.- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE BRADFORD

La concentración de proteínas en el FO de coneja se cuantificó usando el reactivo Pierce Coomassie Plus™ (ref. 23238, Thermo Scientific). Midiendo la absorbancia a 595 nm de 8 diluciones de BSA como se muestra en la tabla 9 se pudo confeccionar una recta de regresión (Fig. 18) se puede inferir la cantidad de proteína de una muestra problema teniendo en cuenta su absorbancia, y a partir de la cantidad se puede calcular la concentración teniendo en cuenta el volumen cargado.

Tabla 9. Concentración de BSA vs absorbancia a 595 nm medida en un espectrofotómetro (S-22 UV/Vis, BOECO, Alemania).

<b>BSA (µg)</b>	<b>Absorbancia (595 nm)</b>
0	0
0.5	0.02
1	0.036
2	0.071
5	0.185
10	0.386
15	0.559
20	0.717

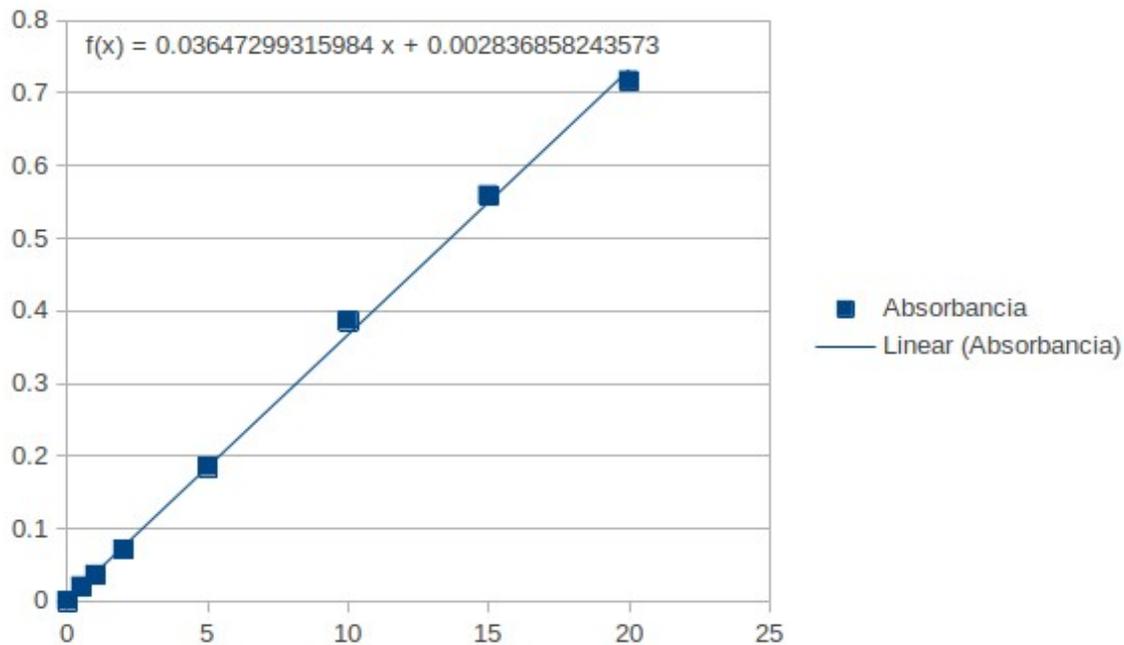


Figura 18. Recta de regresión con la fórmula que relaciona la absorbancia (y) con la concentración (x).

### 3.12.- ELECTROFORESIS EN GEL DE TRIS GLICINA

Las muestras de proteínas fueron desnaturalizadas a 95°C durante 10 minutos en tampón de Laemmli (condiciones reductoras) y cargadas en un gel de electroforesis de Tris-glicina con gradiente 4-20%. La electroforesis del gel se hizo en una cubeta Xcell SureLock® MiniCell (Invitrogen™, Carlsbad, EEUU) rellena de tampón de recorrido (tabla ...) a 200 V durante 1 hora. Junto a las muestras se cargó un marcador de peso molecular estándar Precision Plus Protein™ (BioRad, Hercules, EEUU).

### 3.13.- WESTERN BLOT

La transferencia húmeda a una membrana de PVDF (Merck Millipore, Billerica, EEUU, ref. IPVH00010) se realizó a 40 V durante tiempos de 1h a 1h 30 minutos en función del peso molecular esperado de la proteína problema con el tampón de transferencia (Tabla 11)

con metanol al 10%. Previamente, la membrana se activó mediante incubación en metanol durante 1 minuto.

### 3.14.- INMUNODETECCIÓN EN MEMBRANA

Tras la transferencia, se hizo un lavado inicial con TBST y se bloqueó la membrana incubando a temperatura ambiente con TBST-1% BSA durante 1 hora. Tras esto se incubó con el anticuerpo primario (Tabla 10) toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados en agitación fuerte a temperatura ambiente con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó con TBST 3 veces en agitación fuerte.

Los controles del anticuerpo secundario se hicieron de forma similar obviando la incubación con el anticuerpo primario.

Tabla 10. Referencias y diluciones empleadas para cada anticuerpo.

Nombre	Peso molecular (antígeno)	Clase	Dilución	Casa comercial	Referencia
anti- IgG de conejo-HRP	50 kDa* + 25 kDa	Monoclonal de ratón	de 1:10000	Santa Cruz Biotechnology	SC-2357
anti- IgG de ratón-HRP	50 kDa* + 25 kDa	Policlonal de burro	1:10000	Thermo	SA1-100
anti-OVGP1	65-70 kDa	Policlonal de conejo	1:5000 (WB) 1:400 (IH)	Abcam	ab118590
anti-SPP1	50-55 kDa	Monoclonal de ratón	de 1:2500	Novus Biologicals	NB110-89062
anti-MANF	16 kDa	Policlonal de conejo	1:1000	Proteintech	10869-1-AP
anti-NPY	11 kDa	Policlonal de conejo	1:2000	Proteintech	12833-1-AP
anti-MMP7	30 kDa	Policlonal de conejo	1:2000	Proteintech	10374-2-AP

\* En el caso de las IgG, su peso molecular completo es de unos 150 kDa para ambas especies, ya que la IgG contiene 2 cadenas pesadas de 50 kDa y 2 ligeras de 25 kDa.

### 3.15.- REVELADO

Para el revelado, la membrana se incubó con el reactivo Pierce ECL Western Blotting Substrate (Polysciences, Eppelheim, Alemania) y las fotografías se hicieron en un equipo ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Buckinghamshire, GB), con el software ImageQuant™.

Tabla 11. Composición de los tampones empleados en los experimentos de electroforesis de proteínas y WB. Las cantidades a añadir de cada sustancia están calculadas para preparar un volumen de solución stock 10x de 1 l.

	<b>T. recorrido</b>	<b>T. transferencia</b>	<b>TBST</b>
NaCl	-	-	88 g
Tris	30 g	58 g	24 g
Glicina	144 g	29 g	-
SDS	10 g	3.7 g	-
Tween	-	-	100 ml
pH	8.3	-	7.6

### 3.16.- PROTEÓMICA

#### 3.16.1.- Pre-procesado

8 µg de la muestra de FO se digirieron con 400 µg de tripsina (Promega, Wisconsin, EEUU) toda la noche a 37° C. La digestión terminó con la adición de ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final de 1%. Después se hizo una doble extracción con acetonitrilo (ACN) de la muestra y se secó en un evaporador rotatorio, resuspendiéndose el precipitado en 10 µl de acetonitrilo.

### 3.16.2.- Cromatografía líquida

Se cargaron 3 µl de muestra (con 3 µg de proteína) en una columna de cromatografía C18-CL de 350 x 0.5 mm, con tamaño de partícula de 3 µm (Eksigent, California, EEUU) y se eliminaron las sales eluyendo con TFA 0.1% a un caudal de 5 µl/min durante 5 min. Después la muestra se cargó en una columna analítica C18-CL de 150 x 0.075 mm con tamaño de partícula de 3 µm (Eksigent, California, EEUU) equilibrada con una solución al 5% de ACN y 0.1% de ácido fórmico (AF). La elución de la columna se hizo mediante gradiente lineal del 5 al 40% de B en A durante 45 minutos (siendo la solución A AF al 0.1% y la solución B: ACN + 0.1% AF) a un caudal de 300 nl/min.

### 3.16.3.- Espectrometría de masas

Los péptidos de la muestra se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI-qTOF (6600plus Triple TOF, ABSciex, Massachusetts, EEUU). La fuente de ionización Optiflow Nano aplicó 3kV al spray a 200°C. Los escaneos mediante MS1 se hicieron a 350-1400 m/z durante 250 ms. Para los MS2, la adquisición se hizo a 100-1500 m/z durante 25 ms en modo de alta sensibilidad.

Los resultados se procesaron con ProteinPilot (v. 5.0, ABSciex, EEUU) con los parámetros predeterminados para generar la lista de picos a partir de los ficheros ".wiff" del 6600plus Triple TOF. Se usó el algoritmo Paragon (Shilov et al., 2007) para hacer la búsqueda e identificación de los péptidos con la base de datos de Uniprot restringida al taxón 9986 (correspondiente a *Oryctolagus cuniculus*) teniendo en cuenta cortes específicos de tripsina.

## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- ANÁLISIS DE MICROMATRICES

#### 4.1.1.- CALIDAD DE LAS MUESTRAS

La calidad de las muestras de ARN extraído de las ampollas e istmos de las conejas en las fases pre-ovulatoria y post-ovulatoria fue analizada antes de realizar el experimento de transcriptómica. Once de las 12 muestras presentaron un RIN > 7 que se considera aceptable para muestras de tejido congelado. La muestra "POST-A1" fue incluida en el análisis también al estar muy cerca de este umbral con un RIN de 6.9 (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados de la calidad de las muestras de ARN obtenido a partir de oviducto de coneja.

<b>Muestra</b>	<b>[ARN] (µg/µl)</b>	<b>Abs 260/280</b>	<b>Abs 260/230</b>	<b>RIN</b>
Pre-ovulatorio ampolla 1	366.0	2.04	1.92	9
Pre-ovulatorio ampolla 2	191.1	2.1	0.85	8.9
Pre-ovulatorio ampolla 3	774.2	2.03	1.6	9.7
Pre-ovulatorio istmo 1	193.1	2.11	1.3	8.2
Pre-ovulatorio istmo 1	299.7	2.06	0.77	8.7
Pre-ovulatorio istmo 2	267.4	2.08	1.07	7
Post-ovulatorio ampolla 1	50.5	2.05	0.4	6.9
Post-ovulatorio ampolla 2	110.3	2.06	0.63	8.5
Post-ovulatorio ampolla 3	123.3	2.13	1.25	9
Post-ovulatorio istmo 1	48.8	2.07	0.16	8.3
Post-ovulatorio istmo 2	256.9	2.09	1.62	8.4
Post-ovulatorio istmo 3	59.6	2.06	1.23	9.1
8 células 1	111.7	2.05	1.97	9.8

8 células 2	41.2	2.04	1.25	8.2
8 células3	121.0	2.00	2.17	8.8
Mórula 1	48.2	2.12	1.84	9.0
Mórula 2	33.8	2.04	1.24	8.7
Mórula 3	37.1	1.99	1.27	8.7

#### 4.1.2.- EXPRESIÓN DIFERENCIAL DESDE PRE-OVULATORIO HASTA LA FASE DE BLASTOCISTO EN EL OVIDUCTO EN EL ISTMO

Tras el procesado de los datos de las micromatrices, se generó una tabla con todas las lecturas normalizadas según la sonda (filas) y muestras (columnas). Estos datos fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA; Fig. 19) donde se observó una clara diferenciación entre las muestras de las fases pre y post-ovulatoria y con respecto a las que tenían embriones de 8 células y mórulas, pero no entre las muestras con embriones de 8 células y mórulas. Después se realizó el análisis estadístico que reveló un total de 602 transcritos con diferencias significativas en la intensidad de señal entre las diferentes fases analizadas. Una representación del clustering jerárquico de los 602 transcritos expresados diferencialmente agrupó correctamente las muestras biológicas en función de su grupo original (Fig. 20).

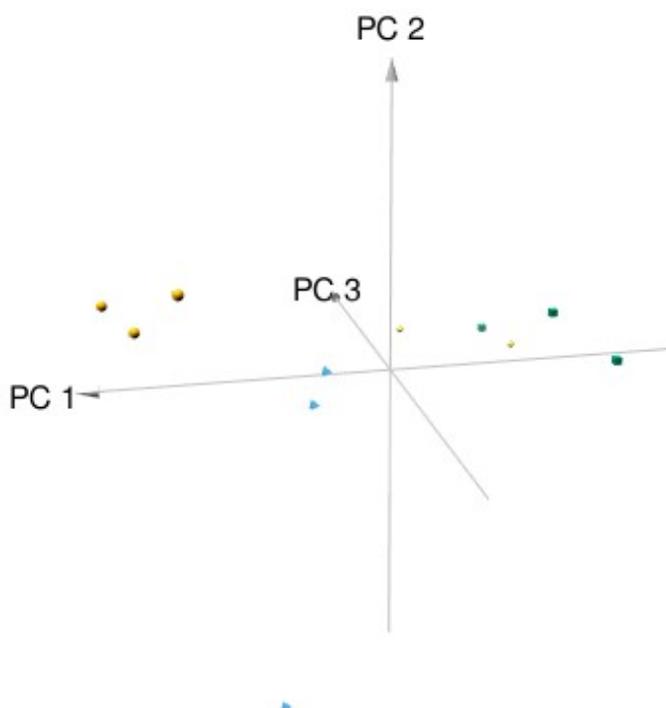


Figura 19. Representación 3D del análisis de componentes principales de las muestras de istmo en las fases: pre-ovulatoria (esferas naranjas),

post-ovulatoria (pirámides azules), con embriones de 8 células (octaedros amarillos) y con mórulas (cubos verdes).

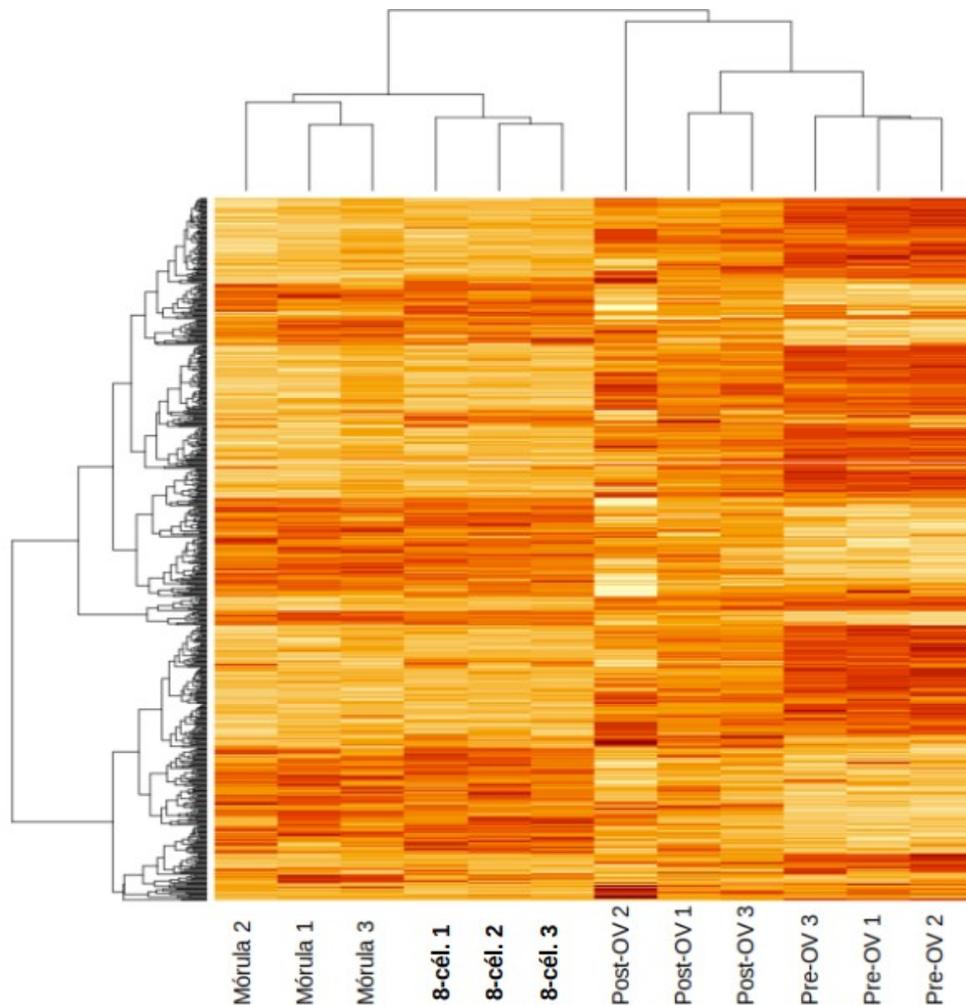


Figura 20. Heatmap de los 602 transcritos vs las 12 muestras de istmo en las 4 fases estudiadas.

El análisis SOTA reveló la presencia de 6 grupos (o clusters) diferentes de transcritos en función de su evolución temporal (Fig. 21). Los dos primeros grupos incluyen transcritos con una expresión moderada que disminuye progresiva y suavemente desde la fase de pre-ovulatorio hasta la de mórulas. El grupo 3 incluye transcritos con una expresión elevada que aumenta en presencia de embriones de 8 células y mórulas. Por otra parte el

grupo 4 contiene transcritos de expresión elevada mayor en las fases pre y post-ovulatoria que en presencia de embriones de 8 células y mórulas. Finalmente, los transcritos de los grupos 5 y 6 presentan una evolución similar a los grupos 3 y al 4 respectivamente pero su expresión es baja. Debido a esto, nos centraremos en estudiar los grupos 3 y 4 que incluyen transcritos con claras diferencias entre el período pre-ovulatorio y en presencia de embriones de 8 células y mórulas, con una expresión elevada en los tejidos del istmo.

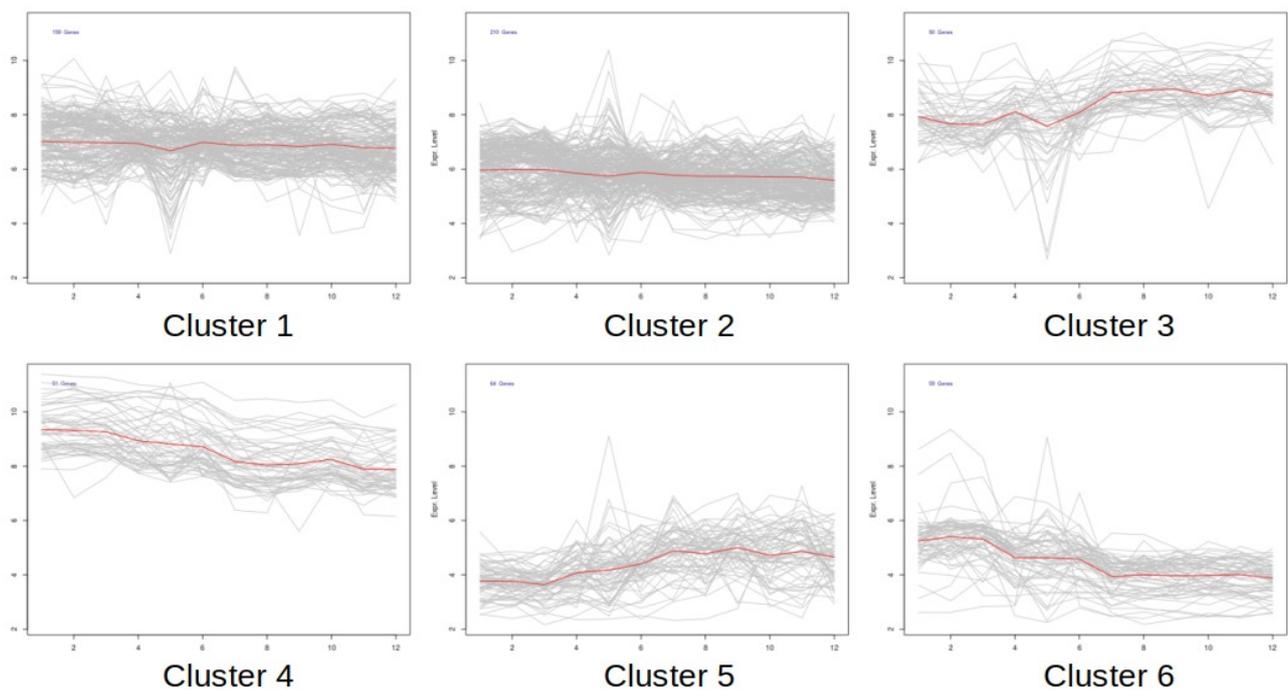


Figura 21. Clusters obtenidos mediante el método de clustering jerárquico divisivo SOTA. La maraña de líneas grises determina la evolución de cada transcrito, mientras que la línea roja representa la tendencia de la expresión en cada clúster.

#### 4.1.2.1.- Genes pertenecientes al grupo SOTA3

Los 50 transcritos pertenecientes al grupo SOTA3 se agrupan en 45 genes diferencialmente expresados cuya expresión aumenta durante el desarrollo embrionario

preimplantacional: “NPY, CES2, SLC26A3, NR1D2, CCL21, RPL7, HBB2, PLD5, ABCA8, SULT1C4, METTL7A, VWA3A, LRP2, SPINK8, ND6, KLF9, SEPP1, LOC100353927, RGS5, RGS4, PLSCR4, ADCK3, RPL34, EFEMP1, TP53INP1, FBXO32, RFTN2, CLK1, SRSF6, SRSF5, SNRNP70, OGT, ROPN1L, DHRS7, RLA-DR-ALPHA, CRYZL2, RBMS3, RPL23A, CKMT1B, ALOX15B, TSHR, PENK, EFCAB10, MFAP5, CYSLTR1”. Según la anotación funcional con DAVID existe un enriquecimiento en el término GO “response to oxygen-containing compound” (con los genes TSHR, TP53INP1, OGT, FBXO32, RGS4, SLC26A3, PLSCR4, SRSF5, SRSF6, SNRNP70, KLF9, PENK y CCL21) y en la ruta “G alpha (I) signalling events”, un mecanismo de señalización clásico que inhibe la adenilato ciclasa y con ello la producción de AMPc y la actividad de las kinasas dependientes de este metabolito (incluye a los genes CCL21, NPY, PENK, RGS4, RGS5 y LRP2).

#### 4.1.2.2.- Genes pertenecientes al grupo SOTA4

Los 51 transcritos pertenecientes al grupo SOTA4 pertenecen a 51 genes diferentes cuya expresión es elevada en torno las fases pre y post-ovulatoria pero que disminuye en presencia de la mórula o del blastocisto (COL1A2, FBN1, ERO1L, COL1A1, FBLN5, MMP2, COL3A1, FN1, IGFBP5, ANGPTL2, COL6A3, EMP3, COL5A1, MICAL2, RAB23, CTGF, CYR61, NEXN, GYG1, RBP1, LBH, ACTN1, HSPB8, TGFBI, EGR1, ITGA5, LOC100343557, HSPB1, PDIA4, DES, FLNC, LIMS2, HSPA5, TNC, BZW2, HSPB7, PDIA6, CD276, TIMP1, GPR64, SAA3, CRYAB, CAPN2, ZNF106, HTRA1, MYO1C, CRIM1, MYH9, ACTN4, SERPINE2, MPRIP). Estos genes se conocen mejor y están más relacionados entre sí que los del grupo SOTA3, por lo que la anotación funcional nos aporta más información. Hay 19 genes que codifican proteínas secretadas (HTRA1, TIMP1, ANGPTL2, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL6A3, CTGF, CYR61,

CRIM1, FBN1, FN1, FBLN5, IGFBP5, MMP2, SERPINE2, TNC y TGFB1), la mayor parte de ellos componentes o remodeladores de la matriz extracelular, como puede inferirse a partir de los datos de la anotación funcional (Tabla 13).

Tabla 13. Términos de la Gene Ontology enriquecidos en el clúster SOTA4.

	%	P-Value	FDR
<b>GO (Procesos biológicos)</b>			
extracellular matrix organization	25.5	3.9E-12	5.5E-09
collagen catabolic process	12.8	8.3E-07	1.2E-03
extracellular matrix disassembly	12.8	2.0E-06	2.8E-03
regulation of cell growth	12.8	2.5E-06	3.6E-03
cellular response to amino acid stimulus	10.6	8.1E-06	1.1E-02
cell adhesion	19.1	3.1E-05	4.4E-02
<b>GO (Componentes celulares)</b>			
extracellular matrix	36.2	9.7E-18	1.1E-14
proteinaceous extracellular matrix	23.4	1.0E-09	1.2E-06
focal adhesion	25.5	2.6E-09	3.0E-06
extracellular region	42.6	3.5E-09	4.0E-06
extracellular space	38.3	1.2E-08	1.4E-05
extracellular exosome	51.1	4.3E-08	5.0E-05
endoplasmic reticulum lumen	17.0	4.9E-07	5.7E-04
Z disc	14.9	4.9E-07	5.7E-04
collagen trimer	12.8	3.4E-06	4.0E-03
<b>GO (Funciones moleculares)</b>			
integrin binding	23.4	1.5E-13	1.7E-10
platelet-derived growth factor binding	8.5	2.9E-06	3.3E-03
insulin-like growth factor binding	8.5	1.4E-05	1.6E-02
extracellular matrix structural constituent	10.6	3.0E-05	3.4E-02

#### 4.1.3.- COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN DOS REGIONES DEL OVIDUCTO ENTRE LAS FASES PRE-OVULATORIA Y POST-OVULATORIA

##### 4.1.3.1.- Istmo

El análisis bioinformático de las muestras de istmo reveló una sobreexpresión de 77 genes en la fase pre-ovulatoria (Tabla 14), mientras que en la fase post-ovulatoria se sobreexpresan 19 genes (Tabla 15).

Tabla 14. Genes sobreexpresados en el istmo en fase pre-ovulatoria comparados con la post-ovulatoria ordenados de mayor a menor fold change (FC). En las distintas columnas se indica: número de acceso de Ensembl, símbolo del gen, nombre de la proteína, fold change, p-valor, media de la intensidad de fluorescencia normalizada para las muestras de la fase pre-ovulatoria (PRE) y post-ovulatoria (POST). Valores positivos de FC indican una sobreexpresión tras la ovulación, mientras que los valores negativos indican represión.

Ensembl accession ID	Gene symbol	Protein name	Fold Change	P-value	PRE	POST
ENSOCUT0000007566	ACTC1	actin, alpha cardiac muscle 1	-30.65	3.06E-12	8.91	3.97
ENSOCUT0000023383	LOC100343299	Metallothionein-2A (MT2A)	-8.74	3.85E-09	7.49	4.36
ENSOCUT00000011416	LOC100353356	UDP-glucuronosyltransferase 3A2 (UGT3A2)	-6.4	3.11E-08	7.09	4.41
ENSOCUT00000020991	PLEKHB2	pleckstrin homology domain containing family B member 2	-4.21	9.04E-06	6.47	4.40
ENSOCUT00000005163	ANGPTL1	angiotensin-like 1	-3.95	1.48E-05	7.98	5.99
ENSOCUT00000011414	TGFB3	transforming growth factor beta 3	-3.84	1.24E-06	8.68	6.74
ENSOCUT00000030686	OLR1	oxidized low density lipoprotein receptor 1	-3.68	2.26E-05	6.80	4.91
ENSOCUT00000013387	EPYC	epiphycan	-3.51	0.0001572	7.98	6.17
ENSOCUT00000011039	LRP2	low density lipoprotein receptor-related protein 2	-3.37	6.60E-06	8.81	7.06
ENSOCUT0000000406	KALRN	kalirin	-3.33	2.07E-06	7.07	5.33
ENSOCUT00000002687	ADCY8	adenylate cyclase 8	-3.33	8.03E-06	7.25	5.51
ENSOCUT00000009189	PLD5	phospholipase D5	-3.12	5.97E-05	7.71	6.06
ENSOCUT00000010758	NPY	neuropeptide Y	-3.05	0.0001072	8.05	6.45
ENSOCUT00000016070	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor	-3.02	2.13E-05	9.24	7.64
ENSOCUT00000001660	SLC7A11	solute carrier family 7	-3	2.16E-05	4.27	2.69
ENSOCUT00000011745	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4	-2.97	5.55E-06	8.42	6.86
ENSOCUT00000004242	HYOU1	hypoxia up-regulated 1	-2.9	6.67E-06	8.02	6.48
ENSOCUT00000024582	C2H2orf40	chromosome 2 open reading frame 40	-2.88	5.24E-05	7.87	6.35
ENSOCUT00000034155	CYP2C30	cytochrome P450 2C30	-2.87	0.0001715	4.89	3.37
ENSOCUT00000001539	DUSP5	dual specificity phosphatase 5	-2.85	7.41E-06	5.04	3.53
ENSOCUT00000010314	MANF	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	-2.84	6.56E-06	8.22	6.71
ENSOCUT00000011357	RRAS2	related RAS viral	-2.82	8.03E-06	7.08	5.59
ENSOCUT00000021511	CYP11A1	cytochrome P450	-2.8	1.23E-05	4.89	3.40
ENSOCUT00000016479	SELP	selectin P	-2.74	1.06E-05	6.46	5.00
ENSOCUT00000026669	SDF2L1	stromal cell-derived factor 2-like 1	-2.71	1.21E-05	7.48	6.04
ENSOCUT00000010849	HSPB7	heat shock 27kDa protein family	-2.71	1.73E-05	10.17	8.73
ENSOCUT00000013725	CRY1	cryptochrome circadian clock 1	-2.7	1.08E-05	5.87	4.43
ENSOCUT00000008863	CORIN	corin	-2.63	1.72E-05	6.27	4.87
ENSOCUT00000011149	TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily	-2.63	2.61E-05	7.14	5.75
ENSOCUT00000010505	NPR3	natriuretic peptide receptor 3	-2.6	3.49E-05	6.59	5.21
ENSOCUT00000015479	FABP4	fatty acid binding protein 4	-2.6	0.000115	7.52	6.14
ENSOCUT00000023979	CYP2B4	Cytochrome P450 2B4	-2.59	8.77E-05	7.32	5.95
ENSOCUT00000008120	RASL11A	RAS-like	-2.55	1.61E-05	5.60	4.25
ENSOCUT00000016761	EXPH5	exophilin 5	-2.54	2.18E-05	5.09	3.74
ENSOCUT00000016642	ITGB1BP2	integrin beta 1 binding protein	-2.54	8.75E-05	6.60	5.25
ENSOCUT00000016946	ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family	-2.51	7.09E-05	7.21	5.88
ENSOCUT00000034138	GADD45G	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 gamma	-2.5	2.44E-05	7.47	6.15
ENSOCUT00000017871	ACTN2	actinin 2	-2.5	8.22E-05	6.07	4.75
ENSOCUT00000033271	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-2.5	3.74E-05	7.82	6.50
ENSOCUT00000013380	ITGA5	integrin alpha 5	-2.49	2.11E-05	9.22	7.90
ENSOCUT00000011949	FLNC	filamin C	-2.48	2.57E-05	9.80	8.49
ENSOCUT0000000483	CAPN9	calpain 9	-2.46	0.0001438	6.92	5.63
ENSOCUT00000012082	MYBBP1A	MYB binding protein 1A	-2.45	2.50E-05	6.83	5.53
ENSOCUT00000022721	PTPRN2	Receptor type protein tyrosine phosphatase N2	-2.44	8.67E-05	7.08	5.79
ENSOCUT00000011697	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	-2.43	3.03E-05	6.24	4.95
ENSOCUT00000009094	SDC4	syndecan 4	-2.42	3.24E-05	8.18	6.90
ENSOCUT00000029691	LOC103350132	protein transport protein Sec61 subunit beta-like	-2.4	2.93E-05	6.33	5.07
ENSOCUT00000024610	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-2.4	0.0001096	7.06	5.80
ENSOCUT00000029934	TNC	tenascin C	-2.33	4.30E-05	10.81	9.60
ENSOCUT00000031562	ACKR1	atypical chemokine receptor 1	-2.32	4.22E-05	8.13	6.92
ENSOCUT00000033880	CRISPLD2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	-2.32	5.19E-05	7.78	6.56
ENSOCUT00000003789	SGCG	sarcoglycan	-2.3	4.44E-05	6.98	5.77
ENSOCUT00000010906	SHISA6	shisa family member 6	-2.29	7.57E-05	5.50	4.31
ENSOCUT00000007763	PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1	-2.28	0.0001309	7.88	6.70
ENSOCUT00000011396	ITGA2	integrin alpha 2	-2.28	0.0001128	7.57	6.39
ENSOCUT00000028957	OTOP1	otopetrin 1	-2.28	0.0001436	4.28	3.09
ENSOCUT00000015950	STK17A	serine/threonine kinase 17a	-2.23	5.93E-05	7.20	6.04
ENSOCUT00000026451	VARS	valyl-tRNA synthetase	-2.23	6.94E-05	7.13	5.97
ENSOCUT00000025480	ST8SIA5	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2	-2.23	9.79E-05	7.67	6.51
ENSOCUT00000023043	ITGB3	integrin beta 3	-2.21	0.0001523	6.90	5.76
ENSOCUT00000033606	USP13	ubiquitin specific peptidase 13	-2.2	7.13E-05	6.27	5.13
ENSOCUT0000002052	DNAJB11	DnaJ homolog subfamily B member 11	-2.2	6.67E-05	7.90	6.77
ENSOCUT00000017621	DNAJC3	DnaJ homolog subfamily C member 3	-2.2	7.06E-05	8.28	7.14
ENSOCUT00000003314	LOX	lysyl oxidase	-2.19	0.0001197	8.70	7.57
ENSOCUT00000025398	HSPA5	heat shock 70kDa protein 5	-2.19	6.88E-05	10.45	9.32
ENSOCUT00000003263	SLCO5A1	solute carrier organic anion transporter family	-2.17	8.41E-05	4.92	3.80
ENSOCUT00000022030	LOC100343557	metallothionein-2D	-2.14	8.86E-05	9.36	8.26
ENSOCUT00000023287	PNO1	partner of NOB1 homolog	-2.13	0.0001038	6.70	5.62
ENSOCUT00000000198	HK2	hexokinase 2	-2.13	0.000103	6.41	5.32
ENSOCUT00000001721	DIAPH3	diaphanous-related formin 3	-2.12	0.00012	6.57	5.49
ENSOCUT00000009191	SLC25A32	solute carrier family 25 member 32	-2.11	0.0001031	6.75	5.68
ENSOCUT00000029581	DERL3	derlin 3	-2.1	0.0001189	6.99	5.92
ENSOCUT00000033220	NIM1K	NIM1 serine/threonine protein kinase	-2.08	0.0001149	6.58	5.52
ENSOCUT00000000943	SYNC	syncollin	-2.06	0.0001502	6.41	5.37
ENSOCUT00000007166	ELL2	elongation factor ELL2	-2.05	0.0001645	7.82	6.79
ENSOCUT00000002301	ENAH	enabled homolog	-2.04	0.0001388	7.20	6.17
ENSOCUT00000021039	PLXNA4	plexin A4	-2.04	0.0001615	5.33	4.30

Tabla 15. Genes sobreexpresados en el istmo en fase post-ovulatoria respecto a la pre-ovulatoria.

Ensembl accession ID	Gene symbol	Protein name	Fold Change	P-value	PRE	POST
ENSOCUT00000013235	LOC100341182	intelectin-2-like (ITLN2)	5.87	1.76E-06	2.74	5.29
ENSOCUT00000014735	LOC100352724	mucin-16-like (MUC16)	4.43	6.63E-06	3.66	5.81
ENSOCUT00000009732	NR1D1	nuclear receptor subfamily 1	4.41	8.41E-07	5.89	8.03
ENSOCUT00000015324	MMP7	matrix metalloproteinase 7	4.22	7.12E-06	5.11	7.19
ENSOCUT00000027988	CEMIP	cell migration inducing protein	4.01	2.45E-06	5.37	7.38
ENSOCUT00000008915	CLDN8	claudin 8	3.96	3.14E-06	5.25	7.24
ENSOCUT00000027539	ACSL6	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	3.89	6.99E-06	5.11	7.06
ENSOCUT00000015287	LOC100359185	insulin growth factor-like family member 4 (IGFL4)	3.58	4.41E-06	5.19	7.03
ENSOCUT00000001209	RXFP1	relaxin/insulin-like family peptide receptor 1	3.2	2.38E-05	5.35	7.03
ENSOCUT00000010391	FREM1	FRAS1 related extracellular matrix 1	3.19	1.06E-05	4.3	5.97
ENSOCUT00000012155	PCSK1	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	3.14	7.02E-05	5.25	6.91
ENSOCUT00000028512	IGJ	immunoglobulin J polypeptide	3.02	3.41E-05	5.64	7.23
ENSOCUT00000029465	PKHD1	polycystic kidney and hepatic disease 1	3	1.75E-05	4.86	6.45
ENSOCUT00000005836	NRG1	neuregulin 1	2.99	1.74E-05	3.43	5
ENSOCUT00000030731	VAMP1	vesicle-associated membrane protein 1	2.88	1.26E-05	4.26	5.78
ENSOCUT00000000191	YPEL4	yippeelike 4	2.78	2.92E-05	3.92	5.4
ENSOCUT00000022202	SPP1	secreted phosphoprotein 1	2.53	7.33E-05	5.93	7.27
ENSOCUT00000007224	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2	2.51	6.87E-05	6.32	7.65
ENSOCUT000000033888	RFTN2	raftlin family member 2	2.37	7.35E-05	6.71	7.95

\* Los genes cuyo símbolo empieza por "LOC" no tienen un nombre oficial en esta especie, por lo que se les asignó el nombre de la proteína ortóloga con mayor homología de secuencia presente en primates y roedores tras comprobar que no estaba registrada en el proteoma de conejo según UniProt.

Entre los genes sobreexpresados durante el período pre-ovulatorio, hay 7 genes que codifican proteínas detectadas previamente mediante proteómica de FO de coneja (Yu et al, 2016): actina citosólica gamma 1 (ACTC1), miembro A2 de la familia 1 de aldehído deshidrogenasas (ALDH1A2), la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4), HSPA5, la proteína regulada por hipoxia 1 (HYOU1), el factor neurotrófico de astrocitos mesenquimales (MANF), el neuropéptido Y (NPY) y la proteína 2 parecida al factor derivado de células estromales 1 (SDF2L1). NPY y MANF son proteínas secretadas que poseen un péptido señal, mientras que el resto se han detectado previamente en exosomas.

De acuerdo con la anotación biológica realizada con DAVID y ToppCluster, hay otros genes que codifican proteínas secretadas sobreexpresados antes de la ovulación:

TNRSF11B, ANGPTL1, C2orf40, EPYC, LOX, OTOP1, PTGIS, SELP, SERPINE1, TNC, TGFB3 y VCAM1.

Entre los términos enriquecidos de localización celular para los genes sobreexpresados antes de la ovulación están “focal adhesion” y “endoplasmic reticulum lumen”. De los de funciones moleculares destaca “chaperone binding”, mientras que para procesos biológicos hay un enriquecimiento en genes involucrados en “response to topologically incorrect protein” y “response to organonitrogen compounds”. Las rutas enriquecidas en este subconjunto de genes son “syndecan interactions” y “extracellular matrix organization”.

La red de interacción generada mediante ToppCluster (Fig. 22) muestra la agrupación de los genes según los diferentes términos enriquecidos. Los términos “endoplasmic reticulum lumen”, “response to topologically incorrect protein” y “chaperone binding” conforman un cluster de proteínas mayoritariamente del retículo endoplásmico involucradas en el plegamiento proteico correcto. El otro gran cluster incluye los términos “focal adhesion”, “syndecan interaction”, “extracellular matrix organization” y “platelet degranulation”; este cluster agrupa proteínas de las adhesiones focales (algunas de las cuales interactúan con sindecano 4) y solapadas con otras que participan la organización de la matriz extracelular.

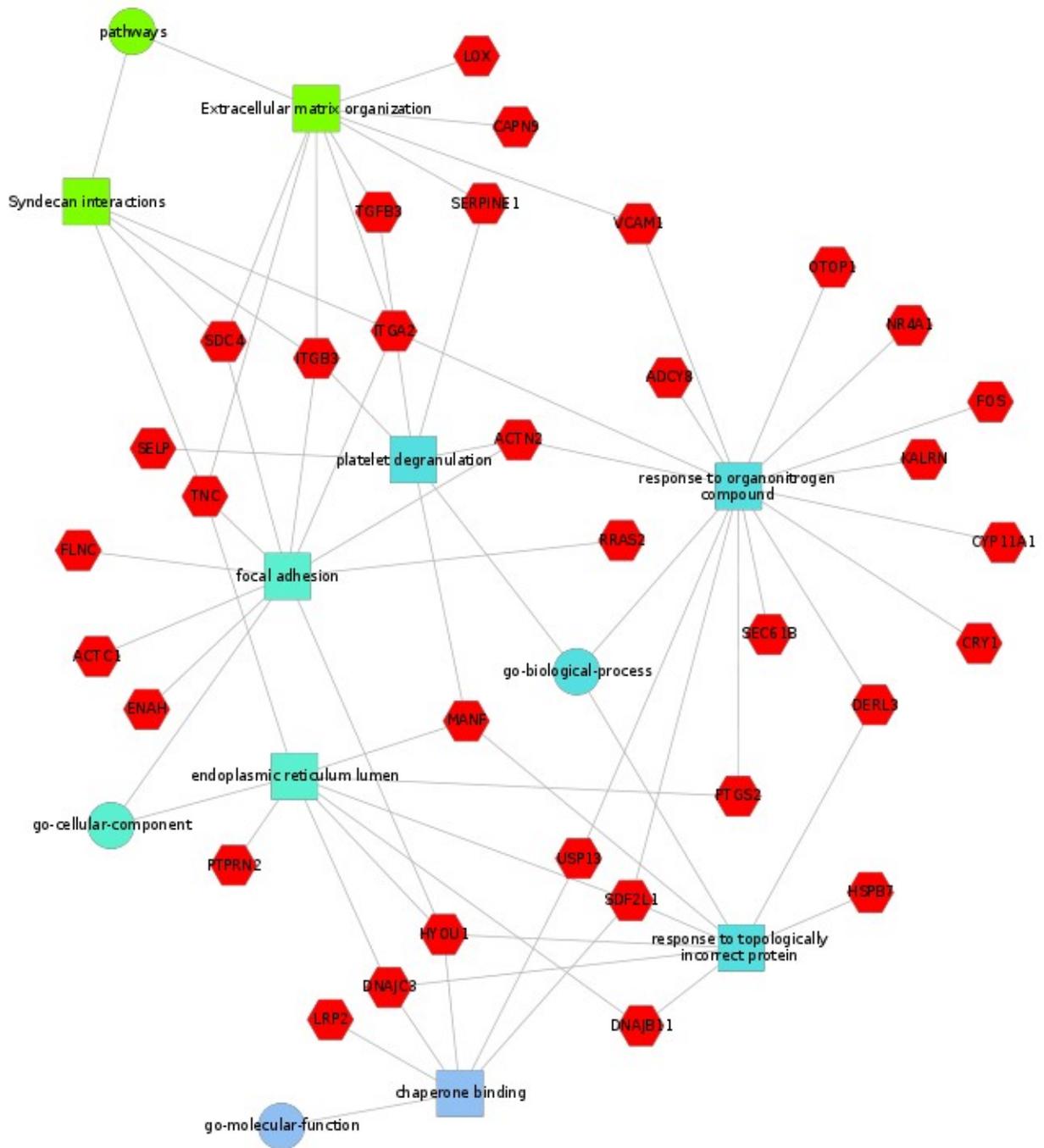


Figura 22. Análisis con ToppCluster de los genes sobreexpresados en el istmo en fase pre-ovulatoria.

Entre los genes sobreexpresados en la fase post-ovulatoria en el istmo no hay ninguno que codifique proteínas detectadas en estudios anteriores en el FO de coneja. Sin

embargo, encontramos SPP1 y PLAT, cuyo papel reproductivo en el FO de otras especies se menciona en la revisión bibliográfica. Además, se sobreexpresa MUC16, una mucina detectada previamente en oviducto humano (O’Shannessy et al. 2013) y bovino. Otros genes que codifican proteínas secretadas son FREM1, IGFL4, CEMIP, MMP7 y NRG1. La anotación biológica mediante DAVID reveló el enriquecimiento en dos términos relacionados con proteínas secretadas: “secreted” y “extracellular space”, lo cual es significativo dado que el número de genes sobreexpresados en la fase post-ovulatoria es muy bajo (33) y hay 8 genes que codifican proteínas secretadas (24.2%). Debido al escaso número de genes no hubo más resultados positivos en la anotación biológica y no fue posible construir una red de interacción para los genes de la fase post-ovulatoria.

#### 4.1.3.2.- Ampolla

La variación en la expresión génica en ampolla resultó ser menor que en istmo. Se obtuvieron 21 genes sobreexpresados en fase pre-ovulatoria (Tabla 16) y 4 genes sobreexpresados en fase post-ovulatoria (Tabla 17).

Tabla 16. Genes sobreexpresados en ampolla en la fase pre-ovulatoria respecto a la post-ovulatoria.

ENSOCUT00000013232	LOC100342219	UDP-glucuronosyltransferase 2B14-like	-8.02	2.94E-08	7.64	4.64
ENSOCUT00000012724	IFI27L2	interferon alpha inducible protein 27-like 2	-6.48	1.47E-07	8.18	5.48
ENSOCUT00000020991	PLEKHB2	pleckstrin homology domain containing	-4.81	6.05E-06	6.42	4.15
ENSOCUT00000006364	DDX60	ATP-dependent RNA helicase DDX60	-4.8	3.42E-06	5.94	3.68
ENSOCUT00000005072	USP18	ubiquitin specific peptidase 18	-4.63	8.68E-06	6.35	4.14
ENSOCUT00000027034	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	-4.36	2.77E-06	6.91	4.78
ENSOCUT00000026836	MS4A18	membrane-spanning 4-domains	-4.3	1.35E-05	5.1	2.99
ENSOCUT00000028397	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	-4.13	1.05E-05	6.93	4.89
ENSOCUT00000021183	IFGGA1	interferon-inducible GTPase 1	-4.12	1.70E-06	5.04	2.99
ENSOCUT00000015830	OAS2	2-5-oligoadenylate synthetase 2	-3.83	2.22E-05	5.71	3.77
ENSOCUT00000029021	LGALS9	galectin 9	-3.7	2.62E-05	6.53	4.65
ENSOCUT00000023856	LOC100357801	interferon-induced very large GTPase 1-like (GVINP1)	-3.35	4.21E-05	6.19	4.44
ENSOCUT00000027108	LOC100341802	UDP-glucuronosyltransferase 2B31-like (UGT2B31)	-3.32	2.41E-05	5.6	3.86
ENSOCUT00000008657	LOC100349257	guanylate-binding protein 5-like (GBP5)	-3.3	2.21E-05	6.67	4.95
ENSOCUT00000015851	HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6	-3.22	3.22E-05	6.39	4.7
ENSOCUT00000010019	CMPK2	cytidine monophosphate kinase 2, mitochondrial	-3.19	3.93E-05	5.57	3.9
ENSOCUT00000026175	HRASLS2	HRAS-like suppressor 2	-3.06	2.10E-05	6.82	5.21
ENSOCUT00000033804	LOC100328967	rabbit leukocyte antigen class I? (HLA-?)	-2.92	2.87E-05	8.97	7.43
ENSOCUT00000012159	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	-2.82	4.31E-05	6.09	4.59
ENSOCUT00000010314	MANF	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	-2.73	3.39E-05	8.11	6.66
ENSOCUT00000033336	CP	ceruloplasmin	-2.65	2.18E-05	5.58	4.17

Tabla 17. Genes sobreexpresados en ampolla en la fase post-ovulatoria comparada con la pre-ovulatoria.

ID Ensembl	Nombre gen	Nombre completo de la proteína	FC	P-value	PRE	POST
ENSOCUT00000027539	ACSL6	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	9.06	6.99E-08	4.81	7.99
ENSOCUT00000027569	PCDH10	protocadherin 10	3.44	6.90E-06	5.28	7.07
ENSOCUT00000015287	LOC100359185	insulin growth factor-like family member 4 (IGFL4)	3.13	5.72E-06	5.83	7.48
ENSOCUT00000013235	LOC100341182	intelectin-2-like (ITLN2)	2.98	2.41E-05	2.44	4.01

Entre los genes sobreexpresados durante el período pre-ovulatorio en ampolla hay dos que codifican proteínas del FO de coneja: MANF y ceruloplasmina (CP). MANF presenta el mismo mecanismo de regulación génica que en el istmo, mientras que CP es una proteína secretada presente también en el plasma sanguíneo que se une a cobre.

De los 5 genes sobreexpresados durante el período post-ovulatorio en ampolla, tres presentan un patrón de expresión similar al visto en istmo: intelectina 1 (ITLN2), la proteína 4 similar al factor de crecimiento insulínico (IGFL4) y la ligasa 6 de ácidos grasos de cadena larga a coenzima A (ACSL6).

El análisis con ToppCluster (Fig. 23), indica un enriquecimiento en genes relacionados con la respuesta inmune innata y señalización mediada por interferón durante la fase pre-ovulatoria, además de 3 factores de transcripción comunes a 4 genes presentes en el conjunto.

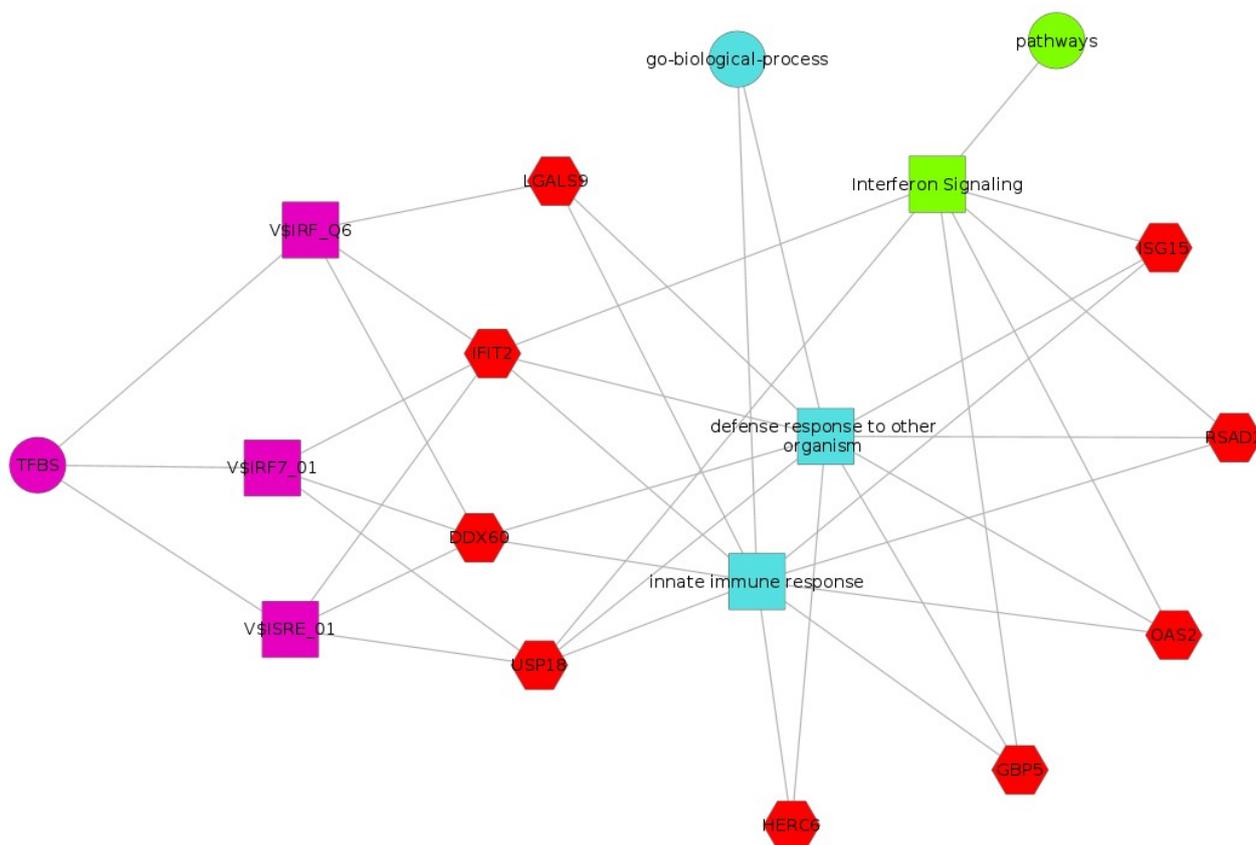


Figura 23. Análisis con ToppCluster del conjunto de genes sobreexpresados en ampolla durante la fase pre-ovulatoria.

#### 4.1.4.- COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN ISTMO ENTRE LA ETAPA POST-OVULATORIA Y EN PRESENCIA DE EMBRIONES DE 8 CÉLULAS

La comparación entre las muestras de istmo obtenidas en la fase post-ovulatoria y en presencia de embriones de 8 células, mostró unos 122 genes expresados diferencialmente (DEGs): 62 sobreexpresados en la fase post-ovulatoria y 60 sobreexpresados en presencia de embriones de 8 células (Tablas 18 y 19).

Tabla 18. Genes sobreexpresados en el istmo en presencia de embriones de 8 células vs la fase post-ovulatoria. En negrita los genes que codifican proteínas secretadas.

Gen	Nombre de la proteína	Fold change	P.value	POST	MORULA
NRGN	Neurogranin	5.95	8.2E-08	4.86	7.44
SLC26A3	Chloride anion exchanger	5.83	6.7E-06	6.39	8.93
NPY	<b>Pro-neuropeptide Y</b>	5.66	1.0E-05	6.44	8.94
PLD5	Inactive phospholipase D5	5.63	4.1E-07	6.17	8.67
SLC25A4	ADP/ATP translocase 1	5.41	2.5E-07	5.84	8.27
VSNL1	Visinin-like protein 1	4.53	4.5E-06	6.16	8.33
HMGCS2	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	4.25	1.3E-06	4.36	6.45
HBB2	Hemoglobin beta 2 chain	4.00	1.8E-06	6.61	8.61
LOC103347775	Ig heavy chain variable region	3.92	2.1E-06	4.35	6.32
CES1	Liver carboxylesterase 1	3.85	1.3E-05	4.47	6.41
ALAS2	5-aminolevulinatase synthase, erythroid-specific, mitochondrial	3.35	6.1E-06	4.37	6.12
VCL	Vinculin	3.28	1.3E-05	6.11	7.83
ALOX15B	Arachidonate 15-lipoxygenase B	3.22	1.5E-04	7.60	9.28
FGF7	<b>Fibroblast growth factor 7</b>	3.14	2.7E-05	5.56	7.22
LOC100353656	Ig heavy chain variable region	3.14	1.2E-05	4.61	6.26
GNAI1	Guanine nucleotide-binding protein G	3.13	2.3E-05	6.81	8.45
UGT3A2	UDP-glucuronosyltransferase 3A2	3.12	1.8E-05	4.50	6.14
RAMAC	RNA guanine-N7 methyltransferase activating subunit	3.06	6.4E-05	5.07	6.69
LOC103347220	Ig heavy chain variable region	3.05	3.2E-05	5.83	7.44
CCKBR	Gastrin/cholecystokinin type B receptor	2.94	2.8E-05	5.36	6.92
MCOLN2	Mucolipin-2	2.93	1.1E-04	4.94	6.49
CCL5	<b>C-C motif chemokine 5</b>	2.93	5.0E-05	4.62	6.17
ANGPTL1	<b>Angiopoietin-related protein 1</b>	2.91	1.8E-04	6.13	7.67
JCHAIN	Immunoglobulin J chain	2.90	6.0E-05	7.13	8.67
STOML3	Stomatin-like protein 3	2.88	1.8E-05	5.30	6.83
LRP2	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	2.87	7.1E-05	7.05	8.57
NRIP3	Nuclear receptor-interacting protein 3	2.85	1.6E-04	6.23	7.74
LOC103346790	Ig heavy chain variable region	2.84	3.3E-05	4.88	6.39
PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	2.83	7.5E-05	6.44	7.94
MLC1	Membrane protein MLC1	2.82	9.4E-05	5.24	6.73
PKHD1L1	Fibrocystin-L	2.82	5.6E-05	5.86	7.35
C4BPA	<b>C4b-binding protein alpha chain</b>	2.80	1.7E-05	5.23	6.72
CCL21	<b>C-C motif chemokine 21</b>	2.80	3.6E-05	7.23	8.72
SPINK8	<b>Serine protease inhibitor Kazal-type 8</b>	2.76	4.5E-05	7.87	9.34
LOC100352996	Ig heavy chain variable region	2.75	1.0E-04	8.02	9.48
ATPIF1	ATPase inhibitor, mitochondrial	2.69	3.0E-05	5.54	6.96
CES2	Cocaine esterase	2.66	1.1E-04	8.32	9.73
AGT	<b>Angiotensinogen</b>	2.66	1.4E-04	8.43	9.84
ABCA8	ATP-binding cassette sub-family A member 8	2.65	1.3E-04	6.84	8.25
GMNC	Geminin coiled-coil domain-containing protein 1	2.65	8.0E-05	4.16	5.56
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	2.64	9.0E-05	5.10	6.50
DDIT4L	DNA damage-inducible transcript 4-like protein	2.58	5.7E-05	6.38	7.74
ROPN1L	Ropporin-1-like protein	2.53	4.6E-05	7.21	8.55
C11orf74	Protein C11orf74	2.53	1.3E-04	6.18	7.52
CALY	Neuron-specific vesicular protein calcyon	2.50	1.2E-04	5.84	7.16
LOC103345989	Ig heavy chain variable region	2.48	6.1E-05	7.77	9.08
SULT1C2	Sulfotransferase 1C2	2.44	1.0E-04	8.45	9.73
CPNE4	Copine-4	2.38	8.7E-05	3.91	5.16
LOC100346848	Olfactory receptor	2.36	1.0E-04	5.82	7.06
RPL7	60S ribosomal protein L7	2.33	7.5E-05	7.43	8.64
RGS5	Regulator of G-protein signaling 5	2.31	1.4E-04	7.72	8.93
ND6	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6	2.27	1.2E-04	7.74	8.92
DHRS7	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	2.26	1.6E-04	7.27	8.45
IL20RB	Interleukin-20 receptor subunit beta	2.26	1.3E-04	5.11	6.29
HMGB2	<b>High mobility group protein B2</b>	2.26	1.5E-04	6.49	7.66
GPLD1	<b>Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D</b>	2.26	1.4E-04	4.45	5.62
LOC100341077	Olfactory receptor	2.25	1.6E-04	3.64	4.81
ACP1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	2.22	1.3E-04	3.80	4.95
CCL28	<b>C-C motif chemokine 28</b>	2.21	1.8E-04	4.39	5.53
C20orf85	Uncharacterized protein C20orf85	2.20	1.8E-04	7.90	9.04
ATP13A5	ATPase type 13A5	2.16	1.6E-04	3.46	4.57

Tabla 19. Genes sobreexpresados en la fase post-ovulatoria vs en presencia de embriones de 8 células.

Gen	Nombre de la proteína				
SPP1	<b>Secreted phosphoprotein 1</b>	10.32	4.4E-09	7.01	3.64
MMP7	<b>Matrilysin</b>	7.15	5.5E-06	7.24	4.40
VCAN	<b>Versican core protein</b>	5.71	2.9E-07	8.48	5.96
S100A8	<b>Protein S100-A8</b>	5.37	9.9E-05	4.95	2.52
COL1A1	<b>Collagen alpha-1</b>	5.36	1.6E-07	10.46	8.04
CEMIP	<b>Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein</b>	5.13	4.5E-07	7.36	5.00
CP	<b>Ceruloplasmin</b>	5.09	9.5E-06	6.03	3.69
HOXC10	Homeobox protein Hox-C10	4.41	6.4E-07	5.75	3.61
DIO2	Type II iodothyronine deiodinase	3.92	8.3E-05	6.63	4.66
PAPPA2	<b>Pappalysin-2</b>	3.85	4.2E-06	8.24	6.30
LOX	<b>Protein-lysine 6-oxidase</b>	3.80	4.1E-06	7.72	5.79
PCSK1	Neuroendocrine convertase 1	3.77	8.1E-06	6.77	4.85
CPXM2	<b>Inactive carboxypeptidase-like protein X2</b>	3.70	3.0E-06	6.59	4.71
FBN2	<b>Fibrillin-2</b>	3.50	3.5E-06	6.05	4.25
SAA3	<b>Serum amyloid A-3 protein</b>	3.49	3.4E-05	9.16	7.36
ELN	<b>Elastin</b>	3.42	6.3E-06	7.17	5.39
DKK3	<b>Dickkopf-related protein 3</b>	3.29	1.1E-05	7.80	6.08
RPS14	40S ribosomal protein S14	3.23	4.2E-05	7.20	5.51
COL5A2	<b>Collagen alpha-2</b>	3.23	6.4E-06	7.73	6.04
COL3A1	<b>Collagen alpha-1</b>	3.16	7.0E-06	10.53	8.87
LOXL2	<b>Lysyl oxidase homolog 2</b>	3.14	7.5E-06	7.16	5.51
COL1A2	<b>Collagen alpha-2</b>	3.10	7.7E-06	9.80	8.17
NR1D1	Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1	3.07	3.2E-05	7.79	6.17
COL4A1	<b>Collagen alpha-1</b>	2.97	1.1E-05	7.78	6.20
MUC4	<b>Mucin-4</b>	2.95	2.2E-05	7.39	5.83
OLR1	<b>Oxidized low-density lipoprotein receptor 1</b>	2.92	3.2E-05	4.79	3.24
LOXL4	<b>Lysyl oxidase homolog 4</b>	2.92	1.7E-05	4.80	3.25
COL12A1	<b>Collagen alpha-1</b>	2.92	3.1E-05	7.20	5.65
TMEM45A	Transmembrane protein 45A	2.84	2.6E-05	5.62	4.11
COL5A1	<b>Collagen alpha-1</b>	2.81	1.8E-05	9.31	7.82
PXDN	<b>Peroxidasin homolog</b>	2.74	2.4E-05	7.39	5.94
ADAMTS2	<b>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2</b>	2.70	2.6E-05	7.29	5.86
COL4A2	<b>Collagen alpha-2</b>	2.64	2.7E-05	6.71	5.31
GJB3	Gap junction beta-3 protein	2.62	4.4E-05	6.76	5.37
PALM2	Paralemmin-2	2.58	4.4E-05	4.84	3.47
FBLN5	<b>Fibulin-5</b>	2.56	4.6E-05	9.52	8.16
COL6A3	<b>Collagen alpha-3</b>	2.56	5.1E-05	8.58	7.22
C1QTNF5	<b>Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 5</b>	2.54	4.7E-05	6.37	5.02
GREM1	<b>Gremlin-1</b>	2.53	1.7E-04	6.06	4.71
ERO1L	ERO1-like protein alpha	2.53	1.7E-04	8.50	7.16
ARHGAP42	Rho GTPase-activating protein 42	2.52	4.9E-05	7.18	5.84
C1orf131	Uncharacterized protein C1orf131	2.50	1.4E-04	5.09	3.77
SPON1	<b>Spondin-1</b>	2.50	5.5E-05	7.79	6.47
LTBP2	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2	2.50	5.5E-05	6.97	5.65
CRABP2	Cellular retinoic acid-binding protein 2	2.49	9.4E-05	8.01	6.69
PCSK6	<b>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6</b>	2.47	1.1E-04	6.23	4.93
SEMA5A	Semaphorin-5A	2.47	4.9E-05	7.23	5.93
ANGPTL2	<b>Angiopoietin-related protein 2</b>	2.45	1.2E-04	8.41	7.11
FNDC1	<b>Fibronectin type III domain-containing protein 1</b>	2.41	7.6E-05	6.96	5.69
NAV1	Neuron navigator 1	2.40	6.7E-05	7.77	6.51
TGFB1	<b>Transforming growth factor beta-1 proprotein</b>	2.38	8.3E-05	7.62	6.37
PCOLCE	<b>Procollagen C-endopeptidase enhancer 1</b>	2.37	8.9E-05	8.06	6.81
MMP2	<b>72 kDa type IV collagenase</b>	2.32	9.9E-05	9.78	8.56
HSPG2	<b>Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein</b>	2.29	8.7E-05	8.09	6.89
CAV3	Caveolin-3	2.28	1.3E-04	6.74	5.55
PARP3	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP3	2.27	1.8E-04	6.00	4.82
FXVD5	FXVD domain-containing ion transport regulator 5	2.27	1.6E-04	6.70	5.52
FKBP10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	2.22	1.5E-04	7.68	6.53
LOC100358984	Protein kinasa containing domain protein	2.22	1.3E-04	6.72	5.57
TRPC6	Short transient receptor potential channel 6	2.22	1.8E-04	5.29	4.14
GPR173	Probable G-protein coupled receptor 173	2.17	1.5E-04	5.72	4.61
DCHS1	Protocadherin-16	2.15	1.8E-04	6.64	5.53

Entre los 60 genes sobreexpresados en presencia de mórulas se encuentran 11 codificantes de proteínas secretadas (NPY, FGF7, ANGPTL1, CCL5, CCL21, CCL28, C4BPA, AGT, SPINK8, HMGB2 y GPLD1). La anotación funcional muestra un enriquecimiento en los procesos biológicos “positive chemotaxis” y “positive regulation of transport”, lo que indica la presencia de genes involucrados en el desplazamiento celular y “cellular chemical homeostasis”, relacionado con la ruta de metabolismo de los aminoácidos glicina, serina y treonina a través del gen ALAS2, que cataliza la conversión del aminoácido glicina en ácido aminolevulínico. En cuanto a funciones moleculares, destaca el término “G protein-coupled receptor binding”, indicando una mayor presencia de proteínas que se unen a receptores asociados a proteína G. Curiosamente, dentro de los DEGs sobreexpresados en mórula se engloba un subconjunto de genes típicos de córtex cerebral.

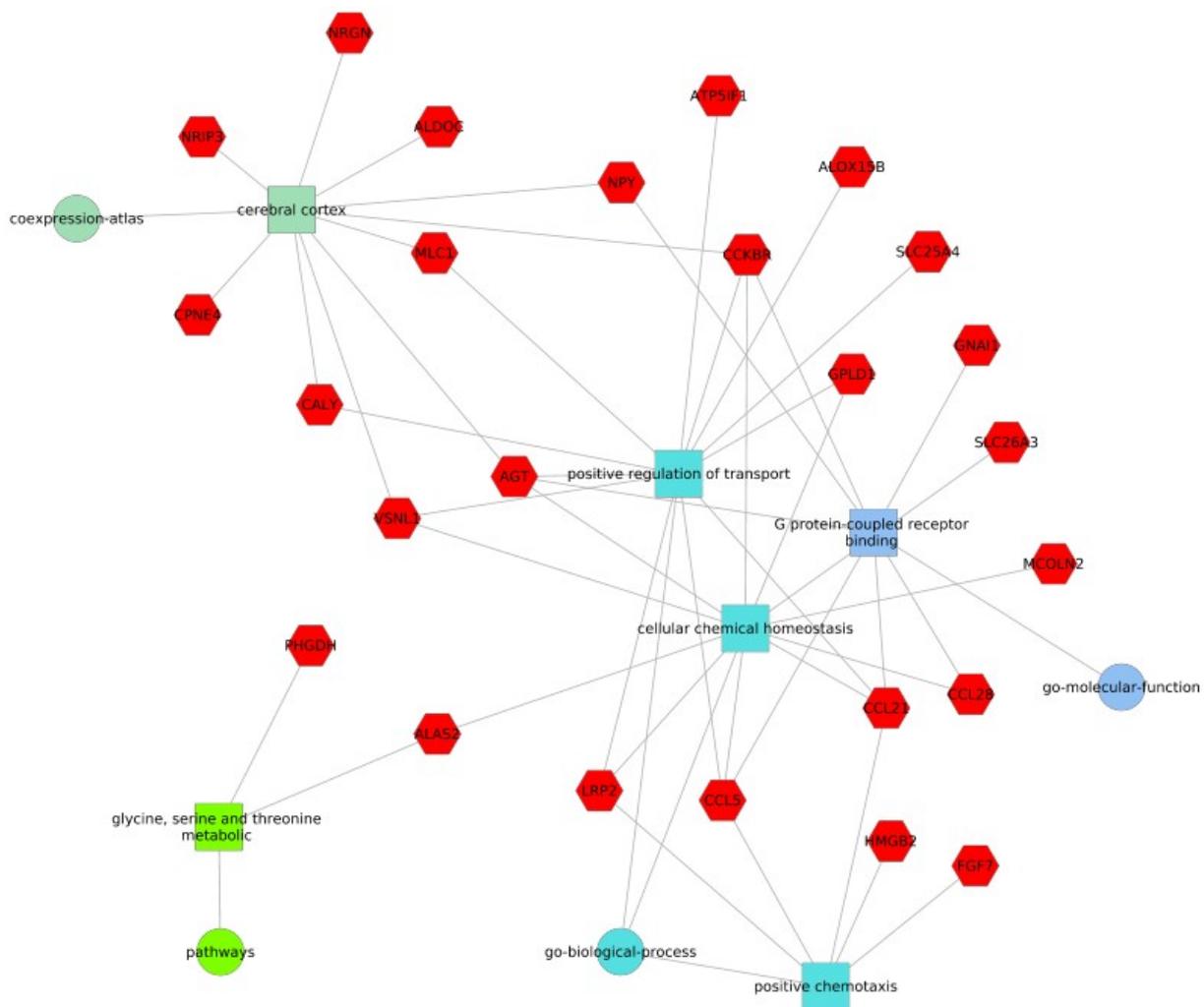


Figura 24. Anotación funcional de los genes sobreexpresados en presencia de embriones de 8 células vs la fase post-ovulatoria según ToppCluster.

Los 62 genes cuya expresión se reprime en el istmo entre las fase post-ovulatoria y en presencia de embriones de 8 células incluyen 39 que codifican proteínas secretadas, una cantidad muy significativa que en la anotación funcional según DAVID da lugar al cluster de genes con mayor puntuación (ADAMTS2, C1QTNF5, S100A8, ANGPTL2, CPXM2, CEMIP, CP, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL5A1, COL5A2, COL6A3, COL12A1, DKK3, ELN, FBN2, FNDC1, FBLN5, GREM1, HSPG2, LTBP2, LOXL2, LOXL4, LOX, MMP2, MMP7, MUC4, OLR1, PAPP2, PXDN, PCOLCE, PCSK6, SPP1, SPON1, TGFB1, VCAN). La mayoría de estos genes pertenecen a la matriz

extracelular y participan en su organización como muestra la anotación biológica (Fig. 24). Entre las funciones moleculares destacadas está la “protein-lysine 6-oxidase activity”, puesto que entre los 62 genes sobreexpresados están 3 de los 5 únicos genes de mamífero que poseen esta actividad. En cuanto a procesos biológicos destaca “cellular response to growth factor beta stimulus”, que incluye tanto a genes de la matriz extracelular como a otros que no lo son (CAV3, constituyente propio de las caveolas, y DKK3, proteína secretada involucrada en múltiples rutas de señalización biológica).

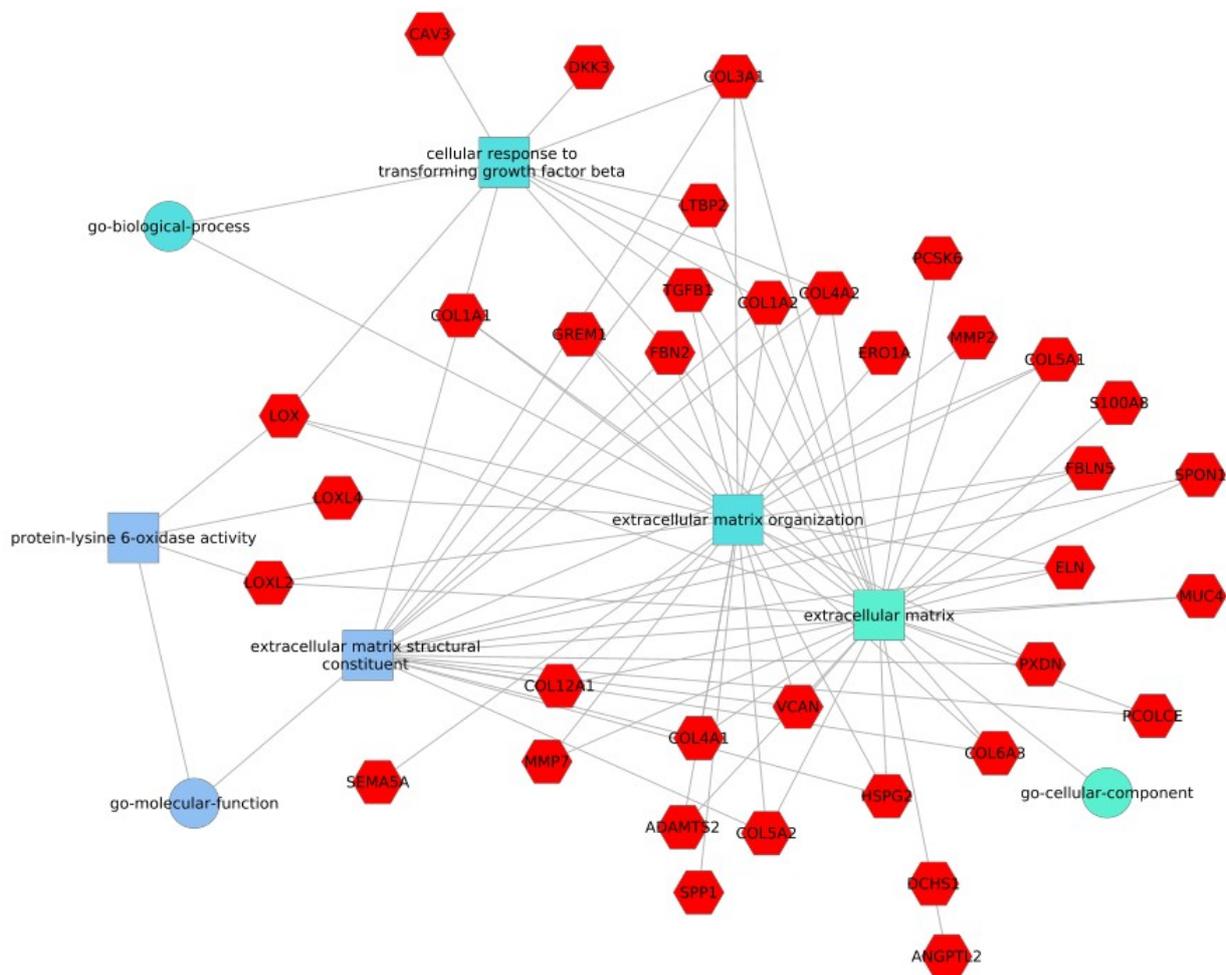


Figura 25. Anotación funcional de los genes sobreexpresados durante la fase post-ovulatoria vs en presencia de embriones de 8 células según ToppCluster.

#### 4.1.5.- COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN ISTMO ENTRE LA ETAPA EMBRIONARIA DE 8 CÉLULAS Y LA DE MÓRULA

La comparación entre los oviductos con embriones en presencia de embriones de 8 células vs oviductos con embriones en la fase de mórula mostró unos 45 DEGs, de los cuáles 35 se sobreexpresaban en presencia de embriones de 8 células y 10 en presencia de mórulas.

Tabla 20. Genes sobreexpresados en el istmo oviductal en presencia de embriones de 8 células vs en presencia de mórulas. En negrita los genes que codifican proteínas secretadas.

Gen	Nombre de la proteína	Fold Change	P-value	MORULA	BLASTO
NRGN	Neurogranin	-2.24	2.4E-05	7.44	6.27
NPY	<b>Pro-neuropeptide Y</b>	-3.57	9.1E-06	8.94	7.10
ITLN1	<b>Intelectin-1</b>	-3.30	6.9E-06	6.47	4.75
DDAH1	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	-2.23	1.2E-05	5.86	4.71
CLDN11	Claudin-11	-2.04	1.1E-04	7.95	6.93
CRYGS	Gamma-crystallin S	-5.14	2.3E-07	7.22	4.86
RPSA	40S ribosomal protein SA	-3.52	5.4E-07	8.45	6.64
ELOVL6	Elongation of very long chain fatty acids protein 6	-1.89	1.1E-04	7.48	6.56
IGJ	Immunoglobulin J chain	-2.04	9.7E-05	8.67	7.64
CXCL1	<b>Growth regulated alpha protein</b>	-2.99	7.0E-07	6.23	4.65
CDKL1	Cyclin-dependent kinase-like 1, EC 2.7.11.22	-2.26	6.0E-05	7.60	6.42
CCL2	<b>C-C motif chemokine 2</b>	-2.01	6.2E-05	6.30	5.29
VSNL1	Visinin-like protein 1	-2.27	2.4E-05	8.33	7.15
CCN3	CCN family member 3	-2.11	2.6E-05	6.42	5.34
ANGPT1	<b>Angiopietin-1</b>	-1.98	5.5E-05	5.75	4.76
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1	-3.09	6.7E-06	7.69	6.07
EPYC	<b>Epiphycan</b>	-2.27	6.3E-05	7.51	6.33
CES2	<b>Cocaine esterase</b>	-4.07	3.2E-08	9.73	7.71
TNFAIP6	<b>Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein</b>	-2.30	1.8E-05	6.61	5.42
RPL37A	60S ribosomal protein L37a	-2.10	6.7E-05	6.65	5.58
KCNE4	Potassium voltage-gated channel subfamily E member 4	-2.00	3.9E-05	7.46	6.46
SLC26A3	Chloride anion exchanger	-2.39	7.6E-06	8.93	7.67
LOC103349048	C-type lectin domain-containing protein	-2.26	2.6E-05	4.68	3.51
RPS27	40S ribosomal protein S27	-2.09	4.5E-05	4.48	3.42
DOK5	Docking protein 5	-2.26	2.3E-05	6.16	4.98
POSTN	<b>Periostin</b>	-3.04	1.3E-05	7.97	6.36
TRPC4	Short transient receptor potential channel 4	-2.39	2.5E-05	7.55	6.29
DEPP1	Protein DEPP1	-2.07	3.7E-05	7.96	6.91
LCN2	<b>Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</b>	-2.74	2.3E-05	7.67	6.21
C16orf89	UPF0764 protein C16orf89	-2.36	2.5E-05	5.90	4.67
FUT2	Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase 2	-1.94	9.8E-05	5.45	4.50
LOC100353328	Ig heavy chain variable region	-2.07	6.9E-05	9.87	8.82
DERL3	Derlin-3	-2.13	2.9E-05	6.09	5.00
LOC103347155	Ras-GEF domain-containing protein	-2.70	1.5E-05	7.42	5.98
CAPN6	Calpain-6	-2.39	9.9E-06	6.55	5.30

Tabla 21. Genes sobreexpresados en el istmo oviductal en presencia de mórulas vs en presencia de embriones de 8 células.

Nombre de la proteína	Fold Change	P-value	MORULA	BLASTO
Zinc finger and BTB domain-containing protein 16	2.92	1.1E-07	5.92	7.47
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5	2.76	3.0E-07	7.15	8.61
Nuclear receptor subfamily 1 group D member 2	2.05	9.7E-06	7.33	8.37
BHLH domain-containing protein, rabbit specific	2.33	1.5E-06	3.30	4.52
<b>Ceruloplasmin</b>	3.55	7.2E-07	3.69	5.51
Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1	3.14	1.5E-06	6.17	7.83
Sorting nexin-31	1.95	6.4E-06	3.79	4.75
Vesicle-associated membrane protein 1	2.48	1.1E-06	6.01	7.32
Serine protease 41	2.01	1.9E-05	3.74	4.74
Transcription initiation factor TFIID subunit 7-like	3.53	2.1E-07	2.49	4.31

De entre los 35 genes sobreexpresados en presencia de embriones de 8 células respecto a la presencia de mórulas el único término de la anotación funcional enriquecido de forma significativa es “extracellular space” que hace referencia a los 10 genes que codifican proteínas secretadas del conjunto (NPY, ITLN1, CXCL1, CCL2, ANGPT1, EPYC, CES2, TNFAIP6, POSTN, LCN2), de las cuáles NPY, LCN2 y CES2 ya habían sido previamente detectadas en el FO de la coneja (Yu et al., 2019). Además, múltiples loci que codifican la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina se encuentran sobreexpresados en esta fase.

En cuanto a los 10 genes sobreexpresados en presencia de mórulas la anotación funcional no pudo demostrar enriquecimiento en ninguna de las categorías debido al limitado número de genes.

#### 4.1.6.- GENES CARACTERÍSTICOS DE CADA FASE

Comparando los genes sobreexpresados y reprimidos en cada fase con respecto a las demás de forma global, se obtuvieron:

- 42 genes sobreexpresados específicamente en la fase pre-ovulatoria (ITGA5, CYP11A1, GADD45G, SHISA6, ACKR1, STK17A, ITGB1BP2, SLC25A32, HSPA5, HYOU1, SYNC, TNFRSF11B, DUSP5, HK2, ACTC1, FLNC, VARS, RRAS2, USP13, MT2D, MANF, SDC4, SELP, KALRN, C2orf40, PTGS2, NPR3, EPHX4, SLCO5A1, RASL11A, SDF2L1, HSPB7, ADCY8, SLC7A11, ITGA2, CRISPLD2, MT2A, CYR61, MYBBP1A, NIM1K, GAR1, DNAJB11). Se Incluyen un número significativo de genes anotados con los términos GO “focal adhesion”, “endoplasmic reticulum chaperone complex”, “response to topologically incorrect protein” y “chaperone binding”.

- 10 genes reprimidos específicamente en la fase pre-ovulatoria (PTN, YPEL4, ZNF793, FIGF, PKHD1, LOC100351812 (Ig región variable de la cadena pesada), ACSL6, CLDN8, RXFP1, RFTN2).

- 4 genes sobreexpresados específicamente en la fase post-ovulatoria (MMP7, CRABP2, PCSK1, CEMIP).

- 4 genes reprimidos específicamente en la fase post-ovulatoria (PLEKHB2, LRP2, PLD5, ANGPTL1).

- 1 gen (VSNL1) sobreexpresado específicamente en presencia de embriones de 8 células, y otro (CP) reprimido específicamente en dicha fase.

- 1 gen que codifica un factor de transcripción (TAF7L) sobreexpresado específicamente en presencia de mórulas, y 2 genes (CRYGS y TNFAIP6) que se reprimen únicamente en esta fase.

#### 4.1.7.- COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE EL ISTMO Y LA AMPOLLA EN LAS FASES PRE Y POST-OVULATORIA

La comparación entre las diferentes zonas del oviducto, reveló unos 382 DEGs, 134 sobreexpresados en el istmo y 248 sobreexpresados en la ampolla.

Entre los 134 genes sobreexpresados en istmo comunes a las fases pre-ovulatoria y post-ovulatoria, encontramos 45 genes que codifican proteínas secretadas y 36 genes presentes en exosomas, siendo el término “extracellular exosome” uno de los sobrerrepresentados según el análisis llevado a cabo con DAVID. Se incluyen un total de 57 proteínas potencialmente secretadas al FO, entre ellas FABP5, FHL1, CRYGS, VCAN, DES, LCN2, FLNA, COL1A2, BMP5, SPP1 y SERPINE1, previamente detectadas por otros investigadores mediante experimentos de proteómica (Yu et al, 2016 en coneja; Pillai et al, 2017 y Lami et al, 2018 en vaca, Smits et al, 2017 en yegua; Mondéjar et al, 2012 en cerda; Soleilhavoup et al, 2016 en oveja).

Un repaso global de la anotación GO de los genes propiamente expresados en istmo muestra un enriquecimiento en términos relacionados con la organización y remodelación

de la matriz extracelular, incluyendo genes que codifican colágeno y proteínas de adhesión de las células a la matriz extracelular. Además, el conjunto es rico en proteínas musculares, de adhesiones focales y en factores de crecimiento

El análisis con ToppCluster (Fig. 26) reveló la presencia de tres clusters principales constituidos por genes que codifican proteínas de la matriz extracelular, del músculo liso, y de adhesiones focales. Además, puso en evidencia la presencia de un sitio de unión a un factor de transcripción común a 37 de los genes del conjunto (“TGGAAA\_V\$NFAT\_Q4\_01”), que permite la unión de un factor de transcripción de la familia NFAT.

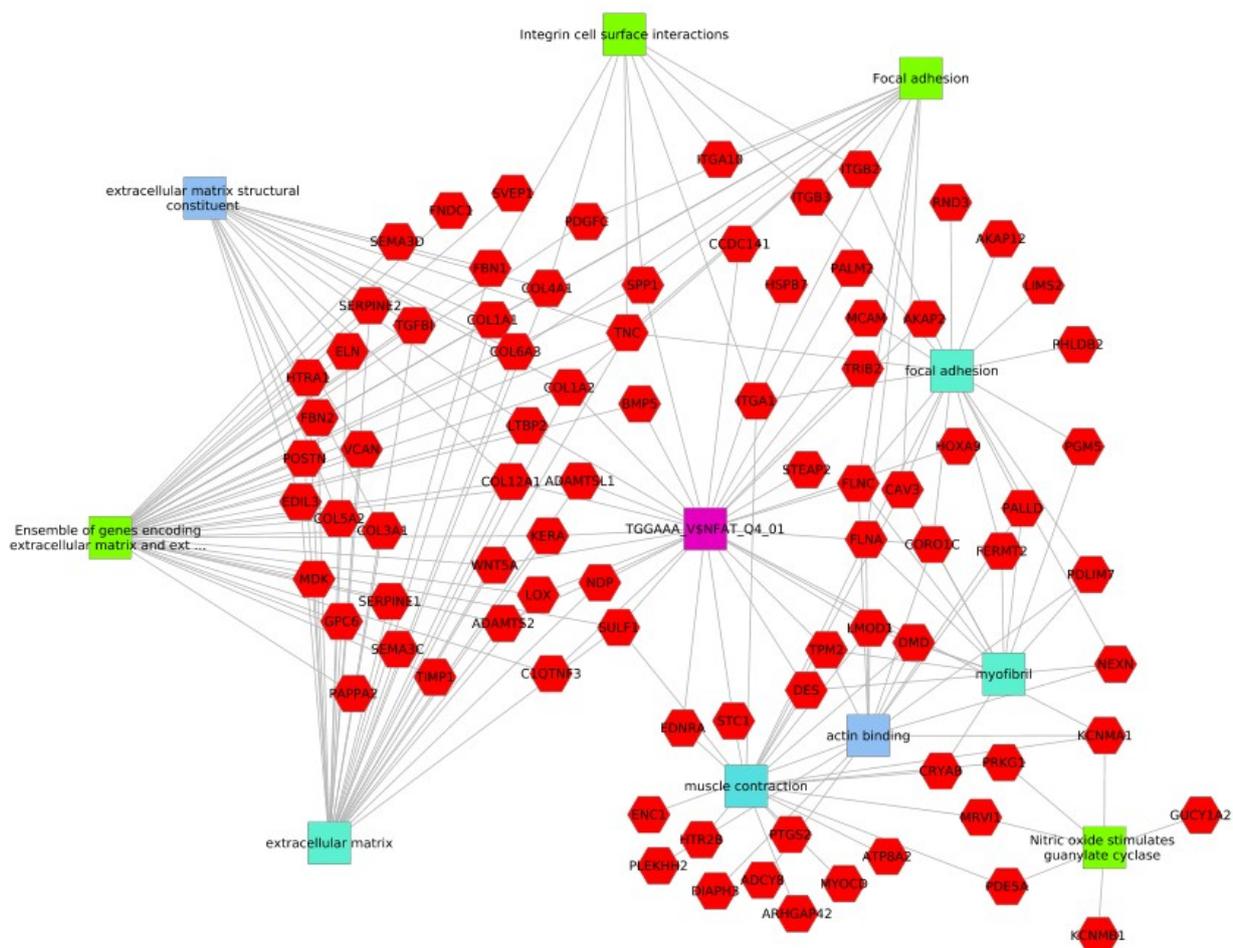


Figura 26. Análisis con ToppCluster de los genes específicos del istmo, con anotaciones GO de localización, función molecular, procesos biológicos y pathways involucrados.

Entre los 166 genes sobreexpresados en la ampolla comunes a los estadios pre-ovulatorio y post-ovulatorio hay 15 que codifican proteínas de secreción clásica y 22 presentes en exosomas. En conjunto, incluyen 31 proteínas potencialmente secretadas al FO.

La anotación con DAVID, no reveló enriquecimiento en muchas categorías debido al desconocimiento en las bases de datos biológicas de la función de un 22% de los genes del conjunto. Sólo fue significativo el enriquecimiento en proteínas ciliares (“epithelial cilium movement”, con un FDR < 0.05).

Por otra parte, el análisis con ToppCluster (Fig. 26), evidencia un clúster de genes que codifican proteínas ciliares y otro clúster aún más amplio que coincide con proteínas expresadas en la trompa de Falopio según el Human Protein Atlas.

Entre los genes que codifican posibles proteínas secretadas están SERPINB5, DSP, CFI, PLBD1, PIGR, CFH, INMT, LRRC51, PLD3, NPY, C4BPA y PDIA5, detectadas anteriormente mediante proteómica (Yu et al., 2016).



presentando un coeficiente de Spearman de 0.92 ( $p = 0.0005$ ) sin tener en cuenta la comparativa qPCR-microarray de MMP7, que alteraba la correlación (si se deja el coeficiente de Spearman es de 0.55,  $p = 0.12$ ). Un caso peculiar es el de OVGP1, cuyos niveles de expresión no presentan diferencias según las micromatrices, mientras que la RT-qPCR muestra una pequeña diferencia de expresión entre las fases de pre-ovulatorio y mórula. Esto puede deberse a la diferente naturaleza de la técnica, puesto que la señal de fluorescencia de las sondas de OVGP1 de la micromatriz puede estar saturada, dada la abundancia del transcrito tan elevada en todas las fases, mientras que la RT-qPCR permitiría ver diferencias más sutiles de expresión.

En cuanto a ITGA5, también se observó un descenso de la expresión entre la fase de post-ovulatorio y mórula que según el microarray no es significativo, pero que debe existir también ya que la diferencia de expresión según el microarray entre la fase pre-ovulatoria y la de mórula es mayor que la diferencia entre las fases pre- y post-ovulatoria.

Tabla 23. Comparativa: expresión diferencial de los transcritos de interés según los ratios observados en las micromatrices y los de las RT-qPCR (“-” indica que no hay cambio un cambio estadísticamente significativo).

Gen		Pre-ovulatorio vs post-ovulatorio		Post-ovulatorio vs mórula		Pre-ovulatorio vs mórula	
		Micromatriz	RT-qPCR	Micromatriz	RT-qPCR	Micromatriz	RT-qPCR
ITGA5	<i>ratio</i>	2.49	1.64	-	1.57	4.71	2.53
	<i>p-valor</i>	0.02	0.05	-	0.09	3.7 x 10 <sup>-7</sup>	0.03
MANF	<i>ratio</i>	2.84	1.79	-	-	3.2	2.42
	<i>p-valor</i>	0.02	0.03	-	-	0.004	0.006
MUC4	<i>ratio</i>	-	-	2.95	1.37	-	-
	<i>p-valor</i>	-	-	0.015	0.08	-	-
MMP7	<i>ratio</i>	-	-	7.15	97.25	-	-
	<i>p-valor</i>	-	-	0.009	0.007	-	-
OVGP1	<i>ratio</i>	-	-	-	-	-	1.69
	<i>p-valor</i>	-	-	-	-	-	0.07
SPP1	<i>ratio</i>	-2.53	-5.01	10.32	22.27	3.6	4.33
	<i>p-valor</i>	0.03	0.04	3.8 x 10 <sup>5</sup>	0.02	0.003	0.04

#### 4.3.- PROTEÓMICA Y COMPARACIÓN CON EXPERIMENTOS DE PROTEÓMICA DE OTROS AUTORES

Los DEGs entre los diferentes grupos experimentales fueron comparados con los datos de proteómica con FO de coneja de Yu y colaboradores (Yu et al., 2016; Yu et al., 2019).

Hay 33 DEGs detectados mediante proteómica (A2M, CES2, AGT, LCN2, C4BPA, SERPINA3, CP, HSPB1, LOXL2, ALDOC, SAA3, HSPA5, HYOU1, ERO1A, RPSA, ALDH1A2, GLRX, LOC100353328, CRYGS, FN1, VCL, VCAN, MANF, ACP1, FABP4, PHGDH, NPY, SDF2L1, S100A8, COL1A2, ECM1, SPON1, IGJ), que como se esperaba, codifican 16 proteínas secretadas y 20 presentes en exosomas (dando un total de 28 proteínas liberadas al medio extracelular según la anotación biológica), a las que habría que añadir IGJ, que codifica la cadena J de las inmunoglobulinas y el locus LOC100353328, que codifica un fragmento de región variable de la cadena pesada de la

inmunoglobulina, y que ambas, por tanto también estarán presentes en el medio extracelular.

#### 4.4.- EXPRESIÓN DE DIFERENTES PROTEÍNAS OVIDUCTALES

##### 4.4.1.- OVIDUCTINA (OVGP1)

La inmunohistoquímica reveló la presencia de la proteína OVGP1 en el citoplasma de las células del epitelio oviductal, concretamente en el citoplasma de células secretoras (Fig. 29). El marcaje positivo en los controles con anticuerpo secundario en vasos sanguíneos y puntos aislados del tejido se debe a que el anticuerpo empleado reconoce la inmunoglobulina G de conejo, mientras que la tinción del epitelio es intensa y específica de la OVGP1 (Fig. 28).

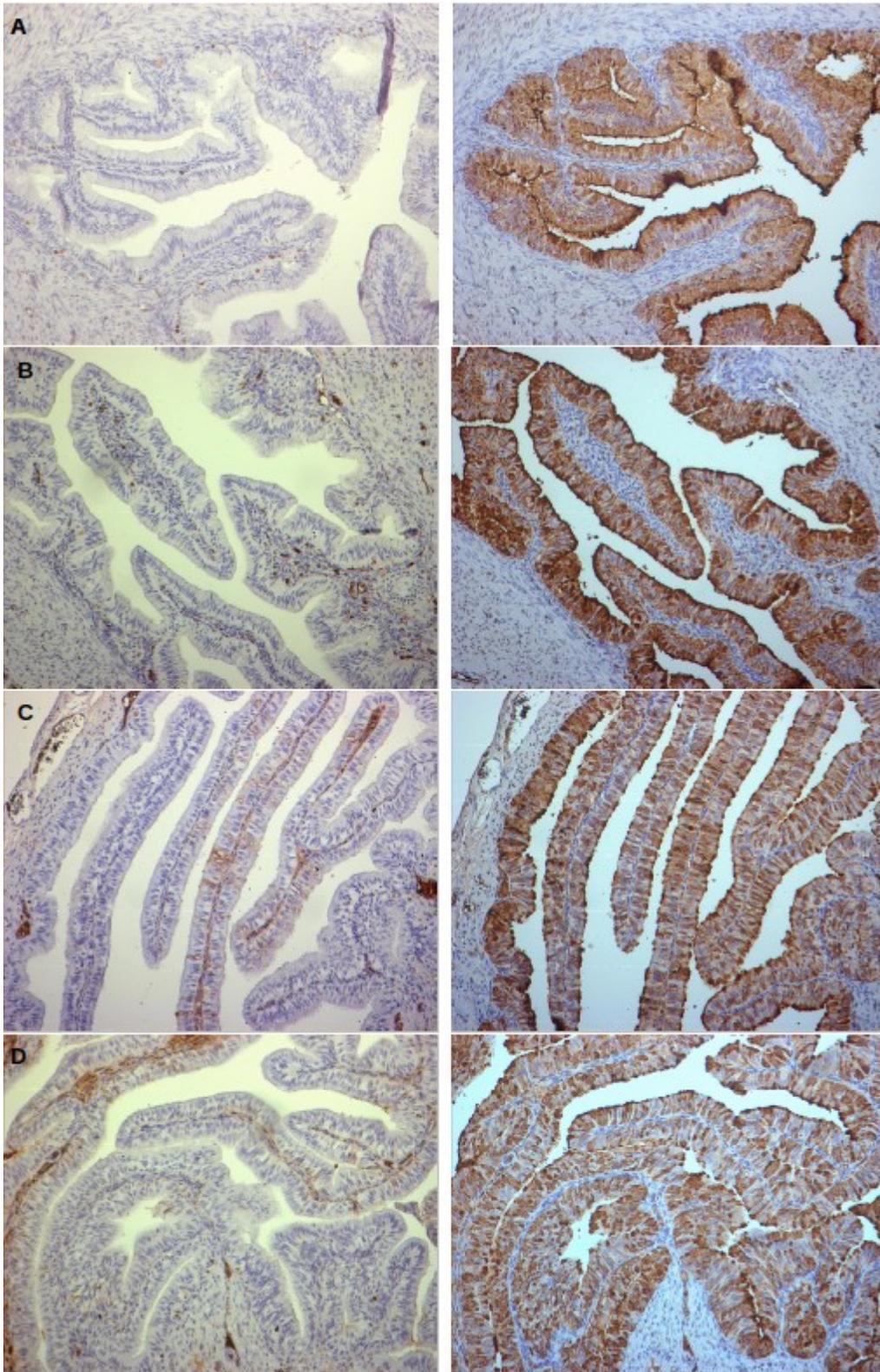


Figura 28. Inmunohistoquímica de OVGP1 en el oviducto de coneja. A: istmo en fase pre-ovulatoria, B: istmo en fase post-ovulatoria, C: ampolla en fase pre-ovulatoria, D: ampolla

en fase postovulatoria. Cada corte incluye la muestra a la derecha con su control de anticuerpo secundario a la izquierda (x100).

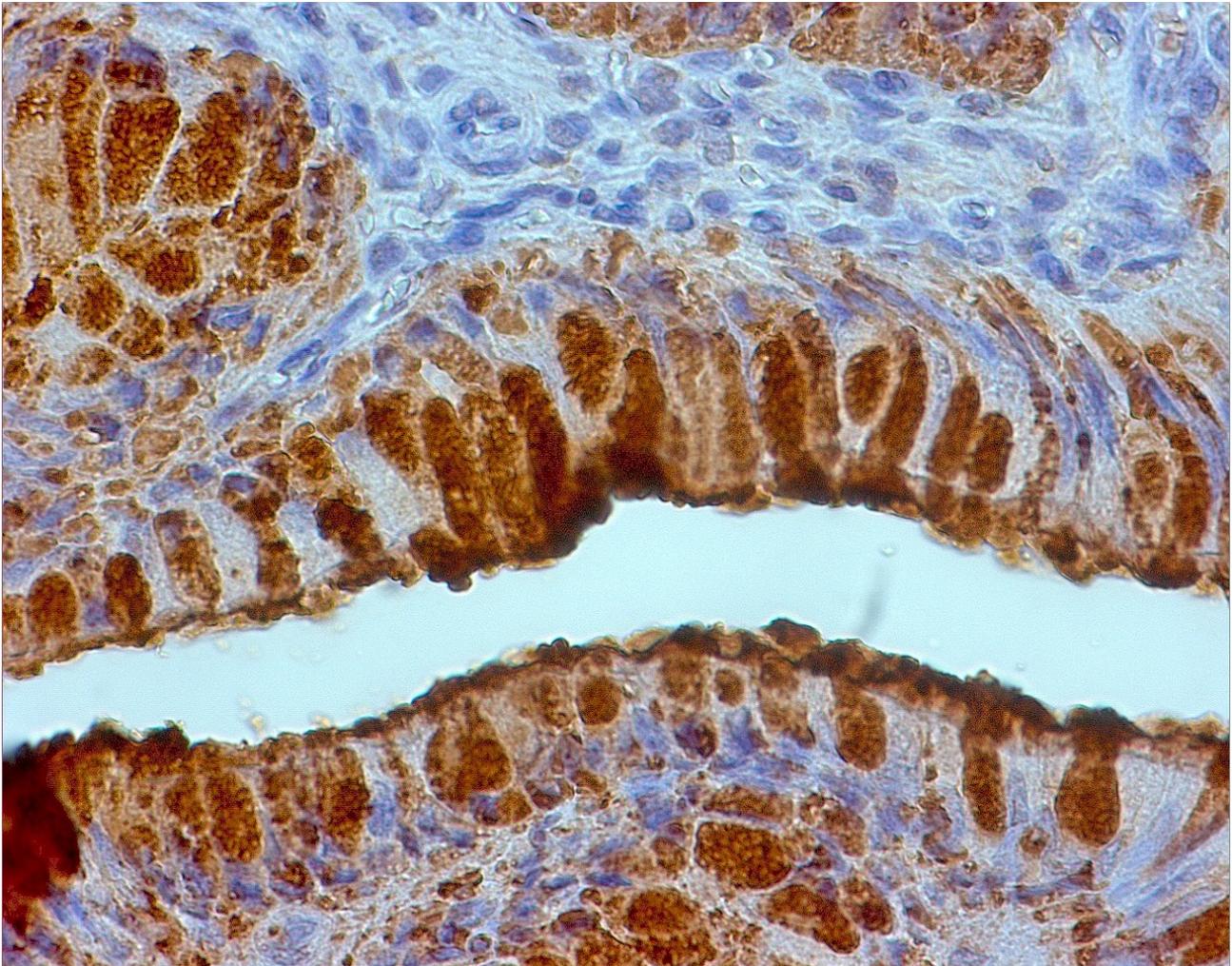


Figura 29. Inmunohistoquímica de OVGP1, detalle a mayor aumento (x400). Se puede confirmar que el marcaje está en las células secretoras.

#### 4.4.2- OSTEOPONTINA (SPP1)

##### 4.5.4.1- Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica reveló la presencia de la proteína SPP1 en el citoplasma de las células del epitelio oviductal. Se observó mayor intensidad de marcaje en las muestras de

ampolla con respecto a las de istmo, un resultado discordante con el del microarray. Aunque algunas células secretoras fueron positivas, la mayor parte de células del epitelio positivas resultaron ser ciliadas.

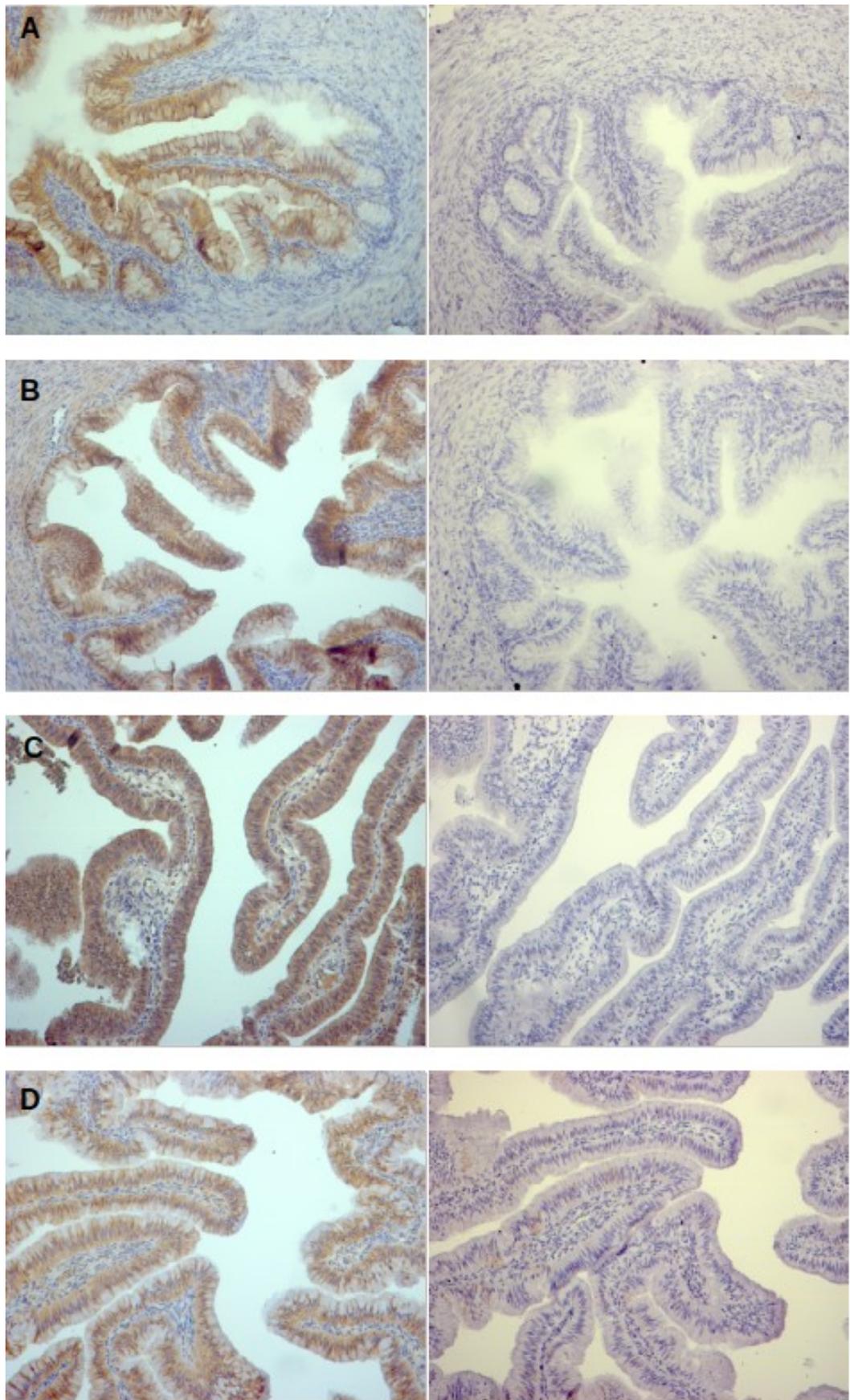


Figura 30. Inmunohistoquímica de SPP1 en el oviducto de coneja. A: istmo en fase pre-

ovulatoria, B: istmo en fase post-ovulatoria, C: ampolla en fase pre-ovulatoria, D: ampolla en fase postovulatoria. Cada corte incluye la muestra a la derecha con su control de anticuerpo secundario a la izquierda (x100).

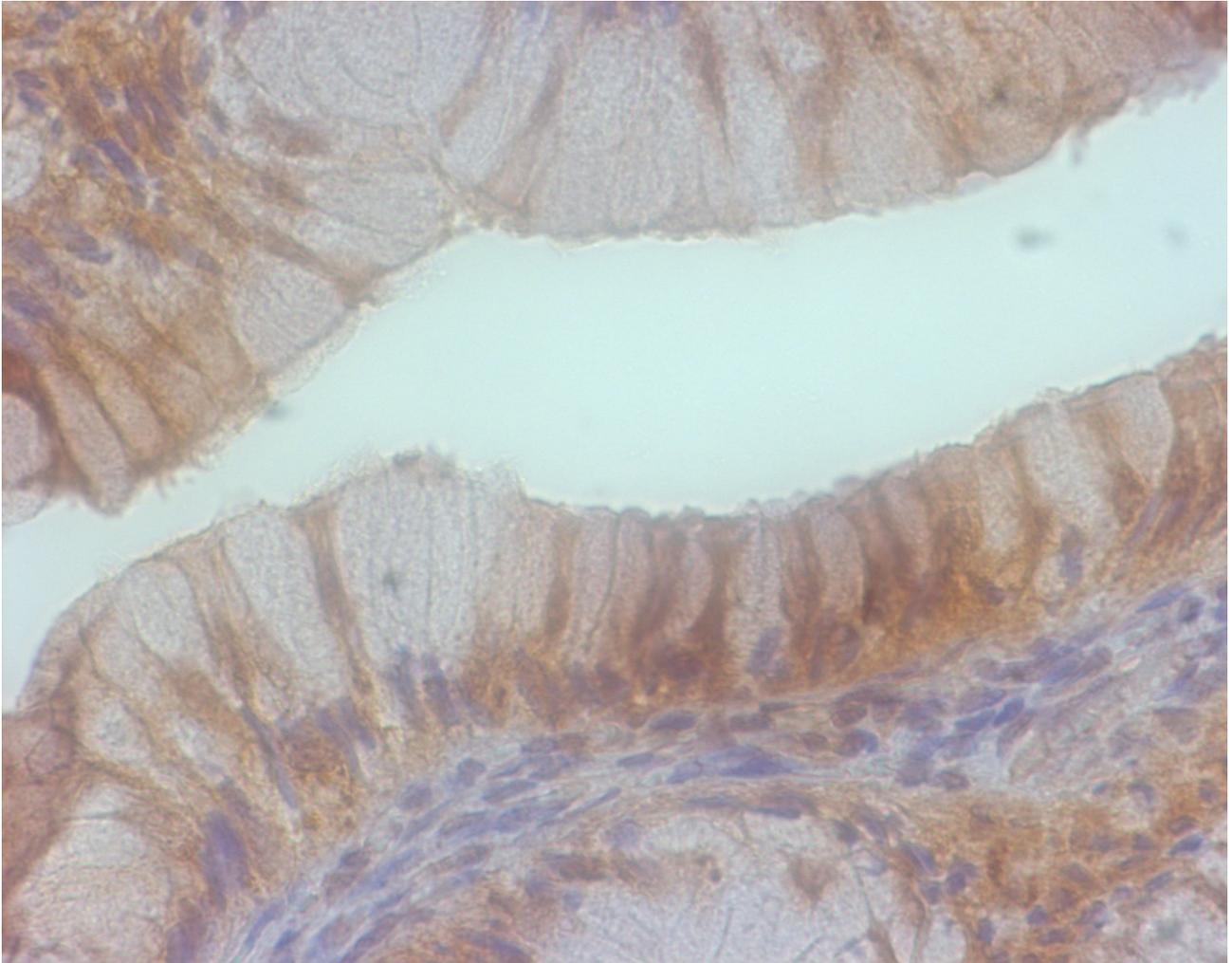


Figura 31. Inmunohistoquímica de SPP1, detalle a mayor aumento (x400). Se puede confirmar que numerosas células secretoras carecen de marcaje positivo.

#### 4.4.2.2.-Western Blot

El análisis mediante Western Blot muestra una banda un poco mayor de 50 kDa (Fig. X). El peso molecular predicho para la oviductina de coneja en base a su secuencia de

aminoácidos es de 35 kDa según Uniprot. Sin embargo, al poseer 3 sitios de O-glicosilación, su peso asciende a los 50-55 kDa, de forma similar a lo observado por Gabler et al, 2003 con la SPP1 bovina o de Hao et al, 2006 con la porcina. La diferencia en la concentración de SPP1 entre las fases pre-ovulatoria y post-ovulatoria no es estadísticamente significativa. Por otra parte, entre cigoto (post-ovulatorio) y mórula la diferencia sí es diferente según la densitometría de las bandas, aunque la variabilidad entre muestras del mismo grupo es grande, observándose una muestra en cada grupo que apenas tiene SPP1. El resultado coherente con el resultado de transcriptómica de mayor concentración de ARNm en presencia de cigotos.

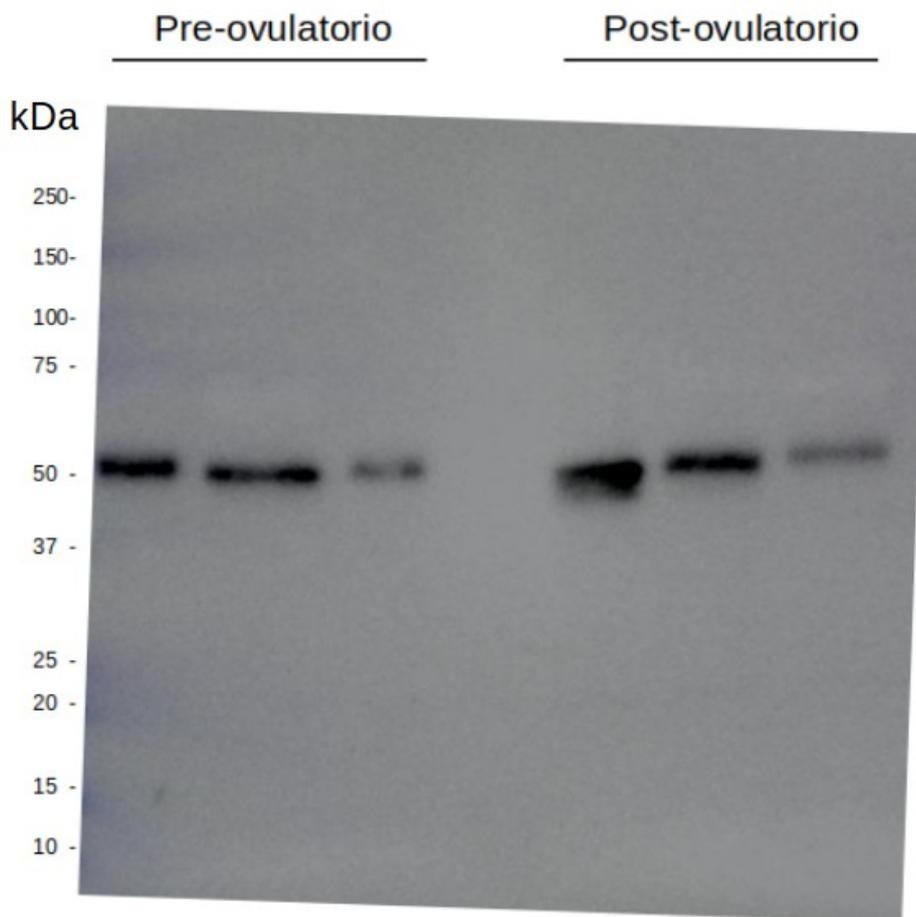


Figura 32. Western Blot de SPP1 en las fases de pre y post-ovulatorio. Se cargaron muestras de FO (n = 3) para cada grupo con 2 µg de proteína.

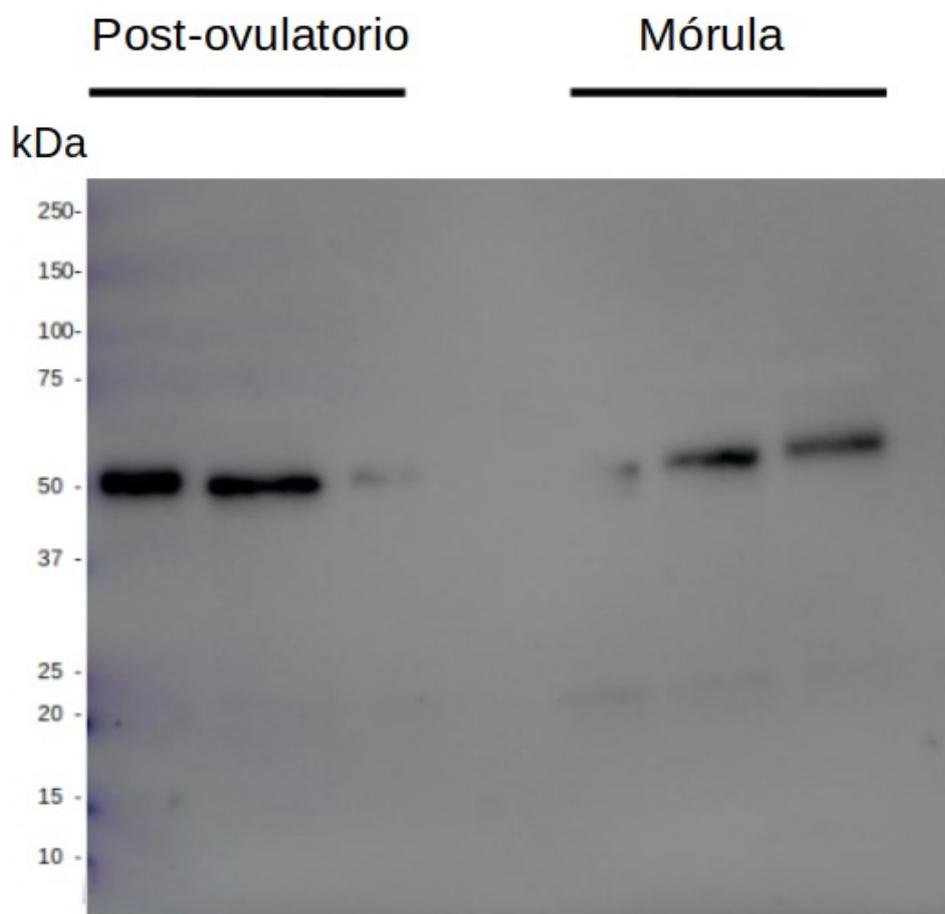


Figura 33. Western Blot de SPP1 en las fases post-ovulatoria (en presencia de cigotos) y con mórulas. Se cargaron muestras de FO de tres conejas diferentes para cada grupo con 2  $\mu$ g de proteína.

#### 4.4.3.- NEUROPEPTIDO Y

El análisis mediante Western Blot muestra en algunas muestras una doble banda de 12-15 kDa similar al peso molecular de la proteína completa humana incluyendo su propéptido (Minth et al., 1984), y compatible con la presencia de modificaciones post-traduccionales (fosforilación de la treonina 83 y amidación de la tirosina 64). Sin embargo, no se observó una banda correspondiente al neuropéptido sin su propéptido de 4.6 kDa

(Keane et al., 2011). La proteína parece expresarse principalmente antes de la ovulación, aunque aún pueden intuirse bandas del peso molecular mayor en dos muestras de FO post-ovulatorio.

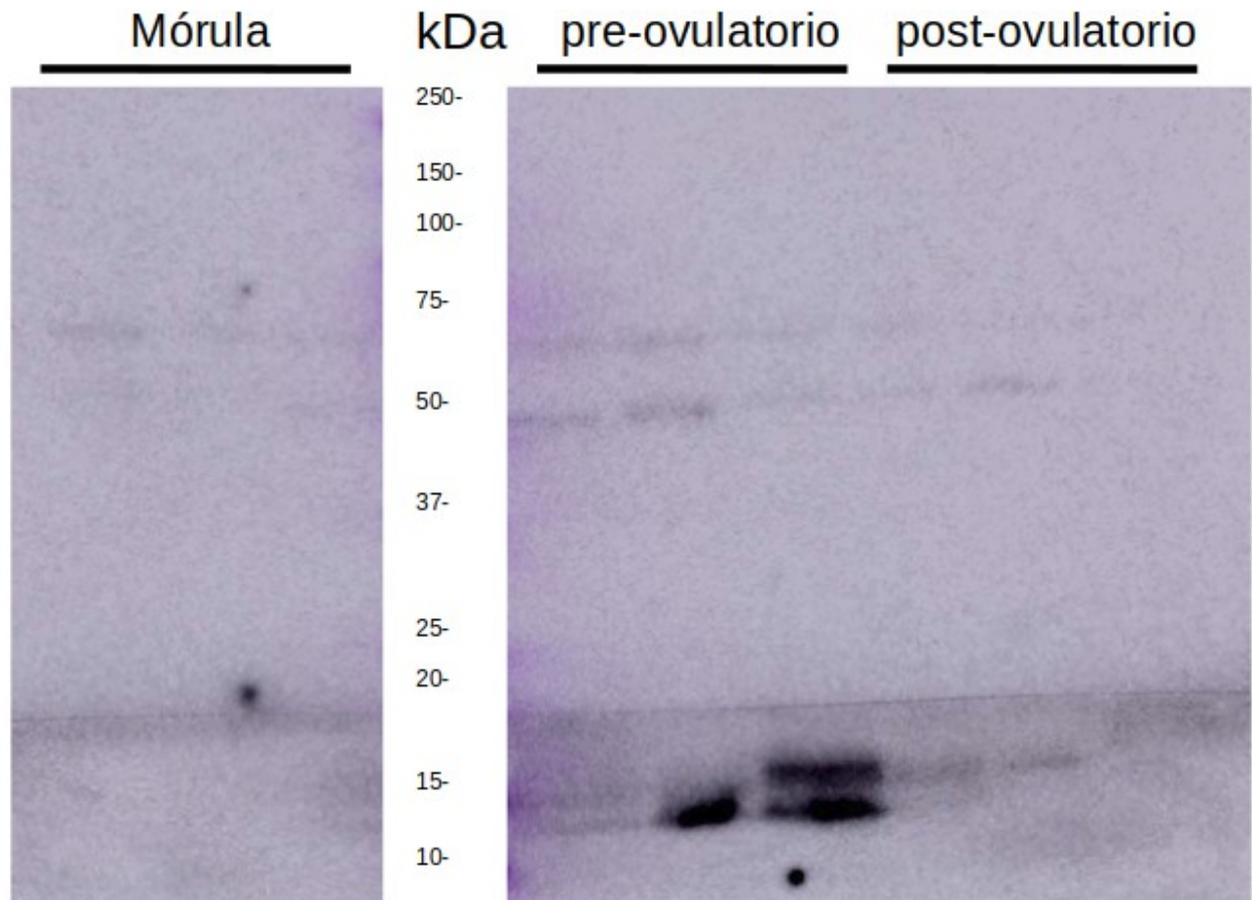


Figura 34. Western Blot de NPY en el FO de fases pre-ovulatoria, post-ovulatoria y de oviductos con mórulas. Se cargaron muestras de FO (n = 3) para cada grupo con 2  $\mu$ g de proteína.

#### 4.4.4.- METALLOPEPTIDASA 7 (MATRILISINA)

El Western Blot muestra que la presencia de MMP7 en el FO de coneja es específica de la fase post-ovulatoria, en la que se puede ver una banda de unos 30 kDa correspondiente al peso molecular del zimógeno de MMP7 (Woessner & Taplin 1988). La cantidad de MMP7 en las muestras de FO obtenido en oviductos con embriones en fase de mórula está por debajo del límite de detección. La variación entre diferentes animales es también evidente, pues uno de los FO de la etapa post-ovulatoria tiene mucha más MMP7.

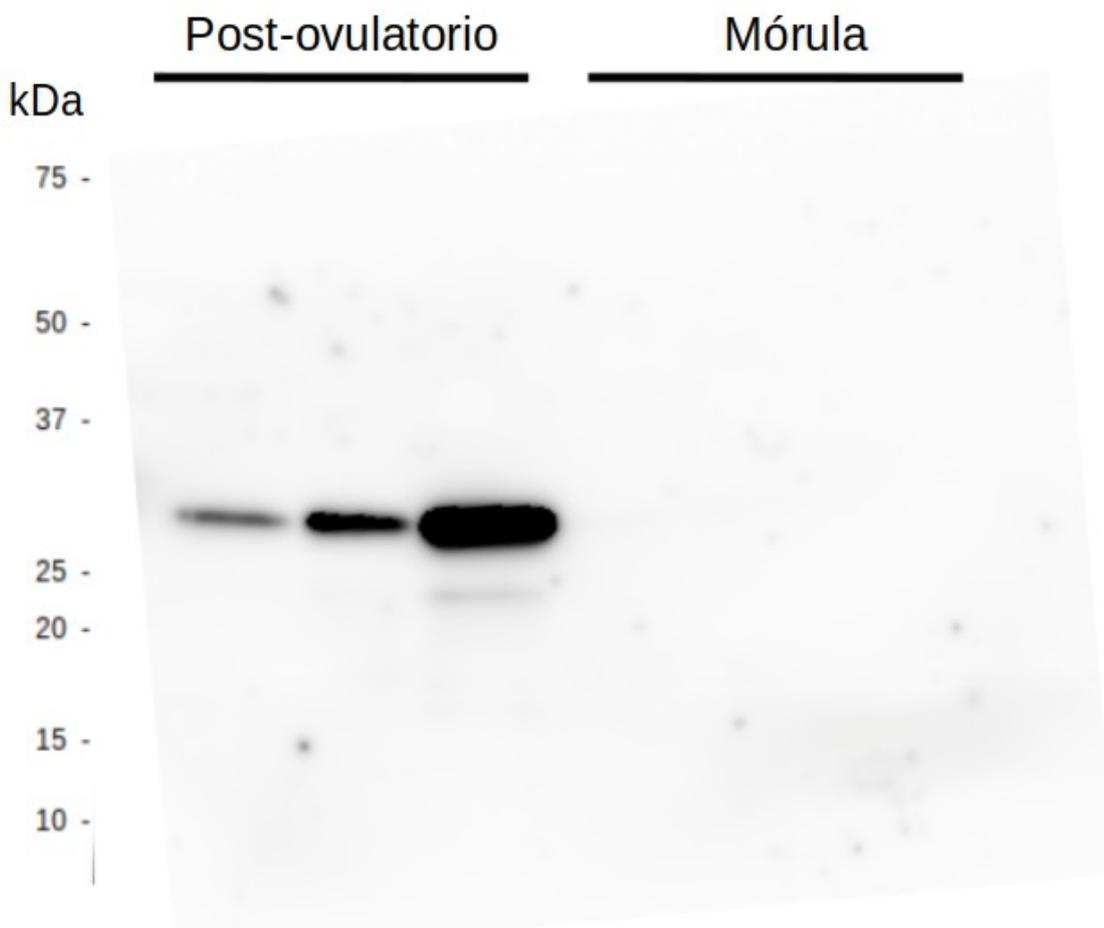


Figura 35. Western Blot para la proteína MMP7 en presencia en la etapa post-ovulatoria (en presencia de cigotos) o en presencia de mórulas. Se cargaron muestras de FO (n = 3) para cada grupo con 2  $\mu$ g de proteína.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1.- CAMBIOS EN EL OVIDUCTO DURANTE LA OVULACIÓN Y FECUNDACIÓN

#### 5.1.1.- EFECTO DE LA OVULACIÓN EN LA AMPOLLA: MODULACIÓN DE LA INMUNIDAD INNATA

El perfil de expresión génica de la ampolla está caracterizado por un silenciamiento de genes relacionados con la inmunidad innata tras la ovulación, incluyendo genes relacionados con la ruta de señalización de los interferones de tipo I (GBP5, IFIT2, ISG15, OAS2, RSAD2, USP18). Algunos de estos genes han sido previamente discutidos en estudios realizados en explantes oviductales de vaca (Schmaltz-Panneau et al, 2014) e *in vivo* en el oviducto de la yegua (Smits et al, 2016). En ambos artículos se mencionan ISG15 y OAS2, además de RSAD2, USP18 e IFIT2 de la ruta del interferon tipo I y LGALS9 y un ortólogo de IFI27 pertenecientes a inmunidad en el artículo de Schmaltz-Panneau et al, 2014. Ambos grupos detectaron sobreexpresión de estos genes en presencia de los embriones, lo que no contradice nuestra observación, dado que lo que observamos es un silenciamiento en presencia de los gametos y no detectamos cambios significativos en fases posteriores, lo que puede sugerir una respuesta diferente del oviducto a los gametos y a los embriones. No he encontrado referencias al respecto de como afecta la presencia de gametos a la expresión de esta ruta de señalización en el oviducto en la bibliografía.

Tanto en la vaca como en la yegua, se ha descrito que los genes relacionados con la ruta de señalización de los interferones de tipo I se sobreexpresan en presencia de embriones a partir de la activación del genoma embrionario (Schmaltz-Panneau et al., 2014; Smits et al., 2017). El interferón juega un papel importante en la vaca durante la implantación

embrionaria (Forde et al, 2012), mientras que en la yegua no se ha detectado su expresión en el conceptus en torno al momento de la implantación (Baker et al, 1991). Sin embargo, en ambas especies se reconoce un rol de los interferones de tipo I desde la etapa embrionaria de 8-16 células como mediador de las comunicaciones entre el embrión y el oviducto. Por otra parte, se ha descrito la influencia positiva que la hormona luteinizante (LH) ejerce sobre la expresión del interferón alfa en las células de la granulosa de rata (Lee et al, 2009). Si el mecanismo se conserva de forma análoga en otras células que poseen el receptor para hormona luteinizante (LHCGR), la expresión de interferón- $\alpha$  aumentaría durante el pico de LH para luego descender. LHCGR se expresa en el epitelio oviductal y media la expresión de proteínas como la oviductina en respuesta a la LH (Sun et al., 1997). Estas evidencias concuerdan con nuestros datos de expresión de genes en respuesta al interferón- $\alpha$  (OAS2, ISG15, IFIT2, RSAD2): más alta en pre-ovulatorio (pico de LH) disminuyendo tras la ovulación.

De esta forma, el paradigma completo de señalización por interferón en el tracto reproductivo femenino de los mamíferos, incluiría una sobreexpresión de interferón- $\alpha$  (y los genes cuya expresión regula) durante la fase pre-ovulatoria a consecuencia del pico de LH. Después se produciría un silenciamiento de la ruta debido a la ausencia del estímulo hormonal. Por último, al menos en ungulados, el embrión de 8-16 células, empieza a secretar interferón- $\tau$  que permitirá la comunicación de éste con el tracto reproductivo femenino y el reconocimiento del conceptus por el endometrio receptivo durante la implantación.

### 5.1.2.- EI ISTMO ANTES DE LA OVULACIÓN

Unas horas antes de la ovulación los espermatozoides se encuentran en el istmo conformando el reservorio espermático. Como revelan nuestros resultados, en esta región del oviducto y en ese mismo momento, se sobreexpresan durante la fase pre-ovulatoria genes que podemos agrupar en 2 clusters con funciones biológicas diferentes: chaperonas del retículo endoplásmico (RE) que se encargan del correcto plegamiento de las proteínas sintetizadas en las células del oviducto y proteínas remodeladoras de la matriz extracelular como ilustra el término GO “extracellular matrix organization”.

Las proteínas del complejo chaperona del RE, como HSPA5, DNAJB11 o HYOU1, son a su vez marcadores exosomales, y han sido detectadas tanto en el FO de coneja (Yu et al, 2016) como en el FO porcino (Luongo et al. 2020), bovino (Lamy et al. 2016; Pillai et al. 2017) y ovino (Soleilhavoup et al. 2016), además de detectarse en oviductosomas bovinos (Almiñana et al, 2018). HSPA5 en concreto, se puede unir a la superficie de espermatozoides humanos *in vitro*, y su presencia inhibe de manera dosis-dependiente la interacción con la ZP (Marín-Briggiler et al. 2010). Además, podría participar en el proceso de capacitación que tiene lugar antes de la ovulación en el oviducto, durante el cuál, se incorporan moléculas presentes en los oviductosomas a los espermatozoides (Al-Dossary et al, 2015).

Las chaperonas de la familia Hp70 (como HSPA5 y HSPA2) forman parte de un mecanismo conservado en mamíferos y aves relacionado con el reservorio espermático y la liberación posterior de estos espermatozoides (Hiyama et al., 2014; Holt y Fazeli 2016). En las aves, las Hp70 interactúan con el canal iónico VDAC2 del espermatozoide

activando la motilidad espermática. Por otra parte, la sobreexpresión de estos genes en presencia de espermatozoides ya ha sido anteriormente documentada en otras especies como el cerdo (Yeste et al., 2015), encajando perfectamente con el perfil observado de expresión en nuestro experimento, en el que las conejas fueron inseminadas y la expresión de los transcritos de Hp70s fue superior en la etapa pre-ovulatoria.

Por otra parte, el remodelado de la matriz extracelular oviductal en la vaca, ha demostrado estar regulado por las hormonas E2 y P4 durante el período periovulatorio (Gonella-Díaz et al., 2018). En nuestro caso, TGFB3, CAPN9, o el gen que codifica la proteína remodeladora de colágeno LOX, se sobreexpresan antes de la ovulación.

La sobreexpresión de TGF- $\beta$  ha sido observada previamente en aves durante la formación del reservorio espermático (Das et al., 2010), al igual que se sabe que los espermatozoides y leucocitos poseen receptores para esta molécula que podría modular su actividad y prolongar la vida útil de los espermatozoides en el reservorio espermático aviar (Das et al., 2006). En el oviducto de coneja, el patrón de expresión concuerda con este dato, pues TGF- $\beta$  se sobreexpresa en fase pre-ovulatoria. Puede estar relacionado con la observación de que en las células de epitelio oviductal bovinas cocultivadas con espermatozoides *in vitro* aumenta la expresión de TGFB (Yousef et al., 2016). Sin embargo, los experimentos de proteómica de Yu y colaboradores (2016 y 2019) y los nuestros no detectan esta proteína en el OF de coneja, lo que sugiere que su expresión en esta especie no está asociada con el epitelio.

Otro grupo de genes importantes relacionados con la matriz extracelular son los de interacción con el sindecano, que incluyen la tenascina (TNC), el sindecano 4 (SDC4) y

las integrinas ITGA2 e ITGB3. En el epitelio luminal del endometrio de ratón el sindecano 4 y las integrinas juegan un papel importante en la implantación (San Martín et al., 2004). Además, Zeng y colaboradores (2018) observaron una sobreexpresión de sindecano 4 y de varias integrinas durante la implantación en el endometrio porcino. Nuestro dato sugiere que el silenciamiento de estos genes en oviducto tras la fecundación podría ser un mecanismo molecular que inhiba la implantación ectópica a nivel de la trompa uterina, dado que su expresión también es inferior en presencia de mórulas con respecto a la fase pre-ovulatoria

Además, se observa la sobreexpresión de genes codificantes de proteínas secretadas identificadas en el FO de otras especies. Entre ellos está el inhibidor 1 de plasminógeno, SERPINE1, sintetizado por las células secretoras del epitelio oviductal en la cerda (Kouba et al., 2000) y que se sobreexpresa en respuesta a la inseminación artificial en esta especie (López-Úbeda et al., 2015), lo que concuerda con el dato de sobreexpresión en la fase pre-ovulatoria en coneja en el istmo, donde se encuentra el reservorio espermático. Todo ello sugiere funciones biológicas de estas proteínas en especies diferentes.

Entre los genes menos estudiados en FO con expresión mayoritaria en la fase pre-ovulatoria, se encuentra NPY cuyo producto ha sido detectado en el FO de coneja por Yu et al., (2016). NPY ha sido descrito en humano tanto en los nervios que innervan la musculatura lisa del oviducto como en la mucosa (Reinecke et al., 1989). Su presencia reduce la liberación de acetilcolina (Herring et al., 2008) y la contracción muscular, por lo que su represión tras la ovulación en la coneja podría estar relacionada con un aumento en las contracciones del músculo liso que participa en el descenso de los ovocitos por el oviducto. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la expresión de quimiorreceptores SRB

(receptor serpentina de clase B) en espermatozoides es necesaria para permitir un desplazamiento eficiente hasta el lugar de fecundación, y estos receptores interactúan con NPY (Hoang y Miller, 2017). Sin embargo, no he encontrado bibliografía al respecto de su presencia en el FO y de su acción potencial sobre los gametos en mamíferos, por lo que estaría por demostrar un efecto positivo de este péptido sobre los espermatozoides. Queda pendiente también hacer una inmunohistoquímica con cortes de oviducto de coneja de la etapa pre-ovulatoria para identificar la localización del marcaje, que nos llevaría a saber si se produce de forma similar a lo observado en humano.

Por último, hay genes que codifican proteínas no secretadas pero cuyos metabolitos pueden tener un efecto importante en el FO. PTGIS es la sintasa de la prostaciclina ( $PGI_2$ ), la prostaglandina principal del oviducto, que se encuentra tanto en el músculo liso como en el epitelio oviductal en humano (Huang et al., 2002). El vínculo entre la prostaciclina y la función espermática no es claro. Schlegel et al. (1986) describen una correlación entre niveles seminales de  $PGI_2$  bajos y motilidad espermática reducida. Sin embargo, la adición de un análogo de  $PGI_2$  al medio de capacitación no afecta a la motilidad espermática en muestras humanas normozoospermicas u oligozoospermicas (Huang et al., 2003).

Por otra parte, se sabe gracias a un modelo en ratón de inflamación aguda en pulmón, que la  $PGI_2$  endógena disminuye la infiltración de neutrófilos. Como respuesta a  $PGI_2$  disminuye la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias  $TNF-\alpha$  e IL-6, y del factor de reclutamiento de neutrófilos LIF, mientras que aumenta la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Toki et al., 2019). En el oviducto bovino, otra prostaglandina ( $PGE_2$ ) tiene un efecto muy parecido: la presencia de espermatozoides estimula la producción de

PGE<sub>2</sub> por las células epiteliales, aumentan los niveles de IL-10 y TGFB1. Estos cambios suprimen la actividad de los neutrófilos del oviducto, suprimiendo su capacidad fagocítica y la formación de trampas neutrófilas extracelulares que inmovilizarían los espermatozoides (Marey et al. 2014; Yousef et al. 2016). Por tanto, las prostaglandinas ejercen un importante papel en el oviducto, evitando la fagocitosis de los espermatozoides del reservorio espermático al inhibir la actividad de los neutrófilos. Nuestros resultados sugieren que esta actividad estaría conservada igualmente en la coneja, aunque estudios futuros son necesarios para confirmar esta hipótesis en los neutrófilos de conejo.

### 5.1.3.- EL ISTMO TRAS LA OVULACIÓN

Durante la etapa post-ovulatoria, se sobreexpresan proteínas secretadas como la osteopontina (SPP1) o la mucina MUC16.

SPP1 se ha empleado en la FIV porcina (Hao et al., 2006; Hao et al., 2008), bovina (Monaco et al., 2009), equina (Mugnier et al., 2009), con resultados positivos en porcino y bovino e inconcluyentes en equino, una especie en la que la FIV no es viable actualmente como método de reproducción asistida. Los resultados de transcriptómica sugieren que la expresión de este gen es claramente superior tras la ovulación en la coneja, apoyando el potencial uso de esta proteína en la FIV. No obstante, debe tenerse cautela con el resultado de transcriptómica, ya que no observamos una diferencia significativa en el contenido en SPP1 del FO de las fases pre- y post-ovulatoria mediante WB. En bovino, por otra parte, la SPP1 en el FO disminuyó durante la fase luteal con respecto al resto del ciclo reproductivo (Gabler et al, 2003). Por otra parte, en el FO de yegua, Mugnier y colaboradores (2009) no observaron diferencias entre las fases del ciclo estral.

MUC16 se expresa habitualmente en el endometrio humano pero se silencia durante la implantación, debido a que su presencia evita la adhesión del trofoblasto (Gipson et al., 2008). El aumento de la expresión de MUC16 tras la ovulación en la coneja sugiere que podría evitar la adhesión/implantación del embrión a su paso por el oviducto.

#### 5.1.4.- EFECTOS DE LA OVULACIÓN COMUNES A LA AMPOLLA Y EL ISTMO

##### 5.1.4.1.- Genes sobreexpresados antes de la ovulación

ACSL6 es una sintasa de ácidos grasos que tiene un papel importante en la fertilidad masculina: Hale et al. (2019) demostraron que esta enzima enriquece en ácido  $\omega$ -3 docohexanóico (DHA) el interior de los túbulos seminíferos y que los ratones macho *Acsl6*<sup>-/-</sup> son presentan subfertilidad severa debido a una espermatogénesis defectuosa que altera el patrón de lípidos conjugados con fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. . Por otra parte, el DHA también determina la competencia de los ovocitos, y se ha suplementado en concentraciones fisiológicas durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos aumentando la tasa de blastocistos de un 25 a un 40% (Elis et al., 2017). La sobreexpresión del enzima encargado de la síntesis de DHA tras la ovulación en el oviducto podría tener un rol en la última etapa de maduración de los gametos femeninos en el oviducto. Además, la presencia de DHA en el medio podría ser beneficiosa en la capacitación espermática, dado que espermatozoides con mayor capacidad para fecundar han demostrado tener mayores niveles de DHA (Furimsky et al., 2005). Por último el DHA se ha detectado mediante cromatografía de gases en el FO de coneja en 48 horas tras la cópula (Yahia Khandoker et al., 1998). Que sea en esta etapa y no antes es un dato contradictorio con nuestro resultado de transcriptómica que sugiere que la expresión del enzima que lo sintetiza se silencia tras la ovulación.

ITLN2 es una lectina dependiente de calcio con afinidad por lipopolisacárido y peptidoglicano, lo que le confiere la capacidad para aglutinar bacterias Gram+ y Gram- (Chen et al., 2016). Esta proteína se sobreexpresa durante el período post-ovulatorio, donde podría proteger el ecosistema oviductal de forma selectiva, evitando la proliferación de bacterias en un momento en el que parte de su sistema inmune ha sido inactivado (Marey et al., 2016). Por otra parte, se sabe ITLN1 e ITLN2 actúan como receptores de la lactoferrina en el intestino de humano, conejo y ratón (Suzuki et al., 2005). La lactoferrina está presente en el FO y que puede unirse a los espermatozoides y la ZP como se comenta en la revisión bibliográfica (Zumoffen et al., 2013). Dado el papel inhibitorio de la lactoferrina en la interacción de gametos, la expresión de intelectinas en el oviducto de la coneja podría modular la concentración de lactoferrina y con ello la interacción entre gametos.

En cuanto a IGFL4, la literatura científica no aporta datos más allá de que pertenezca a una familia de pequeñas proteínas secretadas remotamente relacionadas con el factor de crecimiento insulínico (IGF) que se expresan en tejidos fetales, mama, próstata y numerosos tumores (Emtage et al., 2006). No hay constancia de su presencia en FO de mamíferos incluyendo el FO de coneja por proteómica.

#### 5.1.4.2.- Genes sobreexpresados tras la ovulación

De entre los genes sobreexpresados en ambas regiones del oviducto tras la ovulación, destacan el que codifica MANF y varios genes de la familia de las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs).

MANF (factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos) fue detectada por primera vez en el FO de coneja por Yu y colaboradores (2016). Aunque su función se desconoce en el FO, MANF codifica una pequeña proteína del RE también presente en exosomas con afinidad por los glucolípidos 3-O-sulfogalactosilceramidas (sulfatidas) presente en el suero y en la cara externa de la membrana plasmática de múltiples tipos celulares, incluyendo los espermatozoides (en cola del espermatozoide equino, según Wood et al., 2016, y humanos, según Borges et al., 2018). Curiosamente, MANF puede ser captada por células de mamífero *in vitro* y disminuir el estrés inducido por hipoxia asociándose con HSPA5 (Bai et al., 2018), lo que sugeriría un potencial rol en el mantenimiento de la viabilidad de los cigotos en el oviducto de coneja.

Las UGTs son las enzimas microsomales que realizan un proceso conocido como glucuronidación: la transferencia del ácido uridina difosfato glucurónico (UDP-glucurónico) a un sustrato. La glucuronidación es un proceso esencial del metabolismo de numerosos fármacos, y facilita el transporte de hormonas para facilitar su distribución por el organismo, debido al aumento de la polaridad de una hormona esteroidea tras conjugarla con UDP-glucurónico (Raftogianis et al., 2000). Aunque no hay estudios en oviducto, recientemente, Hankele y colaboradores 2018, monitorizaron la expresión de estas enzimas en el epitelio endometrial durante el ciclo estral en la cerda, donde la expresión de las UGTs es baja tras la ovulación hasta día 6 y después aumenta hasta alcanzar los máximos niveles entre los días 15 y 18. Mientras que el estradiol disminuye drásticamente en los tres primeros días tras la ovulación a su nivel basal y se mantiene así hasta la siguiente ovulación, el estradiol conjugado aumenta progresivamente desde el día 3 en adelante en correlación positiva con el aumento de expresión de UGTs. Hankele y

colaboradores concluyen que la glucuronidación es un proceso que permite modular la actividad de los estrógenos en el útero, aunque son necesarios más experimentos para determinar como afecta este proceso al tracto reproductor femenino

#### 5.1.5.- DIFERENCIAS REGIONALES EN LA EXPRESIÓN DE GENES

La anotación biológica específica de los genes con una expresión mayor en la ampolla con respecto al istmo sólo reveló un término: “epithelial cilium movement”. Algo similar fue observado por Maillo y colaboradores (2016b) entre las dos regiones del oviducto bovino. De estos resultados inferimos que la sobreexpresión de proteínas propias de cilios en la ampolla está correlacionada con las observaciones histológicas que describen una proporción de células ciliadas/células secretoras superior en esta región (Coy et al., 2018). Sin embargo, otros autores han observado la expresión específica de proteínas de secreción clásica por la ampolla, como Kong y colaboradores (2017) con el péptido natriurético C. Por otra parte, las anotaciones relacionadas con músculo enriquecidas en las muestras de istmo corroboran el mayor desarrollo del músculo liso alrededor del istmo con respecto a la ampolla. Además, la expresión de genes que poseen sitios de unión en su secuencia para el factor de transcripción NFAT es mayor en istmo, posiblemente. NFAT regula la expresión de genes importantes para mantener la diferenciación de los miocitos de músculo liso (Eubanks et al, 2003).

Es importante reseñar que entre los genes que se sobreexpresan en el istmo se encuentran algunos con efecto positivo conocido sobre la capacitación espermática. Entre ellos están SPP1, cuya presencia incrementa los porcentajes de RA inducida y el rendimiento de la FIV en varias especies (Hao et al., 2006; Monaco et al., 2009; Mugnier

et al., 2009) y LCN2, que actúa como un extractor de colesterol 100 veces más potente que la albúmina (Watanabe et al., 2014). Probablemente la mayor expresión en istmo de estos genes se debe a que sus productos son proteínas de secreción clásica y por tanto su expresión es mayoritaria en células secretoras que se encuentran en mayor proporción en el istmo, aunque también se sabe que los gránulos de secreción de las células secretoras de la ampolla difieren en composición respecto a los de las células secretoras del istmo en la coneja (Jansen y Bajpai 1982).

## 5.2.- CAMBIOS EN EL OVIDUCTO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO

### 5.2.1.- CAMBIOS DURANTE LA TRANSICIÓN DE ZIGOTO A EMBRIÓN DE 8 CÉLULAS

Curiosamente, la anotación biológica de genes que se sobreexpresan en presencia de embriones de 8 células respecto a la de cigotos sólo incluye un término con un FDR < 0.05 según DAVID: “extracellular space”. Teniendo en cuenta que la anotación no destaca genes que codifican proteínas exosomales (o aparecería el término “extracellular exosome”) se puede concluir que hay un número significativo de genes que codifican proteínas de secreción clásica cuya expresión aumenta en presencia de embriones de 8 células. Entre ellos se encuentra NPY, del que ya hemos hablado anteriormente, pero del que no consta bibliografía relacionada con embriones preimplantacionales. También está HMGB2 (high-mobility group protein B2), una proteína que se sobreexpresa en la fase luteal temprana del útero de ratón (Tan et al., 2003). Esta proteína tiene que ver con la capacidad de diferenciación celular del endometrio, y niveles bajos predisponen a pérdida del embarazo en el primer trimestre (Lucas et al., 2015).

El patrón de expresión del versicano (VCAN) concuerda con el resultado obtenido por Gardela y colaboradores (2020) mediante RT-qPCR de muestras de istmo oviductal de coneja. Este componente de la matriz extracelular juega un papel peculiar en el endometrio humano, puesto que durante la ventana implantacional es secretado por el epitelio endometrial y promueve la adhesión de esferoides BeWo (una línea celular de coriocarcinoma *in vitro*, sugiriendo un papel importante en la implantación embrionaria (Mizayaki et al., 2019). Su represión durante el desarrollo embrionario temprano podría estar relacionado con un mecanismo que evite que se produzca una implantación tubárica típica de primates. El perfil de expresión similar a MMP7, otra proteína típica de la matriz extracelular cuya expresión se reprime en presencia de embriones de 8-células e implicada en la implantación, sugiere que están estrechamente relacionadas. Aunque no hay una relación molecular conocida entre las dos proteínas, investigaciones oncológicas también muestran una correlación en su expresión, puesto que inhibir la expresión de VCAN reduce la expresión de MMP7, además de la capacidad de invasión de células de carcinoma renal (Mitsui et al., 2017).

Los genes “LOC” sin un homólogo directo encontrado codifican receptores olfativos y loci codificantes de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina, sugiriendo una mayor presencia en esta etapa de linfocitos B en el istmo en presencia de embriones de 8 células. La histología de oviducto humano revela que, al menos durante la ovulación, la presencia de linfocitos B en el epitelio oviductal es rara (Varga et al., 2019). No obstante, en el endometrio, se forman agregados de linfocitos B con linfocitos T a su alrededor durante la fase secretora del ciclo menstrual y que incluyen hasta 3000-4000 células por agregado (Agostinis et al., 2019), lo que sería temporalmente equivalente a la

fase luteal temprana en la que se encuentra el oviducto con embriones de 8 células de la coneja.

Por otra parte, hay 3 quimiocinas implicadas en la atracción de células del sistema inmune, todas ellas reclutadoras de linfocitos T sobreexpresadas en presencia de embriones de 8 células. Los linfocitos T sintetizan el factor inhibidor de leucemia (LIF), que mejora el desarrollo *in vitro* de los embriones de oveja y ratón (Fry et al., 1992; Mitchell et al., 1994) y además su presencia ha sido previamente considerada como positiva para el desarrollo preimplantacional en la especie humana por Piccinni y colaboradores (2001).

#### 5.2.2.- CAMBIOS DURANTE EL FINAL DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN EL OVIDUCTO

Se producen pocos cambios en las últimas fases de desarrollo preimplantacional en el oviducto de la coneja, al menos a nivel transcriptómico. Entre las 36 y 68 horas (embriones de 8 células vs mórulas) observamos genes ya mencionados cuya expresión se reprime: LCN2, NPY y genes codificantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina. La menor expresión de inmunoglobulinas podría indicar una migración de linfocitos B fuera del oviducto. La sobreexpresión de NPY en presencia de embriones de 8 células puede indicar de nuevo su participación en el desplazamiento de los embriones en dirección al útero regulando las contracciones del músculo liso del oviducto (Reinecke et al., 1989).

Por otro lado, aumenta la expresión de 10 genes entre los que se encuentran 3 que codifican proteínas secretadas. Uno de ellos codifica la ceruloplasmina, un hecho

bastante chocante puesto que clásicamente se ha descrito como una ferroxidasa que sólo se sintetiza en hígado y es secretada al plasma en mamíferos. Sin embargo, también su RNA se ha detectado en niveles elevados en las células ciliadas del epitelio respiratorio y en las células de Muller de la glía, lo que sugiere que otros tipos celulares concretos a parte de los hepatocitos pueden sintetizarla, presentando además unos niveles de mRNA basales detectables en la mayor parte de tejidos estudiados en humano (datos de Gene Expression Atlas <https://www.ebi.ac.uk/gxa/>). También están NR1D1 y NR1D2, que codifican dos proteínas peculiares de una familia de receptores nucleares de hormonas principalmente estudiados por su papel en la regulación de los ciclos circadianos (Ueda et al., 2005). Los ratones Nr1d1 -/- son subfértiles, tanto los machos como las hembras, aunque la etiología de este defecto no ha sido descrita (Cho et al., 2012).

### 5.2.3.- LA EXPRESIÓN DE OVGP1 DURANTE LA OVULACIÓN Y DESARROLLO TEMPRANO PRE-IMPLANTACIONAL

En la sección de resultados se menciona que sólo se observó mediante RT-qPCR una diferencia en la expresión de OVGP1 en presencia de cigotos y de mórulas, mientras que los microarrays no permitieron detectar diferencias, probablemente debido a la elevada señal de fluorescencia de las sondas asociadas a este locus en todas las muestras.

Hay que destacar que se han observado diferencias según la técnica empleada para comparar la expresión de este gen concreto en la vaca: mientras que Maillo et al. (2016) no vieron diferencia de expresión de OVGP1 entre la ampolla y el istmo empleando microarrays, Gonella-Díaz et al. (2016) sí la detectaron mediante RT-qPCR entre ambas regiones. Por otra parte, Maillo et al. (2015) observaron mediante RNAseq que la OVGP1

se expresaba menos en el epitelio oviductal en presencia de embriones, algo que aquí se puede detectar a nivel temporal comparando las muestras de oviducto pre-ovulatorio vs las que contenían mórulas.

La diferencia de expresión de OVGP1 es moderada. Los elevados niveles de expresión detectados mediante las diferentes técnicas de transcriptómica, y la fuerte señal observada mediante inmunotinción sugieren que es poco probable que suponga una diferencia cualitativa importante para el fluido oviductal en las etapas estudiadas.

### 5.3.- COMPARATIVA ENTRE ESPECIES

#### 5.3.1.- SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE ESTUDIOS DE TRANSCRIPTÓMICA

##### 5.3.1.1.- Pre-ovulatorio vs post-ovulatorio

El consenso entre los datos de coneja y cerda (Acuña et al., 2017) es bajo: 4 genes en común (SPP1, SERPINE1, PTGS2 y DNAJC3; figura 36). Curiosamente, tres de los cuatro genes comunes (SPP1, SERPINE1 y PTGS2) también se expresan diferencialmente en estos dos momentos en la ratona (Fazeli et al., 2004), y SERPINE1 además se sobreexpresa en la cerda como respuesta a la inseminación (López-Úbeda et al., 2015). Es una evidencia más del papel potencial de las proteínas SPP1 y SERPINE1 en la fecundación. Por otra parte, PGE2, el producto del enzima PTGS2, inhibe la fagocitosis de los espermatozoides por neutrófilos (Marey et al., 2014), además de que puede aumentar las contracciones del músculo liso del oviducto y la frecuencia del batido ciliar, facilitando el desplazamiento de los gametos hasta el lugar de la fecundación (Anamthathmakula y Winuthayanon, 2021).

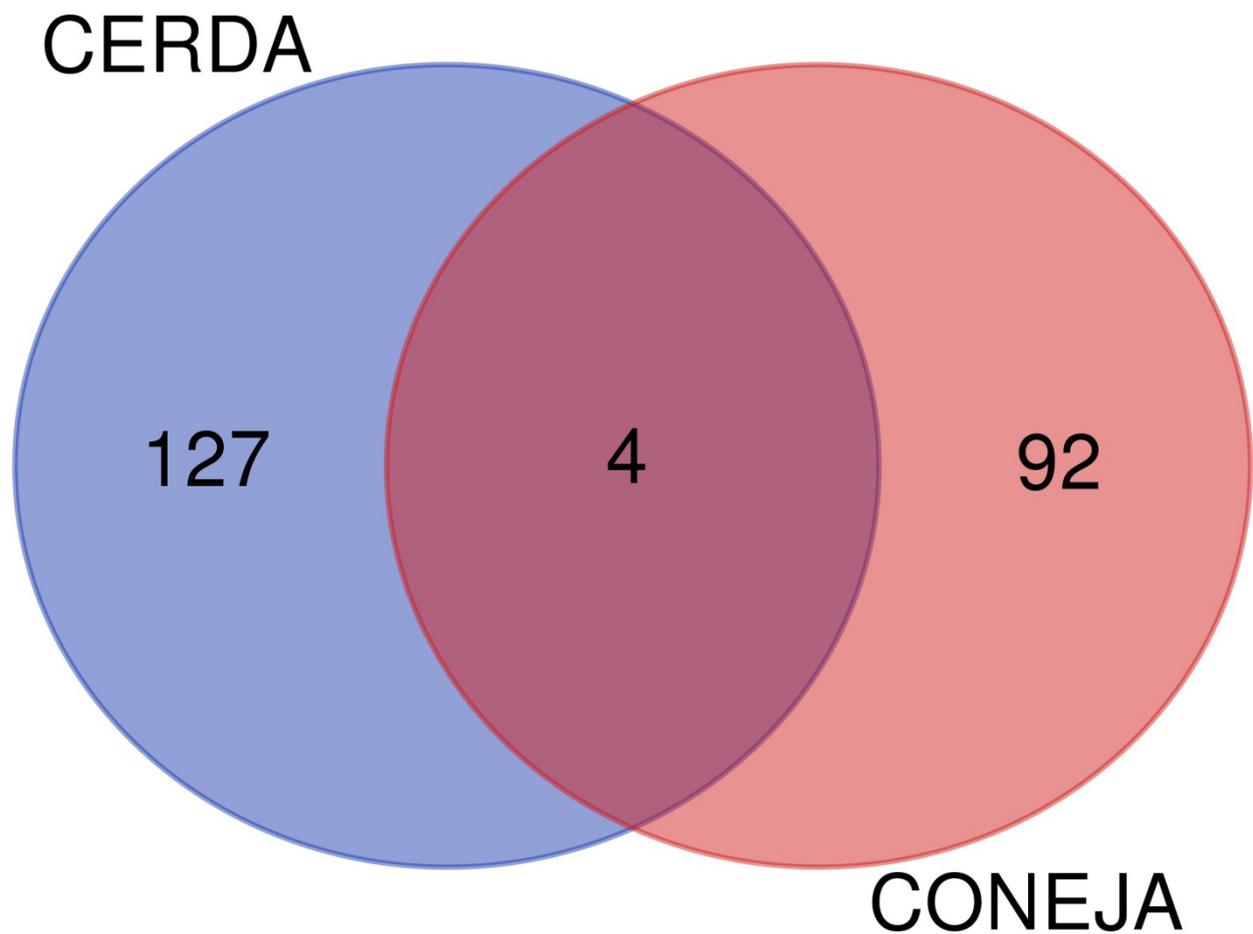


Figura 36. Diagrama de Venn con los genes diferencialmente expresados en la cerda (Acuña et al., 2017) y en la coneja entre las fases pre-ovulatoria y post-ovulatoria.

#### 5.3.1.2.- Post-ovulatorio vs fase luteal temprana

El consenso entre los datos de coneja y cerda (Acuña et al., 2017) es bajo (figura 37). La expresión de COL1A2, MMP7 y MUC4 baja en la fase luteal temprana en ambas especies, mientras que la de CCL28 y PGHDH sube. MMP7 se sobreexpresa además tanto en el oviducto como en el endometrio humanos durante la fase luteal y puede estar relacionada con la remodelación de la matriz extracelular oviductal (Hess et al., 2013), aunque su presencia en el FO de coneja como muestra Yu y colaboradores (2019) o

nuestros propios datos de WB sugiere que también es necesario retirarla del fluido oviductal para no dañar de alguna forma a los embriones. El resultado de MUC4 está, sin embargo, en contradicción directa con el artículo de Idris y Carraway (1999) que observan una regulación hormonal de la secreción de MUC4 en el endometrio de rata, pero no en el oviducto, en el que su expresión es constitutiva. COL1A2 es una proteína típica de la matriz extracelular, pero ha sido detectada en el FO de coneja por nuestro grupo y por el de Yu y colaboradores (2019), su papel potencial en el FO se desconoce. En cuanto a CCL28, un incremento en esta quimiocina se traduciría en un reclutamiento de células plasmáticas productoras de IgA (Cha et al., 2011) en el epitelio oviductal.

**CONEJA**

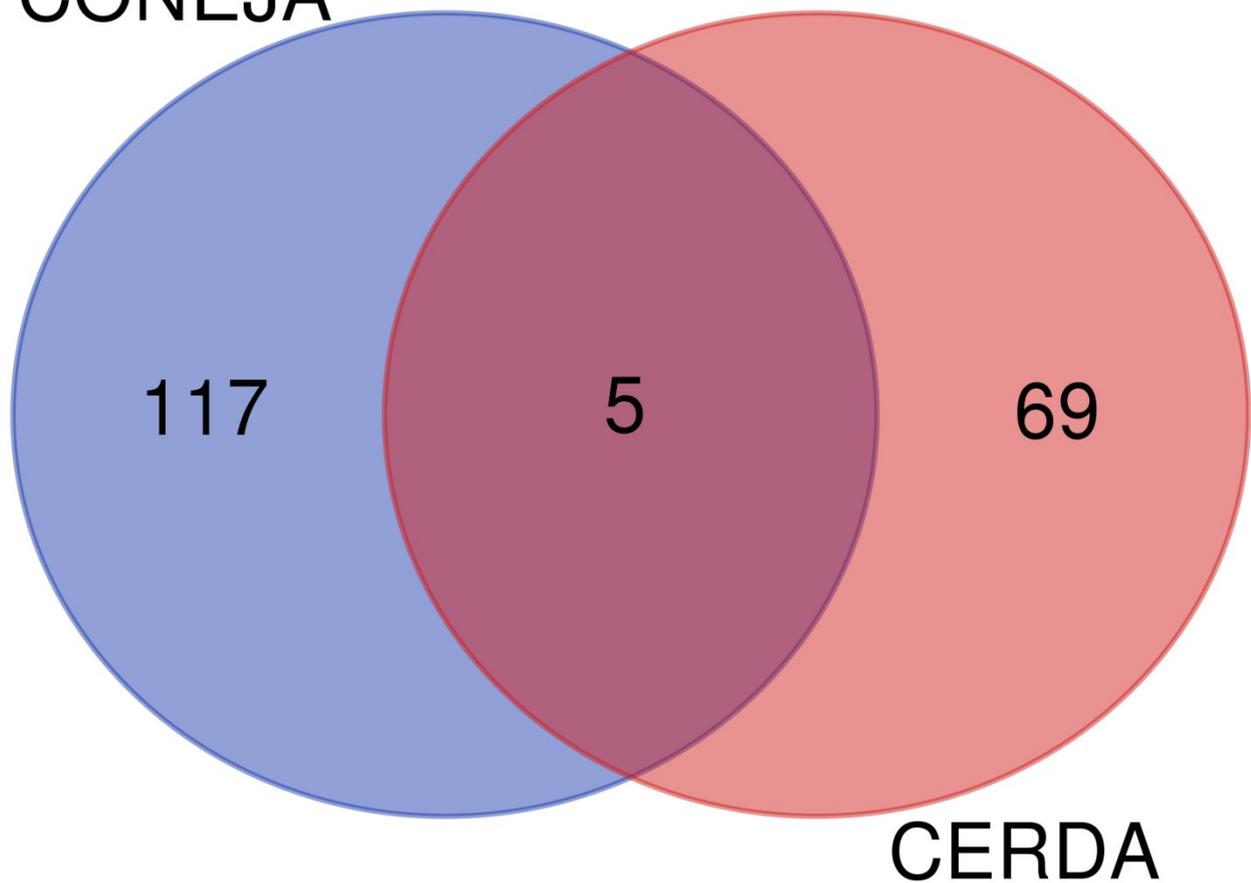


Figura 37. Diagrama de Venn con los genes diferencialmente expresados en la cerda (Acuña et al., 2017) y en la coneja entre las fases post-ovulatoria y luteal temprana.

### 5.3.1.3.- Presencia vs ausencia de embriones

Los diferentes estudios de transcriptómica que han comparado la expresión génica en oviductos con embriones respecto a oviductos sin embriones del mismo día tras la ovulación no muestran un consenso entre especies en cuanto a los genes diferencialmente expresados. Con ningún gen en común a las tres especies estudiadas en artículos anteriores (Maillo et al., 2015; Smits et al., 2016; Martyniak et al., 2018) entre más de 250 genes expresados diferencialmente en cada especie (González-Brusi et al., 2020). Sin embargo, la anotación biológica es más similar entre los grupos, estando muy relacionada con la respuesta inmune al embrión, observándose una regulación de los genes involucrados en la vaca (Maillo et al., 2015), la yegua (Smits et al., 2016) y la cerda (Martyniak et al., 2018) en oviductos con embriones vs oviductos sin embriones, y en nuestros experimentos de coneja entre la fase pre-ovulatoria y los oviductos en fase post-ovulatoria (con cigotos).

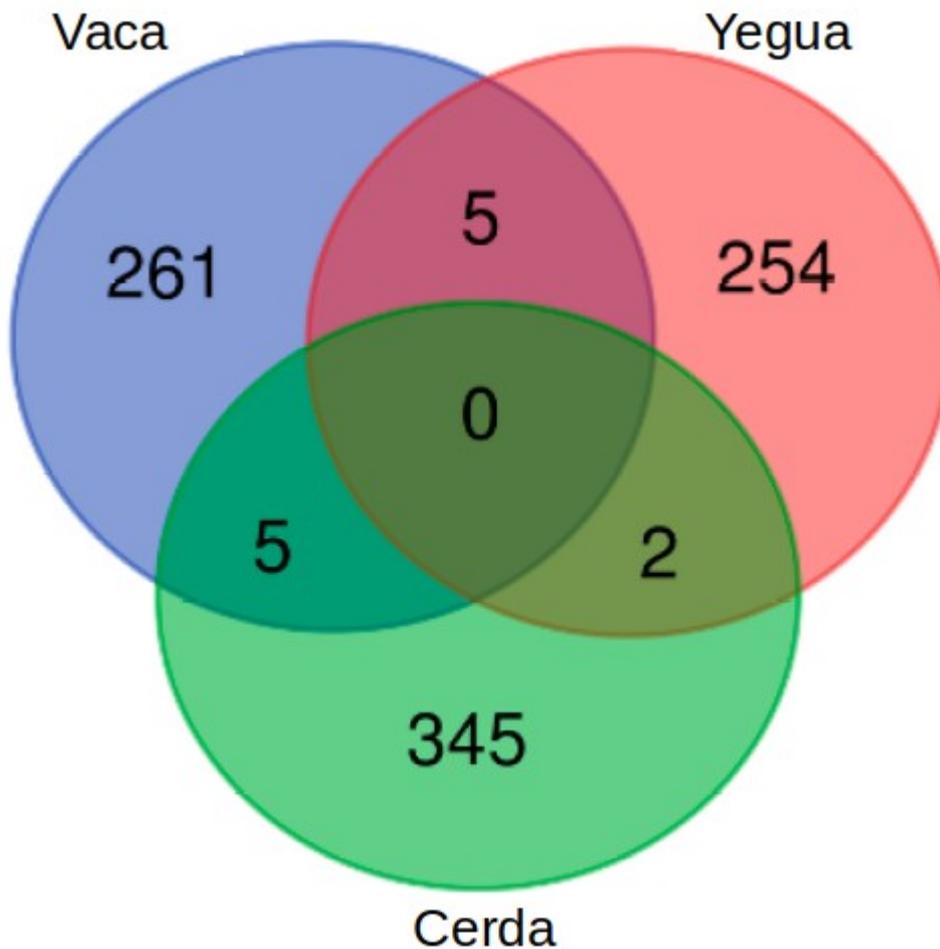


Figura 38. Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados en el oviducto de la vaca, la yegua y la cerda en presencia de embriones.

### 5.3.2.- SIMILITUDES ENTRE ESTUDIOS DE PROTEÓMICA

Como se comentó en el apartado de resultados, la comparativa entre el FO de la mujer, yegua, vaca, oveja, cerda y coneja presenta cientos de proteínas similares.

Menos información existe comparando la influencia de un embrión sobre la composición proteica del FO. Los estudios de proteómica comparativa entre oviductos con embriones vs oviductos sin embriones llevados a cabo en la especie equina (Smits et al., 2017) y bovina (Rodríguez-Alonso et al., 2020) muestran ciertas similitudes. La principal es el

aumento en ciertas proteínas procedentes del plasma sanguíneo. En el caso del FO bovino, 7 de las 12 proteínas cuya concentración aumentó tienen un claro origen en el plasma sanguíneo (ALB, TF, IGL, QDPR, UGP2, SERPINA1 y PLG), mientras que en el FO equino son 12 de las 19 (ALB, TF, IGL, IGHC1, CP, GC, SERPINC1, AHSG, CES1, AMBP and APOA2). Además, se observó un incremento en 2 proteínas cuya presencia en las muestras se debe a la presencia de células del sistema inmune: PNP en el oviducto bovino, proveniente de linfocitos y VNN1 de macrófagos en el oviducto equino.

En equino sólo una proteína cuya expresión aumenta en presencia de embriones de las 12 tiene un claro origen en la secreción de las células del epitelio oviductal (LGALS3BP), mientras que en bovino no hay ninguna proteína con un claro origen en la secreción oviductal.

#### 5.3.2.1.- Permeabilidad del oviducto a las proteínas plasmáticas

Los resultados de los experimentos en la yegua (Smits et al., 2017) y en vaca (Rodríguez-Alonso et al., 2020) muestran que una proporción importante de las proteínas que cambian en el FO en presencia de los embriones tiene su origen en el plasma sanguíneo (ALB, TF, IGL...) y no es un producto de secreción oviductal. Estos datos, sugieren un cambio en la permeabilidad del oviducto a las proteínas plasmáticas en presencia del embrión y puede estar relacionado con los cambios en la expresión génica del oviducto de la coneja entre la fase pre-ovulatoria y las primeras etapas del desarrollo embrionario en el oviducto. En concreto, con aquellos genes involucrados en procesos biológicos como la adhesión célula-célula o con la matriz extracelular, cuya expresión se reduce entre la fase pre-ovulatoria y la post-ovulatoria en presencia de cigotos en la coneja, y sigue disminuyendo entre ésta última y la de mórula. Se ha descrito una mayor permeabilidad

vascular al reprimir la expresión de ITGB3 (Sarelius y Glading, 2015) que podría explicar una sobrerrepresentación de proteínas con un peso molecular inferior a 70 kDa en presencia de embriones incluyendo la albúmina (Ono et al., 2017). No obstante el paso de moléculas mayores de este tamaño (por ejemplo, inmunoglobulinas) sólo podría explicarse si hay una fuga motivada por un proceso inflamatorio (Ono et al., 2017), y el mayor proceso inflamatorio se debería a la ruptura folicular, no a la presencia de embriones en el oviducto. Sin embargo, en nuestro caso no está claro en nuestro caso qué cambios transcriptómicos se deben al ciclo estral y cuáles a la presencia de embriones.

#### 5.4.- IMPACTO DEL EMBRIÓN SOBRE LA TRANSCRIPTÓMICA OVIDUCTAL: ¿CUÁL ES SU DIMENSIÓN REAL?

En la última década se han hecho muchos estudios de transcriptómica del oviducto comparando típicamente dos condiciones específicas: presencia vs ausencia de gametos o presencia vs ausencia de embriones. Lo único que queda claro tras comparar los estudios llevados a cabo en diferentes especies de mamífero es que se modula la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune (Maillo et al., 2015; Smits et al., 2016; Martyniak et al., 2018). No obstante, hay evidencias experimentales de que toda la variación transcriptómica en presencia vs en ausencia de embriones no es una condición necesaria para el desarrollo embrionario pre-implantacional. La transferencia en condiciones no fisiológicas de blastocistos a oviductos de ratonas receptoras 12 horas tras la cópula con machos vasectomizados es viable, aunque el embrión se mantiene en un estado de diapausa hasta que puede implantar dos días después en el útero (Bermejo-Álvarez et al., 2014). Esto indica que el oviducto y el útero siguen con el ciclo estral

independientemente de que se encuentren con un cigoto o un blastocisto y que las hormonas tienen un peso mucho mayor sobre la expresión de proteínas que los gametos (¡ni siquiera han estado presentes espermatozoides!) o los mismos embriones.

Sin embargo, es posible el desarrollo pre-implantacional de embriones en oviductos de especies diferentes, como demuestra Rizos y colaboradores (2010) mediante transferencias heterólogas exitosas con embriones bovinos transferidos a oviductos de coneja, ratona y oveja. Sorprendentemente, además, es posible transferir muchos más embriones de lo que sucede fisiológicamente, como un artículo del grupo de Patrick Lonergan en el que transfieren más de 100 cigotos bovinos a un oviducto ovino (Rizos et al., 2002). Evidentemente en dichas condiciones, el efecto de los embriones sobre la transcriptómica oviductal será mayor, como también observan Maillo y colaboradores (2015) que detectaron cambios evidentes en la transcriptómica del oviducto bovino en presencia de 50 embriones pero no en presencia de un único embrión.

Los hechos de que las transferencias heterólogas sean viables, y que las transferencias de múltiples embriones por encima de niveles fisiológicos es viable no son compatibles con que la respuesta transcripcional a los embriones de los oviductos sea especie-específica como muestra la variabilidad tremenda entre los resultados obtenidos por los diferentes investigadores (Maillo et al., 2015; Smits et al., 2017; Martyniak et al., 2018). La “respuesta” al embrión debería ser lo más parecida posible para mantener la viabilidad embrionaria pero no lo es y esto no afecta a la viabilidad de los embriones.

Por otra parte, la respuesta hormonal del oviducto es mucho más parecida entre especies, como evidencia la comparativa de otros trabajos en esta línea incluyendo el presente trabajo (Bauersachs et al., 2004; Hess et al., 2013). Experimentos como el de Ballester y

colaboradores (2014), muestran que la fase del fluido oviductal sí tiene relevancia en el rendimiento de la FIV porcina, aumentando la eficiencia de un 11.03% usando FO post-ovulatorio a 29.58% con FO pre-ovulatorio, lo que sugiere que *in vivo* debe ser similar. Aún así, el estado hormonal “correcto” del oviducto para el desarrollo pre-implantacional no es esencial, como muestran los experimentos de Beyer y Zeilmaker (1973), que transfirieron cigotos a oviductos de ratonas y ratas en diferentes fases del ciclo estral, y de Papaioannou y Ebert (1986) que transfirieron cigotos a oviductos de ratonas prepúberes y se desarrollaron hasta mórulas y blastocistos respectivamente, aunque el número de células de los blastocistos obtenidos fue menor que usando ratonas sexualmente maduras pseudopreñadas.

Aunque el ambiente sea adecuado para el desarrollo embrionario en todo momento, es necesario controlar el tránsito de los embriones: 1) la velocidad de transporte de partículas en el oviducto varía a lo largo del ciclo estral (Kölle et al., 2009) y 2) la presión en la unión utero-tubárica varía a lo largo del ciclo estral (Ortega-Moreno y Caballero-Gómez, 1994), lo que regularía la salida del embrión al útero. Por supuesto, que el endometrio se encuentre dentro de la ventana implantacional cuando el embrión pase al útero también es esencial, como muestran los experimentos en numerosas especies de mamíferos (Kao et al., 2002; Nakamura et al., 2006; Tabidzadeh 2007). Tanto la velocidad de transporte de partículas como la presión ejercida en la unión útero-tubárica están controladas por hormonas: E2 y las prostaglandinas E y F aumentan la contracción del músculo liso del oviducto (Lindblom et al., 1978; Weber et al., 1991), mientras que P4 lo relaja (Lindblom y Hamberger, 1980). De esta forma, aunque las necesidades nutricionales del embrión estén cubiertas en un oviducto de una hembra no sincronizada, su transporte no será adecuado. Además, el reciente KO de ADGRD1 en ratón proporciona una

evidencia sólida de la importancia del transporte oviductal: los embriones se quedan atrapados en la unión ampular-ístmica de las ratonas *Adgrd1* <sup>-/-</sup>, y son incapaces de desarrollarse más allá de la etapa de blastocisto (Bianchi et al., 2021). No obstante, no hay diferencias en la expresión de *ADGRD1* en el epitelio oviductal de ratón durante el ciclo estral (Bianchi et al., 2021).

Por tanto, parece preferible aplicar un enfoque global a la transcriptómica del oviducto que tenga en cuenta el efecto hormonal y la presencia de gametos y embriones, registrando la evolución temporal del oviducto durante la cópula, fecundación y desarrollo embrionario pre-implantacional.

## CONCLUSIONES

I.- Con respecto a la primera parte de la tesis titulada “SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS EN BASE A INTERACCIÓN CON AZÚCARES PRESENTES EN EL EPITELIO OVIDUCTAL” se extraen las siguientes conclusiones aplicables a la especie porcina:

1- Existen varias subpoblaciones espermáticas con distintas afinidades por azúcares que poseen diferente afinidad por la zona pelúcida.

2- Es posible separar las subpoblaciones espermáticas en base a su afinidad por glicoconjugados mediante sorting, pero su afinidad por la zona pelúcida se ve parcialmente comprometida.

3- Es necesario implementar un método de separación diferente al sorting que no mengüe la afinidad de los espermatozoides por la zona pelúcida.

II.- Con respecto a la segunda parte de la tesis titulada “MODIFICACIONES EN EL OVIDUCTO DE CONEJA DURANTE LA OVULACIÓN Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO PRE-IMPLANTACIONAL” se plantean las siguientes conclusiones:

4- El transcriptoma del oviducto de coneja presenta diferencias espaciales y temporales durante la ovulación y desarrollo embrionario pre-implantacional.

5- Varios productos de secreción presentes en el fluido oviductal varían desde la cópula hasta el final del desarrollo embrionario pre-implantacional, entre ellos MMP7, NPY y SPP1.

6- La respuesta a la ovulación y la cópula presenta ciertos mecanismos moleculares conservados entre diferentes especies de mamíferos, favoreciendo la expresión de: SERPINE1, SPP1 y PTGS2.

7- La respuesta del oviducto de los mamíferos a la presencia de embriones involucra una modulación local del sistema inmune. Aún así, no se ha esclarecido un mecanismo de respuesta universal debido a la fuerte discrepancia de resultados entre especies.

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

Capacitación espermática: cambios fisiológicos que confieren al espermatozoide la habilidad para fecundar un ovocito. La primera descripción del fenómeno fue hecha de forma independiente por Austin y Chang en 1951.

$C_T$ : umbral de ciclo, corresponde al primer ciclo de RT-qPCR en el que se observa un incremento significativo en la fluorescencia de SYBRGreen del pocillo. Valores de  $C_T$  menores indican por tanto una mayor cantidad del amplicón en la muestra analizada.

Espermatozoide: gameto masculino, se trata de una célula haploide móvil que al unirse a un ovocito es capaz de formar un cigoto dando lugar a un ser vivo con una nueva dotación cromosómica.

Exosoma: vesícula extracelular generada por el endosoma de las células eucariotas que se libera al medio cuando un cuerpo multivesicular se fusiona con la membrana plasmática. Tienen un tamaño típico de 30-90 nm y en su interior se encuentran proteínas, mRNAs y miRNAs.

*Hardening*: endurecimiento de la zona pelúcida en ciertas condiciones biológicas responsable del bloqueo de la polispermia a nivel de zona.

Hiperactivación: patrón de movilidad del espermatozoide caracterizado por un movimiento asimétrico de gran amplitud del flagelo, típico de los espermatozoides recuperados del

oviducto que se puede observar en cierto porcentaje de la población espermática durante la capacitación *in vitro*.

*Knockout* (KO): en biología molecular y genética, se refiere a un individuo que carece de una proteína propia de otro individuo típico de la misma especie.

Microarray (micromatriz): conjunto de sondas de ADN monocatenario organizadas de forma ordenada en un soporte sólido.

Ovocito: gameto femenino, célula haploide de gran tamaño rodeada por la zona pelúcida y el cúmulo ovígeno que al ser fecundado por un espermatozoide da lugar a un cigoto. Cada ovocito se desarrolla en un folículo ovárico y tras su ovulación pasa al oviducto, donde completa su maduración minutos después de la fecundación.

PCR (reacción en cadena de la polimerasa): técnica de biología molecular que permite la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN (amplicón). Requiere una secuencia de ADN, cebadores de ADN complementarios a los extremos del amplicón y una ADN polimerasa. Fue desarrollada por Kary Mullis en 1983, obteniendo el premio Nobel en Química de 1993.

Polispermia: penetración por parte de más de un espermatozoide del mismo óvulo durante la fecundación, normalmente generando un cigoto inviable en mamíferos.

Reacción acrosómica (RA): evento celular que incluye la exocitosis del contenido del acrosoma, necesario como paso previo a la fecundación.

Reservorio espermático: acumulación de espermatozoides en el bajo istmo o la unión utero-tubárica (depende de la especie) que se mantienen unidos al epitelio oviductal para mantener su viabilidad hasta la ovulación, momento en el que se van liberando gradualmente.

Zona pelúcida (ZP): estructura extracelular especializada que recubre a los ovocitos y embriones preimplantacionales de mamífero. Consta de 3 o 4 glicoproteínas con un dominio ZP en los mamíferos euterios y de 4 o 6 glicoproteínas en los mamíferos marsupiales.

## ABREVIATURAS, LECTINAS Y GENES

ConA	concanavalina A. Lectina que reconoce $\alpha$ -D-manosa y $\alpha$ -D-glucosa en posición terminal
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> aglutinnin. Lectina que reconoce N-acetilgalactosamina en posición terminal unida a galactosa por enlace $\beta$ 1,4.
FETUB	fetuina B
FIV	fecundación <i>in vitro</i>
FO	fluido oviductal
HP	haptoglobina
HSPA5	miembro de la familia de proteínas de choque térmico A (70kDa) 5
HSPA8	miembro de la familia de proteínas de choque térmico A (70kDa) 8
IA	inseminación artificial
LTF	lactoferrina
MANF	factor derivado de astrocitos mesenquimales
MMP7	metalopeptidasa 7
NPY	neuropéptido Y
OVGP1	oviductina
PLAT	activador tisular del plasminógeno
SNA	<i>Sambucus nigra</i> aglutinnin I. Lectina que reconoce ácido siálico en posición terminal unido preferentemente por enlace $\alpha$ 2,6 a galactosa
SPP1	osteopontina
WGA	wheat germ aglutinnin (aglutinina de germen de trigo). Lectina que reconoce ácido siálico o N-acetil-glucosamina en posición terminal
ZP	zona pelúcida



## BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, O. S., Avilés, M., López-Úbeda, R., Guillén-Martínez, A., Soriano-Úbeda, C., Torrecillas, A., Coy, P., & Izquierdo-Rico, M. J. (2017). Differential gene expression in porcine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(12), 2387–2399. <https://doi.org/10.1071/RD16457>
- Agostinis, C., Mangogna, A., Bossi, F., Ricci, G., Kishore, U., & Bulla, R. (2019). Uterine immunity and microbiota: a shifting paradigm. *Frontiers in immunology*, 10, 2387.
- Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular reproduction and development*, 84(10), 1039-1052.
- Aitken, R. J., & Nixon, B. (2013). Sperm capacitation: A distant landscape glimpsed but unexplored. *Molecular Human Reproduction*, 19(12), 785–793. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat067>
- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2013). Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *International Journal of Developmental Biology*, 57(2–4), 265–272. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130146ja>
- Aitken, R. J., Baker, M. A., & Nixon, B. (2015). Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress?. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 633.
- Al-Dossary, A. A., Bathala, P., Caplan, J. L., & Martin-DeLeon, P. A. (2015). Oviductosome-sperm membrane interaction in cargo delivery: Detection of fusion and underlying molecular players using three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM). *Journal of Biological Chemistry*, 290(29), 17710–17723. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633156>

- Al-Dossary, A. A., & Martin-DeLeon, P. A. (2016). Role of exosomes in the reproductive tract Oviductosomes mediate interactions of oviductal secretion with gametes/early embryo. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *21*, 1278-1285.
- Alasmari, W., Barratt, C. L. R., Publicover, S. J., Whalley, K. M., Foster, E., Kay, V., da Silva, S. M., & Oxenham, S. K. (2013). The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Human Reproduction*, *28*(4), 866–876. <https://doi.org/10.1093/humrep/des467>
- Algarra-Oñate, B. (2016). Estudio molecular de la glicoproteína oviductal OVGP1 y su efecto en la fecundación y el desarrollo embrionario in vitro en la especie porcina (*Sus scrofa*) y bovina (*Bos taurus*).
- Almiñana, C., Heath, P. R., Wilkinson, S., Sanchez-Osorio, J., Cuello, C., Parrilla, I., Gil, M. A., Vazquez, J. L., Vazquez, J. M., Roca, J., Martinez, E. A., Fazeli, A. (2012). Early developing pig embryos mediate their own environment in the maternal tract. *PLoS one*, *7*(3), e33625.
- Almiñana, C., Tsikis, G., Labas, V., Uzbekov, R., da Silveira, J. C., Bauersachs, S., & Mermillod, P. (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*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4982-5>
- Alvau, A., Battistone, M. A., Gervasi, M. G., Navarrete, F. A., Xu, X., Sánchez-Cárdenas, C., De la Vega-Beltran, J. L., Da Ros, V. G., Greer, P. A., Darzson, A., Krapf, D., Salicioni, A. M., Cuaniscu, P. S., & Visconti, P. E. (2016). The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development*, *143*(13), 2325-2333.

- Ambrosi, B., Accogli, G., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Monget, P., Moros, C., Holmskov, U., Mollenhauer, J., Robbe-Masselot, C., Vidal, O., Desantis, S., & Goudet, G. (2013). Deleted in malignant brain tumor 1 is secreted in the oviduct and involved in the mechanism of fertilization in equine and porcine species. *Reproduction*, *146*, 119-133.
- Anamthathmakula, P., & Winuthayanon, W. (2021). Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) in the oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *Endocrinology*, *162*(4), bqab025.
- Anderson, L. L. (2000). Pigs. *Reproduction in farm animals*, 182-191.
- Apichela, S. A., Argañaraz, M. E., Giuliano, S., Zampini, R., Carretero, I., Miragaya, M., & Miceli, D. C. (2014). Llama oviductal sperm reservoirs: involvement of bulbourethral glands. *Andrologia*, *46*(3), 290-295.
- Araki, Y., Nohara, M., Yoshida-Komiya, H., Kuramochi, T., Mamoru, I. T. O., Hoshi, H., Shinkai, Y., & Sendai, Y. (2003). Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization. *Biochemical Journal*, *374*(2), 551-557.
- Aspholm, M., Kalia, A., Ruhl, S., Schedin, S., Arnqvist, A., Lindén, S., Sjöström, R., Gerhard, M., Semino-Mora, C., Dubois, A., , Unemo, M., Danielsson, D., Teneberg, S., Lee, W., Berg, D. E., Borén, T. (2006). Helicobacter pylori adhesion to carbohydrates. *Methods in enzymology*, *417*, 293-339.
- Austin, C. R. (1952). The 'capacitation' of the mammalian sperm. *Nature*, *170*(4321), 326.
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? *Molecular Human Reproduction*, *16*(12), 896–906.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gaq056>

- Bai, M., Vozdek, R., Hnízda, A., Jiang, C., Wang, B., Kuchar, L., ... & Ma, D. K. (2018). Conserved roles of *C. elegans* and human MANFs in sulfatide binding and cytoprotection. *Nature communications*, *9*(1), 1-11.
- Baker, C. B., Adams, M. H., & McDowell, K. J. (1991). Lack of expression of alpha or omega interferons by the horse conceptus. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, *44*, 439-443.
- Baker, M. A., Hetherington, L., & Aitken, R. J. (2006). Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *Journal of Cell Science*, *119*(15), 3182–3192. <https://doi.org/10.1242/jcs.03055>
- Baker, M. A., Hetherington, L., Ecroyd, H., Roman, S. D., & Aitken, R. J. (2004). Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of Cell Science*, *117*(2), 211–222. <https://doi.org/10.1242/jcs.00842>
- Ballester, L., Romero-Aguirregomezcorta, J., Soriano-Úbeda, C., Matás, C., Romar, R., & Coy, P. (2014). Timing of oviductal fluid collection, steroid concentrations, and sperm preservation method affect porcine in vitro fertilization efficiency. *Fertility and sterility*, *102*(6), 1762-1768.
- Battistone, M. A., Alvau, A., Salicioni, A. M., Visconti, P. E., Da Ros, V. G., & Cuasnicu, P. S. (2014). Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation. *Molecular human reproduction*, *20*(11), 1054-1066.
- Bauersachs, S., Rehfeld, S., Ulbrich, S. E., Mallok, S., Prella, K., Wenigerkind, H., Einspanier, R., Blum, H., & Wolf, E. (2004). Monitoring gene expression changes in bovine oviduct

- epithelial cells during the oestrous cycle. *Journal of Molecular Endocrinology*, 32(2), 449-466.
- Bermejo-Alvarez, P., Park, K. E., & Telugu, B. P. (2014). Utero-tubal embryo transfer and vasectomy in the mouse model. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (84).
- Beyer, G., & Zeilmaker, G. H. (1973). Development of mouse and rat zygotes following transfer to non-synchronized rat and mouse oviducts. *Reproduction*, 33(1), 141-143.
- Belleannee, C., Belghazi, M., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Gatti, J. L., Dacheux, J. L., & Dacheux, F. (2011). Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics*, 11(10), 1952-1964.
- Berger, T., Togawa, A., Duncan, G. S., Elia, A. J., You-Ten, A., Wakeham, A., ... & Mak, T. W. (2006). Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6), 1834-1839.
- Bianchi, E., Sun, Y., Almansa-Ordonez, A., Woods, M., Goulding, D., Martinez-Martin, N., & Wright, G. J. (2021). Control of oviductal fluid flow by the G-protein coupled receptor Adgrd1 is essential for murine embryo transit. *Nature Communications*, 12(1), 1-12.
- Biggers, J. D., Whittingham, D. G., & Donahue, R. P. (1967). The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(2), 560.
- Blandau, R. J. (1969). Gamete transport-comparative aspects. *The Mammalian Oviduct. Comparative Biology and Methodology*, 129-162.

- Blease, S. C., French, A. T., Knight, P. A., Gally, D. L., & Pemberton, A. D. (2009). Bovine intelectins: cDNA sequencing and expression in the bovine intestine. *Research in veterinary science*, *86*(2), 254-256.
- Blondin, P., Beaulieu, M., Fournier, V., Morin, N., Crawford, L., Madan, P., & King, W. A. (2009). Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, *71*(1), 30-38.
- Boerke, A., Brouwers, J. F., Olkkonen, V. M., van de Lest, C. H., Sostaric, E., Schoevers, E. J., Helms, J. B., & Gadella, B. M. (2013). Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. *Biology of reproduction*, *88*(1), 21-1.
- Boguenet, M., Bouet, P. E., Spiers, A., Reynier, P., & May-Panloup, P. (2021). Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Human Reproduction Update*.
- Bonet, S., Garcia, E., & Sepúlveda, L. (2013). The boar reproductive system. In *Boar Reproduction* (pp. 65-107). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Borges, E. D., Vireque, A. A., Berteli, T. S., de Lima, C. B., Sobreira, T. J., Ferreira, C. R., & Navarro, P. A. (2018). Lipidomics of sperm cells of fertile and sub-fertile men by MRM-profiling. *Fertility and Sterility*, *110*(4), e303-e304.
- Borell, U., Nilsson, O., Wersäll, J., & Westman, A. (1956). Electron-microscope studies of the epithelium of the rabbit fallopian tube under different hormonal influences. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, *35*(1), 35-41.
- Brenner, R. M., & Slayden, O. D. (1994). Oestrogen action in the endometrium and oviduct of rhesus monkeys during RU486 treatment. *Human reproduction*, *9*(suppl\_1), 82-97.

- Brewis, I. A., Boerke, A., Tsai, P. S., & Gadella, B. M. (2004). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 473-480.
- Briz, M., & Fàbrega, A. (2013). The boar spermatozoon. In *Boar Reproduction* (pp. 3-47). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Brouwers, J. F., Boerke, A., Silva, P. F. N., Garcia-Gil, N., van Gestel, R. A., Helms, J. B., Van de Lest, C. H. A., & Gadella, B. M. (2011). Mass Spectrometric Detection of Cholesterol Oxidation in Bovine Sperm. *Biology of Reproduction*, 85(1), 128–136. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091207>
- Brundin, J., & Wirsén, C. (1964). The distribution of adrenergic nerve terminals in the rabbit oviduct. *Acta Physiologica Scandinavica*, 61(1-2), 203-204.
- Budna-Tukan, J., Światły-Błaszkiwicz, A., Celichowski, P., Kałużna, S., Konwerska, A., Sujka-Kordowska, P., Jankowski, M., Kulus, M., Jeseta, M., Piotrowska-Kempisty, H., Józkowiak, M., Antosik, P., Bukowska D., Skowroński, M. T., Matysiak, J., Nowicki, M., & Kempisty, M. (2019). “Biological Adhesion” is a Significantly Regulated Molecular Process during Long-Term Primary In Vitro Culture of Oviductal Epithelial Cells (Oecs): A Transcriptomic and Proteomic Study. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3387.
- Burkart, A. D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M., & Dean, J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *Ovastacin cleaves ZP2 and prevents polyspermy. The Journal of cell biology*, 197(1), 37-44.
- Buhi, W. C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 123(3), 355-362.

- Buhi, W. C., Alvarez, I. M., & Kouba, A. J. (2000). Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs*, 166(2), 165–179. <https://doi.org/10.1159/000016731>
- Burkman, L. J., Overstreet, J. W., & Katz, D. F. (1984). A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviducal isthmus. *Reproduction*, 71(2), 367-376.
- Caballero, I., Vázquez, J. M., Rodríguez-Martínez, H., Gil, M. A., Calvete, J. J., Sanz, L., García, E. M., Roca, J., & Martínez, E. A. (2005). Influence of seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin on pig gamete interaction. *Zygote*, 13(1), 11-16.
- Cagnone, G. L., Dufort, I., Vigneault, C., & Sirard, M. A. (2012). Differential gene expression profile in bovine blastocysts resulting from hyperglycemia exposure during early cleavage stages. *Biology of Reproduction*, 86(2), 50-1.
- Canovas, S., Ivanova, E., Romar, R., García-Martínez, S., Soriano-Úbeda, C., García-Vázquez, F. A., ... & Coy, P. (2017). DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *Elife*, 6, e23670.
- Cardona, C., Neri, Q. V., Simpson, A. J., Moody, M. A., Ostermeier, G. C., Seaman, E. K., Paniza, T., Rosenwaks, Z., Palermo, D. P., & Travis, A. J. (2017). Localization patterns of the ganglioside GM1 in human sperm are indicative of male fertility and independent of traditional semen measures. *Molecular reproduction and development*, 84(5), 423-435.
- Caridi, G., Lugani, F., Rigat, B., Van den Abeele, P., Layet, V., Gavard, M. S., Campagnoli, M., Galliano, M., & Minchiotti, L. (2019). A novel insertion (c. 1098dupT) in the albumin gene causes analbuminemia in a consanguineous family. *European journal of medical genetics*, 62(2), 144-148.

- Carrasco, L. C., Coy, P., Avilés, M., Gadea, J., & Romar, R. (2008). Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(7), 808-817.
- Carrasco, L. C., Romar, R., Avilés, M., Gadea, J., & Coy, P. (2008). Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction*, 136(6), 833-842.
- Del Carratore, F., Jankevics, A., Eisinga, R., Heskes, T., Hong, F., & Breitling, R. (2017). RankProd 2.0: a refactored bioconductor package for detecting differentially expressed features in molecular profiling datasets. *Bioinformatics*, 33(17), 2774-2775.
- Carroll, P. M., Richards, W. G., Darrow, A. L., Wells, J. M., & Strickland, S. (1993). Preimplantation mouse embryos express a cell surface receptor for tissue-plasminogen activator. *Development*, 119(1), 191–198.
- Castillo, J., Bogle, O. A., Jodar, M., Torabi, F., Delgado-Dueñas, D., Estanyol, J. M., ... & Oliva, R. (2019). Proteomic changes in human sperm during sequential in vitro capacitation and acrosome reaction. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 295.
- Cerny, K. L., Garrett, E., Walton, A. J., Anderson, L. H., & Bridges, P. J. (2015). A transcriptomal analysis of bovine oviductal epithelial cells collected during the follicular phase versus the luteal phase of the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 84.
- Cha, H. R., Ko, H. J., Kim, E. D., Chang, S. Y., Seo, S. U., Cuburu, N., ... & Kweon, M. N. (2011). Mucosa-associated epithelial chemokine/CCL28 expression in the uterus attracts CCR10+ IgA plasma cells following mucosal vaccination via estrogen control. *The Journal of Immunology*, 187(6), 3044-3052.
- Chang, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168(4277), 697.

- Chang, H., & Suarez, S. S. (2010). Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biology of reproduction*, 83(4), 507-513.
- Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Ruth, T. Y., Barish, G. D., Lam, M. T., ... & Evans, R. M. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- $\alpha$  and REV-ERB- $\beta$ . *Nature*, 485(7396), 123-127.
- Chow, W. N., Lee, Y. L., Wong, P. C., Chung, M. K., Lee, K. F., & Yeung, W. S. B. (2009). Complement 3 deficiency impairs early pregnancy in mice. *Molecular reproduction and development*, 76(7), 647-655.
- Coxon, A., Rieu, P., Barkalow, F. J., Askari, S., Sharpe, A. H., von Andrian, U. H., ... & Mayadas, T. N. (1996). A novel role for the  $\beta$ 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*, 5(6), 653-666.
- Coy, P., & Avilés, M. (2010). What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte?. *Biological Reviews*, 85(3), 593-605.
- Coy, P., Avilés, M., Latorre Reviriego, R. (2018). Fallopian Tube/Oviduct. In M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction*. vol. 2, pp. 276–281.
- Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M. D., Romar, R., Grullón, L., Matás, C., & Avilés, M. (2008). Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 105(41), 15809-15814.
- Coy, P., Garcia-Vázquez, F. A., Visconti, P. E., & Avilés, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, 144(6), 649-660.

- Coy, P., Grullon, L., Canovas, S., Romar, R., Matas, C., & Aviles, M. (2008). Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction*, *135*(1), 19.
- Cunha, G. R., Kurita, T., Cao, M., Shen, J., Robboy, S., & Baskin, L. (2017). Molecular mechanisms of development of the human fetal female reproductive tract. *Differentiation*, *97*, 54-72.
- Dacheux, J. L., Druart, X., Fouchecourt, S., Syntin, P., Gatti, J. L., Okamura, N., & Dacheux, F. (1998). Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY-SUPPLEMENT-*, 99-107.
- Daigneault, B. W., McNamara, K. A., Purdy, P. H., Krisher, R. L., Knox, R. V., Rodriguez-Zas, S. L., & Miller, D. J. (2015). Enhanced fertility prediction of cryopreserved boar spermatozoa using novel sperm function assessment. *Andrology*, *3*(3), 558-568.
- David, A., Brackett, B. G., Garcia, C. R., & Mastroianni, L. (1969). Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the Fallopian tube. *Reproduction*, *19*(2), 285-289.
- David, A., Vilensky, A., & Nathan, H. (1972). Temperature changes in the different parts of the rabbit's oviduct. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, *10*(2), 52-56.
- Davis, B. K., Byrne, R., & Bedigian, K. (1980). Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(3 I), 1546–1550. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1546>
- De Geyter, C., Gobrecht-Keller, U., Ahler, A., & Fischer, M. (2019). Removal of DNA-fragmented spermatozoa using flow cytometry and sorting does not improve the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *36*(10), 2079-2086.

- De Lamirande, E. V. E., & Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of andrology*, *13*(5), 368-378.
- De Lamirande, E. V. E., & Gagnon, C. (1993). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, *16*(1), 21-25.
- Demott, R. P. (1995). Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biology of Reproduction*, *52*(6), 1395–1403.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod52.6.1395>
- Denker, H. W. (2000). Structural dynamics and function of early embryonic coats. *Cells Tissues Organs*, *166*(2), 180-207.
- Denker, H. W., & Gerdes, H. J. (1979). The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. *Anatomy and embryology*, *157*(1), 15-34.
- Dickens, C. J., Comer, M. T., Southgate, J., & Leese, H. J. (1996). Human Fallopian tubal epithelial cells in vitro: establishment of polarity and potential role of intracellular calcium and extracellular ATP in fluid secretion. *Human reproduction*, *11*(1), 212-217.
- Dietzel, E., Wessling, J., Floehr, J., Schäfer, C., Ensslen, S., Denecke, B., Tropartz, T., Tolba, R., Renné, T., Egert, A., Schorle, H., Gottenbusch, Y., Hildebrand, A., Yiallourous, I., Stöcker, W., Weiskirchen, R., & Jahnen-Dechent, W. (2013). Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. *Developmental cell*, *25*(1), 106-112.
- Ding, Z. M., Babensee, J. E., Simon, S. I., Lu, H., Perrard, J. L., Bullard, D. C., ... & Ballantyne, C. M. (1999). Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *The Journal of Immunology*, *163*(9), 5029-5038.

- Dobrinski, I., Ignatz, G. G., Thomas, P. G., & Ball, B. A. (1996). Role of carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells in vitro. *American journal of veterinary research*, 57(11), 1635-1639.
- Dobrinski, I., Timothy Smith, T., Suarez, S. S., & Ball, B. A. (1997). Membrane Contact with Oviductal Epithelium Modulates the Intracellular Calcium Concentration of Equine Spermatozoa in Vitro<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 56(4), 861–869.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod56.4.861>
- Dominguez, E. M., Moreno-Irusta, A., Guidobaldi, H. A., Tribulo, H., & Giojalas, L. C. (2018). Improved bovine in vitro embryo production with sexed and unsexed sperm selected by chemotaxis. *Theriogenology*, 122, 1-8.
- Dostálová, Z., Calvete, J. J., Sanz, L., & Töpfer-Petersen, E. (1994). Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *BBA - General Subjects*, 1200(1), 48–54.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(94\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(94)90026-4)
- Drevet, J. R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Molecular and cellular endocrinology*, 250(1-2), 70-79.
- Edström, K. (2009). The porcine cervix.
- Edwards, R. G., Steptoe, P. C., & Purdy, J. M. (1970). Fertilization and cleavage in vitro of preovulator human oocytes. *Nature*, 227(5265), 1307-1309.
- Ehrenwald, E., Foote, R. H., & Parks, J. E. (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Molecular reproduction and development*, 25(2), 195-204.

- Ekhlesi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoлова, M., Petrunkina, A., & Töpfer-Petersen, E. (2005). Spermadhesin AQN1 Is a Candidate Receptor Molecule Involved in the Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in the Pig1. *Biology of Reproduction*, *73*(3), 536–545. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040824>
- Ekhlesi-Hundrieser, M., Sinowatz, F., De Wilke, I. G., Waberski, D., & Töpfer-Petersen, E. (2002). Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Molecular reproduction and development*, *61*(1), 32-41.
- Elis, S., Oseikria, M., Carvalho, A. V., Bertevello, P. S., Corbin, E., Teixeira-Gomes, A. P., ... & Uzbekova, S. (2017). Docosahexaenoic acid mechanisms of action on the bovine oocyte-cumulus complex. *Journal of ovarian research*, *10*(1), 1-14.
- Elliott, R. M. A., Lloyd, R. E., Fazeli, A., Sostaric, E., Georgiou, A. S., Satake, N., ... Holt, W. V. (2009). Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. *Reproduction*, *137*(2), 191–203. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0298>
- Ezzati, M., Djahanbakhch, O., Arian, S., & Carr, B. R. (2014). Tubal transport of gametes and embryos: a review of physiology and pathophysiology. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *31*(10), 1337-1347.
- Fabryova, K., & Simon, M. (2009). Function of the cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes. *Gen Physiol Biophys*, *28*(1), 1-7.
- Farini, V. L., Camaño, C. V., Ybarra, G., Viale, D. L., Vichera, G., Yakisich, J. S., & Radrizzani, M. (2016). Improvement of bovine semen quality by removal of membrane-damaged sperm cells with DNA aptamers and magnetic nanoparticles. *Journal of biotechnology*, *229*, 33-41.

- Fazeli, A., Affara, N. A., Hubank, M., & Holt, W. V. (2004). Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. *Biology of reproduction*, 71(1), 60-65.
- Fischer, B., & Bavister, B. D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Reproduction*, 99(2), 673-679.
- Foley, C. W., & Johnson, A. D. (Eds.). (1974). *The oviduct and its functions*. Academic Press Incorporated.
- Fontes, P. K., Castilho, A. C. D. S., Razza, E. M., Ereno, R. L., Satrapa, R. A., & Barros, C. M. (2014). Prostaglandin receptors (EP2 and EP4) and angiotensin receptor (AGTR2) mRNA expression increases in the oviducts of Nelore cows submitted to ovarian superstimulation. *Animal reproduction science*, 151(3-4), 112-118.
- Forde, N., Duffy, G. B., McGettigan, P. A., Browne, J. A., Mehta, J. P., Kelly, A. K., Mansouri-Attia N., Sandra O., Loftus, B. J., Crowe, M. A., Fair, T., Roche, J. F., Lonergan, P., Evans, A. C. (2012). Evidence for an early endometrial response to pregnancy in cattle: both dependent upon and independent of interferon tau. *Physiological Genomics*, 44(16), 799-810.
- Fry, R. C., Batt, P. A., Fairclough, R. J., & Parr, R. A. (1992). Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biology of reproduction*, 46(3), 470-474.
- Funahashi, H., & Romar, R. (2004). Reduction of the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes by pretreatment of fresh spermatozoa with adenosine and a transient co-incubation of the gametes with caffeine. *Reproduction*, 128(6), 789-800.
- Furimsky, A., Vuong, N., Xu, H., Kumarathanan, P., Xu, M., Weerachayanukul, W., ... & Tanphaichitr, N. (2005). Percoll gradient-centrifuged capacitated mouse sperm have increased fertilizing ability and higher contents of sulfogalactosylglycerolipid and

docosahexaenoic acid-containing phosphatidylcholine compared to washed capacitated mouse sperm. *Biology of reproduction*, 72(3), 574-583.

Fusi, F. M., Tamburini, C., Mangili, F., Montesano, M., Ferrari, A., & Bronson, R. A. (1996). The expression of alpha v, alpha 5, beta 1, and beta 3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. *Molecular Human Reproduction*, 2(3), 169–175. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9238676>

Gabler, C., Chapman, D. A., & Killian, G. J. (2003). Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction*, 126(6), 721–729. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260721>

Gadella, B. M., & Harrison, R. A. P. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of reproduction*, 67(1), 340-350.

García-Vázquez, F. A., Hernández-Caravaca, I., Yáñez-Quintana, W., Matás, C., Soriano-Úbeda, C., & Izquierdo-Rico, M. J. (2015). Morphometry of boar sperm head and flagellum in semen backflow after insemination. *Theriogenology*, 84(4), 566-574.

García-Vázquez, F. A., Soriano-Úbeda, C., Laguna-Barraza, R., Izquierdo-Rico, M. J., Navarrete, F. A., Visconti, P. E., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2019). Tissue plasminogen activator (tPA) of paternal origin is necessary for the success of in vitro but not of in vivo fertilisation in the mouse. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(3), 433–442. <https://doi.org/10.1071/RD18175>

García, M. L., Peiró, R., Argente, M. J., Merchán, M., Folch, J. M., Blasco, A., & Santacreu, M. A. (2010). Investigation of the oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) gene associated with

- embryo survival and development in the rabbit. *Journal of Animal Science*, 88(5), 1597–1602. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2042>
- Garcia-Garcia, R. M., Arias-Alvarez, M., Sanchez-Rodriguez, A., Lorenzo, P. L., & Rebollar, P. G. (2020). Role of nerve growth factor in the reproductive physiology of female rabbits: A review. *Theriogenology*.
- Gardela, J., Jauregi-Miguel, A., Martinez, C. A., Rodriguez-Martinez, H., Lopez-Bejar, M., & Alvarez-Rodriguez, M. (2020). Semen modulates the expression of NGF, ABHD2, VCAN, and CTEN in the reproductive tract of female rabbits. *Genes*, 11(7), 758.
- Gardner, D. K. (2007). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 9-18.
- Garner, D. L., & Hafez, E. S. E. (2000). Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in farm animals*, 96-109.
- Gawronska, B., Paukku, T., Huhtaniemi, I., Wasowicz, G., & Ziecik, A. J. (1999). Oestrogen-dependent expression of LH/hCG receptors in pig Fallopian tube and their role in relaxation of the oviduct. *Reproduction*, 115(2), 293-301.
- Georgiou, A. S., Sostaric, E., Wong, C. H., Snijders, A. P. L., Wright, P. C., Moore, H. D., & Fazeli, A. (2005). Gametes alter the oviductal secretory preteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4(11), 1785–1796. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500119-MCP200>
- Ghosh, A., Syed, S. M., & Tanwar, P. S. (2017). In vivo genetic cell lineage tracing reveals that oviductal secretory cells self-renew and give rise to ciliated cells. *Development*, 144(17), 3031-3041.

- Gil, M., Sar-Shalom, V., Sivira, Y. M., Carreras, R., & Checa, M. A. (2013). Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(4), 479-485.
- Gimeno-Martos, S., González-Arto, M., Casao, A., Gallego, M., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T., & Perez-Pe, R. (2017). Steroid hormone receptors and direct effects of steroid hormones on ram spermatozoa. *Reproduction*, 154(4), 469-481.
- Gipson, I. K., Blalock, T., Tisdale, A., Spurr-Michaud, S., Allcorn, S., Stavreus-Evers, A., & Gemzell, K. (2008). MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biology of reproduction*, 78(1), 134-142.
- Gonçalves, R. F., Wolinetz, C. D., & Killian, G. J. (2007). Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins ( $\alpha V$  and  $\alpha 5$ ) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 67(3), 468–474.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.013>
- Gonella-Diaza, A. M., da Silva Andrade, S. C., Sponchiado, M., Pugliesi, G., Mesquita, F. S., Van Hoeck, V., Strefezzi R. D., Gasparin, G. R., Coutinho, L. L. & Binelli, M. (2015). Size of the ovulatory follicle dictates spatial differences in the oviductal transcriptome in cattle. *PloS one*, 10(12), e0145321.
- Gonella-Diaza, A. M., Silveira Mesquita, F., Lopes, E., Ribeiro da Silva, K., Cogliati, B., De Francisco Strefezzi, R., & Binelli, M. (2018). Sex steroids drive the remodeling of oviductal extracellular matrix in cattle. *Biology of reproduction*, 99(3), 590-599.
- Gould, K. G. (1974). *Fertilization: A function of the oviduct*. Academic Press, New York.

- Green, C. E., Bredl, J., Holt, W. V., Watson, P. F., & Fazeli, A. (2001). Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *Reproduction*, 122(2), 305–315. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220305>
- Greenwald, G. S. (1958). Endocrine regulation of the secretion of mucin in the tubal epithelium of the rabbit. *The Anatomical Record*, 130(3), 477–495. <https://doi.org/10.1002/ar.1091300302>
- Grunewald, S., Paasch, U., & Glander, H. J. (2001). Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell and Tissue Banking*, 2(3), 127–133. <https://doi.org/10.1023/A:1020188913551>
- Hafez, E. S. (1972). Scanning electron microscopy of rabbit and monkey female reproductive tract epithelium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 30(2), 293–296.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (Eds.). (2013). *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons.
- Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., & He, Z. (2014, May). The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 29, pp. 66-75). Academic Press.
- Hale, B. J., Fernandez, R. F., Kim, S. Q., Diaz, V. D., Jackson, S. N., Liu, L., ... & Ellis, J. M. (2019). Acyl-CoA synthetase 6 enriches seminiferous tubules with the  $\omega$ -3 fatty acid docosahexaenoic acid and is required for male fertility in the mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 294(39), 14394-14405.
- Halbert, S. A., Tam, P. Y., & Blandau, R. J. (1976). Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. *Science*, 191(4231), 1052-1053.
- Hamner, C. E., & Fox, S. B. (1968). Effect of oestrogen and progesterone on physical properties of rabbit oviduct fluid. *Reproduction*, 16(1), 121-122.

- Hamner, C. E., & Williams, W. L. (1965). Composition of rabbit oviduct secretions. *Fertility and sterility*, 16(2), 170-176.
- Hankele, A. K., Bauersachs, S., & Ulbrich, S. E. (2018). Conjugated estrogens in the endometrium during the estrous cycle in pigs. *Reproductive biology*, 18(4), 336-343.
- Hao, Y., Mathialagan, N., Walters, E., Mao, J., Lai, L., Becker, D., Li W., Critser J., & Prather, R. S. (2006). Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biology of reproduction*, 75(5), 726-733.
- Hao, Y., Murphy, C. N., Spate, L., Wax, D., Zhong, Z., Samuel, M., ... & Prather, R. S. (2008). Osteopontin improves in vitro development of porcine embryos and decreases apoptosis. *Molecular reproduction and development*, 75(2), 291-298.
- Harper, M. J. K. (1961). The time of ovulation in the rabbit following the injection of luteinizing hormone. *Journal of Endocrinology*, 22(2), 147-152.
- Harrison, R. A., & Gadella, B. M. (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*, 63(2), 342-351.
- Hazeleger, W., Soede, N. M., & Kemp, B. (2005). The effect of feeding strategy during the pre-follicular phase on subsequent follicular development in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(2), 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.03.007>
- Helmond, F. a. (1987). Oestrus and Embryo Mortality in Multiparous Sows Using Transrectal. *Journal of Animal Science*.
- Hermoso, M., Barrera, N., Morales, B., Perez, S., & Villalon, M. (2001). Platelet activating factor increases ciliary activity in the hamster oviduct through epithelial production of prostaglandin E 2. *Pflügers Archiv*, 442(3), 336-345.

- Herrero, M., Lamirande, E. D., & Gagnon, C. (2003). Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Current pharmaceutical design*, 9(5), 419-425.
- Hecht, D., & Zick, Y. (1992). Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 188(2), 773-779.
- Herring, N., Lokale, M. N., Danson, E. J., Heaton, D. A., & Paterson, D. J. (2008). Neuropeptide Y reduces acetylcholine release and vagal bradycardia via a Y<sub>2</sub> receptor-mediated, protein kinase C-dependent pathway. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 44(3), 477-485.
- Hill-Eubanks, D. C., Gomez, M. F., Stevenson, A. S., & Nelson, M. T. (2003). NFAT regulation in smooth muscle. *Trends in cardiovascular medicine*, 13(2), 56-62.
- Hilliard, J., & Eaton Jr, L. W. (1971). Estradiol-17 $\beta$ , progesterone and 20 $\alpha$ -hydroxypregn-4-en-3-one in rabbit ovarian venous plasma. II. From mating through implantation. *Endocrinology*, 89(2), 522-527.
- Ho, H. C., & Suarez, S. S. (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of reproduction*, 68(5), 1590-1596.
- Ho, K., Wolff, C. A., & Suarez, S. S. (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(2), 345-350.
- Hoffman, K. L., Morales, R. I. R., & González-Mariscal, G. (2010). Relevance of mating-associated stimuli, ovulation, and the progesterone receptor for the post-coital inhibition of estrous behavior in the female rabbit. *Hormones and behavior*, 58(5), 747-753.

- Holt, W. V., & Fazeli, A. (2016). Sperm storage in the female reproductive tract. *Annual review of animal biosciences*, 4, 291-310.
- Holt, W. V., Hernandez, M., Warrell, L., & Satake, N. (2010). The long and the short of sperm selection in vitro and in vivo: swim-up techniques select for the longer and faster swimming mammalian sperm. *Journal of evolutionary biology*, 23(3), 598-608.
- Hoang, H. D., & Miller, M. A. (2017). Chemosensory and hyperoxia circuits in *C. elegans* males influence sperm navigational capacity. *PLoS biology*, 15(6), e2002047.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Huang, J. C., Arbab, F., Tumbusch, K. J., Goldsby, J. S., Matijevic-Aleksic, N., & Wu, K. K. (2002). Human fallopian tubes express prostacyclin (PGI) synthase and cyclooxygenases and synthesize abundant PGI. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(9), 4361-4368.
- Huang, J. C., Goldsby, J. S., Arbab, F., Melhem, Z., Aleksic, N., & Wu, K. K. (2004). Oviduct prostacyclin functions as a paracrine factor to augment the development of embryos. *Human Reproduction*, 19(12), 2907-2912.
- Huang, J. C., Wun, W. S., Goldsby, J. S., Wun, I. C., Falconi, S. M., & Wu, K. K. (2003). Prostacyclin enhances embryo hatching but not sperm motility. *Human Reproduction*, 18(12), 2582-2589.
- Hunter, R. H. F. (1991). Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Molecular Reproduction and Development*, 29(4), 385–391. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080290411>

- Hunter, R. H. F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews*, 87(1), 244–255. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x>
- Hunter, R. H. F., Coy, P., Gadea, J., & Rath, D. (2011). Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(3), 191-197.
- Hunter, R. H. F., & Léglise, P. C. (1971). Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus. *Journal of Reproduction and Fertility*, 24(2), 233–246. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0240233>
- Hunter, R. H. F., Nichol, R., & Crabtree, S. M. (1980). Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reproduction Nutrition Développement*, 20(6), 1869-1875
- Idris, N., & Carraway, K. L. (1999). Sialomucin complex (Muc4) expression in the rat female reproductive tract. *Biology of reproduction*, 61(6), 1431-1438.
- Ignotz, G. G., Cho, M. Y., & Suarez, S. S. (2007). Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biology of reproduction*, 77(6), 906-913.
- Inoue, N., Ikawa, M., Nakanishi, T., Matsumoto, M., Nomura, M., Seya, T., & Okabe, M. (2003). Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Molecular and cellular biology*, 23(7), 2614-2622.
- Itze-Mayrhofer, C., & Brem, G. (2020). Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: Female reproductive fluids. *Journal of Proteomics*, 103884.
- Jansen, R. P. S., & Bajpai, V. K. (1982). Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biology of reproduction*, 26(1), 155-168.

- Johnson, L. A., Flook, J. P., & Hawk, H. W. (1989). Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction*, 41(2), 199-203.
- Johnson, L. A. (1991). Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X-and Y-bearing sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 26(6), 309-314.
- Juárez-Mosqueda, M. L., Anzaldúa Arce, S. R., Palma Lara, I., García Dalman, C., Cornejo Cortes, M. A., Cordova Izquierdo, A., Villaseñor Caona, H. & Trujillo Ortega, M. E. (2015). Oestrus synchronization treatment induces histomorphological changes on the uterine tube epithelium of the gilt. *Anatomia, histologia, embryologia*, 44(6), 441-451.
- Kadirvel, G., Machado, S. A., Korneli, C., Collins, E., Miller, P., Bess, K. N., Aoki, K., Tiemeyer, M., Bovin, N., & Miller, D. J. (2012). Porcine Sperm Bind to Specific 6-Sialylated Biantennary Glycans to Form the Oviduct Reservoir<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 87(6), 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.103879>
- Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V. C., Borràs, F. E., Breakfield, X., Budnik, V., & Buzas, E. (2012). Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS biology*, 10(12), e1001450.
- Kane, M. T. (1987). Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biology of reproduction*, 37(4), 775-778.
- Kao, L. C., Tulac, S., Lobo, S. A., Imani, B., Yang, J. P., Germeyer, A., ... & Giudice, L. C. (2002). Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 143(6), 2119-2138.

- Karmilin, K., Schmitz, C., Kuske, M., Körschgen, H., Olf, M., Meyer, K., Hildebrand, A., Felten, M., Fridrich, S., Yiallourous, I., Becker-Pauly, C., Weiskirchen, R., Jahnen-Dechent, W., Floehr, J., & Stöcker, W. (2019). Mammalian plasma fetuin-B is a selective inhibitor of ovastacin and meprin metalloproteinases. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Keane, F. M., Nadvi, N. A., Yao, T. W., & Gorrell, M. D. (2011). Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein- $\alpha$ . *The FEBS journal*, 278(8), 1316-1332.
- Kerns, K., Zigo, M., Drobnis, E. Z., Sutovsky, M., & Sutovsky, P. (2018). Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nature Communications*, 9(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04523-y>
- Khawar, M. B., Gao, H., & Li, W. (2019). Mechanism of acrosome biogenesis in mammals. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 195.
- Kitaji, H., Ookutsu, S., Sato, M., & Miyoshi, K. (2015). A new rolling culture-based in vitro fertilization system capable of reducing polyspermy in porcine oocytes. *Animal Science Journal*, 86(5), 494-498.
- Knox, R. V. (2005). Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(2), 385–397.  
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.025>
- Knox, R. V., Vatzias, G., Naber, C. H., & Zimmerman, D. R. (2003). Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts. *Journal of Animal Science*, 81(1), 249–260.
- Kobayashi, Y., Wakamiya, K., Kohka, M., Yamamoto, Y., & Okuda, K. (2013). Summer heat stress affects prostaglandin synthesis in the bovine oviduct. *Reproduction*, 146(2), 103-110.

- Kölle, S., Dubielzig, S., Reese, S., Wehrend, A., König, P., & Kummer, W. (2009). Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biology of reproduction*, 81(2), 267-274.
- Kong, N., Xu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Hao, X., Zhao, Y., ... & Zhang, M. (2017). Natriuretic peptide type C induces sperm attraction for fertilization in mouse. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(8), 3199-3207.
- Koppers, A. J., Mitchell, L. A., Wang, P., Lin, M., & Aitken, R. J. (2011). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochemical Journal*, 436(3), 687–698. <https://doi.org/10.1042/BJ20110114>
- Kõressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R. y Remm, M. (2018). "Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software". *Bioinformatics*, 34, pp. 1937–1938.
- Kouba, A. J., Alvarez, I. M., & Buhi, W. C. (2000). Identification and Localization of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Within the Porcine Oviduct1. *Biology of Reproduction*, 62(3), 501–510. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.3.501>
- Lachance, C., Bailey, J. L., & Leclerc, P. (2007). Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Human Reproduction*, 22(10), 2606–2614. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem242>

- Langlais, J., Zollinger, M., Plante, L., Chapdelaine, A., Bleau, G., & Roberts, K. D. (1981). Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12 II), 7266–7270.
- Lamy, J., Corbin, E., Blache, M. C., Garanina, A. S., Uzbekov, R., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2017). Steroid hormones regulate sperm–oviduct interactions in the bovine. *Reproduction*, 154(4), 497-508.
- Lamy, J., Labas, V., Harichaux, G., Tsikis, G., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2016). Regulation of the bovine oviductal fluid proteome. *Reproduction*, 152(6), 629–644. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0397>
- Lamy, J., Liere, P., Pianos, A., Aprahamian, F., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2016). Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology*, 86(6), 1409-1420.
- Lamy, J., Nogues, P., Combes-Soia, L., Tsikis, G., Labas, V., Mermillod, P., ... & Saint-Dizier, M. (2018). Identification by proteomics of oviductal sperm-interacting proteins. *Reproduction*, 155(5), 457-466.
- Lee, Y. L., Cheong, A. W., Chow, W. N., Lee, K. F., & Yeung, W. S. (2009). Regulation of complement-3 protein expression in human and mouse oviducts. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 76(3), 301-308.
- Lee, D. L., Kim, S. H., Kim, E., Chun, S. Y., & Kim, T. S. (2009). Interferon- $\alpha$  is involved in the luteinizing hormone-induced differentiation of rat preovulatory granulosa cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(12), 801-808.
- Leese, H. J. (1980). The stimulation of pyruvate appearance in the rabbit oviduct lumen by sodium propionate. *Reproduction*, 59(2), 421-424

- Leese, H. J. (1988). The formation and function of oviduct fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82(2), 843–856. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820843>
- Leese, H. J., & Barton, A. M. (1985). Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *Journal of Experimental Zoology*, 234(2), 231-236.
- Lei, Z. M., Toth, P., Rao, C. V., & Pridham, D. (1993). Novel coexpression of human chorionic gonadotropin (hCG)/human luteinizing hormone receptors and their ligand hCG in human fallopian tubes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 77(3), 863-872.
- Lessley, B. A., & Garner, D. L. (1983). Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll®. *Gamete Research*, 7(1), 49-61.
- Li, K., Li, R., Ni, Y., Sun, P., Liu, Y., Zhang, D., & Huang, H. (2018). Novel distance-progesterone-combined selection approach improves human sperm quality. *Journal of translational medicine*, 16(1), 203.
- Li, S., & Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: Roles in fertilization and early embryo development. *Journal of Endocrinology*, 232(1), R1–R26. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0302>
- Liaw, L., Birk, D. E., Ballas, C. B., Whitsitt, J. S., Davidson, J. M., & Hogan, B. L. (1998). Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *The Journal of clinical investigation*, 101(7), 1468-1478.
- Lindblom, B., Hamberger, L., & Wiquist, N. (1978). Differentiated contractile effects of prostaglandins E and F on the isolated circular and longitudinal smooth muscle of the human oviduct. *Fertility and sterility*, 30(5), 553-559.
- Lindblom, B., & Hamberger, L. (1980). Cyclic AMP and contractility of the human oviduct. *Biology of reproduction*, 22(2), 173-178.

- Liu, Q., Xie, Q. Z., Zhou, Y., & Yang, J. (2015). Osteopontin is expressed in the oviduct and promotes fertilization and preimplantation embryo development of mouse. *Zygote*, 23(4), 622-630.
- López-Úbeda, R., García-Vázquez, F. A., Gadea, J., & Matás, C. (2017). Oviductal epithelial cells selected boar sperm according to their functional characteristics. *Asian journal of andrology*, 19(4), 396.
- López-Úbeda, R., García-Vázquez, F. A., Romar, R., Gadea, J., Muñoz, M., Hunter, R. H., & Coy, P. (2015). Oviductal transcriptome is modified after insemination during spontaneous ovulation in the sow. *PLoS One*, 10(6), e0130128.
- Lorenzen, E., Follmann, F., Jungersen, G., & Agerholm, J. S. (2015). A review of the human vs. porcine female genital tract and associated immune system in the perspective of using minipigs as a model of human genital Chlamydia infection. *Veterinary research*, 46(1), 116.
- Lucas, E. S., Dyer, N. P., Murakami, K., Hou Lee, Y., Chan, Y. W., Grimaldi, G., ... & Brosens, J. J. (2016). Loss of endometrial plasticity in recurrent pregnancy loss. *Stem cells*, 34(2), 346-356.
- Lucy, M. C., Liu, J., Boyd, C. K., & Bracken, C. J. (2001). Ovarian follicular growth in sows. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 58, 31-45.
- Luño, V., Lopez-Ubeda, R., Garcia-Vázquez, F. A., Gil, L., & Matás, C. (2013). Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: in vitro, ex vivo, and in vivo models. *Reproduction*, 146(4), 315-324.
- Maas, D. H., Storey, B. T., & Mastroianni Jr, L. (1977). Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertility and sterility*, 28(9), 981-985.

- Machado, S. A., Sharif, M., Wang, H., Bovin, N., & Miller, D. J. (2019). Release of porcine Sperm from oviduct cells is Stimulated by progesterone and Requires catSper. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
- Maňásková, P., Pěknicová, J., Elzeinova, F., Ticha, M., & Jonakova, V. (2007). Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *Journal of reproductive immunology*, 74(1-2), 103-113.
- Marco-Jiménez, F., & López-Bejar, M. (2013). Detection of glycosylated proteins in rabbit oviductal isthmus and uterine endometrium during early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6), 967-973.
- Maillo, V., de Frutos, C., O'Gaora, P., Forde, N., Burns, G. W., Spencer, T. E., ... & Rizos, D. (2016). Spatial differences in gene expression in the bovine oviduct. *Reproduction*, 152(1), 37-46.
- Maillo, V., Gaora, P. Ó., Forde, N., Besenfelder, U., Havlicek, V., Burns, G. W., ... & Rizos, D. (2015). Oviduct-embryo interactions in cattle: two-way traffic or a one-way street?. *Biology of Reproduction*, 92(6), 144-1.
- Maillo, V., Sánchez-Calabuig, M. J., Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Gutierrez-Adan, A., Lonergan, P., & Rizos, D. (2016). Oviductal response to gametes and early embryos in mammals. *Reproduction*, 152(4), R127-R141.
- Marey, M. A., Liu, J., Kowsar, R., Haneda, S., Matsui, M., Sasaki, M., Shimizu, T., Hayakawa, H., Wijayagunawardane, P. B., & Miyamoto, A. (2014). Bovine oviduct epithelial cells downregulate phagocytosis of sperm by neutrophils: prostaglandin E2 as a major physiological regulator. *Reproduction*, 147(2), 211-219.

- Marey, M. A., Yousef, M. S., Kowsar, R., Hambruch, N., Shimizu, T., Pfarrer, C., & Miyamoto, A. (2016). Local immune system in oviduct physiology and pathophysiology: attack or tolerance?. *Domestic animal endocrinology*, *56*, S204-S211.
- Mariani, M. L., Souto, M., Fanelli, M. A., & Ciocca, D. R. (2000). Constitutive expression of heat shock proteins hsp25 and hsp70 in the rat oviduct during neonatal development, the oestrous cycle and early pregnancy. *Journal of reproduction and fertility*, *120*(2), 217-223.
- Marín-Briggiler, C. I., González-Echeverría, M. F., Munuce, M. J., Ghersevich, S., Caille, A. M., Hellman, U., Corrigan, V. M., & Vazquez-Levin, M. H. (2010). Glucose-regulated protein 78 (Grp78/BiP) is secreted by human oviduct epithelial cells and the recombinant protein modulates sperm–zona pellucida binding. *Fertility and sterility*, *93*(5), 1574-1584.
- Martinez, E. A., Vazquez, J. M., Roca, J., Lucas, X., Gil, M. A., Parrilla, I., Vazquez, J. L., & Day, B. N. (2001). Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, *122*(2), 289-296.
- Martyniak, M., Zglejc-Waszak, K., Franczak, A., & Kotwica, G. (2018). Transcriptomic analysis of the oviduct of pigs during the peri-conceptual period. *Animal reproduction science*, *197*, 278-289.
- Matamoros-Volante, A., Moreno-Irusta, A., Torres-Rodriguez, P., Giojalas, L., Gervasi, M. G., Visconti, P. E., & Treviño, C. L. (2018). Semi-automatized segmentation method using image-based flow cytometry to study sperm physiology: the case of capacitation-induced tyrosine phosphorylation. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, *24*(2), 64-73.
- McCauley, T. C., Buhi, W. C., Wu, G. M., Mao, J., Caamano, J. N., Didion, B. A., & Day, B. N. (2003). Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, *69*(3), 828-834.

- McComb, P., & Gomel, V. (1979). The influence of fallopian tube length on fertility in the rabbit. *Fertility and sterility*, 31(6), 673-676.
- Meers, P., Daleke, D., Hong, K., & Papahadjopoulos, D. (1991). Interactions of annexins with membrane phospholipids. *Biochemistry*, 30(11), 2903-2908.
- Menezo, Y., & Guerin, P. (1997). The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology*, 73(1), 99-104.
- Merchán, M., Peiró, R., Argente, M. J., Santacreu, M. A., García, M. L., Blasco, A., & Folch, J. M. (2009). Effects of the rabbit oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) gene on components of litter size. *Anim. Genet*, 40(5), 756-758.
- Miller, D. J. (2018). The epic journey of sperm through the female reproductive tract. *animal*, 12(s1), s110-s120.
- Minth, C. D., Bloom, S. R., Polak, J. M., & Dixon, J. E. (1984). Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(14), 4577-4581.
- Mitchell, M. H., Swanson, R. J., Hodgen, G. D., & Oehninger, S. (1994). Enhancement of in vitro murine embryo development by recombinant leukemia inhibitory factor. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI*, 1(3), 215-219.
- Mitsui, Y., Shiina, H., Kato, T., Maekawa, S., Hashimoto, Y., Shiina, M., ... & Tanaka, Y. (2017). Versican promotes tumor progression, metastasis and predicts poor prognosis in renal carcinoma. *Molecular Cancer Research*, 15(7), 884-895.

- Miyazaki, Y., Horie, A., Tani, H., Ueda, M., Okunomiya, A., Suginami, K., ... & Sato, Y. (2019). Versican V1 in human endometrial epithelial cells promotes BeWo spheroid adhesion in vitro. *Reproduction*, *157*(1), 53-64.
- Moein-Vaziri, N., Phillips, I., Smith, S., Alminana, C., Maside, C., Gil, M. A., Roca, J., Martínez, E. A., Holt, W. V., Pockley A. G., & Fazeli, A. (2014). Heat-shock protein A8 restores sperm membrane integrity by increasing plasma membrane fluidity. *Reproduction*, *147*(5), 719-732.
- Monaco, E., Gasparrini, B., Boccia, L., De Rosa, A., Attanasio, L., Zicarelli, L., & Killian, G. (2009). Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology*, *71*(3), 450-457.
- Mondéjar, I., Acuña, O. S., Izquierdo-Rico, M. J., Coy, P., & Avilés, M. (2012). The oviduct: functional genomic and proteomic approach. *Reproduction in domestic animals*, *47*, 22-29.
- Montreal, E. V. E. F., Quebec, L. U., Royal, G., & Hospital, V. (1992). and on Sperm. *Society*, 368–378. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00736>
- Moore, K., & Bondioli, K. R. (1993). Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of in vitro matured and fertilized cattle embryos. *Biology of reproduction*, *48*(4), 833-840.
- Mori, E., Yoshitani, N., Mori, T., & Takasaki, S. (2000). Calcium ion-independent recognition of sialyl and nonsialyl N- acetyllactosamine and Le(x) structures by boar sperm. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *374*(1), 86–92. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1642>
- Moros-Nicolás, C., Fouchécourt, S., Goudet, G., & Monget, P. (2018). Genes Encoding Mammalian Oviductal Proteins Involved in Fertilization are Subjected to Gene Death and Positive Selection. *Journal of molecular evolution*, *86*(9), 655-667.

- Mugnier, S., Kervella, M., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Deleuze, S., ... & Goudet, G. (2009). The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved?. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 1-16.
- Mukherjee, A. B., & Cohen, M. M. (1970). Development of normal mice by in vitro fertilization. *Nature*, 228(5270), 472-473.
- Murakami, H., & Imai, H. (1996). Successful implantation of in vitro cultured rabbit embryos after uterine transfer: a role for mucin. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 43(2), 167-170.
- Musset, B., Clark, R. A., DeCoursey, T. E., Petheo, G. L., Geiszt, M., Chen, Y., Cornell J. E., Carlton A. E., Brzyski R. G., & El Jamali, A. (2012). NOX5 in human spermatozoa: Expression, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 9376–9388. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314955>
- Nagase, S., Shimamune, K., & Shumiya, S. (1979). Albumin-deficient rat mutant. *Science*, 205(4406), 590-591.
- Nakamura, H., Kimura, T., Koyama, S., Ogita, K., Tsutsui, T., Shimoya, K., ... & Murata, Y. (2006). Mouse model of human infertility: transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation results in implantation failure. *FEBS letters*, 580(11), 2717-2722.
- Nakaso, E. (1954). Study on the movements of the rabbit's fallopian tube by means of the abdominal-window method and the cinematograph. *Journal of the Japanese Obstetrical & Gynecological Society*, 1(2), 210–211.
- Nelis, H., Bussche, J. V., Wojciechowicz, B., Franczak, A., Vanhaecke, L., Leemans, B., ... & Smits, K. (2016). Steroids in the equine oviduct: synthesis, local concentrations and receptor expression. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(9), 1390-1404.

- Nilsson, O. (1958). Electron microscopy of the Fallopian tube epithelium of rabbits in oestrus. *Experimental Cell Research*, 14(2), 341–354. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(58\)90192-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(58)90192-7)
- Nilsson, O., & Rutberg, U. (1960). Ultrastructure of secretory granules in post-ovulatory rabbit oviduct. *Experimental Cell Research*, 21(3), 622–625. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90298-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90298-6)
- Nixon, B., De Iuliis, G. N., Hart, H. M., Zhou, W., Mathe, A., Bernstein, I. R., Anderson, A. L., Stanger, S. J., Skerrett-Byrne, D. A., Jamaluddin, M. F. B., Almazi, J. G., Bromfield, E. G., Larsen, M. R., & Dun, M. D. (2019). Proteomic profiling of mouse epididymosomes reveals their contributions to post-testicular sperm maturation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(Supplement 1), S91-S108.
- Noguchi, M., Yoshioka, K., Itoh, S., Suzuki, C., Arai, S., Wada, Y., Hasegawa, Y., & Kaneko, H. (2010). Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow. *Reproduction*, 139(1), 153–161. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0018>
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2006). Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(6), 1045-1055.
- Odhiambo, J. F., DeJarnette, J. M., Geary, T. W., Kennedy, C. E., Suarez, S. S., Sutovsky, M., & Sutovsky, P. (2014). Increased Conception Rates in Beef Cattle Inseminated with Nanopurified Bull Semen<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 91(4), 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121897>

- Oliphant, G., Bowling, A., Eng, L. A., Keen, S., & Randall, P. A. (1978). The permeability of rabbit oviduct to proteins present in the serum. *Biology of reproduction*, 18(3), 516-520.
- Ono, S., Egawa, G., & Kabashima, K. (2017). Regulation of blood vascular permeability in the skin. *Inflammation and regeneration*, 37(1), 1-8.
- Ortega-Moreno, J., & Caballero-Gómez, J. M. (1994). Passage pressure across the uterotubal junction during the 4 phases of the oestrous cycle in the rat. *Laboratory animals*, 28(4), 364-368.
- Osycka-Salut, C. E., Castellano, L., Fornes, D., Beltrame, J. S., Alonso, C. A., Jawerbaum, A., ... & Perez Martinez, S. (2017). Fibronectin from oviductal cells fluctuates during the estrous cycle and contributes to sperm–oviduct interaction in cattle. *Journal of cellular biochemistry*, 118(11), 4095-4108.
- Ostermeier, G. C., Cardona, C., Moody, M. A., Simpson, A. J., Mendoza, R., Seaman, E., & Travis, A. J. (2018). Timing of sperm capacitation varies reproducibly among men. *Molecular reproduction and development*, 85(5), 387-396.
- Overstreet, J. W., & Cooper, G. W. (1978). Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: I. The rapid transit phase of transport. *Biology of Reproduction*, 19(1), 101-114.
- Overstreet, J. W., Cooper, G. W., & Katz, D. F. (1978). Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: II. The sustained phase of transport. *Biology of Reproduction*, 19(1), 115-132.
- Owman, C., & Sjöberg, N. O. (1966). Adrenergic nerves in the female genital tract of the rabbit. With remarks on cholinesterase-containing structures. *Cell and Tissue Research*, 74(2), 182-197.

- Pacheco, A., Blanco, A., Bronet, F., Cruz, M., García-Fernández, J., & García-Velasco, J. A. (2020). Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS): A Useful Sperm-Selection Technique in Cases of High Levels of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), 3976.
- Papaioannou, V. E., & Ebert, K. M. (1986). Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. *Reproduction*, 76(2), 603-608.
- Parada-Bustamante, A., Orihuela, P. A., Ríos, M., Navarrete-Gómez, P. A., Cuevas, C. A., Velasquez, L. A., ... & Croxatto, H. B. (2007). Catechol-o-methyltransferase and methoxyestradiols participate in the intraoviductal nongenomic pathway through which estradiol accelerates egg transport in cycling rats. *Biology of Reproduction*, 77(6), 934-941.
- Pedrero-Badillo, F., Anaya-Hernández, A., Corona-Quintanilla, D. L., Castelán, F., Pacheco, P., Martínez-Gómez, M., & Cuevas, E. (2013). Morphohistological characteristics of rabbit oviduct: A proposal for a single regionalization. *Animal reproduction science*, 143(1-4), 102-111.
- Pérez-Cerezales, S., Ramos-Ibeas, P., Acuna, O. S., Avilés, M., Coy, P., Rizos, D., & Gutiérrez-Adán, A. (2018). The oviduct: From sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo. *Biology of Reproduction*, 98(3), 262–276. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox173>
- Pertoft, H. (2000). Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 44(1-2), 1-30.
- Petelak, A., & Krylov, V. (2019). Surface sperm cell ubiquitination directly impaired blastocyst formation rate after intracytoplasmic sperm injection in pig. *Theriogenology*, 135, 115-120.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

- Piccinni, M. P., Scaletti, C., Mavilia, C., Lazzeri, E., Romagnani, P., Natali, I., ... & Maggi, E. (2001). Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development. *European journal of immunology*, 31(8), 2431-2437.
- Pillai, V. V., Weber, D. M., Phinney, B. S., & Selvaraj, V. (2017). Profiling of proteins secreted in the bovine oviduct reveals diverse functions of this luminal microenvironment. *PLoS ONE*, 12(11), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188105>
- Pinto-Bravo, P., Galvão, A., Rebordão, M. R., Amaral, A., Ramilo, D., Silva, E., ... & Ferreira-Dias, G. (2017). Ovarian steroids, oxytocin, and tumor necrosis factor modulate equine oviduct function. *Domestic animal endocrinology*, 61, 84-99.
- Pursel, V. G., & Johnson, L. A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of animal science*, 40(1), 99-102.
- Quesenberry, K., & Carpenter, J. W. (2011). *LIC-Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery*. Elsevier Health Sciences.
- Quill, T. A., Sugden, S. A., Rossi, K. L., Doolittle, L. K., Hammer, R. E., & Garbers, D. L. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14869-14874.
- Quinn, P., Kerin, J. F., & Warnes, G. M. (1985). Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid\*\*Supported in part by a grant from the National Health and Medical Research Council of Australia. *Fertility and Sterility*, 44(4), 493–498. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)48918-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48918-1)

- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-383.
- Rath, D., Long, C. R., Dobrinsky, J. R., Welch, G. R., Schreier, L. L., & Johnson, L. A. (1999). In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. The online version of this article, along with updated information and services, is located on the WoS. *Journal of Animal Science*, (June), 3346–3352.
- Rath, D., Tiedemann, D., Gamrad, L., Johnson, L. A., Klein, S., Kues, W., Mancini, R., Rehbock, C., Taylor, UI, & Barcikowski, S. (2015). Sex-Sorted Boar Sperm—An Update on Related Production Methods. *Reproduction in domestic animals*, 50, 56-60.
- Ramal-Sanchez, M., Bernabo, N., Tsikis, G., Blache, M. C., Labas, V., Druart, X., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2020). Progesterone induces sperm release from oviductal epithelial cells by modifying sperm proteomics, lipidomics and membrane fluidity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 110723.
- Reinecke, M., Gauwerky, J. F., & Schneider, K. (1989). Peptidergic (NPY, NT, VIP, SP, CGRP) innervation of the functional systems of the uterus and fallopian tube in the human. *Archives of gynecology and obstetrics*, 245(1-4), 399-401.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L., & Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603-609.
- Renner, M., Bergmann, G., Krebs, I., End, C., Lyer, S., Hilberg, F., ... & Strobel–Freidekind, O. (2007). DMBT1 confers mucosal protection in vivo and a deletion variant is associated with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 133(5), 1499-1509.

- Reynaud, K., Saint-Dizier, M., Tahir, M. Z., Havard, T., Harichaux, G., Labas, V., Thoumire, S., Fontbonne, A., Bénédicte, G., & Chastant-Maillard, S. (2015). Progesterone plays a critical role in canine oocyte maturation and fertilization. *Biology of reproduction*, *93*(4), 87-1.
- Richardson, L. L., & Oliphant, G. (1981). Steroid concentrations in rabbit oviducal fluid during oestrus and pseudopregnancy. *Reproduction*, *62*(2), 427-431.
- Rickard, J. P., Pool, K. R., Druart, X., & de Graaf, S. P. (2019). The fate of spermatozoa in the female reproductive tract: A comparative review. *Theriogenology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.044>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D. I., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research*, *43*(7), e47-e47.
- Rittling, S. R., Matsumoto, H. N., Mckee, M. D., Nanci, A., An, X. R., Novick, K. E., Kowalski, A. J., Noda, M., & Denhardt, D. T. (1998). Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, *13*(7), 1101-1111.
- Rival, C. M., Xu, W., Shankman, L. S., Morioka, S., Arandjelovic, S., Lee, C. S., ... & Ravichandran, K. S. (2019). Phosphatidylserine on viable sperm and phagocytic machinery in oocytes regulate mammalian fertilization. *Nature communications*, *10*(1), 1-13.
- Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N., & Breitbart, H. (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction*, *70*(2), 518-522.

- Rizos, D., Ramirez, M. A., Pintado, B., Lonergan, P., & Gutierrez-Adan, A. (2010). Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology*, *73*(6), 777-785.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P. A. T., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular reproduction and development*, *61*(2), 234-248.
- Roberts, K. D. (1987). Sterol sulfates in the epididymis; synthesis and possible function in the reproductive process. *Journal of Steroid Biochemistry*, *27*(1-3), 337-341.  
[https://doi.org/10.1016/0022-4731\(87\)90325-6](https://doi.org/10.1016/0022-4731(87)90325-6)
- Roberts, P. J., & Der, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, *26*(22), 3291-3310.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>
- Roblero, L. S., & Riffo, M. D. (1986). High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos in vitro. *Fertility and sterility*, *45*(3), 412-416.
- Rodriguez, P. C., & Beconi, M. T. (2009). Peroxynitrite participates in mechanisms involved in capacitation of cryopreserved cattle. *Animal reproduction science*, *110*(1-2), 96-107.
- Rodríguez-Alonso, B., Maillo, V., Acuña, O. S., López-Úbeda, R., Torrecillas, A., Simintiras, C. A., ... & Rizos, D. (2020). Spatial and Pregnancy-Related Changes in the Protein, Amino Acid, and Carbohydrate Composition of Bovine Oviduct Fluid. *International journal of molecular sciences*, *21*(5), 1681.
- Rodriguez-Martinez, H., Petroni, A., Einarsson, S., & Kindahl, H. (1983). Concentrations of prostaglandin F<sub>2α</sub> in the pig oviductal fluid. *Prostaglandins*, *25*(3), 413-424.

- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Martínez, E. A., Sanz, L., Roca, J., Vázquez, J. M. & Calvete, J. J. (2010). Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. *Journal of reproductive immunology*, 84(1), 57-65.
- Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vázquez, J. M., Calvete, J. J. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, 63(2 SPEC. ISS.), 514–535. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.028>
- Roldán, M. L., Teijeiro, J. M., Ruiz Álvarez, J., & Marini, P. E. (2018). Sperm binding to porcine oviductal cells is mediated by SRCR domains contained in DMBT1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(4), 3755–3762. <https://doi.org/10.1002/jcb.26614>
- Romar, R., Cánovas, S., Matás, C., Gadea, J., & Coy, P. (2019). Pig in vitro fertilization: Where are we and where do we go? *Theriogenology*, (xxxx). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.045>
- Romar, R., Funahashi, H., & Coy, P. (2016). In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology*, 85(1), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.017>
- Romero-Aguirregomezcorta, J., Cronin, S., Donnellan, E., & Fair, S. (2019). Progesterone induces the release of bull spermatozoa from oviductal epithelial cells. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(9), 1463-1472.
- Roopenian, D. C., Low, B. E., Christianson, G. J., Proetzel, G., Sproule, T. J., & Wiles, M. V. (2015, March). Albumin-deficient mouse models for studying metabolism of human albumin and pharmacokinetics of albumin-based drugs. In *MAbs* (Vol. 7, No. 2, pp. 344-351). Taylor & Francis.

- Ruiz Estrada, J. (2018). Reconstrucción de un modelo de epitelio oviductal para el soporte del desarrollo embrionario. Grado en Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sachdev, M., Mandal, A., Mulders, S., Digilio, L. C., Panneerdoss, S., Suryavathi, V., Pires, E., Klotz, K. L., Hermens, L., Herrero, M. B., Flickinger, C. J., van Duin, M., & Flickinger, C. J. (2012). Oocyte specific oolemmal SAS1B involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilization. *Developmental biology*, 363(1), 40-51.
- Saint-Dizier, M., Schoen, J., Chen, S., Banliat, C., & Mermillod, P. (2020). Composing the Early Embryonic Microenvironment: Physiology and Regulation of Oviductal Secretions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 223.
- Salzano, A., De Canditiis, C., Della Ragione, F., Prandi, A., Zullo, G., Neglia, G., Campanile, G., & Gasparrini, B. (2018). Evaluation of factors involved in the failure of ovum capture in superovulated buffaloes. *Theriogenology*, 122, 102-108.
- San Martin, S., Soto-Suazo, M., & Zorn, T. M. T. (2004). Perlecan and syndecan-4 in uterine tissues during the early pregnancy in mice. *American Journal of Reproductive Immunology*, 52(1), 53-59.
- Sarelius, I. H., & Glading, A. J. (2015). Control of vascular permeability by adhesion molecules. *Tissue barriers*, 3(1-2), e985954.
- Schlegel, W., & Meyer, J. (1986). Seminal prostaglandins in men with subnormal sperm motility and therapeutic treatment. *Prostaglandins*, 31(4), 735-744.
- Schmaltz-Panneau, B., Cordova, A., Dhorne-Pollet, S., Hennequet-Antier, C., Uzbekova, S., Martinot, E., Doret, S., Martin, P., Mermillod, P., & Locatelli, Y. (2014). Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during in vitro co-culture. *Animal reproduction science*, 149(3-4), 103-116.

- Schroeder, A. C., Schultz, R. M., Kopf, G. S., Taylor, F. R., Becker, R. B., & Eppig, J. J. (1990). Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP3 during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum. *Biology of reproduction*, *43*(5), 891-897.
- Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., & Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*, *344*(6188), 1164-1168.
- Shadan, S., James, P. S., Howes, E. A., & Jones, R. (2004). Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biology of reproduction*, *71*(1), 253-265.
- Sharif, M., Kerns, K., Sutovsky, P., Bovin, N., & Miller, D. J. (2021). Progesterone Induces Porcine Sperm Release from Oviduct Glycans in a Proteasome-Dependent Manner. *Reproduction*, *1*(aop).
- Shibuya, N., Goldstein, I. J., Broekaert, W. F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B., & Peumans, W. J. (1987). Fractionation of sialylated oligosaccharides, glycopeptides, and glycoproteins on immobilized elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin. *Archives of biochemistry and biophysics*, *254*(1), 1-8.
- Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., Tang, W. H., Keating, S. P., ... & Schaeffer, D. A. (2007). The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Molecular & Cellular Proteomics*, *6*(9), 1638-1655.
- Smith, J. F., Syritsyna, O., Fellousc, M., Serres, C., Mannowetz, N., Kirichok, Y., & Lishko, P. V. (2013). Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca<sup>2+</sup> channel in a CatSper2-deficient infertile patient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

*the United States of America*, 110(17), 6823–6828.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1216588110>

Smits, K., De Coninck, D. I., Van Nieuwerburgh, F., Govaere, J., Van Poucke, M., Peelman, L., Deforce, D. & Van Soom, A. (2016). The equine embryo influences immune-related gene expression in the oviduct. *Biology of reproduction*, 94(2), 36-1.

Smits, K., Nelis, H., Van Steendam, K., Govaere, J., Roels, K., Ververs, C., Leemans, B., Wydooghe, E., Deforce, D., & Van Soom, A. (2017). Proteome of equine oviducal fluid: Effects of ovulation and pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(6), 1085–1095. <https://doi.org/10.1071/RD15481>

Smith, L., & Walker, W. H. (2015). Gamete and zygote transport. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 1, 637-690.

Soede, N. M., Hazeleger, W., & Kemp, B. (1998). Follicle size and the process of ovulation in Sows as studied with ultrasound. *Reproduction in Domestic Animals*, 33,

Soede, N. M., Helmond, F. A., & Kemp, B. (1994). Perioovulatory profiles of oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. *Reproduction*, 101(3), 633-641.

Soede, N. M., Langendijk, P., & Kemp, B. (2011). Reproductive cycles in pigs. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.025>

Soleilhavoup, C., Riou, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P., Reynaud, K., de Graaf, S. P., Gerard, N., & Druart, X. (2016). Proteomes of the female genital tract during the oestrous cycle. *Molecular and Cellular Proteomics*, 15(1), 93–108. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.052332>

- Soriano-Úbeda, C., Matás, C., & García-Vázquez, F. A. (2013). An overview of swine artificial insemination: retrospective, current and prospective aspects. *J Exp Appl Anim Sci*, 1, 67-97.
- Stambaugh, R., Noriega, C., & Mastroianni, L. (1969). Bicarbonate ion; the corona cell dispersing factor of rabbit tubal fluid. *Reproduction*, 18(1), 51-58.
- Steeves, C. L., Hammer, M. A., Walker, G. B., Rae, D., Stewart, N. A., & Baltz, J. M. (2003). The glycine neurotransmitter transporter GLYT1 is an organic osmolyte transporter regulating cell volume in cleavage-stage embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13982-13987.
- Stephoe, P. C., Edwards, R. G., & Purdy, J. M. (1971). Human blastocysts grown in culture. *Nature*, 229(5280), 132-133.
- Suarez, S. S. (1987). Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biology of Reproduction*, 36(1), 203-210.
- Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, 14(6), 647–657. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn029>
- Suarez, S. S. (2015). Gamete and zygote transport. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 1, 197-232.
- Suarez, S. S. (2016). Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell and tissue research*, 363(1), 185-194.
- Suarez, S. S., & Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 12(1), 23–37. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>
- Suarez, S. S., Revah, I., Lo, M., & Kölle, S. (1998). Bull Sperm Binding to Oviductal Epithelium Is Mediated by a Ca<sup>2+</sup>-Dependent Lectin on Sperm That Recognizes Lewis-a

Trisaccharide. *Biology of Reproduction*, 59(1), 39–44.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.39>

- Sumransap, P., Tummaruk, P., & Kunavongkrit, A. (2007). Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination. *Reproduction in domestic animals*, 42(2), 113-117.
- Sun, T., Lei, Z. M., & Rao, C. V. (1997). A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Molecular and cellular endocrinology*, 131(1), 97-108.
- Tabibzadeh, S. (1998). Molecular control of the implantation window. *Human Reproduction Update*, 4(5), 465-471.
- Takito, J., & Al-Awqati, Q. (2004). Conversion of ES cells to columnar epithelia by hensin and to squamous epithelia by laminin. *The Journal of cell biology*, 166(7), 1093-1102.
- Talevi, R., & Gualtieri, R. (2010). Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology*, 73(6), 796–801. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.005>
- Tan, Y. F., Li, F. X., Piao, Y. S., Sun, X. Y., & Wang, Y. L. (2003). Global gene profiling analysis of mouse uterus during the oestrous cycle.
- Tanphaichitr, N., Kongmanas, K., Faull, K. F., Whitelegge, J., Compostella, F., Goto-Inoue, N., ... Saewu, A. (2018). Properties, metabolism and roles of sulfogalactosylglycerolipid in male reproduction. *Progress in Lipid Research*, 72(February), 18–41. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.08.002>
- Teijeiro, J. M., Ignatz, G. G., & Marini, P. E. (2009). Annexin A2 is involved in pig (*Sus scrofa*) sperm-oviduct interaction. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 76(4), 334-341.

- Teijeiro, J. M., & Marini, P. E. (2012). S100A7 is present in human sperm and a homologous pig sperm protein interacts with sperm-binding glycoprotein (SBG). *Andrologia*, 44(SUPPL.1), 772–779. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01264.x>
- Teijeiro, J. M., & Marini, P. E. (2012). The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro-AKAP4 phosphorylation. *Reproduction*, 143(6), 773–785. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0314>
- Thompson, J. G. (1997). Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 9(3), 341-354.
- Tian, X., Pascal, G., Fouchécourt, S., Pontarotti, P., & Monget, P. (2009). Gene birth, death, and divergence: the different scenarios of reproduction-related gene evolution. *Biology of reproduction*, 80(4), 616-621.
- Timothy Smith, T., & Nothnick, W. B. (1997). Role of Direct Contact between Spermatozoa and Oviductal Epithelial Cells in Maintaining Rabbit Sperm Viability. *Biology of Reproduction*, 56(1), 83–89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.1.83>
- Toki, S., Zhou, W., Goleniewska, K., Reiss, S., Dulek, D. E., Newcomb, D. C., ... & Peebles Jr, R. S. (2018). Endogenous PGI<sub>2</sub> signaling through IP inhibits neutrophilic lung inflammation in LPS-induced acute lung injury mice model. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 136, 33-43.
- Tone, A. A., Begley, H., Sharma, M., Murphy, J., Rosen, B., Brown, T. J., & Shaw, P. A. (2008). Gene expression profiles of luteal phase fallopian tube epithelium from BRCA mutation carriers resemble high-grade serous carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 14(13), 4067-4078.

- Töpfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P. F., Ekhlasi-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L., & Calvete, J. J. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, *30*(4-5), 217-224.
- Toshimori, K., & Eddy, E. M. (2015). Gamete and zygote transport. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, *1*, 99-148.
- Tsao, F. H., Chen, X., & Chen, X. (1995). Annexin I in female rabbit reproductive organs: varying levels in relation to maturity and pregnancy. *Lipids*, *30*(6), 507-511.
- Ueda, H. R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., ... & Hashimoto, S. (2005). System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature genetics*, *37*(2), 187-192.
- Uhde, K., van Tol, H. T., Stout, T. A., & Roelen, B. A. (2018). Exposure to elevated glucose concentrations alters the metabolomic profile of bovine blastocysts. *PloS one*, *13*(6), e0199310.
- Van Niel, G., d'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*, *19*(4), 213.
- Varga, I., Miko, M., Kachlík, D., Žišková, M., Danihel Jr, L., & Babál, P. (2019). How many cell types form the epithelial lining of the human uterine tubes? Revision of the histological nomenclature of the human tubal epithelium. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, *224*, 73-80.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P., & Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa: I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, *121*(4), 1129-1137

- Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G. D., Valenzuela, J. P., Jorgez, C. J., Álvarez, J. G., & Kopf, G. S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm  $\beta$ -cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 3235-3242.
- Waberski, D., Magnus, F., Ferreira, F. M., Petrunkina, A. M., Weitze, K. F., & Töpfer-Petersen, E. (2005). Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology*, 63(2), 470-484.
- Wagner, A., Ekhlasi-Hundrieser, M., Hettel, C., Petrunkina, A., Waberski, D., Nimtz, M., & Töpfer-Petersen, E. (2002). Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation - Studies in the pig. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 249–257. <https://doi.org/10.1002/mrd.1154>
- Wånggren, K., Stavreus-Evers, A., Olsson, C., Andersson, E., & Gemzell-Danielsson, K. (2008). Regulation of muscular contractions in the human Fallopian tube through prostaglandins and progestagens. *Human Reproduction*, 23(10), 2359-2368.
- Ward, P. P., Mendoza-Meneses, M., Cunningham, G. A., & Conneely, O. M. (2003). Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin. *Molecular and cellular biology*, 23(1), 178-185.
- Ward, P. P., Paz, E., & Conneely, O. M. (2005). Lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2540.
- Watanabe, H., Takeo, T., Tojo, H., Sakoh, K., Berger, T., Nakagata, N., Mak, T. W., & Kondoh, G. (2014). Lipocalin 2 binds to membrane phosphatidylethanolamine to induce lipid raft movement in a PKA-dependent manner and modulates sperm maturation. *Development (Cambridge)*, 141(10), 2157–2164. <https://doi.org/10.1242/dev.105148>

- Weber, J. A., Freeman, D. A., Vanderwall, D. K., & Woods, G. L. (1991). Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biology of reproduction*, 45(4), 544-546.
- Weber, J. A., Woods, G. L., & Aguilar, J. J. (1996). Location of equine oviductal embryos on day 5 post ovulation and oviductal transport time of day 5 embryos autotransferred to the contralateral oviduct. *Theriogenology*, 46(8), 1477-1483.
- Wertheimer, E. V., Salicioni, A. M., Liu, W., Trevino, C. L., Chavez, J., Hernández-González, E. O., Darszon, A. & Visconti, P. E. (2008). Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(51), 35539-35550.
- Whitten, W. K., & Biggers, J. D. (1968). Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *Reproduction*, 17(2), 399-401.
- Whittingham, D. G. (1968). Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature*, 220(5167), 592-593.
- Winters, R. A., Hamilton, D. N., Bhatnagar, A. S., Fitzgerald, R., Bovin, N., & Miller, D. J. (2018). Porcine sperm binding to oviduct cells and glycans as supplements to traditional laboratory semen analysis. *Journal of Animal Science*, 96(12), 5265–5275. <https://doi.org/10.1093/jas/sky372>
- Wilson, W. K., & Dudley, F. J. (1952). The duration of gestation in rabbit breeds and crosses. *Journal of Genetics*, 50(3), 384.
- Woessner, J. F., & Taplin, C. J. (1988). Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *Journal of Biological Chemistry*, 263(32), 16918-16925.

- Wood, P. L., Scoggin, K., Ball, B. A., Troedsson, M. H., & Squires, E. L. (2016). Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- $\omega$ -hydroxy-fatty acids. *Theriogenology*, 86(5), 1212-1221.
- Woodruff, J. D., & Pauerstein, C. J. (1969). *The fallopian tube: structure, function, pathology, and management*. Williams & Wilkins Co.
- Yahia Khandoker, M. A. M., Tsujii, H., & Karasawa, D. (1998). A kinetics study of fatty acid composition of embryos, oviductal and uterine fluids in the rabbit. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 11(1), 60-64.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. *Zygote*, 2(4), 371–372. <https://doi.org/10.1017/S0967199400002240>
- Yang, C. H., & Yanagimachi, R. (1989). Differences between mature ovarian and oviductal oocytes: A study using the golden hamster. *Human Reproduction*, 4(1), 63–71. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136847>
- Yaniz, J. L., Lopez-Gatius, F., & Hunter, R. H. F. (2006). Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 35(1), 28–34. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2005.00634.x>
- Yeste, M., & Castillo-Martín, M. (2013). Boar Spermatozoa Within the Uterine Environment. In *Boar Reproduction* (pp. 205-255). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Yeste, M., Holt, W. V., Bonet, S., Rodríguez-Gil, J. E., & Lloyd, R. E. (2014). Viable and morphologically normal boar spermatozoa alter the expression of heat-shock protein genes in oviductal epithelial cells during co-culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 81(9), 805–819. <https://doi.org/10.1002/mrd.22350>

- Yousef, M. S., Marey, M. A., Hambruch, N., Hayakawa, H., Shimizu, T., Hussien, H. A., Abdel-Razek, A. K., Pfarrer, C., & Miyamoto, A. (2016). Sperm binding to oviduct epithelial cells enhances TGFB1 and IL10 expressions in epithelial cells as well as neutrophils in vitro: prostaglandin E2 as a main regulator of anti-inflammatory response in the bovine oviduct. *PloS one*, *11*(9).
- Yu, H., Reiser, J., Besenfelder, U., Razzazi-Fazeli, E., Bergquist, J., Brem, G., & Mayrhofer, C. (2016). Exploring the oviductal fluid proteome by a lectin-based affinity approach. *Proteomics*, *16*(23), 2962-2966.
- Yu, H., Hackenbroch, L., Meyer, F. R., Reiser, J., Razzazi-Fazeli, E., Nöbauer, K., Besenfelder, U., Vogl, C., Brem, G., & Mayrhofer, C. (2019). Identification of Rabbit Oviductal Fluid Proteins Involved in Pre-Fertilization Processes by Quantitative Proteomics. *Proteomics*, *19*(5), 1800319.
- Zeng, S., Bick, J., Ulbrich, S. E., & Bauersachs, S. (2018). Cell type-specific analysis of transcriptome changes in the porcine endometrium on Day 12 of pregnancy. *BMC genomics*, *19*(1), 459.
- Zheng, M., Shi, H., Segaloff, D. L., & Van Voorhis, B. J. (2001). Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract. *Biology of reproduction*, *64*(1), 179-187.
- Zigo, M., Jonakova, V., Manaskova-Postlerova, P., Kerns, K., & Sutovsky, P. (2019). Ubiquitin-proteasome system participates in the de-aggregation of spermadhesins and DQH protein during boar sperm capacitation. *Reproduction*, *157*(3), 283-295.
- Zigo, M., Jonáková, V., Šulc, M., & Maňásková-Postlerová, P. (2013). Characterization of sperm surface protein patterns of ejaculated and capacitated boar sperm, with the

detection of ZP binding candidates. *International journal of biological macromolecules*, 61, 322-328.

Zumoffen, C. M., Gil, R., Caille, A. M., Morente, C., Munuce, M. J., & Ghersevich, S. A. (2013).

A protein isolated from human oviductal tissue in vitro secretion, identified as human lactoferrin, interacts with spermatozoa and oocytes and modulates gamete interaction. *Human Reproduction*, 28(5), 1297-1308.

Zúñiga, L. M., Andrade, J. C., Fábrega-Guerén, F., Orihuela, P. A., Velázquez, E. V., Vidal, E. A., ... & Croxatto, H. B. (2021). Mating induces early transcriptional response in the rat endosalpinx: the role of TNF and RA. *Reproduction*, 161(1), 43-59.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis tres directores de tesis todo su trabajo y esfuerzo didáctico y personal.

A Manolo (Manuel Avilés Sánchez) agradecerle acogerme en su laboratorio, su dedicación, por mostrarme su pasión por la Biología de la Reproducción y ayudarme en el análisis crítico de los resultados (“el mejor *referee* es uno mismo”). Gracias también por introducirme en el mundo de la Ciencia académica y, por supuesto, por toda la financiación, que espero que sigas recibiendo durante el resto de tu carrera profesional.

A Carla (Carla Moros Nicolás) me gustaría agradecerle su paciencia y su esfuerzo, sobre todo con las correcciones de la tesis. Gracias por ser un referente, por tu ayuda y asesoramiento en el laboratorio, y por tus enseñanzas en lo relacionado con la Biología Molecular. Te deseo lo mejor en la vida y en tu futuro profesional.

A Manel (Manel López Béjar) me gustaría agradecerle la oportunidad de participar en la línea de investigación de transcriptómica del oviducto de la coneja. Por proporcionarme las valiosas muestras y por tu ayuda y correcciones en toda esta parte de la tesis.

A continuación me gustaría agradecer a mi familia todo su apoyo incondicional durante la tesis. A mis padres por todo su amor, y su esfuerzo durante mi infancia tanto con mi educación como para satisfacer mis pequeñas curiosidades científicas. A mi hermana Guio por su amor y su admiración. Muchas gracias también a mis tíos y tías (Enrique, Rufi, Marino, Mari Carmen, Valen y Charo) y a mis primos (Julia, María y Valen) por su

apoyo, ánimos y por todos los buenos momentos que pude vivir con ellos en las vacaciones. Gracias tía Charo por acogerme en tu casa de Madrid por una temporada y ayudarme con la búsqueda de piso.

También me gustaría agradecer a toda la gente que he conocido gracias al doctorado.

En primer lugar a mis compañeras de laboratorio: a Blanca, Ascen y Lourdes por su acogida en el laboratorio, por facilitarme mi estancia los primeros meses y enseñarme a hacer electroforesis en gel, western blots, extracción de ARN, retrotranscripción y seguro que más cosas de las que recuerdo ahora mismo. Gracias a Analuce por toda enseñarme el arte de los cultivos celulares y su ayuda y apoyo a lo largo de la tesis. Gracias a Juli por su compañía durante la tesis en el laboratorio, los debates que tuvimos sobre experimentos que me ayudaron a crecer como científico, momentos divertidos y comidas entretenidas. Gracias a Rebeca por toda su ayuda durante el tiempo que coincidimos de la tesis, por su gestión y organización de las cosas y pedidos, y por los momentos de locura en el laboratorio, te eché mucho de menos en el matadero las últimas veces. Gracias a Paula (Paula Cots) por toda su ayuda y colaboración en el laboratorio, por dejarme ser parte de su proyecto con TAHE y por las entretenidas sesiones trasteando con R. Gracias a Miriam (Miriam Balastegui) por su ayuda y por todo lo que me enseñó relativo a los animales. Muchas gracias a las dos por vuestra compañía en la última etapa de la tesis, por las excursiones y aventuras pre-confinamiento, y por ende, gracias también a Javi y sus divertidas anécdotas con sus alumnos. Gracias a Rafa por permitirme participar en sus interesantes experimentos con fluido epididimal con los ratones. Y gracias a Nuria Hernández y a Nuria Almunia por permitirme participar en sus proyectos en humano y por enseñarme diferentes procedimientos en la clínica.

Gracias a todos los alumnos de TFG y TFM que han pasado a lo largo de los años de tesis por el laboratorio que de alguna forma o de otra me han enseñado una nueva perspectiva (a Marisa, María, Marina, Juandi, Paula, Alba, Andrés) y especialmente a Noelia, en cuyo TFM tuve la oportunidad de participar directamente.

Gracias a todos los profesores y compañeros del departamento. Gracias a María (María Jiménez Movilla) por sus colaboraciones científicas, su ayuda en el laboratorio siempre que lo he necesitado, sus consejos y conversaciones durante las comidas en el LAIB, y también por su labor como directora del programa de doctorado. Gracias a María José por sus colaboraciones, sus enseñanzas de laboratorio respecto a la Biología Molecular y la solubilización de zonas pelúcidas, por su apoyo y buenos consejos, y por permitirme aprender con ella en parte de las prácticas de profesorado. Gracias a Juan Francisco por toda su ayuda, paciencia y enseñanzas en cuanto a Histología y por el material para prepararme bien para las prácticas docentes y por su tutoría al respecto. Agradezco también a Jose Ángel por ayudarme también con las prácticas docentes en Fisioterapia. Gracias Emilio por toda la formación docente que pude hacer contigo en las prácticas de Enfermería, y por permitirme aprender nuevas técnicas en TAHE fertilidad y por tu buen humor y disponibilidad. Gracias a Concha por todas sus gestiones en el departamento y en cuanto a venia docendi, y por tu compañía y conversaciones cuando me quedaba a comer en el departamento. Gracias a Emma por sus amenas conversaciones durante las comidas en el LAIB y por su ayuda en el laboratorio cuando he tenido cualquier problema. Gracias a Luis Miguel por las conversaciones en los pasillo de los laboratorios y su asesoramiento científico. Gracias a Vicente por tu ayuda con el ordenador del microscopio (menuda locura de aprendizaje) y por los buenos momentos pasados en los exámenes

del alumnado. Gracias a Esther por las conversaciones de las comidas en el LAIB, por su apoyo y ánimos. Muchas gracias a Jesús, por toda su ayuda durante la tesis, has realizado un gran esfuerzo estos años y estoy deseando ver la lectura de tu tesis. Muchas gracias a Ángel, nuestro administrativo del departamento, muy eficiente y dispuesto siempre a ayudarnos con cualquier trámite, me has ayudado mucho. Gracias a Mari Carmen (María del Carmen González Ulloa) por su ayuda y por el aprendizaje en el proceso de la fijación de las muestras, el parafinado de las muestras y la preparación de los cortes histológicos.

Un agradecimiento especial a Manuel Álvarez, a Jaume y Mateo por la obtención de las muestras limpias y diseccionadas de oviducto de coneja, y por las muestras de fluido oviductal que he utilizado en la tesis. Me alegró mucho conoceros en el último congreso presencial de la AETE.

Gracias a María José, Laura, Paula y Natalia de la Universidad de Alicante por permitirme colaborar en su proyecto con lectinas en espermatozoides porcinos.

Muchas gracias a la buena gente del departamento de Fisiología Animal. Gracias a los profesores Pilar, Carmen, Raquel, Joaquín, Sebas y Fran por hacerme hueco en su laboratorio siempre que he tenido que ir y por proporcionarme las muestras de semen de verraco utilizadas en la tesis. Gracias a Sebas por darme la oportunidad de participar en el curso de Epigenética que organizó. Mi agradecimiento a Fran por permitirme participar en sus proyectos de proteómica con semen de cerdo y delfín, por enseñarme a hacer un gradiente de Percoll. Gracias a Luis por sus interesantes conversaciones sobre biología y sobre la vida. Gracias a todos los doctorandos (muchos ya doctores) de Fisiología, que

siempre me han ayudado de una forma u otra: Chiara, Gabi, Eve (especialmente por enseñarme todo lo relacionado con el matadero), Jordana, Sergio, Cristina, Sole, Dani. Muchas gracias a Juan, el supertécnico de laboratorio, por toda su ayuda y asesoramiento con respecto al arte de la preparación de los medios y por ayudarme con la compra de reactivos.

Merci beaucoup à Christophe Arnoult, un référent a l'investigation avec des spermatozoids humains, et un bon professeur. Merci de ton attention pendant mon stage a ton labo à Grenoble. A Jess (Jessica Escoffier), merci de m'avoir appris tes trucs avec des experiments de western blot et de la capacitation spermatique. Merci a Marie, Emilie et JP pour votre aide pendant mon stage ce là, et pour votre camaraderie dedans et dehors le labo.

Muchas gracias a Pablo Bermejo por acogerme en su laboratorio del INIA, y por todo el aprendizaje y experimentos que he podido llevar a cabo con él.

Gracias también a todas las chicas del departamento de Bioquímica B, siempre dispuestas a ayudar y con las que he podido compartir muy buenos ratos en el comedor del LAIB, especialmente por animarme en los duros momentos de la tesis en las que era el único doctorando de nuestro grupo en activo. A Conchi, Ceci, Marta, Julia, Ana, María e Idoya.

Gracias a todos mis amigos. A Adri Izquierdo, mi principal compi de prácticas y trabajos durante la carrera, gracias por todas las reflexiones que compartimos. A Miriam (Miriam Ruiz), por las excursiones en coche y discusiones sobre música. A Adri Matencio, por su

apoyo y comprensión durante esta fase en la que los dos hemos tenido dificultades parecidas en la vida, un gran investigador y mejor amigo, un ejemplo de lo importante que es estar centrado en tus metas. A Francisco Juan, amigo y compañero de fiestas, co-alumno interno y gran persona, estoy deseando que acabe lo del COVID para hacerte una visita a NY. A Alfonso, con quien siempre tendré una deuda vital, gracias por todo tu apoyo, por ayudarme y escucharme, mucho ánimo con el final de tu doctorado.

Gracias a Paula (Paula García Ibáñez), por todas las experiencias vitales compartidas estos años. Fuiste mi primera alumna en el laboratorio, y me animaste y apoyaste durante todo el tiempo que estuvimos juntos del doctorado. Deseo de todo corazón que seas muy feliz.

Gracias al personal de apoyo a la investigación de la Universidad de Murcia y del LAIB. Especialmente un agradecimiento a César por su asesoramiento con las RT-qPCRs, a María José y Francisco por todo su trabajo con la preparación e hibridación de los microarrays y a Alejandro con la proteómica. También a Toñi, Pepe, Juana, Pilar, Azu y Vero de Biología Celular: muchas gracias por toda vuestra buena disposición a ayudarme a mí y a otros usuarios, por todo el tiempo que empleais manteniendo los laboratorios e instrumentos en buen estado y por toda la asistencia con los citómetros, incluyendo las aventuras de sorting con Pepe y Pilar.

Un agradecimiento especial para todos aquellos docentes que además de haber sido unos buenos profesores y transmisores de conocimiento me han motivado y me han empujado en la carrera científica. Entre ellos me gustaría recordar a Jesualdo, coordinador del máster de Bioinformática, gracias a quien he hecho este doctorado, que

me puso en contacto con Manolo y con el estudio de la transcriptómica. Y a Víctor y Pilar, también del departamento de Biología Celular e Histología, por todo lo que me enseñaron en sus clases de Biología Celular e Ingeniería Tisular, y por la oportunidad de ser alumno interno en el departamento durante tres años. También a mis tutores de esos cursos, Raquel, Sergio y Jorge, con los que pude llevarme una primera impresión de cómo es la vida de un investigador y aprender lo más básico. Dejo a muchos más sin mencionar, pero que sin duda han influido mucho en mi trayectoria vital.

