

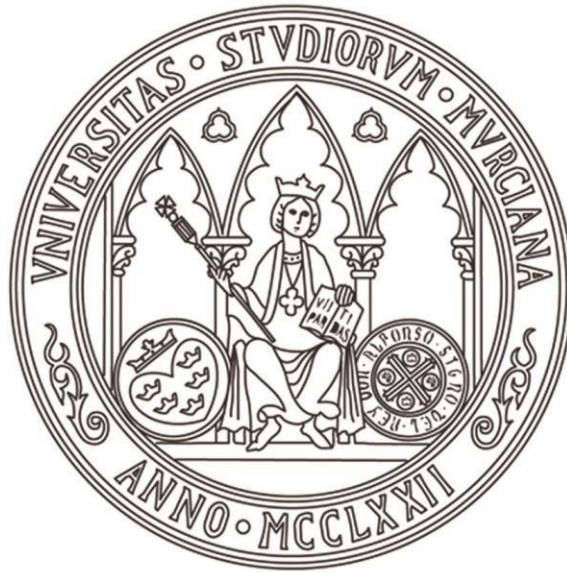


**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**  
**TESIS DOCTORAL**

Estudio de las implicaciones funcionales de la proteína oviductina en la fertilidad y el desarrollo embrionario en hámster dorado y conejo utilizando la tecnología CRISPR-Cas9.

**D.<sup>a</sup> Miriam Balastegui Alarcón**  
**2023**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
TESIS DOCTORAL

Estudio de las implicaciones funcionales de la proteína oviductina en la fertilidad y el desarrollo embrionario en hámster dorado y conejo utilizando la tecnología CRISPR-Cas9.

Autor: D.<sup>a</sup> Miriam Balastegui Alarcón

Director/es: D. Manuel Avilés Sánchez y D.<sup>a</sup> María José Izquierdo Rico





**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD  
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

*Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022*

D./Dña. Miriam Balastegui Alarcón

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología y Tecnología de la Salud Reproductiva

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Estudio de las implicaciones funcionales de la proteína oviductina en la fertilidad y el desarrollo embrionario en hámster dorado y conejo utilizando la tecnología CRISPR-Cas9.

y dirigida por,

D./Dña. Manuel Avilés Sánchez

D./Dña. María José Izquierdo Rico

D./Dña.

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:*

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 01 de marzo de 2023

Fdo.: Miriam Balastegui Alarcón

Firmado por BALASTEGUI ALARCON  
MIRIAM - \*\*\*0568\*\* el día  
01/03/2023 con un certificado  
emitido por AC FNMT Usuarios

*Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.*

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia



El presente trabajo ha sido desarrollado para optar al grado de Doctor en el Programa de Doctorado “Biología y Tecnología de la Salud Reproductiva (REPROBIOL)”.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada durante el periodo de disfrute de un contrato predoctoral de Ayuda para la formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Universidades y ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Proyecto PGC2018-094781-B-I00 (MCINN/AEI/FEDER, UE).





## ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

Estancias de Investigación nacionales llevadas a cabo durante la realización de la presente Tesis Doctoral:

- **Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), 2020. Objetivo:** obtención, manejo y vitrificación embrionaria en conejo. Transferencia embrionaria en conejo.
- **Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de Madrid, 2021. Objetivo:** obtención, manejo y transferencia embrionaria en ratón.

Esta Tesis Doctoral ha sido propuesta para mención de Doctorado Internacional en virtud de la siguiente estancia de investigación:

- **Laboratoire de Biométrie et de Biologie Évolutive de l'Université Claude Bernard de Lyon (Francia), 2022. Objetivo:** análisis filogenético del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae*.

Algunos de los resultados obtenidos han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

## **ARTÍCULOS:**

- Balastegui-Alarcón M, Algarra B, Cots-Rodríguez P, Sáez-Espinosa P, Robles-Gómez L, Izquierdo-Rico MJ, Gómez-Torres MJ, Vicente JS, Marco-Jiménez F, González-Brusi L, Esteves PJ, Moros-Nicolás C, Ballesta J, Avilés M. **Ovastacin pseudogenisation is responsible for the lacking of zona pellucida block to polyspermy in lagomorphs. (En preparación).**
- Balastegui-Alarcón M, Liu Y, Li R, Sáez-Espinosa P, Algarra B, Cots-Rodríguez P, González-Brusi L, Soria-Monzó P, Moros-Nicolás C, Ballesta J, Izquierdo-Rico MJ, Gómez-Torres MJ, Wang Z, Avilés M. **Functional implications of *OVGP1* on fertility and embryonic development in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). (En preparación).**
- Balastegui-Alarcón M, Sáez-Espinosa P, Lamas-Toranzo I, Algarra B, Cots-Rodríguez P, González-Brusi L, Soria-Monzó P, Moros-Nicolás C, Ballesta J, Izquierdo-Rico MJ, Gómez-Torres MJ, Vicente JS, Marco-Jiménez F, Bermejo-Alvarez P, Avilés M. **Functional implications of *OVGP1* on fertility and embryonic development in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). (En preparación).**

## COMUNICACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS CIENTÍFICAS:

- Balastegui-Alarcón M, Cots-Rodríguez P, González-Brusi L, García-Villar M, Soria-Monzó P, Ballesta J, Izquierdo-Rico MJ, Avilés M. **La pseudogenización de ovastacina en conejo es responsable de la falta de bloqueo de la zona pelúcida a la polispermia**. Póster. VI Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca, Murcia, España. Noviembre 2021.
- M. Balastegui-Alarcón, I. Lamas-Toranzo, C. Moros-Nicolás, L. González-Brusi, P. Soria, P. Cots-Rodríguez, B. Algarra, J. Ballesta, P. Sáez-Espinosa, MJ. Gómez-Torres, JS. Vicente, F. Marco-Jiménez, MJ. Izquierdo-Rico, P. Bermejo, M. Avilés. **OVGP1 is not essential for fertilisation, early embryo development and mucin coat formation in the rabbit *Oryctolagus cuniculus***. Póster. 16º Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA). León, España. Octubre 2022.



# **AGRADECIMIENTOS**



En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis **Manuel Avilés Sánchez** y **María José Izquierdo Rico** su implicación en la realización de la presente Tesis Doctoral. Su ayuda, conocimientos y afán investigador han sido esenciales para la culminación de esta. Gracias a los dos por vuestra cercanía y apoyo durante estos años, mostrándome el apasionante mundo de la reproducción y habiendo sembrado en mí la semilla de la inquietud científica. Nunca olvidaré lo importante que es la pregunta “¿por qué?” en ciencia.

Gracias al **Dr. Pablo Bermejo Álvarez** por su hospitalidad durante mi estancia en el Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de Madrid, habiéndome guiado y transmitido sus conocimientos sobre obtención, manejo y transferencia embrionaria en ratón. Así, como por su colaboración irremplazable en la generación del modelo animal KO para *OVGP1* de conejo.

Gracias al **Dr. Zhongde Wang** por su colaboración indispensable en la generación del modelo animal KO para *OVGP1* de hámster dorado.

Gracias a los **Drs. José Salvador Vicente Antón** y **Francisco Marco Jiménez** por involucrarse en el presente proyecto y aportar sus conocimientos, colaboración y ayuda en el manejo reproductivo de conejo, así como en la técnica de recuperación embrionaria *in vivo* guiada por laparoscopia en dicha especie. Gracias por acogerme en el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y otorgarme formación en obtención, manejo, vitrificación y transferencia embrionaria en conejo. Paco, muchísimas gracias por ofrecerme siempre tu ayuda con una sonrisa.

Gracias a la **Dra. Pascale Chevret** por su empatía y acogida durante mi estancia en el Laboratoire de Biométrie et de Biologie Évolutive de l'Université Claude Bernard de Lyon. Así como por compartir sus enormes conocimientos en análisis filogenéticos conmigo.

Gracias al **Dr. Pedro José Esteves** del Centro de Investigación en Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIBIO) del Campus Agrario de Vairão de la Universidad de Oporto,

por su colaboración mediante la aportación de material genético de diferentes especies de lagomorfos.

Gracias a todos los profesores del Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina, a **Concha Ferrer, José Ballesta, Juan Francisco Madrid, José Ángel Martínez, Luis Miguel Pastor, María Jiménez, Emma Martínez, María Teresa Castells, Emilio Gómez, Vicente Seco, Ester Beltrán y Carla Moros.**

Gracias a mis compañeros **Paula, Leopoldo, Blanca, Guillermo, Marta, Pilar, Ismael y Bee** por compartir muchas horas de trabajo Juntos. Paula, gracias por aportar siempre tu tiempo y manos como ayuda y tu enorme sonrisa y abrazos como alivio en cada momento. Gracias por haber hecho tan especiales estos 4 años, dentro y sobre todo fuera del trabajo, amiga. Leopoldo gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme, incluso sin estar cerca, no es nada fácil encontrarse una persona como tú. Guille gracias por hacer que las horas sean más cortas y transmitir tu alegría cada día. Gracias a todos por vuestra generosidad y sobre todo por haber sido mucho más que compañeros de laboratorio, mil gracias por ser mis amigos. ¡Sois únicos!

Gracias a mis compañeros de edificio. Los cafés de media mañana eran un chute de energía para el resto del día, pero no por la cafeína, si no por las personas con los que lo compartía. Sandra, gracias por haberte dejado conocer, ya no me puedes echar de tu lista de amigos, lo siento.

Gracias a mis amigos externos a la ciencia por escuchar mil historias y anécdotas de laboratorio con cara de entusiasmo. Gracias por hacerme desconectar cuando era necesario. Gracias por ser tan especiales. No os nombro porque por suerte sois muchos los que me hacéis sonreír, pero vosotros sabéis quienes sois. Dentro de los amigos, aunque no externos a la ciencia está la futura Doctora del Rey. **Irene**, gracias por estar siempre, hasta a 5.787 Km de distancia.

Gracias al servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia y en especial a **Alejandro, Cesar y María José** por su contribución en este trabajo, estando siempre dispuestos a resolver las posibles dudas.



Gracias a mi **FAMILIA**. Vuestro apoyo incondicional durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral y durante toda mi vida ha hecho que llegue a ser lo que soy. Gracias a mis padres **Paca y Martín** por vuestro cariño, paciencia, empatía y comprensión en los buenos y malos momentos. Gracias por haberme inculcado que con esfuerzo todo se puede, animándome a conseguir todo lo que me proponga, sabiendo que siempre habrá un abrazo que aporte la energía necesaria en los momentos más bajos. Gracias a mi hermano **Mario** por estar a mi lado desde que tengo uso de razón. Gracias a mis preciosos sobrinos **Mario y Fran** por generar esos momentos de desconexión tan importantes durante estos años, llenando de alegría cada momento que compartía con ellos. Gracias a **mi abuela**, siempre he escuchado que el amor de unos padres es incondicional, pero el amor de una abuela... no tiene palabras. Gracias por escucharme y preguntar hasta entender las cosas, has sido un gran motivo para culminar este trabajo.

Por último, gracias a la persona que más tiempo me ha dedicado en la realización de esta Tesis, apoyándome y dándome lo mejor de él en cada momento. Gracias por hacerme sonreír en los momentos más difíciles y disfrutar conmigo los momentos más dulces. **Jesús**, gracias por cuidarme, quererme y comprenderme cuando más falta me hacía. No podría tener un mejor compañero de vida.





Autor: José Mario Sarabia Jurado.

“Lo importante es no tener arrugas en el cerebro”

Margarita Salas (1938-2019)



Autor: Salvador Fernández.



# ÍNDICE



I. INTRODUCCIÓN .....	- 1 -
II. OBJETIVOS .....	- 7 -
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	- 11 -
1. Sistema reproductor .....	- 13 -
1.1 Hámster .....	- 13 -
1.2 Conejo .....	- 14 -
2. Características y manejo reproductivo .....	- 15 -
2.1 Hámster .....	- 15 -
2.2 Conejo .....	- 17 -
3. Fecundación y desarrollo embrionario .....	- 20 -
3.1 Hámster .....	- 20 -
3.2 Conejo .....	- 22 -
4. Oviducto .....	- 24 -
4.1 Anatomía .....	- 25 -
4.2 Histología .....	- 25 -
4.2.1 Capas del oviducto .....	- 25 -
4.2.2 Células del epitelio oviductal .....	- 27 -
4.3 Fluido oviductal .....	- 30 -
4.3.1 Formación del fluido oviductal .....	- 30 -
4.3.2 Composición del fluido oviductal .....	- 31 -
4.3.2.1 Agua y electrolitos .....	- 31 -
4.3.2.2 Pequeños metabolitos y carbohidratos .....	- 32 -
4.3.2.3 Lípidos .....	- 33 -
4.3.2.4 Proteínas .....	- 33 -
4.3.2.5 Hormonas .....	- 35 -
5. Oviductina .....	- 36 -
5.1 Caracterización bioquímica .....	- 38 -
5.2 Secreción y localización .....	- 40 -
5.3 Funciones biológicas .....	- 43 -
5.3.1 Efectos de la oviductina en el gameto masculino .....	- 44 -
5.3.2 Efectos de la oviductina en el gameto femenino .....	- 46 -
5.3.3 Efectos de la oviductina en el desarrollo embrionario temprano .....	- 48 -
5.3.4 Efectos de la oviductina en la implantación .....	- 50 -
5.4 Evolución molecular .....	- 51 -
6. Tecnología CRISPR-Cas9 .....	- 53 -
7. Proteína ovastacina y su implicación en el bloqueo de la polispermia .....	- 56 -

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	- 59 -
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 63 -
1. Modelos KO para <i>OVGP1</i> de hámster y conejo.....	- 65 -
1.1 Ética.....	- 65 -
1.2 Generación y cría de los modelos animales KO para <i>OVGP1</i> .....	- 65 -
1.3 Mantenimiento de los animales.....	- 67 -
1.4 Obtención de muestras biológicas.....	- 68 -
1.4.1 Tejido auricular.....	- 69 -
1.4.2 Oviductos.....	- 69 -
1.4.3 Óvulos y embriones.....	- 70 -
1.4.4 Fluido oviductal de coneja.....	- 73 -
1.5 Obtención de material genético.....	- 73 -
1.5.1 Obtención de ADN genómico.....	- 73 -
1.5.2 Obtención de ARN total.....	- 74 -
1.5.3 Síntesis <i>in vitro</i> de ADN complementario.....	- 76 -
1.6 Genotipado.....	- 77 -
1.7 Análisis de expresión génica de <i>OVGP1</i> en oviducto.....	- 78 -
1.8 Detección de la proteína oviductina.....	- 80 -
1.8.1 Procesamiento de las muestras oviductales.....	- 80 -
1.8.2 Electroforesis en SDS-PAGE.....	- 81 -
1.8.3 Western-blot.....	- 81 -
1.8.4 Tinción con azul de Coomassie.....	- 82 -
1.8.5 Análisis proteómico mediante la técnica de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS).....	- 83 -
1.8.6 Análisis inmunohistoquímico de oviductina sobre cortes de oviducto.....	- 86 -
1.8.7 Técnica citoquímica de lectinas en óvulos de hámster.....	- 88 -
1.9 Análisis de la fertilidad <i>in vivo</i> .....	- 88 -
1.10 Análisis microscópico de oviductos y embriones.....	- 92 -
1.10.1 Microscopía óptica.....	- 92 -
1.10.2 Microscopía electrónica.....	- 94 -
1.11 Análisis transcriptómico de oviductos de hámster.....	- 95 -
1.12 Análisis transcriptómico de embriones de hámster.....	- 96 -
2. Evolución del gen <i>Ovgp1</i> en la subfamilia <i>Murinae</i> .....	- 97 -
2.1 Diseño de cebadores.....	- 99 -
2.2 Amplificación y análisis de las secuencias genómicas de <i>Ovgp1</i> en la subfamilia <i>Murinae</i> .....	- 100 -



2.3 Construcción del árbol filogenético.....	- 101 -
3. Análisis de la secuencia genómica de <i>ASTL</i> en lagomorfos mediante PCR.....	- 102 -
VI. RESULTADOS.....	- 105 -
1. Modelos KO para <i>OVGP1</i> de hámster y conejo.....	- 107 -
1.1 Caracterización de los modelos KO.....	- 107 -
1.1.1 Genotipado.....	- 107 -
1.1.2 Análisis de la expresión génica de <i>OVGP1</i> en oviducto.....	- 111 -
1.1.3 Detección de la proteína oviductina.....	- 114 -
1.1.3.1 Electroforesis en SDS-PAGE y Western-blot de muestras oviductales...	- 114 -
1.1.3.2 Análisis proteómico.....	- 115 -
1.1.3.3 Inmunohistoquímica en oviducto.....	- 123 -
1.1.3.4 Caracterización del patrón de unión de la lectina GSL I a la zona pelúcida de óvulos de hámster.....	- 124 -
1.2 Análisis de la fertilidad <i>in vivo</i> .....	- 125 -
1.3 Análisis histológico de oviducto.....	- 128 -
1.4 Análisis del desarrollo embrionario preimplantacional.....	- 143 -
1.5 Análisis de la formación de la capa de mucina en mórulas de conejo.....	- 149 -
1.6 Análisis transcriptómico de oviductos de hámster mediante RNA-seq.....	- 150 -
1.7 Análisis transcriptómico de embriones de hámster mediante la técnica de microarrays.....	- 153 -
2. Evolución del gen <i>Ovgp1</i> en la subfamilia <i>Murinae</i> .....	- 158 -
3. Análisis del gen <i>ASTL</i> en lagomorfos.....	- 169 -
VII. DISCUSIÓN.....	- 171 -
1. Implicación de la proteína oviductina en el desarrollo de los eventos reproductivos tempranos.....	- 173 -
2. Repercusión de la ausencia de oviductina en el transcriptoma del oviducto de hámster.....	- 179 -
3. Repercusión de la ausencia de oviductina en el transcriptoma de embriones de hámster.....	- 185 -
4. Evolución del gen <i>Ovgp1</i> en la subfamilia <i>Murinae</i> .....	- 194 -
5. Pseudogenización del gen <i>ASTL</i> en lagomorfos.....	- 196 -
VIII. CONCLUSIONES.....	- 199 -
IX. SUMMARY.....	- 203 -
1. Introduction.....	- 205 -
2. Methods.....	- 208 -
3. Results.....	- 211 -
4. Discussion.....	- 215 -

4.1 Involvement of the oviductin protein in the proper development of early reproductive events.....	- 215 -
4.2 Impact of the absence of oviductin on the hamster oviductal transcriptome.....	- 220 -
4.3 Impact of the absence of oviductin on the transcriptome of hamster embryos..	- 221 -
4.4 Evolution of the <i>Ovgp1</i> gene in the <i>Murinae</i> subfamily.....	- 224 -
4.5 Pseudogenisation of the <i>ASTL</i> gene in lagomorphs.....	- 226 -
5. Conclusions.....	- 228 -
X. ABREVIATURAS.....	- 231 -
XI. ANEXOS.....	- 237 -
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	- 243 -

# **I. INTRODUCCIÓN**



La infertilidad es un problema clínico muy extendido que afecta al 8-12% de las parejas en todo el mundo. De ellas, alrededor del 30% son diagnosticadas de infertilidad idiopática, ya que no se encuentra ningún factor causal (Guerra et al., 2019). Las parejas con problemas de fertilidad suelen recurrir a técnicas de reproducción asistida (TRA). Sin embargo, existe entre un 5-15% de estas parejas que tras someterse a procesos de fecundación *in vitro* (FIV) con calidad espermática normal, fracasan (Van der Westerlaken et al., 2005). Se ha descrito que la infertilidad relacionada con el factor femenino representa alrededor del 40-50% de los casos totales de infertilidad (Ganguly y Unisa, 2010; Mascarenhas et al., 2012).

Dentro de los posibles motivos de dichos diagnósticos de infertilidad idiopática, cabe destacar las probables alteraciones presentes en genes implicados en la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Así, las causas genéticas constituyen aproximadamente el 5-10% de todas las causas de infertilidad en las mujeres (Jawad y Saeed, 2020). Estas pueden afectar a diversos tipos celulares o estructuras que juegan un papel relevante en los procesos reproductivos. De esta forma, se han asociado mutaciones que afectan a los gametos (Avenarius et al., 2009; Pausch et al., 2014; Vondrakova et al., 2022) o a la zona pelúcida (ZP) (Liu et al., 2017; Zhou et al., 2019; Cao et al., 2020; Shen et al., 2022) con problemas de fertilidad.

El oviducto, denominado trompa de Falopio en la especie humana, ha sido considerado durante mucho tiempo como un simple conducto de transporte para gametos y embriones. Sin embargo, numerosos estudios han mostrado que el oviducto y en particular el fluido oviductal (FO) generado a partir del trasudado del plasma sanguíneo y el producto de secreción de las células del epitelio oviductal (Leese, 1988; Leese et al., 2001; Coy et al., 2018; Marins et al., 2022), crea un microambiente que interviene en importantes procesos claves para la fecundación y la correcta fisiología del gameto y del embrión: maduración de gametos, selección espermática, capacitación y desarrollo embrionario temprano (King et al., 1994; Satoh et al., 1995; Abe et al., 1995b; Boatman y Magnoni, 1995; O'Day-Bowman et al., 1996; Kouba et al., 2000; Pradeep et al., 2011; Coy et al., 2012; Hunter, 2012; Saccary et al., 2013; Hribal et al., 2014; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2016; Algarra et al., 2018; González-Brusi et al., 2020). Sin embargo, siguen sin conocerse en su totalidad las proteínas presentes en dicho FO y la función

## 1. Introducción

desempeñada por muchas de ellas, pudiendo ser imprescindibles para que se produzcan los diferentes procesos anteriormente comentados.

La oviductina o glicoproteína oviductal 1 codificada por el gen *OVGP1*, es la proteína no sérica mayoritaria en el FO. Esta proteína ha sido identificada en diferentes especies de mamíferos, incluido el ser humano (Rapisarda et al., 1993; Arias et al., 1994; O'Day-Bowman et al., 1995; Briton-Jones et al., 2001; Briton-Jones et al., 2004). Se trata del miembro mejor estudiado de la familia de las mucinas del tracto reproductivo y su secreción varía con la región oviductal y con la fase del ciclo estral en la mayoría de las especies (Lee et al., 1990; Buhi et al., 1991; Donnelly et al., 1991; Arias et al., 1994; DeSouza y Murray, 1995; O'Day-Bowman et al., 1995; Komiya et al., 1996; Buhi et al., 1996; Verhage et al., 1997a, 1997b; Buhi et al., 2000; Lok et al., 2002; Merchán et al., 2007; Saint-Dizier et al., 2014).

Para determinar la función de esta proteína se han realizado experimentos que implican la generación de animales modificados genéticamente. El modelo KO (del inglés, *knock out*) de *Ovgp1* en el ratón (*Mus musculus*) es fértil (Araki et al., 2003). En otras especies como la rata (*Rattus norvegicus*) (Tian et al., 2009) o el gran zorro volador (*Pteropus vampyrus*) (Moros-Nicolás et al., 2018) *OVGP1* es un pseudogén. Estos resultados hacen que algunos autores concluyan que *OVGP1* es un gen prescindible para la fertilidad. Sin embargo, *Ovgp1* de ratón es peculiar ya que su expresión predomina en la región de la ampolla y la mayor parte de la proteína oviductina secretada pasa al espacio perivitelino del óvulo, quedando poca cantidad de la proteína unida a la ZP del óvulo en esta especie (Kapur y Johnson, 1986; Lyng y Shur, 2009). Por el contrario, la interacción de oviductina con la ZP parece tener un papel importante en otras especies como en el hámster, donde el uso de un anticuerpo monoclonal contra oviductina inhibe la unión espermatozoide-ZP (Sakai et al., 1988; Yang et al., 2015) o el conejo donde la presencia de un polimorfismo en el exón 11 y un microsatélite situado en la región promotora de *OVPG1* mostraron una asociación favorable con el tamaño de la camada, el número de crías nacidas vivas, el número de embriones implantados, la supervivencia embrionaria, la supervivencia fetal y la supervivencia prenatal (Merchán et al., 2007; Merchán et al., 2009; García et al., 2010).

Bajo la premisa de estos antecedentes, el principal propósito científico de esta Tesis Doctoral es comprobar qué papel desempeña la proteína oviductina en la modulación de la fecundación y en el desarrollo embrionario temprano, usando como modelos animales KO las especies hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) y conejo común o europeo (*Oryctolagus cuniculus*).

Mediante el empleo de la tecnología CRISPR-Cas9 se generaron animales KO para *OVGP1* de ambas especies. Se emplearon dichas especies por presentar las siguientes características: oviductina tiene afinidad por la ZP del óvulo, estudios previos sugieren que la oviductina puede tener un papel reproductivo importante (Sakai et al., 1988; Yang et al., 2015; Merchán et al., 2007; García et al., 2010), son de fácil manejo reproductivo y presentan una ZP compuesta por cuatro proteínas ZPs (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) (Jiménez-Movilla et al., 2009; Izquierdo-Rico et al., 2009; Stetson et al., 2012). Esta composición de la ZP las hace más adecuadas para trasladar los resultados a otras especies como la humana. La introducción de la tecnología CRISPR-Cas9 es de gran interés porque nos proporciona una herramienta muy poderosa para abordar cuestiones científicas en modelos animales diferentes al ratón.

Otro objetivo del presente estudio en relación con el gen *Ovgp1* es el análisis de la evolución molecular del mismo en varias especies enmarcadas en el seno de la subfamilia *Murinae*. Dentro de esta subfamilia encontramos a la rata donde *OVGP1* es un pseudogén, no existiendo una proteína funcional (Tian et al., 2009) y al ratón en el cual *Ovgp1* se expresa generando una proteína funcional (Kapur y Johnson, 1986; Lyng y Shur, 2009). El análisis de la evolución molecular del gen *Ovgp1* permitirá determinar en qué punto de la evolución, tras la divergencia de la rata y el ratón, se ha perdido su expresión y si el proceso de pseudogenización afecta a otras especies enmarcadas dentro de la subfamilia *Murinae*.

Otro aspecto estudiado en esta Tesis Doctoral está relacionado con el bloqueo de la polispermia. La poliploidía (existencia de más de dos juegos de cromosomas) es una condición indeseable que provoca el fracaso del desarrollo embrionario. Para evitarla, el bloqueo de la polispermia impide la fecundación del óvulo por más de un espermatozoide. Dependiendo de la especie de mamífero, el bloqueo de la polispermia se produce a diferentes niveles: el oolema, la ZP o ambos (Sun, 2003; Gardner y Evans,

## *I. Introducción*

2005; Evans, 2020; Fahrenkamp et al., 2020; Yanagimachi, 2022). Además, algunos factores, como la proteína oviductina y algunos glicosaminoglicanos sulfatados son también necesarios para controlar la polispermia (Coy et al., 2008; Coy y Avilés, 2010). En especies como el perro, el topillo de campo y la oveja, el bloqueo de la polispermia tiene lugar a nivel de la ZP (Braden y Austin, 1954; Yanagimachi, 1994). Sin embargo, en la mayoría de las especies (ratón, rata, cobaya, vaca, cerdo, gato, hurón y mujer) este bloqueo se produce a ambos niveles (Austin y Braden, 1953; Braden y Austin, 1954; Hunter, 1991; Horvath et al., 1993; Miller et al., 1993; Yanagimachi, 1994; Sengoku et al., 1995; Hunter et al., 1998; Patrat et al., 2006). En el caso de especies como el conejo, el topo, la pica y el topo de bolsillo, el bloqueo de la polispermia se produce a nivel del oolema (Austin y Braden, 1953; Braden y Austin, 1954; Overstreet y Bedford, 1974; Oh y Brackett, 1975; Yanagimachi, 1994; Gardner y Evans, 2005). El bloqueo de la polispermia a nivel del oolema parece producirse a nivel de la unión espermatozoide-óvulo, con la participación de JUNO (IZUMO1R) en el óvulo e IZUMO1 en el espermatozoide (Inoue et al., 2005; Bianchi et al., 2014). Mientras que, en el bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP, las proteínas ovastacina y ZP2 desempeñan un papel crucial (Burkart et al., 2012). El propósito científico del desarrollo de la presente Tesis Doctoral asociado al gen *ASTL* es demostrar mediante análisis genómico si existe pseudogenización de dicho gen que codifica para ovastacina en lagomorfos, lo cual explicaría por qué el bloqueo de la polispermia no se produce a nivel de la ZP en estas especies.



## **II. OBJETIVOS**



Por lo expuesto anteriormente, los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Determinación del papel en la fecundación y el desarrollo embrionario temprano de la proteína oviductina en hámster dorado mediante la generación de animales KO para *OVGP1* con la tecnología de edición genética CRISPR-Cas9.
2. Determinación del papel en la fecundación y el desarrollo embrionario temprano de la glicoproteína oviductal 1 en conejo mediante la generación de animales KO para *OVGP1* con la tecnología de edición genética CRISPR-Cas9.
3. Análisis de la evolución del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae*.
4. Estudio del gen *ASTL* en lagomorfos mediante técnicas de biología molecular y su implicación en el bloqueo de la polispermia.



# **III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

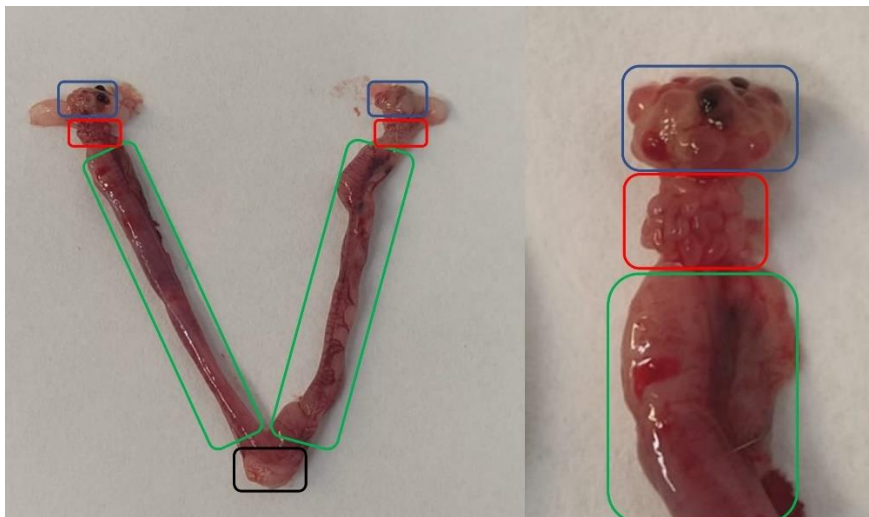


## 1. Sistema reproductor

### 1.1 Hámster

En la hembra de hámster, la madurez reproductiva suele alcanzarse entre las 8-10 semanas de edad, cuando el peso corporal medio es de 90-100 g. La apertura vaginal se produce alrededor del día 10 de vida. Esto difiere de otros roedores de laboratorio en los que la apertura vaginal y la madurez sexual se producen al mismo tiempo (Diamond y Yanagimachi, 1970; Fitzgerald y Zucker, 1976).

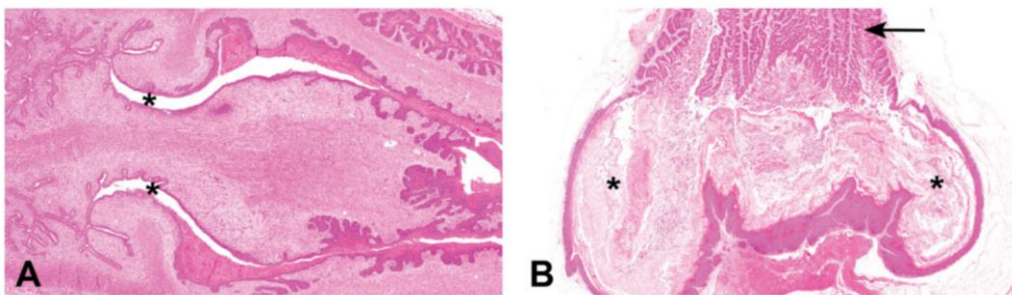
En lo referente a la anatomía del aparato reproductor de la hembra, los ovarios están ubicados dorsolateralmente respecto a los riñones, tienen forma ovalada y una longitud de 3-4 mm. Cada ovario está completamente encerrado en una bursa dentro de la cual se abre el orificio infundibular del oviducto, conducto tortuoso de unos 40 mm de longitud en esta especie (Battalia y Yanagimachi, 1979). Presenta dos cuernos uterinos de aproximadamente 20 mm de largo que conducen al cuello uterino de 7-8 mm de longitud y 2-3 mm de diámetro que desemboca en la vagina (**Figura 1**). Finalmente, en la parte externa del aparato reproductor encontramos la vulva (Bivin et al., 1987; Chanut y Williams, 2016).



**Figura 1.** Aparato reproductor de la hembra de hámster dorado. En la imagen se muestran ambos ovarios (recuadrados en azul) seguidos de los oviductos (recuadrados en rojo), cada uno de los cuales conduce a un cuerno uterino (recuadrados en verde) y ambos cuernos desembocan en el cuello uterino (recuadrado en negro).

### III. Revisión bibliográfica

Cabe destacar que en la parte inferior de la vagina del hámster existen un par de bolsas que sobresalen de las paredes laterales. Estas bolsas se extienden caudal y lateroventralmente terminando cerca del orificio vaginal (**Figura 2**). Las bolsas vaginales son una característica única del tracto reproductivo del hámster y contienen queratina y otros desechos celulares generados durante todo el ciclo estral (Chanut y Williams, 2016). Esta característica anatómica de la parte inferior de la vagina del hámster conlleva a que la determinación de la fase del ciclo estral mediante la realización de un único frotis vaginal aislado no sea fiable. La acumulación en dichas bolsas de desechos celulares de fases anteriores dificulta la evaluación del frotis. Sin embargo, la realización de lavados vaginales diarios evita la acumulación de estos desechos y los frotis obtenidos reflejan más fielmente la fase del ciclo estral (Bivin et al., 1987).



**Figura 2.** Características histológicas del cérvix y la vagina de la hembra de hámster dorado. (A) Cérvix superior. Se visualizan los dos canales (\*), cada uno de los cuales conduce a uno de los dos cuernos uterinos. (B) Vagina inferior, se observan las bolsas en la pared lateral (\*). En el interior de las bolsas se evidencia la acumulación de restos de queratina. También se observa el aspecto histológico de la vagina superior (flecha), completamente diferente al de la vagina inferior. Figura tomada de Chanut y Williams, 2016.

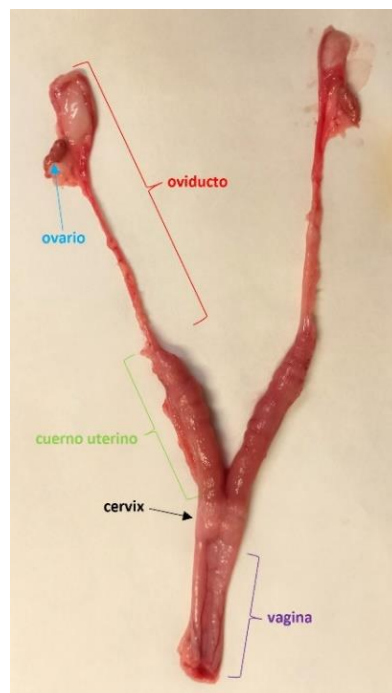
## 1.2 Conejo

En la coneja la pubertad aparece a los 3,5-4 meses de edad, cuando alcanza el 70-75% del peso adulto. Siendo preferible esperar a los 4,5 meses de vida para comenzar la reproducción (Scapinello, 2014; Vicente et al., 2014).

A nivel anatómico el aparato reproductor de la coneja comprende: dos ovarios, cada uno rodeado por un pliegue del peritoneo conocido como bolsa ovárica; dos oviductos; dos úteros; vagina y vulva. Los ovarios presentan forma alargada y elíptica, con una superficie irregular, el peso oscila entre 200-800 mg y la longitud entre 1-1,5 cm



(Scapinello, 2014). Los oviductos están situados junto al ovario y tienen una longitud aproximada de 8-13,5 cm (McComb y Gomel, 1979). La coneja presenta úteros dobles, completamente separados entre sí de 5-7 cm de longitud, con dos cuernos uterinos de grandes dimensiones y un cérvix diminuto que se abre a la vagina (**Figura 3**). La vagina es un conducto de 6-10 cm de longitud, en la zona ventral de su tercio final se sitúa la apertura de la uretra. La localización de la uretra es importante para evitarla durante las prácticas de inseminación artificial (IA). La vulva representa la porción final y externa del aparato reproductor de la coneja (Scapinello, 2014).



**Figura 3.** Aparato reproductor de la coneja. En la imagen se muestra el ovario (en azul) seguido del oviducto (en rojo), el cual continúa con el cuerno uterino (en verde). Este último se comunica con la vagina (en morado) a través del cérvix (en negro).

## 2. Características y manejo reproductivo

### 2.1 Hámster

La hembra de hámster es poliéstrica estacional de ovulación espontánea. Su ciclo estral tiene una duración de 4 días y comprende 4 etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. En la **Tabla 1** se describe la duración y los diferentes tipos celulares presentes en una citología vaginal exfoliativa en cada una de las fases (**Figura 4**) (Goldman et al.,

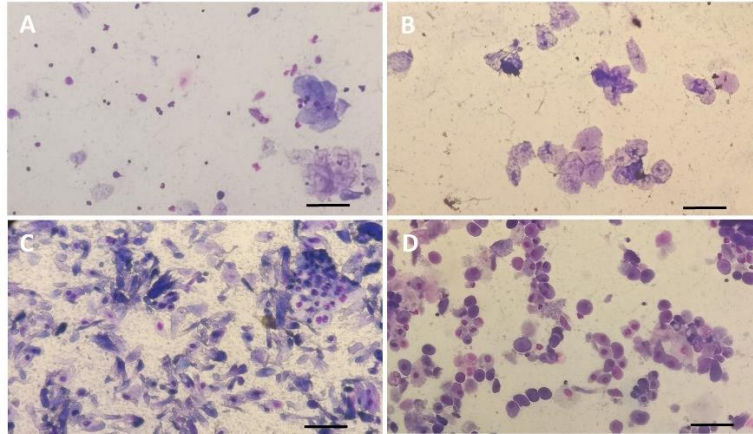
### III. Revisión bibliográfica

2007). Su ciclo reproductivo es sensible al fotoperiodo, cesando su actividad reproductiva durante las estaciones de luz corta. Este cese está mediado por la producción y secreción de melatonina por parte de la glándula pineal (Newcomer et al., 1987). Bajo condiciones experimentales controladas con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, los ciclos estrales son continuos durante todo el año, tendiendo a estros persistentes a partir de los 10 meses de edad (Vargas et al., 2018). En el hámster, una vez que se ha producido la ovulación, el cuerpo lúteo (CL) se organiza muy rápidamente y es el encargado de producir progesterona (P4), responsable del mantenimiento de la gestación en el caso de que haya habido fecundación. A diferencia de especies policíclicas como la rata y el ratón, donde se pueden apreciar varios CLs simultáneos provenientes de ciclos anteriores, en el ovario del hámster se produce un desarrollo y regresión rápidos de los CLs durante un solo ciclo, lo que conlleva a que nunca haya CLs de diferentes ciclos visibles histológicamente en el ovario (Greenwald, 1985).

Otra característica del hámster es la presencia de una copiosa secreción vaginal al día siguiente de la ovulación, en la fase de metaestro. Esta característica puede utilizarse como herramienta para determinar la etapa del ciclo estral (Lisk, 1985).

**Tabla 1.** Ciclo estral de la hembra de hámster dorado. Etapas, duración y tipo de células vaginales de descamación presentes en una citología vaginal exfoliativa en las diferentes fases del ciclo estral. Tabla modificada de Chanut y Williams, 2016.

<b>Etapa</b>	<b>Duración (horas)</b>	<b>Tipos de células vaginales presentes en la citología exfoliativa</b>
Proestro	3	Células epiteliales y pocos leucocitos
Estro	12	Células estratificadas y escasas células epiteliales
Metaestro	4	Escasas células estratificadas y células epiteliales
Diestro	76	Abundantes leucocitos y pocas células epiteliales



**Figura 4.** Citología vaginal exfoliativa en cada una de las fases del ciclo estral en la hembra de hámster dorado. Fase de proestro (A), estro (B), metaestro (C) y diestro (D). Barra: 100  $\mu$ m.

La gestación tiene una duración de 16 días pudiendo producirse pseudogestación con persistencia de la etapa de diestro durante 12 días aproximadamente (Bivin et al., 1987). Se puede realizar diagnóstico de gestación a partir del día 7 de apareamiento, donde por palpación abdominal se localizarán en ambos lados de la línea media los úteros con los embriones o fetos en crecimiento. De 2 a 3 días antes del parto la hembra gestante deberá ser apartada a una jaula individual con material para hacer el nido (Vargas et al., 2018).

El destete puede realizarse hacia los 21 días de vida, aunque podrá variar dependiendo de la condición corporal de las crías, las cuales deben tener un peso de 10 a 12 g. Las hembras suelen acabar con bajo peso al destete, reanudando su ciclo estral a los pocos días (Vargas et al., 2018).

## 2.2 Conejo

En condiciones naturales, la temporada reproductiva de los conejos comprende desde el inicio de la primavera hasta el otoño, presentando las mayores tasas de gestación durante la primavera. Bajo condiciones experimentalmente controladas, la temporada reproductiva se mantiene durante todo el año. Se trata de una hembra poliéstrica estacional de ovulación inducida por la monta (Scapinello, 2014), la cual se desencadena 11-12 horas después del apareamiento (Bakker y Baum, 2000). Por

### III. Revisión bibliográfica

consiguiente, el ciclo estral de la coneja solo es completo cuando se produce coito, el resto de los ciclos son incompletos.

El ciclo estral en esta especie es extremadamente sensible a factores externos, pudiendo desencadenarse la ovulación por estímulos diferentes a la monta. Entre estos posibles estímulos estarían: cambios ambientales (luz y temperatura), alimentación, manejo y procesos de bioestimulación como el alojamiento comunal o la aplicación de tratamientos hormonales. Estos factores se presentan como estímulos que llegan al hipotálamo desencadenando la síntesis de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que estimula a la hipófisis a producir hormona folículo estimulante (FSH) y en mayor escala hormona luteinizante (LH) que desencadenan la ovulación sin monta (Beyer et al., 2007; Scapinello, 2014). Este aspecto fisiológico exige que las hembras sean mantenidas en jaulas separadas, evitando así la presencia de estímulos generados por otros animales que provoquen la ovulación, lo cual desencadenaría un periodo denominado pseudogestación o falsa gestación de 16-18 días de duración (Vicente et al., 2014).

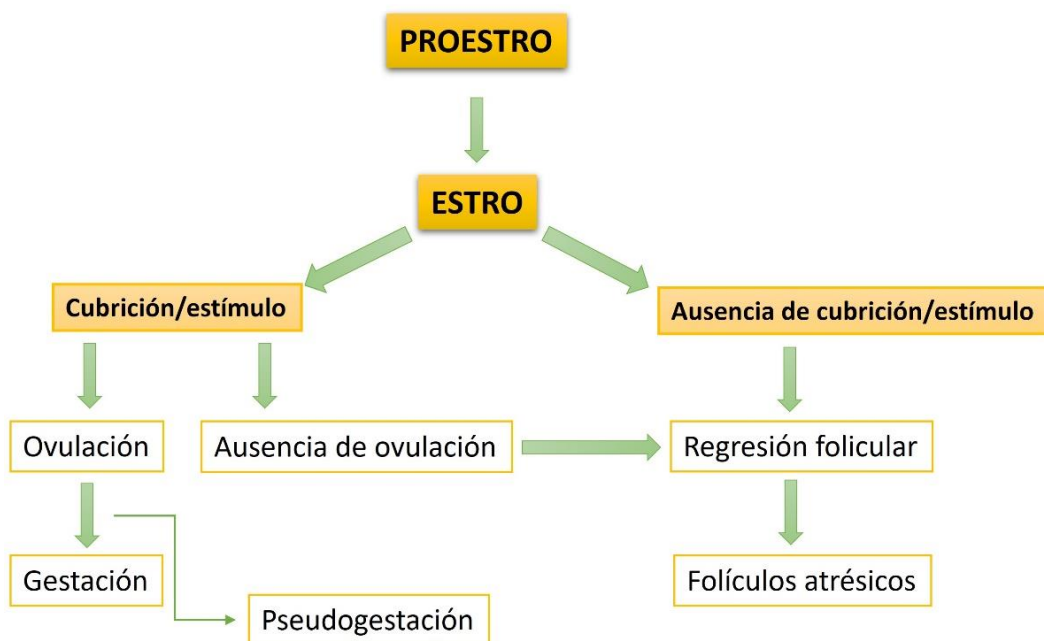
Existe controversia acerca del comportamiento de la coneja a lo largo del ciclo estral. Algunos autores afirman que la coneja se presenta receptiva sexualmente al macho y con una tasa de fecundación adecuada de manera constante, es decir, en fase de estro persistente. Sin embargo, la mayoría de los investigadores afirman que la coneja muestra un ritmo cíclico en la receptividad sexual con variaciones en la tasa de fecundación (**Tabla 2**) (Scapinello., 2014).

**Tabla 2.** Variabilidad de la tasa de fecundación, aceptación de la monta y coloración de la vulva en la coneja durante el ciclo estral. Tabla confeccionada a partir de los datos de Scapinello, 2014.

Días del ciclo	1-4	5-9	10-11	12-16
Aceptación de la monta	19,5%	63%	97,5%	32,2%
Tasa de fecundación	0%	20%	80-90%	50%
Coloración de la vulva	Blanca	Rosada	Roja	Violácea

Este ritmo cíclico es debido a que se produce un desarrollo folicular en oleadas, con la generación de 5-10 folículos en cada ovario. Cuando los folículos alcanzan la

madurez producen estrógenos durante 12-14 días, responsables del comportamiento de celo y la receptividad sexual de la hembra. Si no se produce la ovulación durante este periodo, los folículos degeneran disminuyendo el nivel de estrógenos y por consiguiente la receptividad sexual por parte de la hembra. Tras 4-7 días se desarrolla una nueva oleada folicular volviendo a ser receptiva sexualmente al macho. Por tanto, la coneja tiene un ciclo estral de 16-18 días con unos 12-14 días de receptividad sexual (fase de estro), seguido de un periodo de no receptividad sexual de 2-4 días, fase de proestro (Patton, 1994; Scapinello., 2014). La vulva de la coneja presenta cambios físicos vinculados a la variación en los niveles de estrógenos durante el ciclo estral. A medida que se aproxima el estro la vulva se va hinchando, humedeciendo y enrojeciendo hasta alcanzar una tonalidad púrpura al final del periodo de receptividad sexual. El momento idóneo para la monta es cuando la vulva presenta tonalidad roja. Si la coneja ovula por monta u otro factor desencadenante, la vulva vuelve a presentar un color rosa claro tras 24 horas (Scapinello, 2014; Harcourt-Brown, 2017). Una vez se ha producido la ovulación, el folículo se convierte en una nueva estructura endocrina denominada CL, que pasa a producir la hormona P4. Esta hormona es la encargada del mantenimiento de la gestación, en el caso de haberse producido fecundación, o del proceso de pseudogestación en su defecto (**Figura 5**).



**Figura 5.** Ciclo estral en la coneja. Fases del ciclo estral en base a la presencia o no de monta, ovulación y fecundación. Figura modificada de Scapinello, 2014.

### *III. Revisión bibliográfica*

Transcurridos 28 días de gestación se debe colocar el nidal y material para preparar el lecho. Además, en torno a la fecha de parto la coneja deposita dentro del nidal pelos que ella misma arranca de su región ventral y de su papada para proteger a las crías.

El parto tiene lugar 30-32 días posmonta, en función del número de fetos gestados y de la estirpe genética. El diagnóstico de gestación se puede realizar entre el día 10-15 de gestación. El método más seguro y simple es la palpación ventral. Para ello, se realiza la contención de la hembra sujetándola con una mano por las orejas y un pliegue de la piel de la región torácico-cervical, manteniéndola en la jaula o sobre una mesa con la cabeza dirigida hacia el operador. Con la otra mano se hace la palpación en la región inguinal buscando localizar los embriones en el útero, los cuales presentarían un tamaño próximo a 1 cm en ese rango de días (Scapinello, 2014).

El destete es recomendado realizarlo alrededor de los 30-35 días de edad con un peso de las crías de 200-300 g, pudiendo variar según la estirpe. La coneja es capaz de iniciar una nueva gestación con éxito desde el mismo momento del parto y durante toda la etapa de lactación, no siendo por ello necesario esperar al destete para realizar una nueva monta (Fuentes-Paredes et al., 2010).

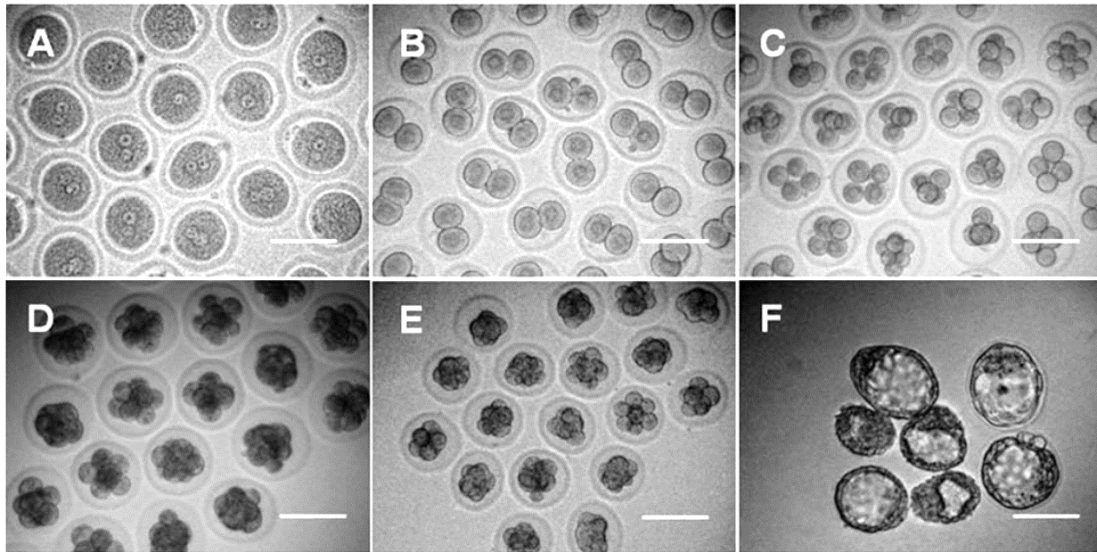
## **3. Fecundación y desarrollo embrionario**

### **3.1 Hámster**

En el hámster, los espermatozoides se depositan en el útero durante la cópula (Smith y Yanagimachi, 1989). La ovulación en la hembra se suele producir aproximadamente a las 8 horas posmonta y la fecundación tiene lugar en la ampolla oviductal 2 horas después de la ovulación, es decir, unas 10 horas después de la monta (Bavister et al., 1983).

Tras la fecundación comienza el proceso de segmentación. A las 6-10 horas se observan los pronúcleos. La primera división embrionaria (2 células) se produce a las 20-24 horas, momento de la activación del genoma embrionario en hámster (Seshagiri

et al., 1992) y a las 44-48 horas la segunda división (4 células). La siguiente división embrionaria (8 células) tiene lugar a las 56-58 horas, produciéndose la entrada al útero en torno a las 62 horas. Una vez en el útero, en torno a las 65 horas ocurre el paso a mórula y a las 70-74 horas se forma el blastocisto temprano (Austin, 1956; Sato y Yanagimachi, 1972; Bavister et al., 1983; McKiernan y Bavister, 1994; Trejo et al., 2005; Seshagiri y Vani, 2019) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Desarrollo embrionario *in vivo* en hámster dorado. A) Estadio de cigoto (se observan los dos pronúcleos en cada cigoto). B) Estadio de dos células. C) Estadio de cuatro células. D) Estadio de ocho células. E) Estadio de ocho células y mórula. F) Estadio de blastocisto. Barra: 100  $\mu$ m. Figura tomada de Pan et al., 2014.

Tras la formación del blastocisto, la eclosión de la ZP es el siguiente paso fundamental para lograr la implantación. En esta especie, la eclosión se rige por la interacción de varios reguladores celulares (Gonzales et al., 1996) y moleculares (Seshagiri et al., 2002, 2009; Roy y Seshagiri, 2013).

La implantación del blastocisto comienza en torno a las 77 horas de la fecundación completándose a las 122 horas (Austin et al., 1956; Sato y Yanagimachi, 1972; Bavister et al., 1983; Reese et al., 2008). Los embriones de hámster en las primeras etapas de implantación no pueden ser expulsados mediante lavado uterino, lo que sugiere una firme adhesión en comparación con los de ratón y rata (Reese et al., 2008). La progesterona ovárica es requerida para la receptividad del útero, implantación y

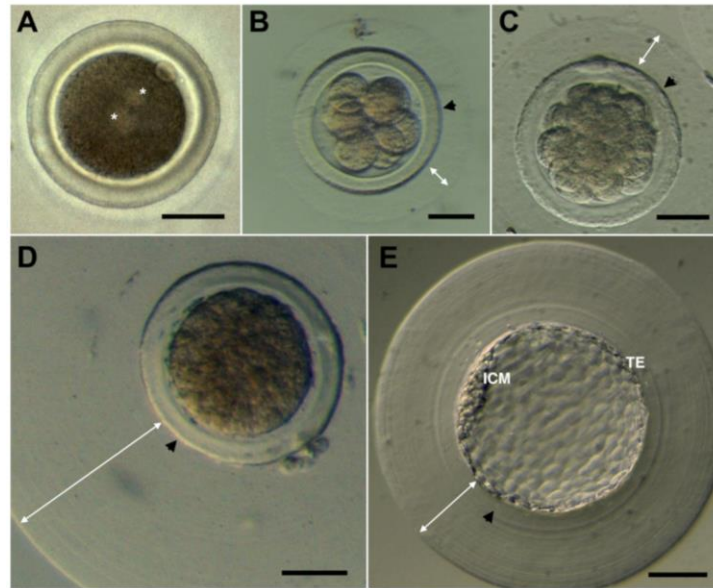
mantenimiento de la gestación temprana en todos los mamíferos. Sin embargo, mientras que en ratón (McCormack y Greenwald, 1974; Paria et al., 1993) y rata (Psychoyos, 1961) la progesterona maternal y los estrógenos son críticos para la implantación, en la mayoría de las especies incluido el hámster (Harper et al., 1969; Greenwald, 1985), la cobaya (Deanesly, 1960), el conejo (George y Wilson, 1978) y el cerdo (Perry et al., 1973) la implantación puede ocurrir con la presencia solo de progesterona, los estrógenos ováricos no son necesarios. En torno al día 8,5 poscoito se forma la placenta corioalantoidea y hemicorial (Butler, 1970).

### **3.2 Conejo**

En el conejo, los espermatozoides se depositan en la zona superior de la vagina durante la cópula (Overstreet y Cooper, 1978). La ovulación, inducida por la monta en esta especie, ocurre 11-12 horas después del apareamiento. La fecundación se produce en la ampolla oviductal 2 horas después de la ovulación, es decir aproximadamente 14 horas después de la monta o IA (Bakker y Baum, 2000).

Durante el paso por el oviducto se va depositando alrededor de la ZP del embrión una cubierta de mucina derivada de las secreciones oviductales. La secuencia del proceso de segmentación en función de las horas posmonta es la siguiente: a las 14-16 horas se produce la expulsión del segundo corpúsculo polar, a las 21-24 horas tiene lugar la primera división embrionaria (2 células), a las 48 horas hay 8-16 células, a las 60 horas se encuentran en estadio de mórula y a las 72 horas se constituye el blastocisto temprano (**Figura 7**) (Vicente et al., 2014). En esta especie la activación del genoma embrionario ocurre de una forma muy progresiva, adquiriendo especial importancia para promover el desarrollo del embrión a partir del estadio de 8 a 16 células (Léandri et al., 2009).

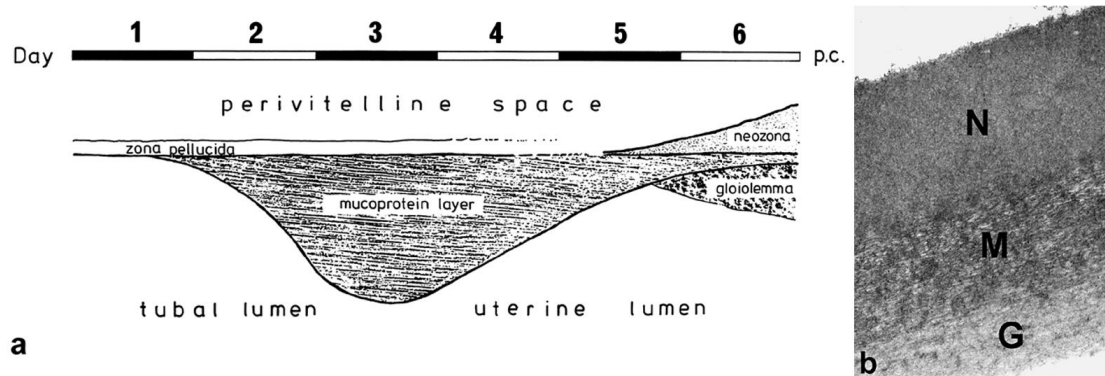




**Figura 7.** Desarrollo embrionario en conejo. A) Estadio de cigoto. B) Estadio de ocho células. C) Estadio de mórula temprana. D) Estadio de mórula compacta. E) Estadio de blastocisto. Los asteriscos indican los dos pronúcleos en estadio de cigoto. Las flechas negras indican la ZP. Las flechas blancas señalan el grosor de la capa de mucina. Se muestra la masa celular interna (ICM) y el trofoectodermo (TE). Barra: 50  $\mu$ m. Figura tomada de García-Domínguez et al., 2019.

Una vez que el blastocisto ha alcanzado el útero se inicia una etapa de intensa proliferación y diferenciación del embrioblasto y el trofoblasto. En este período las cubiertas embrionarias sufren importantes modificaciones, consecuencia tanto del proceso de expansión del blastocisto como de la actividad enzimática a la que se ven sometidas. La ZP y la cubierta de mucina son progresivamente transformadas y reemplazadas. De esta forma, el blastocisto presenta finalmente tres capas de distinto origen. De más externa a más interna encontramos: el gliolema, que parece derivar de las secreciones uterinas; la capa media, que parece representar restos de la capa de mucina; y la neozona, que podría estar formada por secreciones del trofoblasto o por secreciones uterinas que han difundido a través de las otras capas (**Figura 8**). Las principales funciones que se han postulado para estas capas son facilitar la separación de los blastocistos en el cuerno uterino en el momento de la implantación e inmovilizar y orientar a éstos en los lugares de implantación (Denker, 2000). Tras la llegada al útero y hasta el quinto día, los embriones colonizan progresivamente los cuernos uterinos. No se producen migraciones de los embriones de un cuerno a otro debido a que los cuernos uterinos en la coneja están completamente separados entre sí. Entre los días 6-7 los blastocistos incrementan su diámetro de 1 a 5 mm y se observa una distribución

equidistante entre ellos a lo largo del cuerno uterino. La expansión del blastocisto no solo provoca dicha separación, sino que determina finalmente su inmovilización quedando establecida la posición definitiva que ocupará cada embrión en el cuerno uterino durante la gestación. Entre los días 10-17 se desarrolla la placenta de tipo corioalantoidea y hemocorial (Hoffman et al., 1998; Vicente et al., 2014).



**Figura 8.** a) Esquema de la transformación y reemplazo de La ZP y la cubierta de mucina del embrión de conejo. b) Microscopía electrónica de transmisión de las capas del blastocisto a los 6,5 días posmonta. Se muestra la neozona (N), la capa de mucoproteína (M), y el gliolema (G). Aumento 11.500x. Figura modificada de Denker, 2000.

## 4. Oviducto

Los oviductos, denominados trompas de Falopio en la especie humana, son dos órganos tubulares intraperitoneales que por un extremo se abren hacia la cavidad abdominal a través del infundíbulo, en conexión íntima con el ovario, y por el otro extremo se comunican con la luz uterina mediante un segmento estrecho llamado unión útero-tubárica. Durante mucho tiempo han sido considerados como simples conductos de transporte para embriones y gametos. Sin embargo, estudios posteriores han confirmado que el oviducto y en particular el FO crean un microambiente que interviene en importantes procesos claves para la fecundación y la correcta fisiología de los gametos y del embrión: maduración de gametos, selección espermática, capacitación y desarrollo embrionario temprano (Killian, 2004; Holt y Fazeli, 2010; Coy et al., 2012; Hunter, 2012; Li y Winuthayanon, 2017; Pérez-Cerezales et al., 2018; González-Brusi et al., 2020).

## 4.1 Anatomía

A nivel anatómico se han diferenciado cuatro regiones funcionales en el oviducto de los mamíferos: infundíbulo, ampolla, istmo y unión útero-tubárica (Leese, 1988; Menezo y Guerin, 1997). Sin embargo, el número de regiones, los nombres y los límites de las regiones, así como la longitud total del oviducto varía considerablemente entre las especies animales (Abe y Oikawa, 1991; Yániz et al., 2000; Hwang y Song, 2004; Yániz et al., 2006; Pedrero-Badillo et al., 2013). En el caso de la coneja el oviducto tiene una longitud total de 8-13,5 cm (McComb y Gomel, 1979) y en el hámster 4 cm aproximadamente (Battalia y Yanagimachi, 1979). Dentro de las cuatro regiones que constituyen el oviducto de los mamíferos el infundíbulo es la región más próxima al ovario, presenta forma de embudo y en su extremo se encuentran las fimbrias que son prolongaciones que participan principalmente en el transporte de los óvulos desde el ovario hasta el interior del oviducto tras la ovulación (Suarez y Wolfner, 2021). El infundíbulo se continúa con la ampolla, parte del oviducto de mayor diámetro y lugar donde se produce la fecundación en la mayoría de los mamíferos. Esta región se estrecha hasta el istmo, región donde se forma el reservorio espermático en algunas especies (Suarez, 2016) y finaliza en la unión útero-tubárica, porción intramural en la mujer, que se abre a la cavidad uterina.

## 4.2 Histología

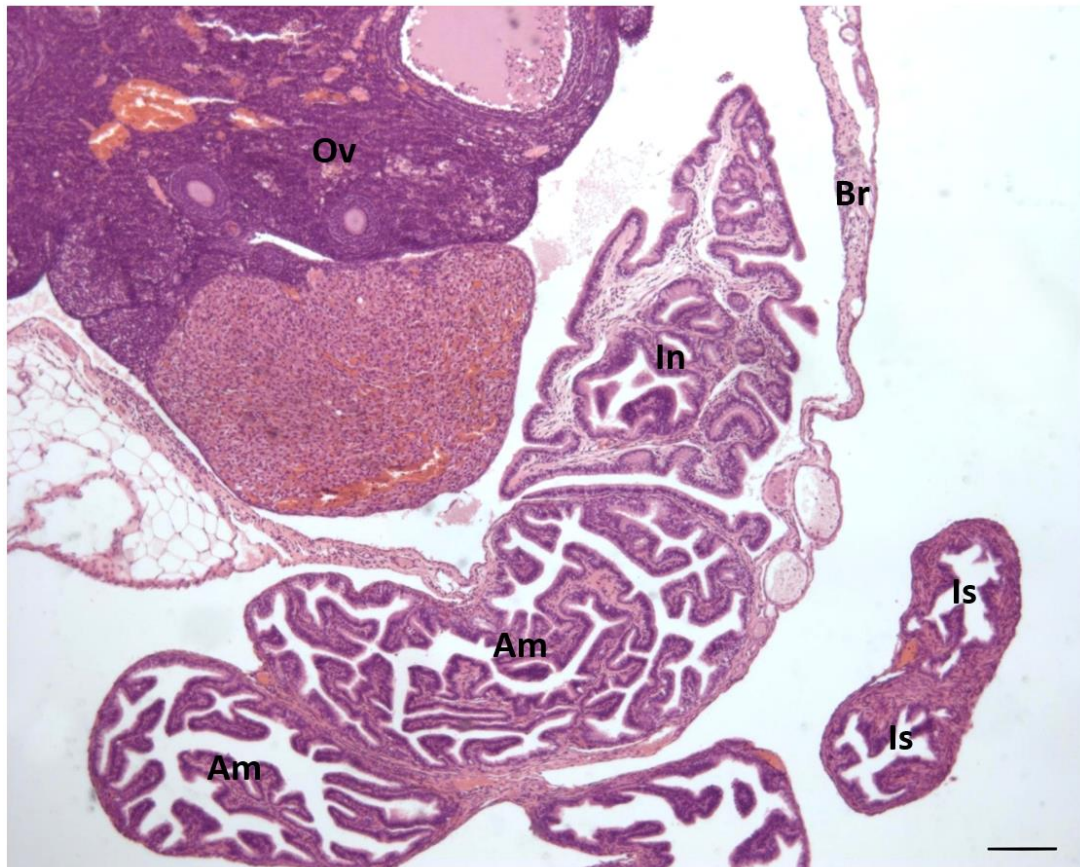
### 4.2.1 Capas del oviducto

El principal criterio para diferenciar las regiones del oviducto se basa en sus características histológicas. Así, el oviducto está formado por varias capas que comprenden de más externa a más interna: una capa serosa, una capa muscular y una capa mucosa.

La capa serosa es la más externa de todas ellas, está formada por un mesotelio y una delgada capa de tejido conjuntivo. La capa muscular está compuesta a su vez por dos capas, una capa circular interna más gruesa y una capa longitudinal externa más delgada. Finalmente, la capa mucosa forma pliegues y posee un epitelio de

revestimiento cilíndrico simple compuesto por células secretoras y ciliadas y una lámina propia de tejido conjuntivo laxo. Intercalado entre los pliegues hay un complejo sistema de criptas, bolsillos y surcos (Abe y Oikawa, 1991; Hunter et al., 1991; Pedrero-Badillo et al., 2013; Coy et al., 2018).

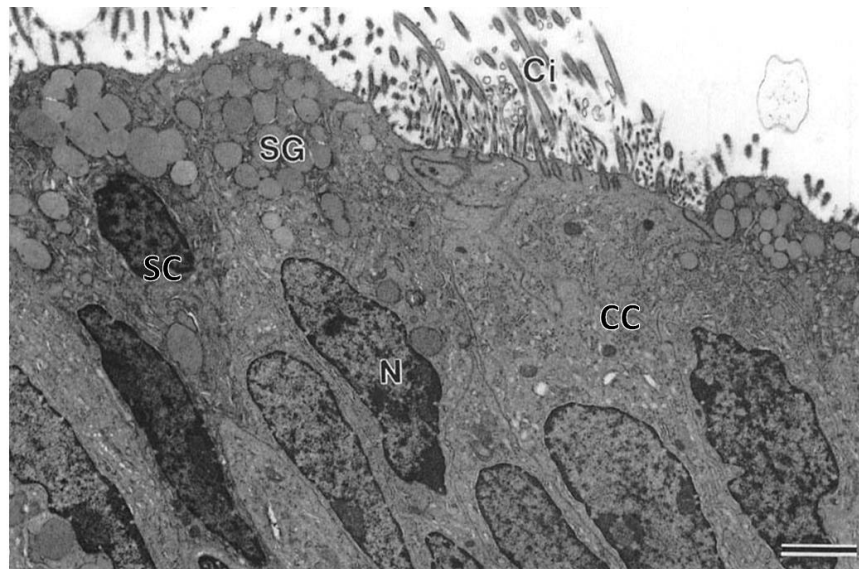
Cada una de las cuatro regiones que constituyen el oviducto en los mamíferos presenta características histológicas particulares que permiten su diferenciación. De esta forma, podemos observar que desde el infundíbulo hasta la unión útero-tubárica el grosor de la capa muscular aumenta mientras que el número, longitud y complejidad de los pliegues de la capa mucosa disminuye (**Figura 9**) (Abe, 1996; Pedrero-Badillo et al., 2013).



**Figura 9.** Fotografía de un corte histológico de ovario y oviducto de hámster dorado teñido con hematoxilina-eosina. Se observa el ovario (Ov) rodeado por una bursa (Br) e íntimamente ligado a la apertura infundibular/fimbrias del oviducto (In). También se muestran las regiones de la ampolla (Am) y del istmo (Is) del oviducto, apreciándose la variación del número, longitud y complejidad de los pliegues del epitelio de la capa mucosa entre dichas regiones. Barra: 200  $\mu$ m.

#### 4.2.2 Células del epitelio oviductal

En el epitelio cilíndrico simple del oviducto de los mamíferos están presentes dos tipos de células principalmente, las células secretoras no ciliadas y las células ciliadas (Umezu y Tomooka, 2004; Yamanouchi et al., 2010). Las células secretoras del oviducto tienen forma cilíndrica, un citoplasma eosinófilo y un núcleo grande, basófilo y esférico. Estas células presentan microvellosidades en su extremo apical, sintetizan proteínas activamente y poseen numerosos gránulos de secreción positivos al ácido peryódico de Schiff (PAS) (Johnson y Foley, 1974). Además, las células secretoras son las encargadas del mantenimiento del epitelio oviductal, dividiéndose para dar lugar a nuevas células secretoras y diferenciándose en células ciliadas (Ghosh et al., 2017). Las células ciliadas tienen forma cilíndrica y poseen cilios que se mueven en dirección al útero, participando en el transporte de óvulos y embriones en dicha dirección (**Figura 10**) (Abe y Oikawa, 1993). En referencia al transporte oviductal cabe citar al gen receptor D1 acoplado a la proteína G (*Adgrd1*). Este gen se expresa en la membrana plasmática de las células secretoras y ciliadas del epitelio oviductal, siendo las ratonas KO para *Adgrd1* estériles debido a una retención de los embriones en la región de la ampolla (Bianchi et al., 2021). Estos resultados demuestran que estas células desempeñan un papel crucial en el transporte del embrión a nivel oviductal.



**Figura 10.** Fotografía electrónica del epitelio oviductal de hámster dorado. Se muestra: célula secretora (SC), célula ciliada (CC), cilios (Ci), núcleo (N) y gránulos secretorios (SG). Barra: 2  $\mu$ m. Figura modificada de Abe y Oikawa, 1993.

### *III. Revisión bibliográfica*

La distribución de los dos tipos celulares varía tanto entre las diferentes regiones del oviducto como dentro de los pliegues que forman la capa mucosa. Las células secretoras son más abundantes en la región del istmo y las células ciliadas en la ampolla e infundíbulo (Abe y Oikawa, 1991; Coy et al., 2018; Pedrero-Badillo et al., 2013). En particular, en el oviducto del hámster dorado el número de células ciliadas en las fimbrias es muy elevado en comparación con el del resto de regiones, mientras que las células secretoras representan el 65% y 97% de todas las células epiteliales de la ampolla e istmo respectivamente (Abe y Oikawa, 1991; Abe, 1996). En coneja el número de células ciliadas constituye el 65% de todas las células epiteliales de las fimbrias, mientras que en ampolla e istmo hay un predominio claro de las células secretoras (Rumery y Eddy, 1974; Pedrero-Badillo et al., 2013). En cuanto a la distribución dentro de los pliegues, se ha visto en la especie porcina que las células ciliadas son más abundantes a lo largo de las paredes laterales y en la región apical de los pliegues de la mucosa que en la zona basal (Yániz et al., 2006). La distribución de los dos tipos celulares a lo largo del oviducto tiene un significado funcional. Así, las células ciliadas son abundantes en los lugares donde el óvulo ha de ser captado por la superficie oviductal, mientras que las células secretoras predominan donde su secreción es necesaria en la interacción óvulo-espermatozoide y el desarrollo embrionario preimplantacional (Abe y Hoshi, 2008; Yamanouchi et al., 2010).

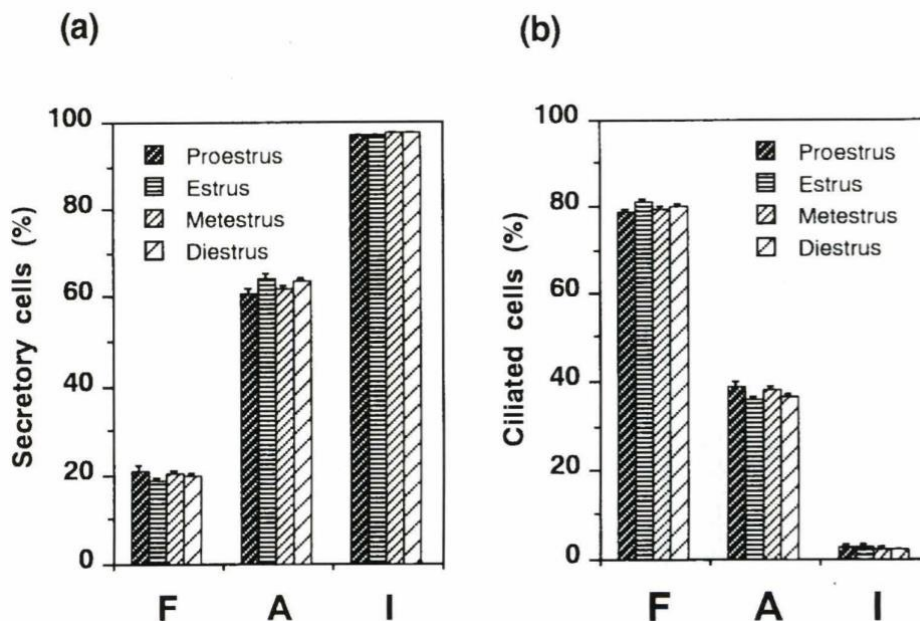
Las células ciliadas desempeñan un papel importante en el transporte de gametos (Odor y Blandau, 1973; Coy et al., 2018). Sin embargo, las células secretoras no ciliadas sintetizan y liberan productos específicos de secreción (Oliphant, 1986; Abe, 1996; Coy et al., 2018; Saint-Dizier et al., 2019). Las secreciones de las células no ciliadas forman el FO junto al trasudado del plasma sanguíneo (Leese, 1988; Leese et al., 2001; Coy et al., 2018; Marins et al., 2022). Algunas de estas proteínas secretadas se asocian a los gametos y al embrión, pudiendo desempeñar un papel importante en los eventos reproductivos (Hunter, 1994; Gandolfi, 1995; Avilés et al., 2015; González-Brusi et al., 2020).

El número relativo de estas células se ha estudiado en una gran variedad de especies durante todo el ciclo estral y bajo diversas condiciones experimentales. En la

mayoría de las especies se han observado cambios en el número relativo de células secretoras y ciliadas a lo largo de las fases del ciclo (Brenner, 1969; Rumery y Eddy, 1974; Verhage et al., 1979, 1990; Odor et al., 1980; Abe y Oikawa, 1989, 1991, 1992, 1993a, b; Abe, 1994; Odor y Augustine, 1995).

Estos cambios cíclicos están bajo la influencia hormonal de los estrógenos y la progesterona que modulan la proporción de células ciliadas y secretoras en el oviducto y, por ende, afectan a la actividad biosintética del mismo (Buhi 2002). Entre las especies en las que se han observado estos cambios destaca la especie humana y algunos primates, formándose un gran número de cilios durante la fase folicular y apareciendo una amplia atrofia y deciliación durante la fase lútea (Brenner, 1969; Verhage et al., 1979; Odor et al., 1980).

En el caso de la coneja también se ha observado esta variación en el número relativo de células secretoras y ciliadas asociada al ciclo estral, mostrando una disminución en el número de cilios durante la fase lútea y un aumento de estos durante la fase estral (Özen et al., 2010). Previamente a este estudio, ya se demostró que las hormonas esteroideas tienen un efecto sobre las células ciliadas y secretoras del epitelio oviductal de la coneja. Las conejas ovariectomizadas muestran una gran reducción en el número de cilios presentes en la superficie del epitelio oviductal, produciéndose una recuperación casi completa tras la administración de estrógenos (Odor y Blandau, 1973; Rumery y Eddy, 1974). Sin embargo, en el caso del hámster dorado la proporción de células secretoras y ciliadas del epitelio oviductal no varía durante el ciclo estral en ninguna región (**Figura 11**) (Abe, 1996). Estos resultados sugieren que los cambios en la proporción de células ciliadas y secretoras en el epitelio oviductal puede estar asociado a la duración del ciclo estral de la especie. Así, especies con un ciclo estral largo muestran cambios más evidentes en comparación con las que poseen un ciclo estral corto (Roberson et al., 2021).



**Figura 11.** Porcentajes medios de células secretoras (a) y ciliadas (b) en las fimbrias/infundíbulo (F), la ampolla (A) y el istmo (I) del oviducto de hámster dorado durante el ciclo estral. Los valores se expresan como media de la media ponderada (N=7). Figura tomada de Abe, 1996.

### 4.3 Fluido oviductal

#### 4.3.1 Formación del fluido oviductal

La formación del FO está regulada hormonalmente (Bishop, 1956; Mastroianni et al., 1961; Hunter et al., 2007; Hunter, 2012). La procedencia de las hormonas involucradas es diversa. Algunas tienen su origen en el fluido peritoneal, como las hormonas procedentes del intestino y mesenterios y las asociadas a depósitos de tejido graso como la leptina. Las células foliculares y el fluido folicular también pueden ser una fuente hormonal que influya sobre el oviducto (Hunter et al., 2007; Hunter, 2012).

Otros elementos reguladores de la formación del FO son los neurotransmisores del sistema nervioso como la adrenalina, la noradrenalina y la acetilcolina. Su influencia puede ser indirecta, disminuyendo o aumentando el aporte sanguíneo mediante vasoconstricción o vasodilatación y por consiguiente afectando a la formación de FO; o directa, siendo responsables de absorción en presencia de noradrenalina y secreción bajo la acción de la acetilcolina (Leese, 1988; Jankovic et al., 2004).



En el caso de la mujer, la principal fuerza motriz implicada en la formación del FO es la secreción transepitelial de iones cloro ( $\text{Cl}^-$ ) al oviducto (Dickens et al., 1995, 1996). Mediante el cultivo *in vitro* de células epiteliales de oviducto de coneja se ha demostrado que la adrenalina favorece el transporte de iones  $\text{Cl}^-$  desde la zona basal a la apical de la célula, mientras que el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) favorece el transporte en sentido contrario produciéndose absorción (Dickens et al., 1993; Leese et al., 2001).

#### **4.3.2 Composición del fluido oviductal**

El FO está formado por componentes transportados pasiva o activamente a través de la barrera epitelial desde la sangre circulante o el tejido intersticial, o bien secretados de *novo* por las células epiteliales del oviducto (Leese, 1988; Leese et al., 2001; Coy et al., 2018; Marins et al., 2022).

Se ha identificado una compleja mezcla de moléculas, desde pequeños metabolitos y hormonas de bajo peso molecular (PM) hasta lípidos, proteínas y glicoproteínas de alto PM (Aguilar y Reyley, 2005; Yu et al., 2019; Saint-Dizier et al., 2019). También pueden estar presentes de manera minoritaria una pequeña fracción proveniente del fluido folicular por la ruptura de los folículos ováricos tras la ovulación, 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; Hunter et al., 2007).

##### **4.3.2.1 Agua y electrolitos**

El componente mayoritario del FO es el agua. Esta es transportada de manera pasiva mediante gradiente osmótico. Los electrolitos presentes en el FO proceden del plasma sanguíneo y son los responsables primarios del pH y de la osmolaridad del FO (Leese y Gray, 1985; Gott et al., 1988; Grippo et al., 1992). Además, algunos de ellos influyen de manera importante en la capacitación y movilidad espermática, la reacción acrosómica (RA), la fecundación y el desarrollo embrionario (Brown et al., 2019; Gafeska et al., 2022).

#### 4.3.2.2 Pequeños metabolitos y carbohidratos

Los aminoácidos (aa) presentes en el FO pueden servir al embrión como precursores de proteínas y ácidos nucleicos; pero también como fuente de energía, señalización de moléculas y osmolitos (Guérin y Ménéz, 1995; Aguilar y Reyley, 2005; Kranc et al., 2018). La importancia de los aa durante el desarrollo embrionario fue ya indicada en 1983 por Bavister y colaboradores, los cuales demostraron que la adición de los aa glutamina, fenilalanina, metionina e isoleucina al medio de cultivo embrionario generaba un incremento del desarrollo desde el estadio de 8 células a blastocisto (Bavister et al., 1983).

Dentro de los aa identificados en el FO de los mamíferos la alanina, la glicina, la glutamina y la lisina son los más abundantes, presentando la glicina un claro predominio en todas las especies estudiadas (Leese et al., 1979; Hugentobler et al., 2007; Li et al., 2007; Leese et al., 2008; Guérin et al., 2012). Un reciente estudio ha demostrado que la glicina regula el desarrollo preimplantacional de cigotos de ratón a través de receptores de glicina. Entre ellos, la subunidad alfa-4 (*Glr4*) y la subunidad  $\beta$  se expresan en el estadio de cigoto, y la carencia de *Glr4* frena el desarrollo embrionario hasta la fase de blastocisto, disminuye el número de células en los blastocistos y reduce el tamaño de la camada (Nishizono et al., 2020). Estos resultados podrían explicar el predominio de la glicina en el FO respecto al resto de aa.

Para producir energía, el embrión temprano utiliza principalmente el metabolismo oxidativo a partir de lactato y piruvato, cambiando progresivamente a un metabolismo glucolítico desde su salida del oviducto (Leese, 2012; González-Fernández et al., 2020; Chen et al., 2022). Asimismo, se ha observado que desde la fase de cigoto hasta la de mórula, los embriones absorben muy poca glucosa dependiendo principalmente del lactato y el piruvato para obtener energía (Leese y Barton, 1984; Gardner et al., 1993; Dean, 2019). El lactato está presente en el FO en concentraciones mucho más elevadas que en el suero (Gardner et al., 1996; Harris et al., 2005; Hugentobler et al., 2008; Dean, 2019), mientras que la glucosa presenta menor concentración en FO que en suero (Gardner y Leese, 1990; Gardner et al., 1996; Dean, 2019). Recientes análisis metabolómicos del FO equino y bovino detectaron un elevado

número de sustratos energéticos adicionales como el mioinositol, el malonato y el succinato (Lamy et al., 2018; González-Fernández et al., 2020).

#### **4.3.2.3 Lípidos**

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para los embriones. Sin embargo, el FO contiene también lípidos incluyendo colesterol, triglicéridos y ácidos grasos (Drews et al., 2018; Banliat et al., 2019). La capacidad de absorción de ácidos grasos por parte del embrión se ha demostrado en varios estudios (Waterman y Wall, 1988; Ashworth et al., 2009; Rodríguez et al., 2018), pudiendo proporcionar una fuente potencial de energía (Sturmey et al., 2009; Sutton-McDowall et al., 2012) y desempeñar funciones clave en la proliferación y diferenciación celular (Ferguson y Leese, 2006).

Estudios previos han demostrado que los ácidos grasos intervienen en la modificación de las propiedades físicas y las funciones de las membranas biológicas, además de tener efectos potenciales sobre la maduración de los ovocitos, el desarrollo y el transporte embrionario (Kane, 1979; Stubbs y Smith, 1984; Warzych y Lipinska, 2020). Así, las dietas enriquecidas con ácidos grasos consumidas en torno al periodo de fecundación y los primeros días de gestación muestran correlación positiva con la tasa de ovulación, el desarrollo y la calidad del embrión (Ashworth et al., 2009; Rodríguez et al., 2018; Hadjadj et al., 2021).

#### **4.3.2.4 Proteínas**

Recientemente, el conocimiento sobre el contenido proteico del FO en los mamíferos ha aumentado considerablemente gracias a la espectrometría de masas (Itze-Mayrhofer y Brem, 2020). Entre las especies analizadas encontramos a la cerda (Georgiou et al., 2005; Mondéjar et al., 2012; Acuña et al., 2017), la coneja (Yu et al., 2016, 2019), la oveja (Soleilhavoup et al., 2016), la perra (Reynaud et al., 2015), la vaca (Pillai et al., 2017; Lamy et al., 2018) y la yegua (Smits et al., 2017; Fernández-Hernández et al., 2021). Las proteínas más abundantes sintetizadas por el oviducto en la especie bovina son: oviductina, proteínas de choque térmico (HSP90B1, HSP90AB1, HSP90AA1, HSPA8, HSPA1B, HSPA5), anexinas (ANXA1, ANXA2, ANXA4 y ANXA5), subunidades de

### *III. Revisión bibliográfica*

tubulina (TUBB5, TUBA4A), complemento C3 y miosinas (MYH9, MYH14) (Lamy et al., 2017). En la coneja, los estudios proteómicos sugieren que las proteínas oviductales mayoritarias en esta especie coinciden con las proteínas mayoritarias detectadas en el oviducto bovino a excepción de MYH14 (Yu et al., 2016, 2019).

La mayoría de las proteínas identificadas en el FO se han clasificado como proteínas citoplasmáticas, mientras que solo una pequeña fracción de las proteínas (13-27%) se han clasificado como secretadas (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, de manera que su detección puede ser debida a la descamación celular y al posible daño celular provocado durante las técnicas de recolección (Saint-Dizier et al., 2019). Sin embargo, el aislamiento de vesículas extracelulares (VE) en el FO muestra un enriquecimiento en muchas proteínas de retículo endoplasmático, citosol o integrales de membrana. Esto implica que una gran cantidad de las proteínas constituyentes del FO son liberadas como parte de estas VE (Al-Dossary et al., 2015; Al-Dossary y Martin-Deleon, 2016; Almiñana et al., 2018). Según el origen de las VE pueden distinguirse dos tipos principales, exosomas y microvesículas. Los exosomas son VE generadas por el endosoma de las células eucariotas que se liberan al medio cuando un cuerpo multivesicular se fusiona con la membrana plasmática. Tienen un tamaño de 25-100 nm y en su interior se han hallado proteínas, ARNs y micro-ARNs (Théry et al., 2002; Valadi et al., 2007; Kalra et al., 2012; Al-Dossary y Martin-Deleon, 2016; Van Niel et al., 2018; Almiñana et al., 2018). Los exosomas se pueden encontrar en fluidos biológicos de mamíferos incluyendo los de naturaleza reproductiva, recibiendo nombres concretos en función de su procedencia como es el caso de los oviductosomas presentes en oviducto (Al-Dossary et al., 2013). Las microvesículas son VE de 50-1000 nm de tamaño, liberadas por gemación y fusión de la membrana plasmática hacia el medio extracelular (Théry et al., 2002; Tricarico et al., 2017; Van Niel et al., 2018).

Entre las primeras proteínas identificadas en los oviductosomas encontramos la ATPasa transportadora de calcio de la membrana plasmática 4 (PMCA4) y la molécula de adhesión espermática 1 (SPAM1), asociadas a pasos esenciales previos a la

fecundación (Griffiths et al., 2008; Al-Dossary et al., 2013). Además, se han identificado proteínas implicadas en la unión espermatozoide-óvulo, la fecundación y el desarrollo embrionario, así como numerosas proteínas ribosomales (Almiñana et al., 2017; Almiñana et al., 2018). Las VE *in vivo* presentan oviductina, proteína de choque térmico A8 (HSPA8) y miosina 9 (MYH9) y la coincubación de dichas VE con embriones bovinos producidos *in vitro* aumenta la tasa de blastocistos, prolonga la supervivencia de los embriones en el tiempo y mejora su calidad (Almiñana et al., 2017). Estos resultados demuestran el impacto funcional de estas VE en el desarrollo embrionario. Un reciente estudio ha demostrado que la composición de las VE está bajo regulación hormonal, al menos en la especie bovina (Almiñana et al., 2018).

#### 4.3.2.5 Hormonas

Las hormonas de bajo PM (~300 Da), como los esteroides y las prostaglandinas, producidas en altas concentraciones por los folículos ováricos y los CLs, pueden llegar al FO localmente por transporte activo desde la rama oviductal de la vena ovárica. También es posible una difusión local de hormonas desde la red linfática del mesovario hasta la luz del oviducto (Hunter., 2012). Las hormonas ováricas P4 y estradiol (E2) se detectan en el FO durante todo el ciclo estral de las hembras, pero sus concentraciones varían mucho entre especies. En conejos, la P4 y el E2 oviductal se encuentran en concentraciones más o menos similares a las presentes en el suero circulante (0,5 ng/ml de progesterona y 50-120 pg/ml de estradiol) (Richardson y Oliphant, 1981). Por el contrario, en el hámster la concentración de P4 en el FO disminuye de 175,06 ng/ml en el periodo preovulatorio a 44,01 ng/ml tras la ovulación, pero mantiene en ambos casos concentraciones mucho más altas que las presentes en el suero circulante (5,64-12,85 ng/ml) (Libersky y Boatman, 1995). En el FO también están presentes otras hormonas esteroideas además de la P4 y el E2. Así, mediante espectrometría de masas se han detectado a lo largo del ciclo estral en el FO bovino: testosterona, estrona, cortisol, cortisona y numerosos metabolitos de la progesterona (Lamy et al., 2016).

Las prostaglandinas también están presentes en el FO. Estas junto con las hormonas esteroideas pueden participar en el transporte de gametos y embriones a

través de sus efectos moduladores sobre la contractilidad muscular y la frecuencia de los batidos ciliares en el oviducto (Coutinho y Maia, 1971; Weber et al., 1991; Wijayagunawardane et al., 2001; Li y Winuthayanon, 2017). En ratón hay 10 veces más prostaglandina I<sub>2</sub> en el día 2 que en el día 4 posmonta, reduciéndose su concentración cuando los embriones eclosionan en el útero (Huang et al., 2004). Estos datos sugieren un papel potencial de esta prostaglandina durante el desarrollo embrionario temprano.

## 5. Oviductina

La glicoproteína oviductal 1 u oviductina es codificada por el gen *OVGP1* y es la proteína no sérica mayoritaria en el FO. Fue detectada por primera vez en conejo (Oliphant et al., 1984) y hámster (Oikawa et al., 1988) como una proteína de alto PM producida y secretada al FO por las células no ciliadas del epitelio oviductal y que se unía a la ZP de los óvulos tras su paso por el oviducto. Posteriormente ha sido identificada en numerosas especies de mamíferos (**Tabla 3**). De todas las especies estudiadas hasta el momento cabe destacar que *OVGP1* es un pseudogén en la rata (*Rattus norvegicus*) (Tian et al., 2009) y el gran zorro volador (*Pteropus vampyrus*) (Moros-Nicolás et al., 2018).

**Tabla 3.** Especies de mamíferos en las que ha sido detectada la proteína oviductina. Tabla modificada de la Tesis Doctoral de Algarra, 2016.

<b>Especie</b>	<b>Referencias</b>
<b>Babuino</b> ( <i>Papio anubis</i> )	(Fazleabas y Verhage, 1986; Verhage y Fazleabas, 1988; Donnelly et al., 1991; O'Day-Bowman et al., 1996; Verhage et al., 1997a)
<b>Cabra</b> ( <i>Capra aegagrus hircus</i> )	(Abe et al., 1995a; Pradeep et al., 2011)
<b>Cerdo</b> ( <i>Sus scrofa</i> )	(Buhi et al., 1989; Buhi et al., 1990; Buhi et al., 1996; Kouba et al., 2000; Merchán et al., 2006)
<b>Chimpancé</b> ( <i>Pan troglodytes</i> )	(Kim et al., 2011)
<b>Conejo</b> ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	(Oliphant y Ross, 1982; Yong et al., 2002; Merchán et al., 2009; García et al., 2010)
<b>Gato</b> ( <i>Felis catus</i> )	(Hachen et al., 2012; Hribal et al., 2014)
<b>Hámster</b> ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	(Léveillé et al., 1987; Oikawa et al., 1988; Robitaille et al., 1988; Kan et al., 1990; Suzuki et al., 1995; Schmidt et al., 1997; Abe et al., 1998; O'Day-Bowman et al., 2002; McBride et al., 2004)
<b>Mono Rhesus</b> ( <i>Macaca mulatta</i> )	(Verhage et al., 1997b; Yan et al., 2011)
<b>Oveja</b> ( <i>Ovis aries</i> )	(Sutton et al., 1984; Gandolfi et al., 1989; Gandolfi et al., 1991; DeSouza y Murray, 1995; Hill et al., 1996a, 1996b; Hill et al., 1997)
<b>Perro</b> ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	(Saint-Dizier et al., 2014)
<b>Ratón</b> ( <i>Mus musculus</i> )	(Kapur y Johnson, 1985; Sendai et al., 1995; Araki et al., 2003)
<b>Ser humano</b> ( <i>Homo sapiens</i> )	(Rapisarda et al., 1993; Arias et al., 1994; O'Day-Bowman et al., 1995; Briton-Jones et al., 2001; Briton-Jones et al., 2004)
<b>Vaca</b> ( <i>Bos taurus</i> )	(Malayer et al., 1988; Boice et al., 1990a; King et al., 1994; Satoh et al., 1995; Abe et al., 1995c; Martus et al., 1998)

## 5.1 Caracterización bioquímica

La secuencia de aa de la proteína oviductina presenta una longitud variable entre especies (Avilés et al., 2010). El marco abierto de lectura del gen *OVGP1* codifica para un péptido señal de unos 11-21 aa y una proteína de 527 a 721 aa según la especie. La secuencia codificante de *OVGP1* está constituida por 11 exones, ubicándose la secuencia señal en los exones 2 y 3 y el péptido maduro entre los exones 4-11 (Buhi, 2002).

El análisis de la secuencia entre especies indicó que la proteína oviductina tiene un alto grado de identidad (77-84%) y similitud (86-90%) en la región N-terminal y un bajo grado de identidad (37-63%) y similitud (50-75%) en la región C-terminal, lugar donde están principalmente localizadas las posibles O-glicosilaciones (Buhi, 2002). Las principales diferencias en la región C-terminal de la proteína se encuentran en el exón 11 (Verhage et al., 1997a). Las proteínas oviductinas maduras y totalmente glicosiladas varían en PM según la especie: 90-95 kDa en animales domésticos, 110-150 kDa en primates y 160-350 kDa en roedores. La variabilidad encontrada se atribuye a las diferencias en los patrones de glicosilación (Verhage et al., 1997a). En el hámster (Robitaille et al., 1988; Paquette et al., 1995; McBride et al., 2004; Yang et al., 2015), el conejo (Yong et al., 2002) y el ser humano (O'Day-Bowman et al., 1995) el PM de oviductina es de 160-350 kDa, 66 kDa y 110-130 kDa respectivamente. Los distintos grados de glicosilación de oviductina dan lugar a diferentes polimorfismos y glicofomas, además dentro de la misma especie como ocurre en conejo (Merchán et al., 2007; Merchán et al., 2009), hámster (McBride et al., 2005; Paquette et al., 1995) y la especie humana (Lapensée et al., 1997; Buhi, 2002).

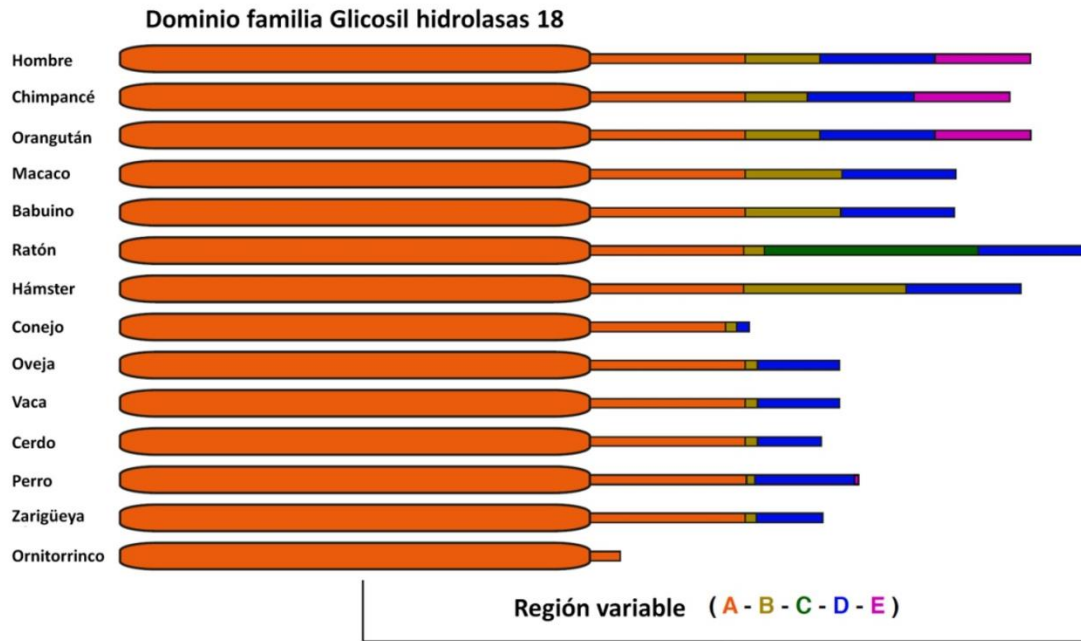
La glicosilación juega un papel crítico en la actividad biológica de la oviductina. La eliminación del ácido siálico y los azúcares de tipo N-unidos genera una reducción significativa en la habilidad de la oviductina bovina para mantener la viabilidad espermática (Sato et al., 1995). Además, los azúcares presentes en la oviductina parecen ser esenciales para mantener la hidrofilia de la proteína en el entorno extracelular, ya que su deglicosilación completa da lugar a una proteína insoluble (Sato et al., 1995). También se han detectado diferencias en la glicosilación a lo largo del ciclo



estral, lo que podría ser responsable de sus diferentes acciones biológicas (McBride et al., 2004, McBride et al., 2005).

El análisis *in silico* de oviductina reveló un dominio en la región N-terminal que la asemeja a las proteínas quitinasas pertenecientes a la familia glicosil-hidrolasas 18 (GH18). Sin embargo, el dominio catalítico de oviductina carece de un residuo esencial de ácido glutámico lo que hace que sea una quitinasa inactiva (Malette et al., 1995; Huang et al., 2012). La presencia de un número variable de repeticiones en tándem en la región C-terminal también clasifica a oviductina como miembro de la familia de las mucinas (Lapensée et al., 1997; Buhi, 2002). Teniendo en cuenta que estas regiones en tándem suelen estar fuertemente glicosiladas, la proteína oviductina de hámster y ratón que tienen un mayor número de ellas, pueden estar más relacionadas con las mucinas que sus homólogos de otras especies (Paquette et al., 1995; Sendai et al., 1995; Buhi, 2002).

La comparación *in silico* de la secuencia aminoacídica de oviductina entre especies reveló cinco regiones distintas (A-E) que se conservan de forma diferente entre los grupos de mamíferos (**Figura 12**) (Avilés et al., 2010). Las regiones A y D están conservadas en los diferentes mamíferos. La región A se corresponde con la región N-terminal y ambas poseen un alto grado de identidad entre especies (DeSouza y Murray, 1995; Avilés et al., 2010). La región B presenta baja identidad entre especies, conteniendo múltiples indels. La región C solo está presente en el género *Mus* y la región E es característica de la especie humana, orangután y chimpancé (Avilés et al., 2010). Por tanto, todas las proteínas oviductina de mamíferos poseen la región A arquetípica del dominio quitinasa en la región N-terminal, pero difieren en la longitud total de la proteína y en la presencia o ausencia de las otras regiones del extremo C-terminal (Algarra et al., 2016).



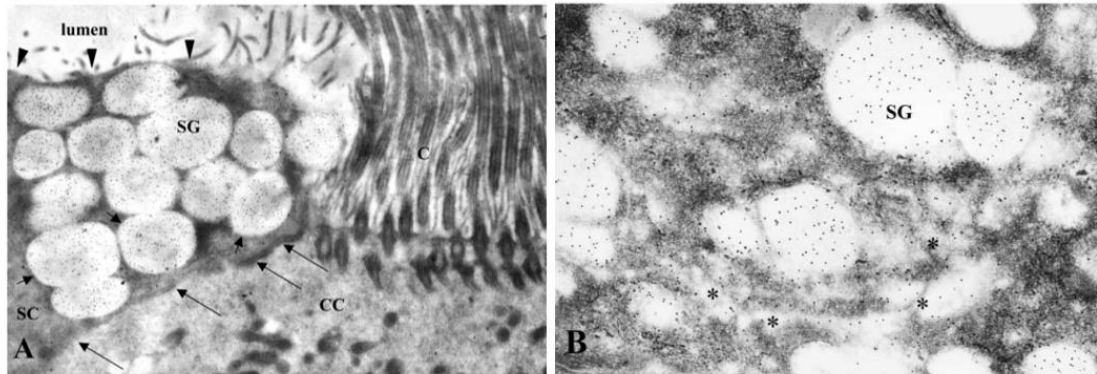
**Figura 12.** Representación esquemática de las regiones (A, B, C, D y E) de la proteína oviductina en diferentes especies de mamíferos. Figura tomada de Avilés et al., 2010.

La región de unión de la oviductina a la ZP fue determinada recientemente mediante la generación de oviductinas recombinantes con supresión de las diferentes regiones. Todas las glicoproteínas recombinantes de oviductina que contenían la región A mantuvieron su capacidad de unión a la ZP, sugiriendo que la región A contiene un dominio de unión a esta matriz. La supresión de la región C-terminal redujo la capacidad de la glicoproteína para penetrar a través de la ZP e impidió la endocitosis de la oviductina. Este hecho afectó a la estructura de la matriz de la ZP aumentando su resistencia a la digestión por proteasas (Algarra et al., 2016). Estos resultados indican que la presencia o ausencia de regiones conservadas en el extremo C-terminal de oviductina es responsable de las modificaciones en la asociación con la ZP, afectando a la estructura de la ZP y por consiguiente haciendo que sea permisiva a la penetración del espermatozoide y a la endocitosis de oviductina por el óvulo (Algarra et al., 2016).

## 5.2 Secreción y localización

La proteína oviductina es sintetizada y secretada por las células secretoras del epitelio oviductal (St-Jacques y Bleau 1988; Kan et al., 1988; Zhao et al., 2022). Mediante técnicas de inmunomarcaje se ha detectado su presencia en el aparato de Golgi y en los

gránulos de secreción de las células secretoras del epitelio oviductal (**Figura 13**) (Oliphant et al., 1984; Kan et al., 1988; Abe y Oikawa, 1991; Rapisarda et al., 1993; Murray y DeSouza, 1995; McBride et al., 2004).



**Figura 13.** Inmunolocalización de oviductina en oviducto de hámster dorado. Fotomicrografías electrónicas de secciones ultrafinas del oviducto que muestran inmunomarcaje con partículas de oro para oviductina de hámster por medio de un anticuerpo policlonal contra oviductina recombinante de hámster. (A) Los gránulos secretores (SG) de las células secretoras no ciliadas (SC) están intensamente marcados. Sin embargo, la membrana de los gránulos secretores (flechas cortas), la membrana apical (cabezas de flecha) y la membrana lateral (flechas largas) carecen de partículas de oro. Las células ciliadas (CC) no están marcadas, excepto por unas pocas partículas de oro asociadas a los cilios (C) que se extienden hacia el lumen del oviducto. Aumento 17.000x. (B) Ampliación de una célula secretora del epitelio oviductal que muestra una alta concentración de partículas de oro en los gránulos secretores (SG) y en el interior de los sáculos de Golgi (asteriscos). Aumento 33.000x. Figura modificada de McBride et al., 2004.

Estudios sobre la síntesis y secreción de oviductina indican que se produce exclusivamente en el epitelio oviductal (Buhi 2002; Avilés et al., 2010). Sin embargo, se ha detectado dicha proteína en el útero de varias especies entre las que se encuentran el ser humano (Laheri et al., 2018), el hámster (Roux et al., 1997) y el conejo (Hendrix et al., 2001; Merchán et al., 2007).

La expresión de *OVGP1* y la secreción de oviductina en el epitelio oviductal está regulada de forma estrógeno-dependiente durante el ciclo estral en la mayoría de las especies. Se encontró un elemento incompleto de respuesta a los estrógenos (iERE) (5'-GGTCANNTGACT-3') en la posición 150-162 pb, antes del codón de inicio de la región promotora del gen humano *OVGP1* (*HuOVGP1*) (Agarwal et al., 2002). Esta secuencia iERE de *HuOVGP1* es capaz de unirse al receptor de estrógenos  $Er\beta$ , pero no al  $ER\alpha$ . También se encontró el mismo sitio iERE en la región promotora de *OVGP1* de conejo, hámster y ratón (Merchán et al., 2007). Se ha confirmado la variación en la expresión

### III. Revisión bibliográfica

de ARNm y secreción de oviductina a lo largo del ciclo estral o menstrual en la mayoría de las especies de mamíferos analizadas entre las que se encuentran la mujer, la cerda, la mujer, la oveja, la perra y la vaca (Lee et al., 1990; Buhi et al., 1991; Donnelly et al., 1991; Arias et al., 1994; DeSouza y Murray, 1995; O'Day-Bowman et al., 1995; Buhi et al., 1996; Verhage et al., 1997a, 1997b; Lok et al., 2002; Saint-Dizier et al., 2014). Los niveles de ARNm y proteína se encuentran muy bajos o ausentes durante la fase lútea, detectándose los niveles máximos durante la fase folicular. Durante el periodo de máxima expresión también aumenta el número de gránulos secretores que contienen oviductina en el borde apical de las células secretoras del epitelio oviductal, así como la cantidad de oviductina en el FO (Buhi, 2002).

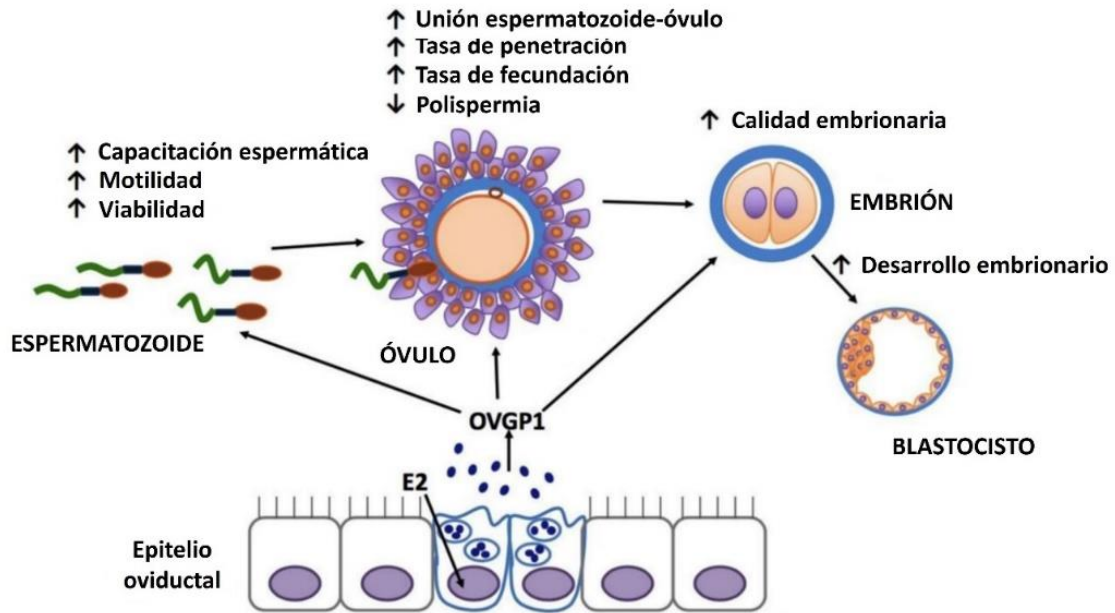
En hámster, Komiya y colaboradores en 1996 observaron que la expresión de ARNm de *OVGP1* también se modificaba entre las etapas del estro y diestro en esta especie, pero solo en la ampolla oviductal. Un nivel basal del transcrito se mantenía durante todo el ciclo estral en la región de la ampolla y del istmo (Komiya et al., 1996). En base a estos resultados, Roux y Kan mostraron por medio de un análisis cuantitativo que en hámster se encontraba un máximo de oviductina en los gránulos secretores de las células no ciliadas en la fase de estro, mostrándose un mínimo de señal en la fase de diestro (Roux y Kan, 1995). También se han demostrado otros cambios en el epitelio oviductal de hámster como es la variación en la actividad de la glucosiltransferasa en el momento de la ovulación. Cambio posiblemente asociado a la presencia del nivel más alto de oviductina glicosilada en la fase de estro y el más bajo en el diestro, sugiriendo que la glicosilación de oviductina puede ser necesaria para sus funciones durante la fecundación (McBride et al., 2004). Estos resultados corroboran que la expresión de *OVGP1* está regulada por estrógenos en la mayoría de las especies, pudiendo tener una respuesta diferente en especies con un ciclo estral largo en comparación con las que poseen un ciclo estral corto, como los roedores.

En el caso de la coneja no se ha determinado variación de los niveles de oviductina durante su ciclo estral, pudiendo estar asociado al hecho de que se trata de una especie de ovulación inducida teniendo ciclos estrales incompletos en ausencia de monta o IA. Sin embargo, sí se ha detectado un aumento en la concentración de

oviductina en muestras de FO de coneja a las dos horas de realizar IA (Steinberger et al., 2017; Yu et al., 2019). Además, se observó una correlación positiva entre la abundancia de oviductina y la abundancia de la proteína 1 de cadena ligera asociada a los microtúbulos (LC3-II) (Steinberger et al., 2017). En las células secretoras altamente especializadas los genes de la autofagia, incluida la proteína LC3, participan en la secreción de proteínas incluidas las mucinas (Patel et al., 2013). Este hecho reafirma que la pérdida de proteínas de autofagia conduce a defectos en la función de varios tipos de células secretoras, aunque el mecanismo preciso no está claro hasta el momento (Cadwell et al., 2008; Ebato et al., 2008; Jung et al., 2008; Mariño et al., 2010; DeSelm et al., 2011; Ushio et al., 2011).

### 5.3 Funciones biológicas

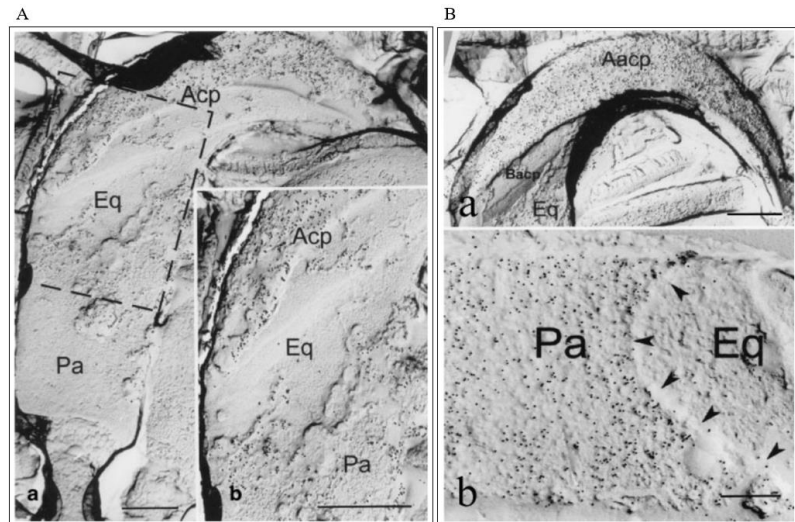
Los altos niveles de oviductina en la fase peri-ovulatoria sugieren que esta glicoproteína puede desempeñar un papel durante la fecundación. Estudios *in vitro* realizados en varias especies de mamíferos han demostrado que la oviductina nativa puede ejercer efectos positivos en los espermatozoides, en los óvulos y en el embrión. Se han observado efectos en: la capacitación de los espermatozoides, la movilidad y viabilidad espermática, la unión espermatozoide-óvulo, la tasa de penetración y de fecundación, la reducción de la polispermia, la calidad del embrión y las tasas de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (**Figura 14**) (Killian, 2004, 2011; Kouba et al., 2000; Coy et al., 2008; Saccary et al., 2013; Algarra et al., 2018; Zhao et al., 2022).



**Figura 14.** Esquema resumen de las funciones biológicas de la proteína oviductina en el proceso reproductivo. La síntesis y secreción de oviductina se ve influenciada por el nivel de estrógenos. Los estudios *in vitro* en varias especies de mamíferos han demostrado que la oviductina nativa puede unirse a los espermatozoides y a los óvulos, mejorar la capacitación de los espermatozoides y aumentar su movilidad y viabilidad. La oviductina nativa también puede mejorar la unión espermatozoide-óvulo, aumentar las tasas de penetración y fecundación de los espermatozoides, disminuir la polispermia, mejorar la calidad del embrión y la tasa de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto. Figura modificada de Zhao et al., 2022.

### 5.3.1 Efectos de la oviductina en el gameto masculino

Se ha demostrado que la oviductina se une a los espermatozoides de mamíferos y que su localización varía según la especie. En hámster, la oviductina homóloga parcialmente purificada se une a la cabeza de los espermatozoides (Boatman y Magnoni, 1995; Kan y Esperanzate, 2006; Yang et al., 2015). En bovino, se une a la región posterior de la cabeza y a la parte media de la cola del espermatozoide (Abe et al., 1995c). En la especie humana se detectó la unión de dicha proteína en la región de la cabeza (Lippes y Wagh, 1989), determinando mediante el empleo de oviductina humana recombinante su localización en dominios de membrana específicos de los espermatozoides humanos. El empleo de técnicas de inmunomarcaje mostró cambios regionales en el patrón de unión durante la capacitación espermática (**Figura 15**) (Boatman y Magnoni, 1995; Kan y Esperanzate, 2006; Yang et al., 2015).



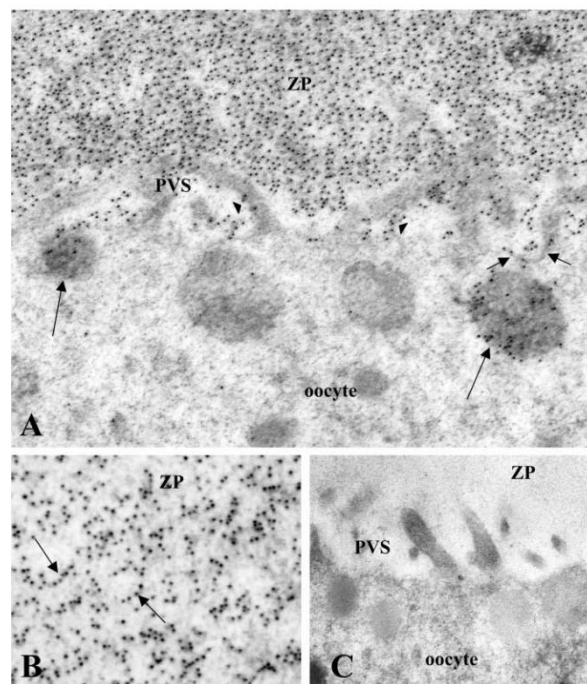
**Figura 15.** Inmunolocalización de oviductina en la cabeza de espermatozoide de hámster dorado según su estado de capacitación. A) Espermatozoide no capacitado y B) capacitado, previamente marcados con anticuerpo contra oviductina de hámster y proteína A-oro. (A) a: muestra la superficie de la cabeza del espermatozoide de hámster no capacitado. Región del capuchón acrosómico (Acp); segmento ecuatorial (Eq); región posacrosómica (Pa). b: ampliación de la región delimitada por el recuadro en (a) mostrando una alta concentración de partículas de oro sobre la región del capuchón acrosómico (Acp). También se detecta un marcaje moderado y relativamente débil, respectivamente, sobre la región posacrosomal (Pa) y el segmento ecuatorial (Eq). a, b) Barra: 1  $\mu$ m. (B) a: muestra la superficie de la cabeza del espermatozoide de hámster no capacitado. La región del casquete acrosómico apical (Aacp) está más intensamente marcada que la región del casquete acrosómico basal (Bacp). b: ampliación de la región del Eq en (a). La región posacrosómica (Pa) también presenta un fuerte marcaje por partículas de oro, mientras que en el segmento ecuatorial (Eq) solo se ven unas pocas partículas de oro. La región posacrosomal y el segmento ecuatorial están separados entre sí por el borde posterior del segmento ecuatorial (puntas de flecha). a) Barra: 0,1  $\mu$ m; b) Barra: 0,5  $\mu$ m. Figura modificada de Kan y Esperanzate, 2006.

Se ha demostrado que la proteína oviductina no solo se une a los espermatozoides si no que tiene efectos positivos sobre los mismos afectando a la capacitación, la viabilidad, la motilidad y la RA. La adición al medio de capacitación de oviductina purificada a partir de FO estral en hámster y oviductina recombinante homóloga en el ser humano aumentó los niveles de fosforilación de la tirosina de proteínas espermáticas de manera tiempo dependiente (Saccary et al., 2013; Zhao et al., 2016). La incubación de espermatozoides bovinos en medio suplementado con oviductina purificada mejoró de manera dosis-dependiente la capacitación de los espermatozoides, la RA, la tasa de fecundación (King et al., 1994; Satoh et al., 1995), la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Abe et al., 1995b, 1995c). La incubación de espermatozoides de la especie porcina en medio suplementado con bajas concentraciones de oviductina homóloga parcialmente purificada fue capaz de aumentar la viabilidad espermática (McCauley et al., 2003). En conjunto, los resultados

de los estudios *in vitro* con oviductina indican efectos beneficiosos de su presencia en los medios de capacitación o FIV, sugiriendo que la suplementación con oviductina podría mejorar la capacidad fecundante de los espermatozoides (Avilés et al., 2010; Zhao et al., 2022).

### 5.3.2 Efectos de la oviductina en el gameto femenino

La proteína oviductina está ausente en los folículos ováricos del ovario y se une a la ZP de los óvulos a su paso por el oviducto (Araki et al., 1987; St-Jacques y Bleau, 1988; Kan et al., 1989; Abe y Oikawa, 1990; O'Day-Bowman et al., 1996). Se ha detectado asociación de la proteína oviductina a estructuras filamentosas de la matriz de la ZP, al espacio perivitelino y a las microvellosidades e invaginaciones de la membrana plasmática de óvulos (**Figura 16**) (Kan et al., 1990; Gandolfi et al., 1991, Buhi et al., 1993; McBride et al., 2004).



**Figura 16.** Inmunolocalización de oviductina en óvulos de hámster dorado. Fotomicrografías electrónicas de secciones ultrafinas de óvulos incubados con un anticuerpo contra oviductina recombinante de hámster. A) Se detecta inmunomarcaje sobre la zona pelúcida (ZP), en el espacio perivitelino (PVS), sobre las microvellosidades (puntas de flecha) y en invaginaciones de la membrana plasmática (flechas cortas). En el óvulo, dos vesículas inmediatamente por debajo del oolema están marcadas con partículas de oro (flechas largas). Aumento 56.000x. B) Las partículas de oro están asociadas a estructuras filamentosas densas (flechas) de la matriz de la ZP. Aumento 70.000x. C) Sección de control que muestra la ausencia de partículas de oro sobre la ZP, PVS, o en el ovocito propiamente dicho. Aumento 31.000x. Figura tomada de McBride et al., 2004.



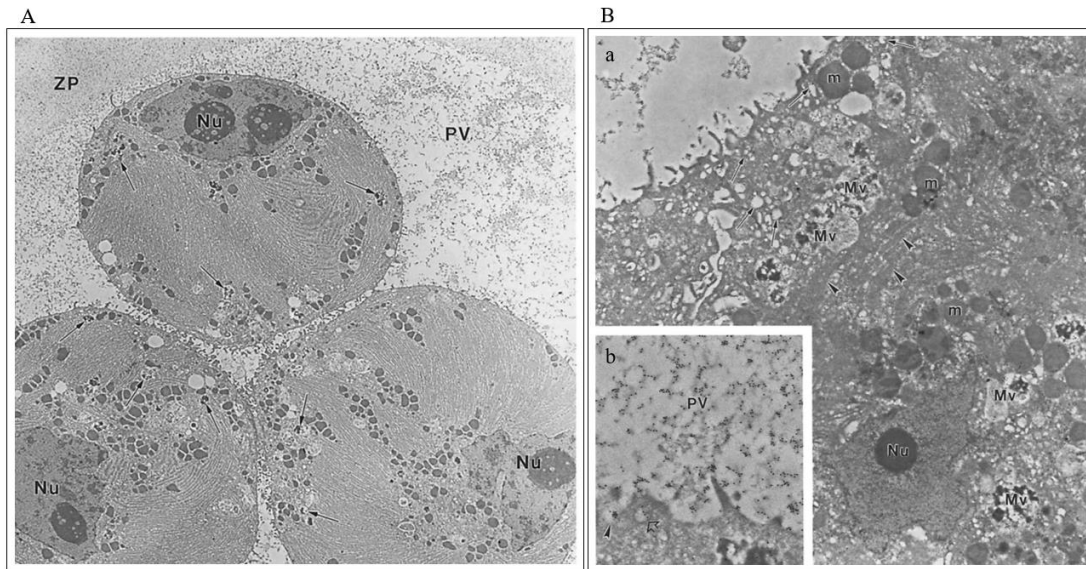
La interacción de oviductina con la ZP de los óvulos es importante en especies como el babuino (O'Day-Bowman et al., 2002), el cerdo (Algarra et al., 2016), el conejo (Algarra et al., 2016), el hámster (Sakai et al., 1988; O'Day-Bowman et al., 2002; Yang et al., 2015) o el ser humano (O'Day-Bowman et al., 1996). Por el contrario, en el ratón la mayor parte de la oviductina secretada pasa al espacio perivitelino del óvulo, quedando poca cantidad unida a la ZP en esta especie (Kapur y Johnson, 1986; Lyng y Shur, 2009).

Artículos previos han descrito que la adición de FO previamente a la fecundación es capaz de aumentar la resistencia de la ZP a la digestión de enzimas proteolíticas de manera dosis dependiente (Coy et al., 2008). Este efecto de endurecimiento de la ZP podría estar íntimamente asociado a la presencia de oviductina ya que la incubación de ovocitos porcinos y bovinos con oviductina recombinante previamente al tratamiento con la enzima pronasa incrementó la resistencia frente a la digestión proteolítica mediada por dicha enzima (Algarra et al., 2016). Además, estudios *in vitro* han demostrado en varias especies de mamíferos que la unión de oviductina a la ZP de los óvulos puede modificar las funciones de la ZP, desencadenando efectos positivos en la unión espermatozoide-ZP, la tasa de fecundación y la reducción de la polispermia (Martus et al., 1998; Kouba et al., 2000; Coy et al., 2008; Mondéjar et al., 2013; Yang et al., 2015; Algarra et al., 2016). Los efectos biológicos observados desaparecían al introducir en el tratamiento anticuerpos específicos contra oviductina, sugiriendo que esta era la responsable directa de los mismos (Martus et al., 1998, Kouba et al., 2000; Yang et al., 2015). La incubación de ovocitos porcinos con oviductina recombinante homóloga previamente a la FIV incrementó el porcentaje de monospermia correlacionando el incremento del endurecimiento enzimático de la ZP con la mejora de las tasas de FIV (Kouba et al., 2000; McCauley et al., 2003; Coy et al., 2008; Algarra et al., 2016). En la especie bovina la preincubación de los ovocitos con oviductina homóloga conllevó a un aumento significativo en las tasas de fecundación, similar al observado cuando se adicionó oviductina en el periodo de FIV, de 16-18 horas de duración (Martus et al., 1998). También se ha evidenciado efectos positivos de la oviductina en la unión de los gametos y en la tasa de fecundación en el ser humano y en el hámster, donde la coincubación de espermatozoides y ovocitos o hemizonas de la misma especie con oviductina homóloga antes y durante el ensayo de unión espermatozoides-ZP aumentó

significativamente el número de espermatozoides unidos a la ZP. (Boatman y Magnoni, 1995; O'Day-Bowman et al., 1996; Yang et al., 2015). Sin embargo, a pesar de la alta homología entre la oviductina del ser humano y la de babuino, la adición de oviductina de babuino en el ensayo con hemizonas y espermatozoides humanos resultó en una disminución de la unión de los espermatozoides a la ZP (O'Day-Bowman et al., 1996). Este resultado demuestra la importancia de la especificidad de las especies en la unión de los espermatozoides a los óvulos. Estudios posteriores han atribuido a la región C-terminal de la oviductina la función especie-específica modulando el paso de los espermatozoides a través de la matriz ZP remodelada (Algarra et al., 2016).

### **5.3.3 Efectos de la oviductina en el desarrollo embrionario temprano**

Estudios de inmunolocalización a nivel ultraestructural han revelado la presencia de oviductina en las microvellosidades de la membrana plasmática y en el espacio perivitelino de cigotos y en los cuerpos multivesiculares de los embriones tempranos de hámster (**Figura 17**) (Kan et al., 1990, 1993; Kan y Roux, 1995). También se ha detectado su presencia en el citoplasma de las blastómeras de embriones tempranos de babuino (Boice et al., 1990b). Estos resultados confirman la endocitosis e internalización de oviductina durante el desarrollo embrionario temprano, al menos en hámster y babuino.



**Figura 17.** Localización de la proteína oviductina en embrión de hámster de 4 células. A) Fotomicrografía electrónica de bajo aumento que muestra tres blastómeras. El etiquetado de la ZP por partículas de oro es homogéneo. El espacio perivitelino (PV) está ocupado por material floculante distribuido de forma dispersa. Se visualizan abundantes cuerpos multivesiculares (flechas) bajo la membrana plasmática de las tres blastómeras. (Nu), núcleo. Aumento 3.750x. B) Fotomicrografía electrónica de alto aumento que muestra porciones de una de las blastómeras. a) El material teñido de oscuro presente en el PV está llegando a la superficie de la blastómera y se encuentra fuertemente marcado con partículas de oro. Parte del material teñido es absorbido por una fosa recubierta (punta de flecha) observándose una vesícula recubierta con marcaje de oro al lado (punta de flecha abierta). También aparecen abundantes partículas de oro en un cuerpo multivesicular (flecha) localizado debajo de la membrana plasmática. Sin embargo, el resto del citoplasma no está marcado. b) En este caso, el inmunomarcaje se observa predominantemente sobre los cuerpos multivesiculares (Mv) y las vesículas endocíticas apicales, donde las partículas de oro parecen estar asociadas a su membrana (flechas). Otras estructuras como las mitocondrias (m), el núcleo (Nu) y las estructuras laminares (cabezas de flecha) están desprovistas de partículas de oro. Aumento: a) 28.000x; b) 12.500x. Figura tomada de Kan et al., 1993.

Se han realizado estudios *in vitro* utilizando oviductina tanto recombinante como purificada del FO para observar su efecto en el desarrollo embrionario temprano. Estos estudios *in vitro* han demostrado efectos positivos en el desarrollo embrionario asociados a la presencia de oviductina en diferentes especies como la bovina, caprina, felina, ovina y porcina (Kouba et al., 2000; Pradeep et al., 2011; Algarra et al., 2018; Hribal et al., 2014). Se observó una tendencia positiva en el porcentaje de blastocistos bovinos obtenidos a día 9 al tratar previamente a los ovocitos durante el cultivo *in vitro* con oviductina recombinante. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la tasa de división entre los grupos tratados y el grupo control (Algarra et al., 2018). En cabra y oveja, el uso de oviductina en los medios de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* aumentó la tasa de división embrionaria y la formación de blastocistos (Pradeep et al., 2011). En cerdo, la incorporación de oviductina homóloga en los medios FIV también

produjo un aumento en la tasa de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto, aunque no se observaron efectos en las tasas de división (Kouba et al., 2000). En gata, Hribal y colaboradores observaron que el uso de oviductina recombinante homóloga en la FIV no varió las tasas de división embrionaria ni el número de mórulas y blastocistos obtenidos. Sin embargo, la abundancia relativa de ARNm de *GJA1*, un gen cuyo nivel de expresión es un marcador de la calidad embrionaria, aumentó significativamente en los blastocistos tras el tratamiento con oviductina (Hribal et al., 2014). Este efecto en la calidad embrionaria en base a la expresión génica del embrión también ha quedado reflejado en la especie bovina donde se ha observado una sobreexpresión del gen *DSC2*, entre otros, en embriones tratados con oviductina durante el cultivo *in vitro* (Algarra et al., 2018). La abundancia relativa de ARNm de *DSC2* es significativamente mayor en blastocistos de buena calidad comparado con los de mala calidad (Sathanawongs et al., 2012).

Por tanto, los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* realizados hasta el momento indican que la captación de oviductina por los embriones tempranos tiene un potencial papel durante el desarrollo embrionario temprano (Zhao et al., 2022).

#### **5.3.4 Efectos de la oviductina en la implantación**

Durante el inicio de la gestación en hámster se observó que el inmunomarcaje contra oviductina sobre la superficie celular del epitelio uterino disminuía en intensidad del día 1 al 6 (Roux et al., 1997). En ratones, se observó que la intensidad de inmunomarcaje contra oviductina en el epitelio uterino aumentaba gradualmente tras la fecundación (Laheri et al., 2018), alcanzándose el nivel de expresión más evidente el día 5 después de la implantación, disminuyendo posteriormente. La modificación de los niveles de oviductina en el epitelio uterino durante la implantación sugiere un posible papel de la oviductina en la regulación de la receptividad uterina. En la especie humana, experimentos KD (del inglés, *knock down*) de *OVGP1* y reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) cuantitativa demostraron que la pérdida de oviductina en las células epiteliales del endometrio humano alteraba la expresión de genes relacionados con la receptividad endometrial y reducía la

adhesividad *in vitro* de las células del trofoblasto (Laheri et al., 2018). Además, descubrieron que la expresión de ARNm de *OVGP1* estaba significativamente disminuida en el endometrio de mujeres con fallo de implantación recurrente (Laheri et al., 2018). Por consiguiente, estos hallazgos refuerzan la teoría de que la proteína oviductina puede desempeñar un papel en la regulación de la receptividad uterina durante la implantación y la gestación temprana.

## 5.4 Evolución molecular

Los genes que codifican proteínas relacionadas con la reproducción muestran elevados niveles de divergencia en su secuencia entre especies en comparación con los genes que no participan en los procesos reproductivos (Clark et al., 2006; Swanson y Vacquier, 2002; Wilburn y Swanson, 2016). Se ha descrito una evolución molecular más rápida en las proteínas involucradas en la reproducción en comparación con otras proteínas no involucradas en el proceso reproductivo (Singh y Kulathinal, 2000; Swanson y Vacquier, 2002; Dapper y Wade, 2020). Este patrón de evolución rápida persiste en el árbol de la vida, incluso en microorganismos (Ferris et al., 1997; Armbrust y Galindo, 2001), hongos (Wik et al., 2008), plantas (Sato et al., 2002; Arunkumar et al., 2013), invertebrados marinos (Vacquier y Swanson, 2011; Weber et al., 2017; Wilburn et al., 2019), insectos (Haerty et al., 2007; Whittle y Extavour, 2017) y mamíferos, incluidos los primates (Wyckoff et al., 2000; Ramm et al., 2008; Dean y Mank, 2016; Finseth y Harrison, 2018).

La evolución rápida puede estar asociada a una pérdida de funcionalidad que a veces conduce a la pseudogenización del gen (Bodmer y Ashburner 1984; Hellberg y Vacquier 1999; Li et al., 1981), o estar relacionada con una evolución adaptativa inducida por la selección natural (Swanson y Vacquier 2002). Esta rápida evolución puede ser específica de cada especie e incluso podría desempeñar un papel en la especiación, como se ha descrito, por ejemplo, para *CD9* en el ovocito e *IZUMO1* en el espermatozoide (Claw et al. 2014).

Existen pocos estudios centrados en la evolución de los genes que codifican para proteínas oviductales. Moros-Nicolás y colaboradores han sugerido recientemente que

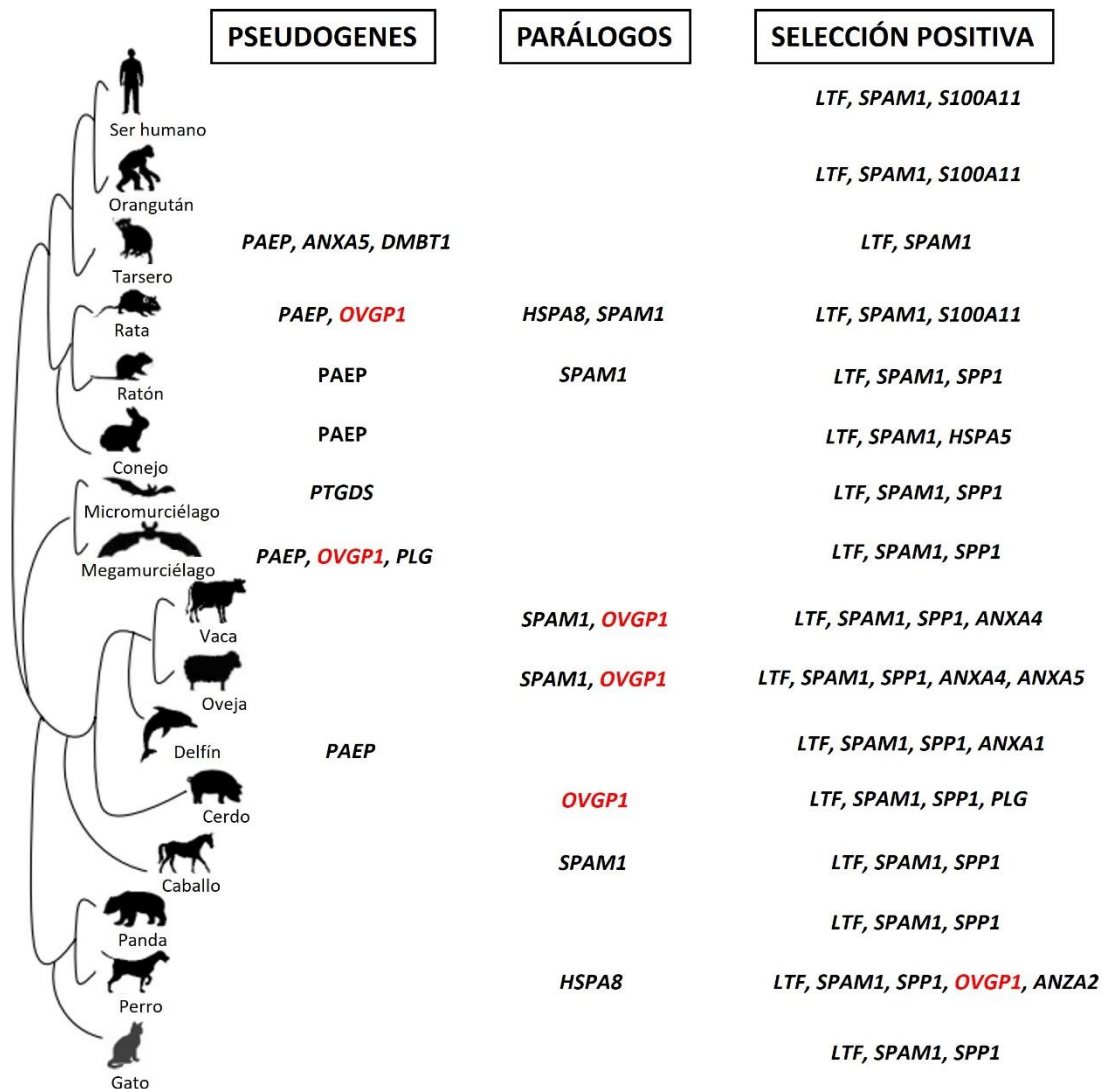
### III. Revisión bibliográfica

la alta diversidad de proteínas presentes en el FO de los mamíferos está asociada a un patrón evolutivo de los genes codificantes específico de la especie, siendo bastante frecuente la muerte génica, la cual suele producirse por la introducción de un indel que conduce a un codón de parada prematuro (Tian et al., 2009; Moros-Nicolás et al., 2018). A lo largo de la evolución de los mamíferos ha tenido lugar una pérdida progresiva de genes que codifican proteínas oviductales implicadas en el proceso de fecundación (Moros-Nicolás et al., 2018). Estos genes están sometidos a una evolución particularmente rápida, así como a selección positiva. Este hecho sugiere una diversificación de sus funciones y del papel desempeñado en las diferentes especies de mamíferos, con un posible impacto en el proceso de especiación como se ha propuesto, por ejemplo, para la evolución de los genes que codifican proteínas del líquido seminal de diferentes especies (Meslin et al. 2015).

En referencia al gen *OVGP1*, se ha descrito que apareció antes de la divergencia de los mamíferos (Tian et al., 2009) y que está sujeto a una evolución adaptativa rápida (Swanson et al., 2001), responsable de la divergencia del gen *OVGP1* entre las especies de mamíferos. Estudios *in silico* posteriores demostraron que *OVGP1* muestra una selección positiva en el perro, eventos de duplicación en la vaca, la oveja y el cerdo (Moros-Nicolás et al., 2018), habiendo sido identificado como un pseudogén en la rata (*Rattus norvegicus*) (Tian et al., 2009) y el gran zorro volador (*Pteropus vampyrus*) (Moros-Nicolás et al., 2018) (**Figura 18**).

Centrándonos en la pseudogenización del gen *OVGP1* observada en la rata (Tian et al., 2009), cabe citar que esta especie se encuentra integrada en la subfamilia *Murinae* donde también encontramos al ratón doméstico o ratón de laboratorio (*Mus musculus*), en el cual *Ovgp1* se expresa generando una proteína funcional (Kapur y Johnson, 1986; Lyng y Shur, 2009). Por tanto, *Ovgp1* se muestra como un gen cuya expresión se ha perdido en algún punto de la divergencia del ratón y la rata, que data de hace aproximadamente 12,5 millones de años (Aghová et al., 2018). La subfamilia *Murinae* abarca un total de 11 tribus: *Apodemini*, *Arvicanthini*, *Hapalomyini*, *Hydromyini*, *Malacomyini*, *Millardini*, *Murini*, *Otomyini*, *Phloeomyini*, *Praomyini* y *Rattini* (Lecompte et al., 2008; Pagès et al., 2016; Aghová et al., 2018). Muchas de las especies

pertenecientes a dichas tribus no tienen secuenciado por completo su genoma, pudiendo también verse *Ovgp1* afectada por el proceso de pseudogenización.



**Figura 18.** Genes codificantes para proteínas oviductales. Se muestra la pérdida de genes, la duplicación y la selección positiva. En color rojo encontramos a *OVGP1*. Figura modificada de Moros-Nicolás et al., 2018.

## 6. Tecnología CRISPR-Cas9

La existencia de CRISPR fue reportada por primera vez en 1987, cuando Ishino y colaboradores observaron la presencia de secuencias de nucleótidos repetidas en tándem en el genoma de *Escherichia coli*, interrumpidas por secuencias no repetitivas denominadas espaciadores (Ishino et al., 1987). En el año 2000, se informó de la presencia de repeticiones similares en la mayoría de los procariotas y Ruud Jansen las

### III. Revisión bibliográfica

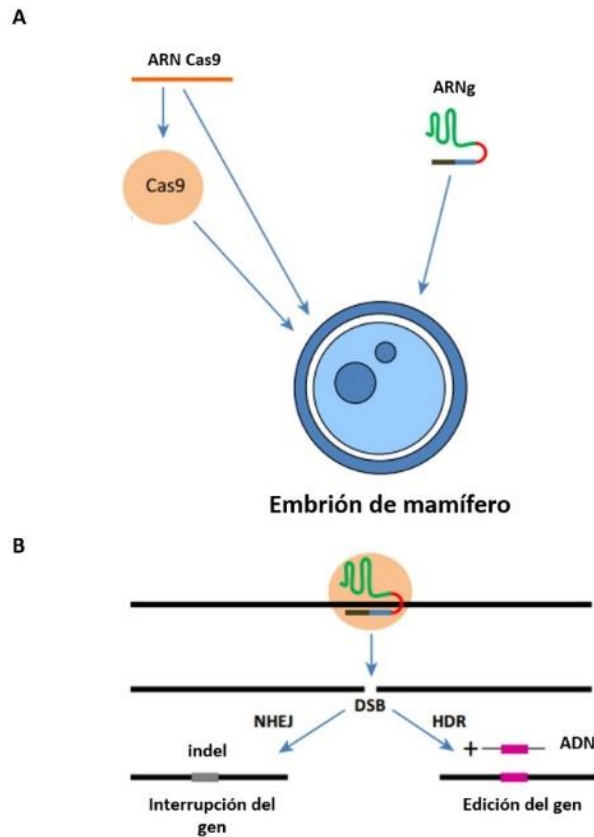
denominó “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas” (CRISPR, del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) (Jansen et al., en 2002). Esta estructura en su conjunto es denominada CRISPR *array*. En el año 2005, Mojica observó que los espaciadores correspondían con fragmentos de ADN de virus y plásmidos, sugiriendo que CRISPR constituía un sistema inmune adaptativo en estos organismos (Mojica, et al., 2005). A partir de entonces se secuenciaron 4.500 secuencias CRISPR de 67 cepas que representaban tanto a bacterias como a arqueas (Mojica, et al., 2005). Próximo al CRISPR *array* se encuentran múltiples genes altamente conservados denominados asociados a CRISPR (Cas, del inglés *CRISPRassociated*). Estos genes codifican proteínas con dominios nucleasas y helicasas encargados de llevar a cabo las distintas funciones relacionadas con la inmunidad. En función de las proteínas Cas implicadas existen diversos tipos de sistemas CRISPR-Cas, siendo el más sencillo el tipo II (Mojica y Montoliu, 2016).

El uso del sistema CRISPR-Cas9 como actual método de edición genética apareció en el año 2012 cuando Emmanuelle Charpentier, de la Unidad Max Planck para la Ciencia de los Patógenos, y Jennifer Doudna, de la Universidad de California en Berkeley, definieron un sistema CRISPR-Cas9 II *in vitro*. Este sistema no solo podía cortar el ADN viral, sino que también podía programarse con dos ARNs, ARN CRISPR (ARNcr) y ARNtracr (del inglés, *trans-activating* ARNcr), diseñados para cortar cualquier ADN en un sitio específico de la secuencia (Jinek et al., 2012). La especificidad de la secuencia diana viene dada por homología con 20 nucleótidos del ARNcr. Un año más tarde, CRISPR-Cas9 se utilizó para generar ratones KO por inyección directa en cigotos (Shen et al., 2013; Wang et al., 2013). Tras el éxito obtenido en ratones, se ha aplicado en muchas otras especies animales. En menos de una década, las aplicaciones de esta poderosa tecnología se han disparado en todo el mundo y han propiciado importantes avances en la ingeniería genética de plantas y animales, la medicina personalizada y en prometedoras terapias clínicas (Martinez-Lage et al., 2018; Li et al., 2020; El-Mounadi et al., 2020). En la producción ganadera, permite mejorar la productividad o la salud animal, así como reducir el impacto ambiental de la ganadería (Lamas-Toranzo et al., 2017). Miles de publicaciones informan del uso de la tecnología CRISPR-Cas9, siendo ahora utilizada universalmente debido a su simplicidad y facilidad de uso frente a otras



herramientas de edición genética por mutagénesis dirigida, como las nucleasas de dedos de zinc (Rémy et al., 2010) y las nucleasas efectoras (Sommer et al., 2015).

El actual sistema CRISPR-Cas9 está compuesto por un ARNg (resultado de la fusión del ARNtracr y el ARNcr) y una endonucleasa Cas9. El ARNg guía el complejo hasta el lugar de interés donde Cas9 corta el ADN generando una rotura de doble cadena (DSB, del inglés *double-strand break*), ante la cual la célula activa alguno de los mecanismos de reparación endógenos que posee. Las células eucariotas suelen reparar estas roturas mediante la ruta de unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologues end joining*), produciéndose errores asociados a inserciones y deleciones aleatorias de nucleótidos (indels), lo que suele dar como resultado la interrupción del gen. Este hecho puede aprovecharse para desarrollar modelos KO si la diana CRISPR se encuentra dentro de un marco de lectura abierto de un gen, ya que el indel provocará una mutación de desplazamiento del marco de lectura en caso de que no sea un múltiplo de tres. Otra ruta es la de reparación dirigida por homología (HDR, del inglés *homology-directed repair*), la cual tiene lugar en presencia de otra molécula de ADN con homología a la región con la DSB y que actúa como ADN donador o molde en el proceso de HDR. De este modo, se permite la inserción y modificación de genes. Por lo tanto, se recurre a esta segunda vía, HDR, para la obtención de modelos KI (del inglés, *knock in*) (**Figura 19**) (Mojica y Montoliu, 2016).



**Figura 19.** A) Herramientas CRISPR-Cas9 para la edición genética en embriones de mamíferos. Los embriones son microinyectados con proteína Cas9 o ARN Cas9 y ARNg. B) Tras la reconstitución en el núcleo del embrión, los compuestos CRISPR-Cas9 cortan el ADN generando una DSB, ante la cual la célula activa alguno de los mecanismos de reparación endógenos que posee. La ruta NHEJ está asociada a la inserción y deleción de nucleótidos (indels) para eliminar la rotura creada. Como consecuencia se generan mutaciones o codones de parada prematuros, que se traducen en proteínas truncadas o no funcionales. La ruta HDR tiene lugar en presencia de otra molécula de ADN con homología a la región con la DSB y que actúa como ADN donador o molde en el proceso de HDR. De este modo, se permite la inserción y modificación de genes. Por lo tanto, la vía NHEJ es usada para la interrupción del gen (modelos *knock out*), mientras que se recurre a la vía HDR para la modificación del gen (modelos *knock in*). Figura modificada de Mojica y Montoliu, 2016.

## 7. Proteína ovastacina y su implicación en el bloqueo de la polispermia

La polispermia es la penetración del citoplasma del óvulo por más de un espermatozoide. Se trata de una condición patológica en los mamíferos placentarios, que suele causar la muerte temprana del embrión (Wang et al., 2003; Coy et al., 2008; Evans, 2020). El bloqueo de la polispermia es el proceso por el cual se impide dicho evento, permitiendo la formación de un embrión diploide. Dependiendo de la especie de mamífero, el bloqueo de la polispermia ocurre a diferentes niveles: el oolema, la ZP

o ambos (Wang et al., 2003; Sun, 2003; Gardner y Evans, 2005; Evans, 2020; Yanagimachi, 2022). Además, algunos factores como la proteína oviductina y algunos glicosaminoglicanos sulfatados son también necesarios para controlar la polispermia (Coy et al., 2008; Coy y Avilés, 2010).

En especies de lagomorfos como el conejo este evento se produce a nivel del oolema, ya que se observan múltiples espermatozoides en el espacio perivitelino (Austin y Braden, 1953; Braden y Austin, 1954; Overstreet y Bedford, 1974; Oh y Brackett, 1975; Yanagimachi, 1994; Gardner y Evans, 2005). En especies como el perro, el topillo campesino y la oveja, tiene lugar a nivel de la ZP (Braden y Austin, 1954; Yanagimachi, 1994). Sin embargo, en la mayoría de las especies (humano, ratón, rata, cobaya, vaca, cerdo, gato o hurón) este bloqueo se produce a ambos niveles (Austin y Braden, 1953; Braden y Austin, 1954; Hunter, 1991; Horvath et al., 1993; Miller et al., 1993; Yanagimachi, 1994; Sengoku et al., 1995; Hunter et al., 1998; Patrat et al., 2006).

El bloqueo de la polispermia a nivel del oolema parece producirse por la unión espermatozoide-óvulo. Dentro de los candidatos moleculares para la interacción espermatozoide-óvulo encontramos en el óvulo la proteína JUNO cuyo receptor en el espermatozoide se llama IZUMO1 (Inoue et al., 2005; Bianchi et al., 2014). La interacción JUNO-IZUMO1 está muy conservada en los mamíferos, como se ha demostrado en el caso del cerdo, el ratón, el ser humano, y la zarigüeya (Bianchi et al., 2014). La expresión superficial de *JUNO* se pierde rápidamente en los óvulos fecundados, se internaliza en vesículas extracelulares y se libera al espacio perivitelino, donde podría participar en el rápido bloqueo de la polispermia (Burkart et al., 2012; Bianchi et al., 2014). IZUMO1 se moviliza desde el acrosoma hasta el segmento ecuatorial, región considerada para iniciar la fusión con el oolema (Satouh et al., 2012).

En cuanto al bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP, la proteína “metaloendopeptidasa similar a la astacina” también conocida como ovastacina, desempeña un papel crucial. La ovastacina es una metaloendopeptidasa de zinc que pertenece a la familia de las astacinas (Gomis-Rüth et al., 2012), codificada por el gen *ASTL* y contenida en los gránulos corticales del óvulo (Burkart et al., 2012). Inmediatamente después de la fecundación, se establece un rápido y transitorio bloqueo de la penetración de los espermatozoides en la ZP que precede a la escisión de

### III. Revisión bibliográfica

ZP2. Este bloqueo de los espermatozoides se asocia con la liberación de zinc de los gránulos corticales tras la exocitosis. Los niveles elevados de zinc afectan a la motilidad de los espermatozoides impidiendo su paso a través de la matriz de la ZP. Este bloqueo transitorio proporciona una ventana temporal para que ovastacina complete la escisión de ZP2, perdiendo su capacidad de unión al espermatozoide e induciendo el bloqueo de la polispermia necesario para un desarrollo embrionario exitoso (Burkart et al., 2012; Avella et al., 2014; Tokuhiko y Dean, 2018).

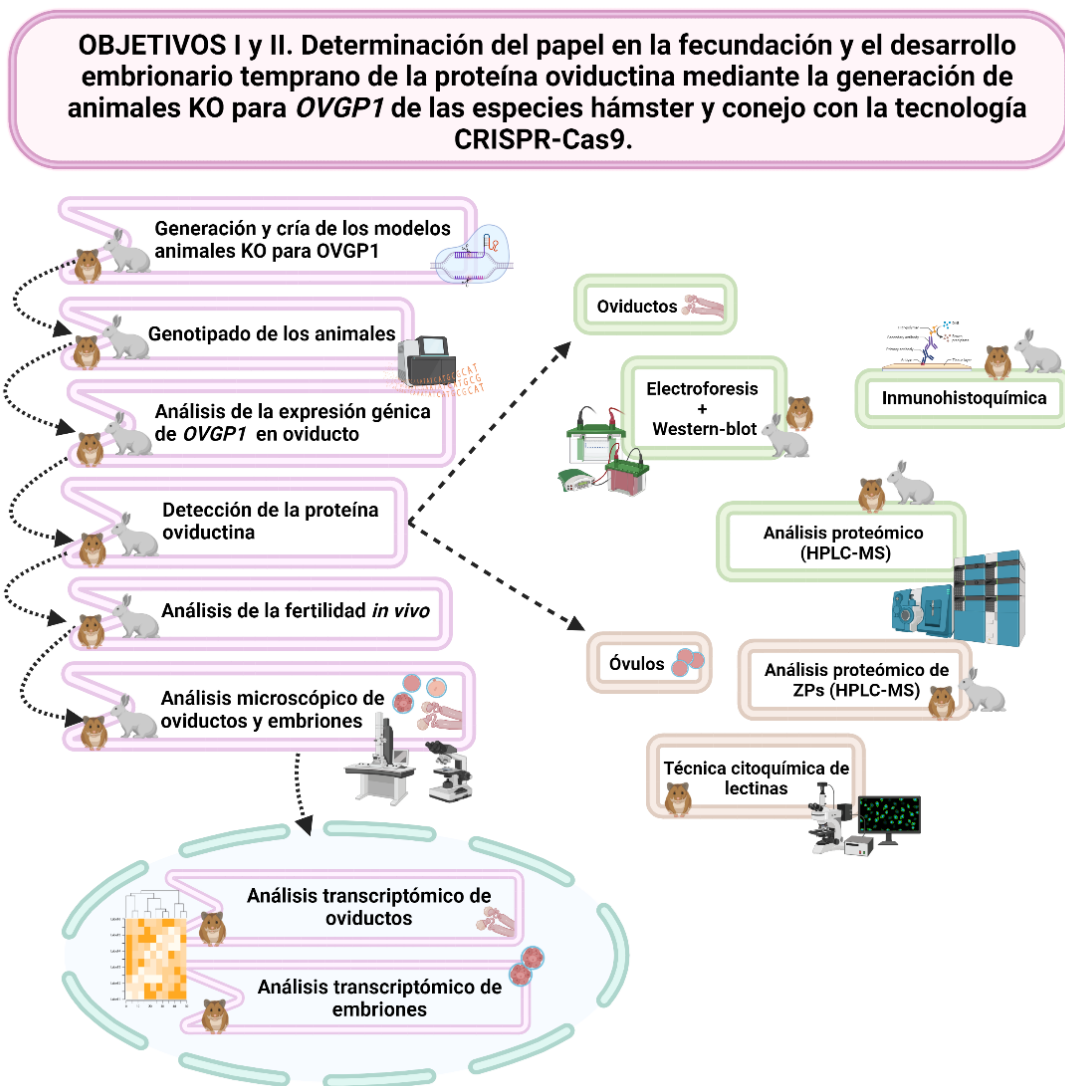
En los ratones KO para *AstI*, no se produce la escisión de ZP2 (Burkart et al., 2012) ni el endurecimiento de la ZP (Körschgen et al., 2017). Sin embargo, la fecundación no se ve impedida, aunque el número de embriones recuperados y el tamaño de la camada se reducen (Sachdev et al., 2012; Körschgen et al., 2017; Xiong et al., 2017). Un reciente estudio ha mostrado que las mujeres adultas homocigotas para una variante truncada de ovastacina presentan una fertilidad marcadamente reducida con un patrón sorprendentemente similar al de las ratonas KO para *AstI*, siendo el primer informe de infertilidad relacionada con ovastacina en el ser humano. Estos resultados sugieren la introducción de esta proteína en los paneles de genes asociados a la infertilidad femenina (Maddirevula et al., 2021).

Una posible pseudogenización del gen *ASTL* en conejo explicaría por qué el bloqueo de la polispermia se produce solo a nivel de oolema y no de ZP en esta especie.

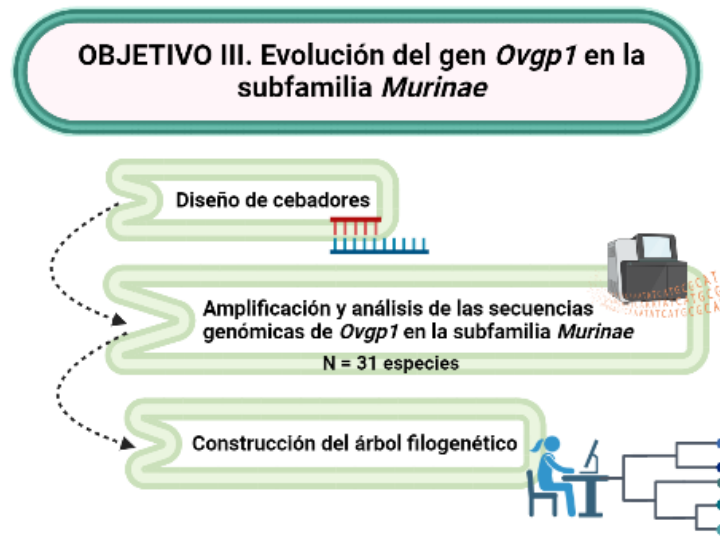
# **IV. DISEÑO EXPERIMENTAL**



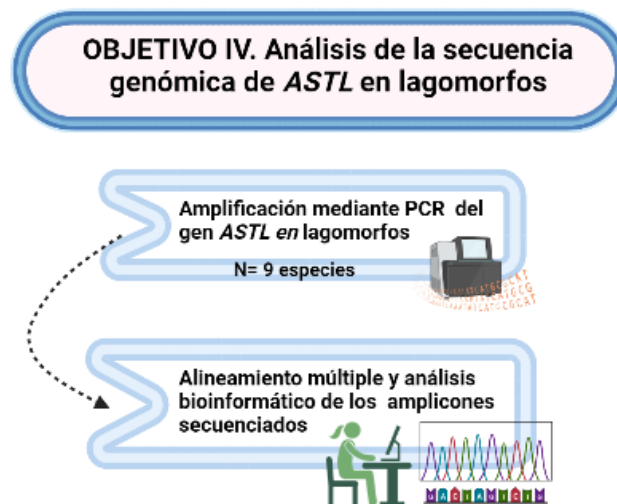
El diseño experimental llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral se encuentra dividido en 4 objetivos: determinación del papel en la fecundación y el desarrollo embrionario temprano de la proteína oviductina mediante la generación de animales KO para *OVGP1* de las especies hámster (objetivo I) y conejo (Objetivo II) con la tecnología CRISPR-Cas9, evolución del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae* (Objetivo III) y análisis de la secuencia genómica de *ASTL* en lagomorfos (Objetivo IV). El esquema resumen de cada uno de ellos se encuentra reflejado en las Figuras 20, 21 y 22 respectivamente.



**Figura 20.** Diseño experimental objetivos I y II “Determinación del papel en la fecundación y el desarrollo embrionario temprano de la proteína oviductina mediante la generación de animales KO para *OVGP1* de las especies hámster y conejo con la tecnología CRISPR-Cas9”. Creado con BioRender.com



**Figura 21.** Diseño experimental objetivo III “Evolución del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae*”. Creado con BioRender.com



**Figura 22.** Diseño experimental objetivo IV “Análisis de la secuencia genómica de *ASTL* en lagomorfos”. Creado con BioRender.com



# **V. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Modelos KO para *OVGP1* de hámster y conejo

### 1.1 Ética

El cuidado, manejo y sacrificio de los animales de experimentación empleados durante la realización de esta Tesis Doctoral se efectuó de acuerdo con los principios de cuidado animal recogidos en el Real Decreto 53/2013 y la Directiva 63/2010/UE que establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. El Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia aprobó el presente estudio con las especies hámster dorado y conejo común. Visto el resultado favorable de la evaluación del proyecto en ambas especies por el CEEA de la Universidad de Murcia, la Dirección General de Producción Agrícola, Ganadera y del Medio Marino de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM) autorizó la realización de dicho proyecto en ambas especies.

### 1.2 Generación y cría de los modelos animales KO para *OVGP1*

La generación de los modelos animales KO para *OVGP1* de las especies hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) y conejo común (*Oryctolagus cuniculus cuniculus*) se logró utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 en colaboración con especialistas en la manipulación embrionaria *in vitro* y la edición genética en estas especies. Concretamente, para el modelo de hámster se ha colaborado con el grupo del Dr. Zhongde Wang de la Universidad de Utah y para el modelo de conejo con el grupo del Dr. Pablo Bermejo Álvarez del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA, Madrid).

La generación del modelo de conejo comenzó con el diseño de diferentes ARNg contra el inicio de la región codificante de *OVGP1* en base a los criterios de (Hsu et al., 2013) ([www.genome-engineering.org](http://www.genome-engineering.org)). Los ARNg se produjeron y purificaron mediante el kit Guide-it ARNg *In Vitro* Transcription (Takara Bio, EE. UU). El ARNm de Cas9 poliadenilado se generó mediante transcripción *in vitro* con el kit mMESSAGING mMACHINE® T7 ULTRA (Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), EE. UU) a partir del

## V. Material y métodos

plásmido pMJ920 (Addgene, EE. UU) linealizado con la enzima de restricción BbsI (NEB, Reino Unido) y tratado con fosfatasa antártica (NEB, Reino Unido). El ARN transcrito *in vitro* se purificó mediante el kit MegaClear (Ambion, EE. UU). Los dos componentes del sistema (Cas9 y ARNg) se microinyectaron como ARN (100 ng/μl de Cas9 y 25 ng/μl de ARNg) en el ooplasma de cigotos de cada especie obtenidos 14 horas después del apareamiento.

Los embriones microinyectados se transfirieron un día después de la microinyección al oviducto de una receptora pseudopreñada y estimulada mediante una inyección intramuscular (IM) de 0,02 mg de gonadorelina el día anterior. Las crías resultantes (F0) fueron genotipadas (tanto en biopsias de oreja como en muestras de sangre) mediante secuenciación clonal como se describe en Bermejo-Alvarez et al., 2015. Tras la purificación del ADN, la secuencia genómica que incluye el sitio diana CRISPR se amplificó mediante PCR y el producto de PCR purificado se clonó en el vector pMD20 (Takara Bio, EE. UU) y se transformó en bacterias competentes DH5-α (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Se secuenciaron 15 clones para detectar los indels generados por la vía de reparación NHEJ de las DSB inducidas por CRISPR en cada individuo.

La generación del modelo de hámster se llevó a cabo de manera similar a la indicada para el modelo de conejo (Fan et al., 2014; Li et al., 2018).

En el modelo de hámster se seleccionó como macho fundador al portador de una delección de 76 pb ubicada en el exón 3, posición g.1.065 y c.138 de las secuencias de ADNg (NW\_024429193.1) y ARNm (NM\_001281337.1) respectivamente. Dicha delección genera un cambio en el marco de lectura en la posición p.44 y un codón de parada prematuro en la posición p.66 de la secuencia de aminoácidos (NP\_001268266.1).

En el modelo de conejo se seleccionó como macho fundador al portador de una delección de 35 pb ubicada en el exón 3, posición g.1.046 y c.109 de las secuencias de ADNg (NC\_067386.1) y ARNm (NM\_001082105.1) respectivamente. Esta delección genera un cambio en el marco de lectura en la posición p.33 y un codón de parada prematuro en la posición p.53 de la secuencia de aminoácidos (NP\_001075574.1).

Los individuos fundadores (F0) seleccionados se trasladaron a las instalaciones del animalario de la Universidad de Murcia donde se cruzaron con hembras salvajes (WT, del inglés *wild type*) para generar la F1. Los individuos de las generaciones F1 y sucesivas se genotiparon como queda indicado en el apartado 1.6 dado que ya se conocían todos los alelos parentales. Los individuos F1 heterocigotos para la mutación se cruzaron entre sí para obtener las siguientes generaciones, seleccionando para su estudio a los animales en base a su genotipo.

### **1.3 Mantenimiento de los animales**

#### **Hámster**

Para la realización de los experimentos *in vivo* y la obtención de muestras *post mortem* se emplearon un total de 90 hámsteres, 20 machos y 70 hembras. Todos ellos en edad fértil, de entre 2 y 10 meses las hembras y de entre 3 y 10 meses los machos.

Los animales se mantuvieron en las instalaciones del animalario de la Universidad de Murcia. Durante su mantenimiento fueron alojados en jaulas colectivas en grupos de 4 animales con material de nido y tubos de metacrilato como enriquecimiento ambiental, suministro *ad libitum* de alimento completo para hámsteres y agua de bebida mediante sistema de biberones. El fotoperiodo experimental empleado fue 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad mediante iluminación LED y con orto y ocaso de intensidad gradual. La temperatura fue de 23 °C y la humedad relativa del 60% mantenida mediante sistema de ventilación forzada.

#### **Conejo**

Para llevar a cabo los experimentos *in vivo* y obtener las muestras *post mortem* se emplearon un total de 18 conejos, 9 machos y 9 hembras. Todos ellos en edad fértil, de entre 5 y 24 meses de edad.

Los animales se mantuvieron en las instalaciones del animalario de la Universidad de Murcia. Durante su mantenimiento fueron alojados en jaulas individuales con soporte para descanso podal, suministro *ad libitum* de alimento completo para conejos y agua de bebida mediante sistema de biberones. El fotoperiodo experimental empleado fue 12 horas luz y 12 horas oscuridad salvo en el periodo estival que se modificó a 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, mediante iluminación LED y con orto y ocaso de intensidad gradual en todas las estaciones. La temperatura fue de 22 °C y la humedad relativa del 60% mantenida mediante sistema de ventilación forzada.

#### **1.4 Obtención de muestras biológicas**

El tamaño muestral empleado en cada experimento fue para hámster 3 hembras KO para *OVGP1* y 3 hembras WT y para conejo 2 hembras KO para *OVGP1* y 3 hembras WT. En los experimentos donde dicho tamaño muestral varió queda indicado en el apartado correspondiente. Las muestras obtenidas fueron almacenadas y preservadas según el protocolo indicado para cada técnica.

El sacrificio de los hámsteres se realizó mediante sobredosis de CO<sub>2</sub> en las instalaciones del animalario de la Universidad de Murcia. El flujo de CO<sub>2</sub> empleado fue del 30% del volumen de la cámara por minuto durante 8 minutos.

El sacrificio de los conejos se llevó a cabo en las instalaciones del animalario de la Universidad de Murcia. En primer lugar, se realizó sedación previa de los animales con ketamina hidroclorada (Imalgène 500, Merial S.A., Francia) y xilacina (Rompún, Bayer AG, Alemania) vía intramuscular (IM), a razón de 50 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente. A continuación, se procedió a la administración intracardiaca de 20 mg/kg del eutanásico pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol Especialidades veterinarias SA, España).

### **1.4.1 Tejido auricular**

#### **Hámster**

Tras el destete el día 25 de vida de todas las crías generadas, se procedió a la recogida de tejido auricular con la ayuda de un perforador de orejas para animales Fisherbrand™ (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Para ello, previamente se preparó la zona auricular mediante limpieza y desinfección con agua destilada y alcohol al 70%. Inmediatamente después se realizó la perforación auricular recuperando unos 0,3 mm<sup>3</sup> de tejido. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior procesado para extracción de ADN genómico (ADNg).

#### **Conejo**

Tras el destete, en el día 30 de vida de los gazapos se procedió a la recogida del tejido auricular con la ayuda de una tijera de corte quirúrgica de punta recta. El borde del pabellón auricular se preparó mediante el recorte de pelo, limpieza y desinfección con agua destilada y alcohol al 70%. A continuación, se realizó el corte del tejido auricular recuperando unos 3 mm<sup>3</sup> de tejido. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior procesado para obtención de ADNg.

### **1.4.2 Oviductos**

Tras el sacrificio de las hembras de ambas especies se extrajeron los oviductos mediante incisión abdominal y disección posterior de los mismos, eliminando todo el tejido adiposo periférico. Estas muestras biológicas fueron empleadas en diferentes experimentos, siguiendo diferentes protocolos de preservación según la técnica de destino. Cada protocolo queda explicado de manera específica en el apartado correspondiente.

### 1.4.3 Óvulos y embriones

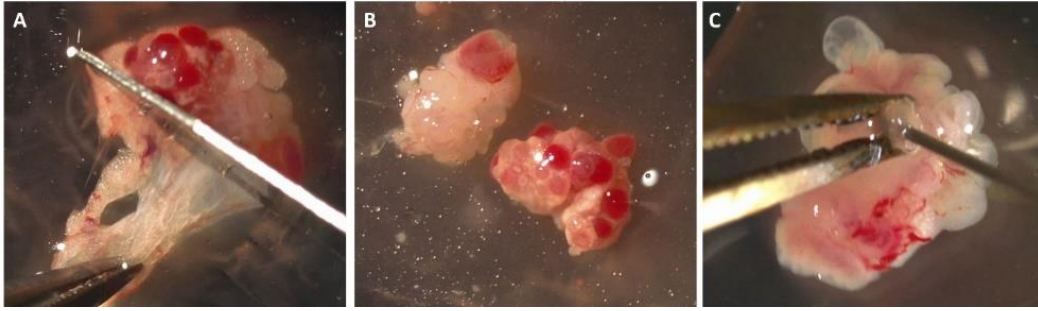
#### Hámster

Se realizó recuperación *post mortem* de óvulos y embriones en día 1,5 y 2,5 de desarrollo aproximadamente ya que al no ser las hembras superovuladas el momento de la monta puede ocurrir en una horquilla de 12 horas (tiempo de duración del estro en esta especie). Las hembras empleadas presentaron estricta regularidad en su ciclo estral. La regularidad del ciclo estral de las hembras fue comprobada mediante determinación diaria de la fase del ciclo estral a través de citología vaginal exfoliativa. Las citologías se realizaron durante 8 días consecutivos abarcando así dos ciclos estrales completos en las hembras. Para la toma y evaluación de la muestra citológica se realizó lavado vaginal con PBS Dulbecco (Sigma-Aldrich, EE. UU), extensión citológica y posterior visualización microscópica previa tinción con el Kit panóptico rápido (Química Clínica Aplicada SA, España).

Las hembras fueron colocadas en fase de proestro en la jaula del macho de fertilidad probada. Hembra y macho permanecieron juntos hasta el sacrificio de la hembra, siendo a los 2,5 días para recuperación de embriones en estadio de 2-4 células (1,5 días de desarrollo) y 3,5 días para recuperación de embriones en estadio de 6-8 células (2,5 días de desarrollo). En el caso de los óvulos se recuperaron a los 1,5 días de la detección del proestro no siendo la hembra cruzada con el macho. Tras el sacrificio de las hembras se aislaron los oviductos mediante incisión abdominal y disección. A continuación, se recuperaron los óvulos o embriones mediante lavado oviductal desde infundíbulo a unión útero-tubárica con aguja de 30 G y 300  $\mu$ l de PBS Dulbecco (Sigma-Aldrich, EE. UU) por oviducto (**Figura 23**).

Estas muestras biológicas fueron empleadas en diferentes técnicas, siguiendo diferentes protocolos de preservación según la técnica de destino. Cada protocolo queda explicado de manera específica en el apartado correspondiente.





**Figura 23.** Pasos realizados para la recuperación de óvulos y embriones mediante lavado oviductal en hámster. A y B) Separación mecánica de ovario y oviducto con hoja de bisturí, C) canulación del orificio infundibular con aguja de 30 G y lavado oviductal con PBS Dulbecco (Sigma-Aldrich, EE. UU).

### Conejo

Se realizó recuperación *in vivo* de óvulos, cigotos/embriones de 2 células y embriones en estadio de mórula y blastocisto. Previamente las hembras fueron sometidas a tratamiento de superovulación (Viudes-de-Castro et al., 2015; Viudes-de-Castro et al., 2017; Viudes-de-Castro et al., 2019; Vicente et al., 2022). Para ello, se les administró vía subcutánea (SC) 3 µg de la hormona corifolitropina alfa (Elonva, MSD, España) suplementada con 5 unidades internacionales (UI) de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Veterin Corion, Divasa-Farmavic SA, España). Tras 72 horas se realizó IA con eyaculado de macho de fertilidad probada y se indujo la ovulación mediante inyección IM de 1 µg de acetato de buserelina (Suprefact, (Hoescht Marion Roussel, España). Para la recuperación de óvulos se llevó a cabo el mismo protocolo con la salvedad de que no se inseminó a la hembra. La recuperación de óvulos, cigotos/embriones de 2 células, mórulas y blastocistos se realizó mediante lavado oviductal y uterino *in vivo* guiado por laparoscopia tras 16 horas de la inducción de la ovulación en el caso de los óvulos y a las 24, 72 y 96 horas tras la IA en el caso de cigotos/embriones de 2 células, mórulas y blastocistos respectivamente.

Previamente a la realización de la técnica de laparoscopia las hembras fueron anestesiadas mediante inyección IM de 4 mg/Kg de xilacina (Rompún, Bayer AG, Alemania) seguida de la administración intravenosa (IV), a través de la vena marginal de la oreja, de 16-20 mg/kg de ketamina hidroclicorada (Imalgène 500, Merial S.A., Francia). Una vez los animales se encontraban anestesiados se les rasuró, limpió y desinfectó la zona abdominal para el abordaje laparoscópico.

## V. Material y métodos

Tras estabilizar el plano anestésico y preparar la zona de intervención, los animales fueron posicionados cabeza abajo en un ángulo de 45° sobre la mesa de operaciones, posición que mantuvieron durante toda la intervención (**Figura 24**).



**Figura 24.** Colocación de la coneja durante la técnica de laparoscopia. Se muestra una coneja en decúbito supino posicionada cabeza abajo en un ángulo de 45° sobre la mesa de operaciones.

En primer lugar, se introdujo una aguja de Verres en la cavidad abdominal para realizar la distensión abdominal con la introducción de CO<sub>2</sub>, facilitando así el acceso del trócar y de la cánula del endoscopio. En segundo lugar, se retiró la aguja de Verres y se instaló un trócar de 10 mm para la introducción del laparoscopio (Wolf paediatric 0°). Mediante observación laparoscópica se insertó a nivel de la región inguinal una aguja epidural, posición cercana a la localización de los ovarios en conejo. Se retiró el fiador de la aguja y se introdujo el catéter de lavado en uno de los oviductos realizando un lavado con 5 ml de medio de manejo embrionario (**Anexo 2**). A continuación, se reintrodujo la aguja epidural a través del fiador previamente colocado y se puncionó la pared del cuerno uterino del mismo lado a unos 3 cm tras la unión útero-tubárica, realizando un lavado con 50-60 ml de medio de manejo embrionario. Finalmente se recuperó vía vaginal todo el volumen empleado en los lavados (Cortell et al., 2010). El procedimiento se repitió en el otro oviducto y cuerno uterino de manera idéntica.

Al concluir se limpió y desinfectó de nuevo la zona abdominal y se aplicó a los animales tratamiento de antibioterapia y analgesia cada 24 horas durante 3 días consecutivos: 10 mg/Kg de enrofloxacinó vía IM (Baytril, Bayer AG, Alemania), 0,2 mg/Kg

de meloxicam vía SC (Metacam, Boehringer Ingelheim, Alemania) y 0,03 mg/Kg de buprenorfina vía SC (Bupaq, Richter Pharma, Austria).

Estas muestras biológicas fueron empleadas en diferentes técnicas, siguiendo diferentes protocolos de preservación. Cada protocolo queda explicado de manera específica en el apartado correspondiente a cada técnica.

#### **1.4.4 Fluido oviductal de coneja**

El FO se obtuvo *post mortem* mediante lavado de la luz oviductal desde infundíbulo hacia la unión útero-tubárica con 2 ml por oviducto de PBS Dulbecco (Sigma-Aldrich, EE. UU). El volumen recuperado se almacenó en tubos de 1,5 ml de volumen a -20 °C.

### **1.5 Obtención de material genético**

El tamaño muestral empleado fue para hámster 3 hembras KO y 3 hembras WT y para conejo 2 hembras KO y 3 hembras WT, tamaño muestral que se mantuvo en cada uno de los experimentos realizados. En los experimentos donde dicho tamaño muestral fue diferente queda explicado en el apartado correspondiente.

#### **1.5.1 Obtención de ADN genómico**

##### **Hámster**

Para la extracción de ADNg de hámster se emplearon muestras de tejido auricular preservadas a -20 °C de todas las crías generadas.

Las muestras fueron descongeladas en hielo y procesadas con el kit Extracta DNA Prep for PCR-Tissue (Quantabio, EE. UU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la descongelación se procedió a la digestión del tejido mediante la adición de 50 µl del reactivo de extracción e incubación en termobloque (ThermoMixer® C Eppendorf®, Alemania) durante 30 minutos a 95 °C y agitación (500 rpm). A continuación, las

muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl del tampón de estabilización y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

## **Conejo**

Para la extracción de ADNg en conejo se emplearon muestras de tejido auricular almacenadas a -20 °C de cada uno de los gazapos generados.

Una vez las muestras fueron descongeladas en hielo se procedió a la digestión del tejido mediante la adición de 50 µl de tampón STES (**Anexo 3**) (Roskams et al., 2006) más 2 mg/ml de proteinasa K e incubación durante toda la noche a 55-65 °C. A la mañana siguiente se añadieron 400 µl de agua de biología molecular libre de ADNasas y ARNasas y se homogenizó la muestra en vortex (Heidolph, Alemania) durante 5 segundos a velocidad media. Finalmente, la muestra se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 g. El ADNg obtenido se preservó a -80 °C hasta su utilización.

### **1.5.2 Obtención de ARN total**

#### **De oviductos**

Para la extracción de ARN total se emplearon muestras oviductales de hámster y conejo almacenadas a -80 °C en reactivo RNAlater™ (Sigma-Aldrich, EE. UU), el cual posee inhibidores de ARNasas y permite la conservación del ARN a -80 °C durante un tiempo indefinido.

El kit empleado fue RNAqueous Phenol-free Total RNA Isolation (Invitrogen, EE. UU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos los pasos indicados a continuación se llevaron a cabo a 4 °C mediante el empleo de hielo y centrifuga refrigerada. Tras el descongelado de las muestras, se pesaron y se añadió un volumen de 10 µl de tampón de lisis por cada mg de muestra. Posteriormente se disgregaron con ayuda de un homogeneizador manual, Potter-Elvehjem (VWR, Pensilvania). El homogenado obtenido se pasó a través de una jeringuilla de 25 G para reducir viscosidad y se centrifugó a 14.000 g durante 2 minutos, desechando el precipitado. El

sobrenadante se agregó en proporción 1:1 con etanol al 64%, se transfirió a una membrana proporcionada en el kit y se centrifugó a 14.000 g durante 2 minutos descartando el volumen recuperado. A continuación, la membrana (donde se queda unido el ARN) fue sometida a 3 pasos de lavado con los tampones suministrados en el kit. Tras el último paso de lavado se procedió al montaje de la membrana en el tubo colector, se adicionaron 40 µl del tampón de elución, se incubó 1 minuto a 75 °C en termobloque (ThermoMixer® C Eppendorf®, Alemania) y se realizó una centrifugación a 14.000 g. Finalmente se adicionaron 15 µl de solución elución y se repitieron los pasos de incubación a 75 °C y centrifugación a 14.000 g, recuperando un volumen final de 60 µl. La calidad y concentración del ARN total obtenido se valoró mediante espectrofotometría (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y se conservó a -80 °C.

#### **De embriones de hámster**

Las muestras biológicas empleadas fueron grupos de embriones en día 2,5 de desarrollo formados, en el caso de las hembras KO, por 30 embriones procedentes de 4 hembras distintas y, en el caso de las hembras WT, por 10 embriones procedentes de una misma hembra. En total se utilizaron 4 muestras, dos de hembras KO (4 hembras por muestra) y 2 de hembras WT (una hembra por muestra). La diferencia en el número de embriones empleados entre hembras KO y WT fue debido a la menor cantidad de material genético obtenido de los embriones de las hembras KO ya que estos presentaban un menor número de blastómeras. La extracción de ARN total se realizó con el kit RNeasy Micro (Qiagen, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La cantidad de ARN se comprobó con bioanalizador (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, EE. UU) y se conservó a -80 °C hasta su conversión a ADNc.

### 1.5.3 Síntesis *in vitro* de ADN complementario

#### De oviductos

La síntesis *in vitro* de ADNc se realizó por retrotranscripción a partir del ARN total obtenido de muestras de oviducto de hámster y conejo. El kit empleado fue QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Alemania) siguiendo los pasos descritos por el fabricante.

Todos los pasos indicados a continuación se llevaron a cabo a 4 °C mediante el empleo de hielo y centrífuga refrigerada. La cantidad de ARN total de partida fue de 1 pg. En primer lugar, se preparó un volumen final de 14 µl de Master Mix, compuesto por 2µl del tampón gDNA wipeout 7x junto al volumen de muestra de ARN total equivalente a 1 pg. En los casos de muestras de ARN total muy concentradas se adicionó agua libre de ARNasas hasta completar los 14 µl de Master Mix. A continuación, el Master Mix se incubó durante 2 minutos a 42 °C en termobloque (ThermoMixer® C Eppendorf®, Alemania) y seguidamente se enfrió en hielo. Mientras, se llevó a cabo la preparación del Reverse-Transcription mix con los volúmenes y reactivos indicados y suministrados en el kit y se adicionó al Master Mix. Se realizó una nueva incubación a 42 °C durante 20 minutos y finalmente una incubación a 95 °C durante 3 minutos. La calidad y concentración del ADNc obtenido se valoró mediante espectrofotometría (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y se conservó a -80 °C hasta su empleo en reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR, del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*).

#### De embriones de hámster

El ADNc se sintetizó a partir de 300 pg de ARN total obtenido de cada grupo de embriones en estadio de 2,5 días de desarrollo. El kit empleado fue GeneChip™ 3' IVT Pico Kit (Affymetrix Thermo Fisher Scientific, EE. UU), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. La cantidad y calidad del ADN se comprobó con bioanalizador (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, EE. UU) y mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, EE. UU). Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su empleo en la técnica de microarrays.

## 1.6 Genotipado

El genotipado de los animales se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de ADN<sub>g</sub> del gen *OVGP1* que abarcaba la delección generada mediante la tecnología CRISPR-Cas9 en hámster y conejo. Como molde se emplearon las muestras de ADN<sub>g</sub> de tejido auricular de cada animal.

Las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de 2  $\mu$ l de ADN<sub>g</sub> en ambas especies, hámster y conejo, y la mezcla de reactivos se llevó a cabo en cabina de flujo laminar (AV-100, AZBIL TELSTAR, S.L.U, España). En el caso del hámster la mezcla de la reacción contenía 2  $\mu$ l de ADN<sub>g</sub>, 0,3  $\mu$ l de cada cebador a 25  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ l de la enzima polimerasa KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems, EE. UU) y 4,9  $\mu$ l de agua para completar un volumen final de 15  $\mu$ l. En el caso del conejo la mezcla de PCR contenía 2  $\mu$ l de ADN<sub>g</sub>, 1,25  $\mu$ l de cada cebador a 10  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ l de la enzima polimerasa KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems, EE. UU) y 8  $\mu$ l de agua de biología molecular libre de ADNasas y ARNasas para completar un volumen final de 25  $\mu$ l.

Las amplificaciones se efectuaron en termociclador Mastercycler<sup>®</sup> personal Thermal Cycler (Eppendorf<sup>®</sup>, Alemania), programando una fase inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos. Cada ciclo de PCR se repitió 35 veces, contando cada uno de ellos de tres fases: fase de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, fase de alineamiento durante 15 segundos y a temperatura de fusión ( $T_m$ ) de 55 °C para el par de cebadores empleado en hámster y de 60 °C para el par de cebadores empleado en conejo (**Anexo 1**) y fase de extensión a 72 °C durante 1 segundo. Tras los 35 ciclos se llevó a cabo una extensión final a 72 °C durante 1 minuto.

Para comprobar la eficiencia de la amplificación por PCR y el tamaño de los amplicones en cada reacción se tomaron 4  $\mu$ l de cada producto de PCR y se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con la adición de 1,5  $\mu$ l del colorante fluorescente de ácidos nucleicos GelRed (GelRed<sup>®</sup> Nucleic Acid Gel Stain, Biotium, EE. UU) para su posterior revelado. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de recorrido TAE (Tris Acetate-EDTA, Sigma-Aldrich, España) a 75 V durante 50 minutos, a

temperatura ambiente y en soporte horizontal. Finalmente, se procedió a su revelado en un transiluminador (Alphalmager MINI, Cell Biosciences, EE. UU).

Los productos de PCR fueron purificados con el kit Gel/PCR Purification (Favorgen Biotech Corporation, Austria) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transfirió la totalidad del volumen restante del producto de PCR, 13  $\mu$ l en el caso de hámster y 23  $\mu$ l en el caso de conejo, a un tubo de microcentrífuga, se agregaron 5 volúmenes por volumen de producto de PCR del tampón FADF y se homogenizó con vortex (Heidolph, Alemania). A continuación, se montó la membrana en un tubo de recolección, ambos suministrados en el kit, y se transfirió toda la mezcla. Se sometió a una centrifugación a 11.000 g durante 30 segundos y se desechó el líquido sobrante obtenido en el tubo recolector. Se realizó un paso de lavado de la membrana con el tampón de lavado suministrado en el kit y se repitió el paso de centrifugación, volviendo a desechar el líquido sobrante obtenido. Se realizó una nueva centrifugación a 18.000 g durante 3 minutos para secar por completo la membrana. Finalmente, la membrana se transfirió a un nuevo tubo de recolección, se agregaron 40  $\mu$ l de agua de biología molecular libre de ADNasas y ARNasas, se mantuvo la membrana 1 minuto a temperatura ambiente y se realizó una última centrifugación a 18.000 g durante 1 minuto. El volumen obtenido fue preservado a 4 °C y sometido a secuenciación por Sanger en la sección de biología molecular del Área Científica y Técnica de Investigación (ACTI) de la Universidad de Murcia. El equipo de secuenciación masiva empleado fue del modelo MiSeq (Illumina, EE. UU).

La determinación del genotipo de cada animal se comprobó mediante el análisis de los cromatogramas obtenidos tras la secuenciación de los productos de PCR, empleando el programa informático Chromas versión 2.5.

### **1.7 Análisis de expresión génica de *OVGP1* en oviducto**

El objetivo fue comprobar si existía expresión de *OVGP1* en los animales KO y en ese caso secuenciar el producto obtenido comprobando si la delección generada mediante la tecnología CRISPR-Cas9 estaba presente en el amplicón. Para ello se realizó



amplificación mediante RT-PCR empleando como molde el ADNc sintetizado a partir del ARN total de las muestras de oviducto de cada especie.

Las amplificaciones por RT-PCR se realizaron de idéntica manera en el caso de ambas especies, hámster y conejo. Se emplearon 2  $\mu$ l de ADNc y la mezcla de los reactivos se hizo en cabina de flujo laminar (AV-100, AZBIL TELSTAR, S.L.U, España). La mezcla de PCR contenía 2  $\mu$ l de ADNc, 1,25  $\mu$ l de cada cebador a 10  $\mu$ M, específico para cada especie (**Anexo 1**), 12,5  $\mu$ l de la enzima polimerasa KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems, EE. UU) y 8  $\mu$ l de agua de biología molecular libre de ADNasas y ARNasas para completar un volumen final de 25  $\mu$ l.

Las amplificaciones se efectuaron en termociclador Mastercycler® personal Thermal Cycler (Eppendorf®, Alemania) con las mismas características de número de ciclos, temperatura y tiempo que las indicadas en el apartado 1.6, con la salvedad de que en la fase de alineamiento se establecieron las T<sub>m</sub> óptimas de 55 °C y 58 °C para el par de cebadores en hámster y conejo respectivamente (**Anexo 1**).

La eficiencia de la amplificación por RT-PCR y el tamaño de los amplicones en cada reacción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa siguiendo los pasos indicados en el apartado 1.6. Finalmente, la identidad de todos los productos amplificados fue verificada mediante secuenciación por Sanger en la sección de biología molecular del ACTI de la Universidad de Murcia previa purificación siguiendo los pasos también indicados en el apartado 1.6.

## **1.8 Detección de la proteína oviductina**

### **1.8.1 Procesamiento de las muestras oviductales**

#### **Hámster**

Las muestras de partida fueron oviductos preservados a -20 °C sin medio de conservación.

Todos los pasos indicados a continuación se llevaron a cabo a 4 °C mediante el empleo de hielo y centrifuga refrigerada. Tras el descongelado en hielo de las muestras se llevó a cabo su disgregación con ayuda de un homogeneizador manual, Potter-Elvehjem (VWR, Pensilvania), en 500 µl de buffer RIPA (Sigma-Aldrich, EE. UU) con inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics, Alemania) al 1x. A continuación, las muestras se mantuvieron 30 minutos a 4 °C en hielo. El homogenado obtenido se sometió a una centrifugación de 5 minutos a 13.000 g para separar el sobrenadante y el sedimento. Tras dicha centrifugación se recuperaron 200 µl de sobrenadante por muestra y se descartaron los sedimentos. Las muestras de sobrenadante fueron sometidas a cuantificación proteica y se almacenaron de nuevo a -20 °C hasta su empleo en las técnicas de detección proteica explicadas en los apartados siguientes.

#### **Conejo**

Las muestras de partida fueron fluidos oviductales obtenidos de lavado oviductal y preservados a -20 °C.

Todos los pasos indicados a continuación se llevaron a cabo a 4 °C mediante el empleo de hielo y centrifuga refrigerada. Las muestras fueron sometidas a una centrifugación de 5 minutos a 13.000 g para separar el sobrenadante y el sedimento. Tras dicha centrifugación se alicuotaron 500 µl de sobrenadante por muestra y se descartó el sedimento. Las muestras de sobrenadante fueron sometidas a cuantificación proteica y se almacenaron a -20 °C hasta su empleo en las técnicas de detección proteica explicadas a continuación.

La concentración proteica en las muestras de oviducto de hámster y FO de coneja se cuantificó mediante espectrofotometría (S-22 UV/Vis, BOECO, Alemania) usando el reactivo Pierce™ Coomassie Plus (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente al análisis de las muestras se confeccionó una recta de regresión midiendo la absorbancia a 595 nm de 8 diluciones de albúmina sérica bovina (BSA). La determinación de la concentración proteica de las muestras problema se llevó a cabo utilizando como recta patrón la ecuación de la recta de regresión elaborada. Se añadió un volumen de 1 µl de las muestras problema en 49 µl del reactivo Coomassie Plus (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y se midió su absorbancia a 595 nm.

### 1.8.2 Electroforesis en SDS-PAGE

Tras la descongelación en hielo de las muestras oviductales indicadas en el apartado 1.8.1 se tomó un volumen equivalente a 50 µg de proteína en las muestras de hámster y 10 µg de proteína en las muestras de coneja y se incubaron bajo condiciones reductoras a 95 °C durante 8 minutos en tampón de carga SDS (4x) (Merck Millipore, EE. UU) para su desnaturalización. A continuación, se realizó electroforesis en SDS-PAGE con el sistema Xcell SureLock® MiniCell (Invitrogen™, EE. UU) cubriendo toda la cubeta con tampón de recorrido (**Anexo 4**). Los geles de electroforesis empleados fueron de poliacrilamida con gradiente 4-20% y las condiciones de la electroforesis fueron 200 V durante 1 hora. Junto a las muestras se cargó un marcador de proteínas estándar Precision Plus Dual Colors Standards (Bio-Rad, EE. UU).

### 1.8.3 Western-blot

La presencia y PM de la proteína oviductina en oviducto de hámster y FO de coneja se analizó mediante transferencia a membrana o Western-blot. Tras la finalización de la electroforesis en condiciones reductoras se realizó la transferencia húmeda a una membrana de PVDF Inmobilon®-P (Merck Millipore, EE. UU). Las membranas fueron activadas previamente mediante su incubación durante 1 minuto en metanol. Las condiciones de transferencia fueron 40 V durante 1,5 horas con tampón de transferencia (**Anexo 5**) con metanol a una concentración final del 10%.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue lavada con TBST (**Anexo 6**) e inmediatamente bloqueada mediante su incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en la solución tamponada TBST con un 1% de BSA. A continuación, se realizaron las incubaciones con los anticuerpos primario y secundario (**Anexo 7**). En primer lugar, se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-oviductina toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, tras 3 lavados en agitación fuerte con la solución TBST, se incubó con el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G de conejo durante 1 hora a temperatura ambiente. Previamente a su revelado se realizaron 3 lavados con TBST en agitación fuerte. Los controles del anticuerpo secundario se hicieron obviando la primera incubación con el anticuerpo primario.

Para la visualización de las bandas, las membranas se incubaron con el reactivo Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y se revelaron con el equipo ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Reino Unido) con el programa ImageQuant™.

#### **1.8.4 Tinción con azul de Coomassie**

En primer lugar, se realizó la electroforesis en SDS-PAGE bajo las mismas condiciones explicadas en el apartado 1.8.2. En segundo lugar, se transfirió el gel a una placa Petri de vidrio cubriéndolo por completo con el reactivo Coomassie Plus (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) donde se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación suave durante 12 horas. Tras la incubación se eliminó la solución de tinción, se realizaron 3 lavados del gel con agua destilada y se mantuvo durante 24 horas en una placa Petri con agua destilada a 4 °C para la mejor visualización de las bandas.

### **1.8.5 Análisis proteómico mediante la técnica de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS)**

#### **De muestras oviductales**

Tras permanecer, el gel teñido con azul de Coomassie, 24 horas en agua destilada se realizó el recorte de las bandas de 250 kDa en las muestras de hámster y 70 kDa en las muestras de conejo, ya que el peso esperado de la forma nativa de oviductina de hámster es 160-350 kDa (Yang et al., 2015) y 70 kDa en conejo (Algarra et al., 2016). A continuación, las muestras fueron analizadas en la sección de proteómica del ACTI de la Universidad de Murcia.

Las bandas de gel recortadas se lavaron dos veces con agua destilada MilliQ y dos veces con tampón de bicarbonato de amonio 25 mM, pH 8,5 en acetonitrilo al 50% durante 30 minutos a 37 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las bandas se secaron durante 15 minutos utilizando un evaporador de vacío modelo Eppendorf 5301 (Alemania). A continuación, se incubaron con 100 µl de tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8,5 con 20 mM de ditioneitol a 56 °C durante 20 minutos (para romper los puentes disulfuro de las proteínas), se eliminó el sobrenadante y se incubaron con 100 µl de tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8,5 con iodoacetamida 100 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad (para bloquear los grupos tioles de las cisteínas con el objetivo de impedir que vuelvan a formar los puentes disulfuro). El sobrenadante se eliminó de nuevo y las bandas de gel se lavaron en primer lugar con tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8,5 y en segundo lugar con tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8,5 en acetonitrilo al 50% durante 15 minutos a 37 °C. Tras el lavado, las bandas de gel se secaron de nuevo y se incubaron con 50 µl de tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8,5 que contenía 0,5 µg de Trypsin Gold Proteomics Grade (Promega Corporation, EE. UU) y 0,01% de surfactante ProteaseMax (Promega Corporation, EE. UU) durante 10 minutos a 4 °C para facilitar la rehidratación de las bandas. Las muestras se sometieron a la digestión con tripsina durante al menos 3 horas a 37 °C. El sobrenadante se recogió y las bandas de gel se lavaron con 100 µl de una solución que contenía 50% de acetonitrilo y 0,5% de ácido trifluoroacético y a continuación con 100 µl de acetonitrilo durante 30

## V. Material y métodos

minutos a 37 °C. Ambos sobrenadantes después de los lavados se recogieron junto con el primer sobrenadante y se secaron utilizando el evaporador de vacío modelo Eppendorf 5301 (Alemania).

La separación y el análisis de las digestiones con tripsina de las muestras se llevó a cabo mediante un sistema HPLC-MS/MS. Este sistema consistía en un HPLC Agilent 1290 Infinity II Series (Agilent Technologies, EE. UU) equipado con un módulo de automuestreador y una bomba binaria de alta velocidad conectado a un espectrómetro de masas Agilent 6550 Q-TOF con i-Funnel (Agilent Technologies, EE. UU), utilizando una interfaz dual de electrospray Agilent Jet Stream (AJS-Dual ESI). Los parámetros experimentales para el HPLC y Q-TOF se establecieron en el programa de adquisición de datos MassHunter Workstation (Agilent Technologies, Rev. B.08.00).

Las muestras procedentes de la digestión con tripsina se resuspendieron en 20 µl de tampón A, constituido por agua/acetonitrilo/ácido fórmico (94,9:5:0,1), y se inyectaron en una columna HPLC Agilent AdvanceBio Peptide Mapping (Agilent Technologies, EE. UU) atemperada a 50 °C, utilizando un flujo de 0,4 ml/min. Tras la inyección, la columna se lavó con tampón A durante 3 minutos y los péptidos digeridos se eluyeron utilizando un gradiente lineal 0-40% de tampón B, constituido por agua/acetonitrilo/ácido fórmico (10:89,9:0,1) durante 40 minutos, seguido de un gradiente lineal 40-95% de tampón B durante 8 minutos. Finalmente, la columna se equilibró en las condiciones iniciales durante 6 minutos antes de una nueva inyección.

El espectrómetro de masas funcionó en modo positivo. La presión del gas nebulizador se fijó en 35 libras por pulgada cuadrada, mientras que el flujo de gas de secado se fijó en 14 l/min a una temperatura de 300 °C, y en la envoltura de la fuente (*sheath*), el flujo de gas se fijó en 11 l/min a una temperatura de 250 °C. Los voltajes del capilar, el inyector o *nozzle*, el fragmentador y el octopolo fueron de 3500 V, 100 V, 360 V y 750 V respectivamente. Los datos se adquirieron en modo de alta resolución (*profile*) en rango dinámico extendido a 4 GHz para los barridos de MS y MS/MS. El rango de masas de MS y MS/MS fue de 50-1700 *m/z* y las velocidades de barrido fueron de 8 espectros/segundo para MS y 3 espectros/segundo para MS/MS. Se utilizó el modo MS/MS automático con selección de precursores por abundancia y un máximo de

20 precursores por ciclo. Se utilizó una energía de colisión lineal con una pendiente de 3,68 y un desplazamiento de -4,28 según la carga del ion seleccionado.

El procesamiento y análisis de los datos se realizó con el motor de búsqueda Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Rev B.06.00.201, Agilent Technologies, EE. UU). Los datos brutos se extrajeron en las siguientes condiciones predeterminadas: cisteínas no modificadas o carbamidometiladas; [MH]<sup>+</sup>50-10000 *m/z*; carga máxima del precursor +5; relación señal/ruido MS mínima (S/N) 25; búsqueda de señales 12C.

La búsqueda MS/MS contra la proteína oviductina de hámster o conejo, según el tipo de muestra, se realizó en modo de búsqueda de modificaciones variables (cisteínas carbamidometiladas, fosforilación STY, metionina oxidada y conversión de glutamina N-terminal en ácido piroglutámico); digestión con tripsina con 5 puntos de corte perdidos como máximo; instrumento ESI-Q-TOF; intensidad mínima de pico coincidente 50%; carga máxima de precursor ambiguo +5; masas monoisotópicas; tolerancia de masa de precursor de péptido 20 partes por millón; tolerancia de masa de ion producto 50 partes por millón; y cálculo de puntuaciones invertidas de la base de datos. La validación de los datos de péptidos y proteínas se realizó utilizando umbrales automáticos.

### **De zonas pelúcidas aisladas**

Las muestras empleadas fueron grupos de 50 ZPs aisladas de óvulos de hámster y 16 ZPs aisladas de óvulos de conejo en un volumen final de 50 µl de agua destilada por grupo. En el caso de las muestras de hámster, los grupos (WT y KO) se constituyeron a partir de ZPs aisladas de óvulos procedentes de 5 hembras con genotipo WT y 5 con genotipo KO, mientras que para las muestras de coneja se emplearon 3 hembras WT y 2 KO. El aislamiento de las ZPs se consiguió realizando una abertura en la ZP con una pipeta Pasteur biselada de vidrio y eliminando por aspiración la zona citoplasmática del óvulo. A continuación, las muestras fueron procesadas en la sección de proteómica del ACTI de la Universidad de Murcia.

## V. Material y métodos

Las muestras se disolvieron en 100 µl de tampón de bicarbonato de amonio 50 mM pH 8,5 con 0,01% de ProteaseMax (Promega Corporation, EE. UU). A continuación, se incubaron con 20 mM de ditioneol a 56 °C durante 20 minutos y seguidamente con iodoacetamida 100 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, se realizó la digestión añadiendo 1 µg de tripsina Gold Proteomics Grade (Promega Corporation, EE. UU) durante 3 horas a 37 °C. La reacción se detuvo con ácido fórmico al 0,1% y se filtró a través de 0,2 µm. Finalmente, las muestras se secaron utilizando un concentrador de vacío modelo Eppendorf 5301 (Alemania).

La separación y análisis de Las muestras procedentes de la digestión con tripsina se llevó a cabo mediante HPLC-MS/MS siguiendo los pasos indicados en este mismo apartado (1.8.5) para las muestras oviductales.

### **1.8.6 Análisis inmunohistoquímico de oviductina sobre cortes de oviducto**

Las muestras de partida fueron oviductos de hámster y coneja fijados en formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 24 horas y mantenidos en PBS a 4 °C hasta su procesado e inclusión en parafina.

La inclusión de los oviductos se realizó mediante procesador automático (Histokinette). Los pasos iniciales abarcaron una deshidratación progresiva de la muestra en soluciones crecientes de etanol seguido de aclarado en tolueno y finalmente inmersión del tejido en parafina líquida.

Para la elaboración de los bloques se colocaron los oviductos en moldes con la orientación deseada y se añadió parafina Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, EE. UU) en estado líquido a 60 °C. Tras el enfriado del bloque y su desmoldado se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor que se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Santa Cruz Biotechnology, Alemania).

Para realizar la técnica de inmunohistoquímica, los portaobjetos se desparafinaron durante toda la noche mediante incubación en una solución sustitutiva



de xileno. A la mañana siguiente se hidrató el tejido usando soluciones decrecientes de etanol, comenzando en etanol absoluto hasta etanol al 70%, finalizando con la muestra en agua. Para el desenmascaramiento antigénico se empleó tampón citrato a pH 6 incubando a 98 °C durante 30 minutos en una olla a presión. Tras tres lavados de 5 minutos en tampón TBS (Sigma-Aldrich, EE. UU) se realizó un lavado con TBST (**Anexo 6**) y se delimitó el área del tejido con un lápiz. Antes de comenzar con las incubaciones de 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. Posteriormente, se procedió al bloqueo de ruido de fondo incubando las secciones con suero normal de caballo al 2,5% (Vector laboratories, EE. UU) durante 20 minutos a 37 °C. Tras aclarar con TBS (Sigma-Aldrich, EE. UU), los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-oviductina toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. A la mañana siguiente, las muestras se atemperaron a 37 °C durante 10 minutos y se lavaron durante 3 minutos con TBST. Seguidamente se incubaron 30 minutos con un polímero de anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulina G de conejo a 37 °C conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) (**Anexo 7**) y se realizaron dos lavados durante 2 minutos con TBST.

El revelado se hizo con solución de 0,5 mg/ml de 3,3'-diaminobenzidina en TBS (Sigma-Aldrich, EE. UU). 3,3'-diaminobenzidina es un compuesto que se oxida en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> precipitando un producto de color marrón. Los portaobjetos se lavaron durante 5 minutos con agua corriente y después con agua destilada. Tras contrastar con la técnica de tinción hematoxilina-eosina durante 30 segundos, los portaobjetos se lavaron 5 minutos en agua y se procedió a su deshidratación con incubaciones de 5 minutos a soluciones crecientes de etanol (96% y dos veces en absoluto). Después de aclarar las secciones en sustituto de xileno en dos baños de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente, las secciones se montaron con cubreobjetos (24x36 mm) en medio de montaje permanente con base de tolueno, DPX (Panreac Química S.L.U., España).

La visualización de los cortes histológicos se realizó con un microscopio Zeiss AxioPhot con óptica convencional y las fotos se tomaron con cámara modelo DC500 (Leica, Alemania).

### 1.8.7 Técnica citoquímica de lectinas en óvulos de hámster

Se elaboraron tres grupos, uno formado por óvulos procedentes 3 hembras WT, otro grupo formado por óvulos de 3 hembras KO y un tercer grupo formado por ovocitos ováricos de 3 hembras WT. A su vez cada grupo se dividió en dos para formar los controles negativos, es decir, sin incubación con lectina. Los óvulos y ovocitos fueron fijados al 2% de paraformaldehído (PAF) durante 30 minutos y posteriormente preservados al 1% de PAF a 4 °C.

Al comenzar la técnica con lectinas se eliminó el PAF residual presente en las muestras mediante 3 lavados en PBS. A continuación, se realizó el bloqueo de los posibles grupos aldehídos del fijador mediante incubación de las muestras en PBS glicina 20 mM durante 15 minutos. Se volvieron a realizar 3 lavados en esta ocasión en TBS (Sigma-Aldrich, EE. UU) y se incubaron (a excepción de los grupos control) con la lectina fluorescente Griffonia Simplicifolia Lectin I (GSL I) isolectin B4, Dylight<sup>R</sup> 649 (Vector Laboratories, EE. UU) a 10 µg/ml durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 nuevos lavados con solución TBS (Sigma-Aldrich, EE. UU) y se montaron empleando como medio de montaje el propio TBS. Las imágenes fueron captadas mediante un microscopio de fluorescencia confocal SP8 (Leica, Alemania).

## 1.9 Análisis de la fertilidad *in vivo*

### Hámster

Los estudios de fertilidad *in vivo* se realizaron en animales en edad fértil, de 2-10 meses las hembras y de 3-10 meses los machos. Para comprobar la fertilidad *in vivo* de las hembras WT, KO y heterocigotas (Hz, del inglés *heterozygous*) se emplearon un total de 6 hembras de cada genotipo con diferentes machos de fertilidad probada. En el caso de las 6 hembras KO, 4 de ellas fueron cruzadas durante 5 días consecutivos con machos de fertilidad probada, abarcado al completo el ciclo estral en esta especie (4 días de duración). Para realizar el siguiente cruce con la misma hembra se confirmó la no gestación esperando hasta la posible fecha de parto, siendo la gestación en esta especie de 16 días. En total se realizaron 6 cruces con cada una de las 4 hembras,

cambiando en cada cruce de macho de fertilidad probada. Las 2 hembras KO restantes fueron mantenidas durante un mes ininterrumpidamente con un mismo macho de fertilidad probada, abarcando 7-8 estros de cada hembra (**Tabla 4**). Las hembras con genotipo WT y Hz fueron cruzadas durante 5 días consecutivos en 1-3 ocasiones cada una con diferentes machos de fertilidad probada (**Tabla 5**).

**Tabla 4.** Datos de los cruces realizados con las hembras de hámster KO para *OVGP1* en el análisis de fertilidad *in vivo*.

Hembras KO	Número de cruces <sup>1</sup>
KO 1	6
KO 2	6
KO 3	6
KO 4	6
KO 5	1 cruce durante 1 mes (7-8 estros)
KO 6	1 cruce durante 1 mes (7-8 estros)

<sup>1</sup>Todos los machos empleados en los análisis de fertilidad *in vivo* fueron de fertilidad probada, siendo cada macho diferente en los cruces de una misma hembra.

**Tabla 5.** Datos de los cruces realizados con las hembras de hámster WT y Hz para *OVGP1* en el análisis de fertilidad *in vivo*.

Genotipo de las hembras	Número de hembras empleadas	Número de cruces totales <sup>1</sup>
WT	6	12
Hz	6	14

<sup>1</sup>Todos los machos empleados en los análisis de fertilidad *in vivo* fueron de fertilidad probada, siendo cada macho diferente en los cruces de una misma hembra.

También se analizó la fertilidad *in vivo* en los machos WT, KO y Hz, empleando 4, 10 y 6 animales respectivamente. Cada uno de los machos fue cruzado en 1-2 ocasiones durante 5 días consecutivos con diferentes hembras de fertilidad probada (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Datos de los cruces realizados con los machos de hámster WT, Hz y KO para *OVGP1* en el análisis de fertilidad *in vivo*.

Genotipo de los machos	Número de machos empleados	Número de cruces totales <sup>1</sup>
WT	4	4
Hz	6	6
KO	10	17

<sup>1</sup>Todas las hembras empleadas en los análisis de fertilidad *in vivo* fueron de fertilidad probada, siendo cada hembra diferente en los cruces de un mismo macho.

Con el fin de determinar si existían diferencias significativas en el tamaño de las camadas de hembras y machos en base al genotipo para *OVGP1* de los progenitores, se realizó análisis estadístico de los resultados obtenidos. Para el tratamiento de los datos se utilizó la herramienta RStudio (R version 4.1.3) (RStudioTeam, 2020) junto con la librería “dplyr” (Wickham et al., 2022) para agrupar las camadas según el genotipo de los progenitores. Las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett se usaron para evaluar la distribución normal de los datos y la homocedasticidad de las varianzas, respectivamente. Para la búsqueda de diferencias significativas entre los distintos grupos, cuando las variables resultaron ser paramétricas, se usó la ANOVA de una vía, cuando no había homocedasticidad de las varianzas se utilizó la corrección de “Welch”. Como análisis de contraste *post hoc* se utilizó el método de “Holm” considerando estadísticamente significativas aquellas diferencias con un p-valor < 0,01.

## Conejo

Los estudios de fertilidad *in vivo* se llevaron a cabo en animales en edad fértil, entre 5 y 24 meses de edad. Para comprobar la fertilidad *in vivo* de las hembras WT, KO y Hz se emplearon un total de 4, 2 y 3 hembras respectivamente. De las 2 hembras KO empleadas, una fue cruzada en 5 ocasiones y otra en 2 ocasiones, cambiando en cada uno de los cruces de macho de fertilidad probada (**Tabla 7**). Las hembras con genotipo WT y Hz fueron cruzadas en 1-2 ocasiones cada una con diferentes machos de fertilidad probada (**Tabla 8**).

**Tabla 7.** Datos de los cruces realizados con las conejas KO para *OVGP1* para el análisis de fertilidad *in vivo*.

Hembras KO	Número de cruces <sup>1</sup>
KO 1	5
KO 2	2

<sup>1</sup>Todos los machos empleados en los análisis de fertilidad *in vivo* fueron de fertilidad probada, siendo cada macho diferente en los cruces de una misma hembra.

**Tabla 8.** Datos de los cruces realizados con las conejas WT y Hz para *OVGP1* en el análisis de fertilidad *in vivo*.

Genotipo de las hembras	Número de hembras empleadas	Número de cruces totales <sup>1</sup>
WT	4	5
Hz	3	5

<sup>1</sup>Todos los machos empleados en los análisis de fertilidad *in vivo* fueron de fertilidad probada, siendo cada macho diferente en los cruces de una misma hembra.

También se analizó la fertilidad *in vivo* en los machos WT, KO y Hz empleando un total de 6, 2 y 1 animales respectivamente, siendo cruzados en 1-5 ocasiones cada uno con diferentes hembras de fertilidad probada (**Tabla 9**). En todos los casos se realizó monta natural colocando a la hembra en la jaula del macho durante 15 minutos y confirmando 2-3 montas efectivas. Para confirmar la ausencia de gestación y realizar el siguiente cruce se esperó hasta la posible fecha de parto (siendo la gestación en esta especie de 30 días aproximadamente).

De igual modo al indicado en el modelo de hámster, se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos del tamaño de camada en hembras y machos.

**Tabla 9.** Datos de los cruces realizados con los machos de conejo WT, Hz y KO para *OVGP1* en el análisis de fertilidad *in vivo*.

Genotipo de los machos	Número de machos empleados	Número de cruces totales <sup>1</sup>
WT	6	6
Hz	1	5
KO	2	4

<sup>1</sup>Todas las hembras empleadas en los análisis de fertilidad *in vivo* fueron de fertilidad probada, siendo cada hembra diferente en los cruces de un mismo macho.

## **1.10 Análisis microscópico de oviductos y embriones**

### **1.10.1 Microscopía óptica**

#### **Microscopía óptica de oviducto**

Las muestras de oviducto de hámster y coneja fueron fijadas en formaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 24 horas y se mantuvieron en PBS a 4 °C hasta su procesado e inclusión en parafina.

La inclusión, elaboración de los bloques y obtención de secciones de 5 µm de grosor se realizó de manera idéntica a la indicada en el apartado 1.8.6. En este caso, para la correcta observación microscópica de las diferentes partes de las células se realizó tinción con hematoxilina-eosina y se llevó a cabo el montaje con DPX (Panreac Química S.L.U., España) en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (Santa Cruz Biotechnology, Alemania).

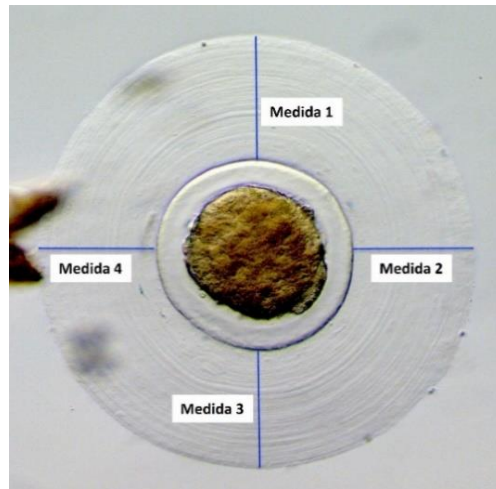
El estudio y visualización de los cortes histológicos de oviducto se realizó con un microscopio Zeiss AxioPhot con óptica convencional y las fotos se adquirieron con cámara modelo DC500 (Leica, Alemania).

#### **Microscopía óptica de embriones**

Las muestras de embriones de hámster en día 1,5 y 2,5 de desarrollo y de conejo en estadio de cigoto/embrión de 2 células, mórula y blastocisto fueron fijadas en placas de 4 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) con PAF al 2% a temperatura ambiente durante 2 horas y se mantuvieron en PBS Dulbecco (Sigma-Aldrich, EE. UU) hasta su posterior evaluación microscópica. El estudio y visualización de los embriones se realizó con un microscopio Zeiss AxioPhot con óptica convencional y las fotos se tomaron con cámara modelo DC500 (Leica, Alemania).

En el caso de los embriones de hámster se contabilizó el número de blastómeras presentes en ambos estadios (día 1,5 y 2,5 de desarrollo) y en las mórulas de conejo se

realizó una medición detallada del grosor de la capa de mucina siguiendo el esquema de medición indicado en la **Figura 25**.



**Figura 25.** Esquema de medición de la capa de mucina en embriones de conejo en estadio de mórula.

Para determinar si existían diferencias significativas en el número de blastómeras de los embriones de hámster, así como en el espesor de la capa de mucina de las mórulas de conejo en base al genotipo para *OVGP1* de los progenitores, se realizó el análisis estadístico comparado de los datos obtenidos. Para el tratamiento de los datos en el caso del análisis del número de blastómeras se utilizó la herramienta RStudio (R version 4.1.3) (RStudioTeam, 2020) junto con la librería “dplyr” (Wickham et al., 2022) y para el análisis del grosor de la capa de mucina el programa SPSS 27.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU, 2002), agrupando así los embriones según el genotipo de los progenitores. Las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett se usaron para evaluar la distribución normal de los datos y la homocedasticidad de las varianzas, respectivamente. Para la búsqueda de diferencias significativas entre los distintos grupos, cuando las variables resultaron ser paramétricas, se usó la ANOVA de una vía. Como análisis de contraste *post hoc* se utilizó el método de “Holm” para el análisis del número de blastómeras y el método de “Bonferroni” para el análisis del grosor de la capa de mucina, considerando estadísticamente significativas aquellas diferencias con un p-valor < 0,01 y < 0,05 respectivamente. Para la creación de los gráficos se utilizó el programa Prism 8 (GraphPad Software, 2023).

### **1.10.2 Microscopía electrónica**

Las muestras de oviducto de hámster y coneja fueron fijados al 0,5% de glutaraldehído durante 2 horas a 4 °C y se conservaron en PBS Dulbecco (Sigma-Aldrich, EE. UU) a 4 °C hasta su posterior inclusión.

La inclusión se realizó manualmente. Los pasos iniciales abarcaron una deshidratación progresiva de la muestra en soluciones crecientes de etanol (50, 70, 90, B95 y 100%). A continuación, se realizaron 2 inmersiones en la Resina LR-White Hard grade Acrylic Resin (Agar Scientific, Reino Unido) al 70% de etanol durante 1 hora cada una y a continuación 3 inmersiones en LR - WHITE absoluta (2 de ellas de 1 hora y la última durante toda la noche). Para la elaboración de los bloques, a la mañana siguiente se colocaron las muestras de oviductos en cápsulas de gelatina y se procedió a la polimerización del LR - WHITE a 55 °C en vacío durante 24 horas. Tras el enfriado del bloque y su desmoldado se realizaron dos tipos de cortes, semifinos de 1 µm y ultrafinos de 70 nm de grosor, empleando ultramicrotomo LKB-III con cuchilla de vidrio (Leica, Alemania) y ultramicrotomo modelo Ultracut R con cuchilla de diamante (Leica, Alemania) respectivamente. Los cortes semifinos se montaron en portaobjetos gelatinizados, se tiñeron con azul de toluidina al 0,5% y se examinaron con un microscopio óptico DMRB (Leica, Alemania). La cámara de adquisición de imágenes fue modelo Lumenera Infinity (Microsercon, España). Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo al 5% (Electron Microscopy Science, Reino Unido) y citrato de plomo al 2,5% (Electron Microscopy Science, Reino Unido) empleando rejillas de cobre 100 mesh (Electron Microscopy Science, Reino Unido). El estudio y visualización de los cortes histológicos ultrafinos de oviducto se realizó con microscopio electrónico de transmisión modelo JEM-2010 (JEOL, Japón). La cámara de adquisición de imágenes fue ORIUS SC600 (Gatan, EE. UU) montada en eje con el microscopio en la parte inferior e integrada dentro del programa de adquisición y tratamiento de imágenes DigitalMicrograph 1.80.70 para GMS 1.8.0. (Gatan, EE. UU).



### 1.11 Análisis transcriptómico de oviductos de hámster

Para valorar posibles cambios en la expresión génica en el oviducto de hembras de hámster KO para *OVGP1*, se realizó un estudio transcriptómico comparado de oviducto mediante la técnica RNA-seq. La técnica fue realizada en la empresa Novogene.

Las muestras de partida fueron ARN total obtenido de oviductos preservados a -80 °C. Para poder ser analizadas mediante RNA-seq las muestras debían tener al menos 400 ng totales de ARN y un valor RIN (del inglés, RNA Integrity Number) de integridad del ARN  $\geq 6,8$ . Por ello, previamente a la realización de la técnica de transcriptómica se analizó la concentración y pureza de las muestras en la sección de biología molecular del ACTI de la Universidad de Murcia mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, EE. UU). Adicionalmente se evaluó la integridad del ARN, mediante bioanalizador (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, EE. UU).

La técnica RNAseq se realizó empleando la técnica de secuenciación de nueva generación, de alto rendimiento y precisión. Se emplearon las plataformas Illumina NovaSeq de última generación que utilizan una estrategia de secuenciación de 150 pb por pares (*short-reads*) (Marguerat y Bähler, 2010).

Los ficheros FASTQ correspondientes a cada muestra se procesaron con kallisto v 0.46 (Bray et al., 2016). En primer lugar, se construyeron índices a partir del transcriptoma de referencia de *Mesocricetus auratus* (región codificante del genoma depositado bajo el ID GCF\_017639785.1 en RefSeq). Tras unos análisis preliminares se vio que el porcentaje de lecturas pseudoalineadas era superior con un índice de tamaño de k-mero de 19, por lo que se empleó este índice para el pseudoalineamiento y cuantificación de la expresión génica. Para el pseudoalineamiento se empleó el módulo quant de kallisto con 100 pasos de *bootstrapping*. Los resultados en forma de ficheros .h5 se procesaron mediante un script en R (v 4.2.0). Tras exportar las tablas de expresión génica con tximport (Soneson et al., 2015), los genes diferencialmente expresados se evaluaron con el paquete DESeq2 (Love et al., 2014). Se consideraron diferencialmente expresados los genes con una ratio de falsos positivos (FDR, del inglés *False Discovery*

*Rate*) menor a 0,05 (FDR < 0,05) y un valor absoluto del logaritmo en base 2 del FC (del inglés *Fold Change*) superior a 0,75 ( $\log_2 FC > |0,75|$ ). Para concluir, se realizó un mapa de calor mediante la herramienta ComplexHeatmap (Gu et al., 2016) y un diagrama de dispersión mediante la herramienta Package 'ggplot2' (Wickham et al., 2014).

Para asignar el nombre oficial correspondiente a cada gen se utilizó la herramienta biomaRt (Durinck et al., 2005), la cual parte del ID del transcrito y mediante la base de datos Ensembl (ensembl.org) (Cunningham et al., 2022) le asigna el nombre del gen al que pertenece. Los genes desconocidos para *Mesocricetus auratus* se reanotaron con el programa EggNog mapper (Cantalapiedra et al., 2021).

### **1.12 Análisis transcriptómico de embriones de hámster**

Para valorar posibles cambios en la expresión génica de los embriones procedentes de hembras KO para *OVGP1*, se realizó un estudio transcriptómico comparado de embriones en día 2,5 de desarrollo mediante la técnica de microarrays. La técnica fue realizada en la sección de biología molecular del ACTI de la Universidad de Murcia. La muestra de partida fue ADNc obtenido a partir de ARN total de embriones.

Se limpiaron las dianas de ADNc y, tras la fragmentación y el etiquetado terminal, se incluyeron 2,3 µg de ADNc fragmentado y biotinilado en la mezcla de hibridación, utilizando el kit GeneChip® Hybridization, Wash and Stain (Affymetrix Thermo Fisher Scientific, EE. UU) según las recomendaciones del fabricante. Las preparaciones resultantes se incubaron en Mouse Clariom S Arrays (Affymetrix Thermo Fisher Scientific, EE. UU) con rotación a 60 rpm durante 16 horas a 45 °C. A continuación, se lavaron y tiñeron todos los arrays antes de escanearlos con GeneChipTMSystem 3000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). Tras el escaneo con GeneChipTMSystem 3000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) los datos de los microarrays se procesaron con el programa Affymetrix Expression Command Console (Affymetrix Thermo Fisher Scientific, EE. UU). El análisis de los datos se realizó con media robusta de matrices múltiples lo que permitió que los valores de intensidad brutos se corrigieran de fondo, se transformaran en log<sub>2</sub> y se normalizaran por cuantiles para obtener un valor de intensidad individual para cada conjunto de sondas. Para el análisis estadístico se

utilizaron los programas Partek Genomics Suite y Partek Pathways (Partek Incorporated, St. Louis, EE. UU) y se aplicó una prueba de ANOVA con un umbral restrictivo de valor de probabilidad inferior a 0,05 ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). Por tanto, se consideraron diferencialmente expresados los genes con un  $p$ -valor inferior a 0,05 ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) y un FC superior a 2 ( $FC > |2|$ ). Finalmente, se analizaron las redes de interacción, reacción y relación molecular que mostraban genes expresados diferencialmente mediante la enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG).

Para reducir la dimensionalidad de las variables se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) (Blighe, 2019) mediante el programa Partek Genomics Suite versión 7.19 ([www.partek.com](http://www.partek.com)).

La anotación biológica se analizó mediante los paquetes clusterProfiler y enrichplot de R (Wu et al., 2021).

## 2. Evolución del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae*

Los análisis previos del gen *OVP1* en *Rattus norvegicus* demostraron la presencia de un indel en el exón 1 que conduce a la formación de codones de parada prematuros, siendo *OVGP1* un pseudogén en esta especie (Tian et al., 2009). Sin embargo, *Mus musculus* perteneciente, al igual que *Rattus norvegicus*, a la subfamilia *Murinae* presenta un gen funcional.

En base a esta premisa, para determinar qué otras especies se ven afectadas por este proceso y datar la aparición de la pseudogenización de *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae* se estudió el comienzo del gen (exones 1 a 6) en varias especies de *Muridae*, la familia de roedores a la que pertenecen *Mus* y *Rattus*. Los datos disponibles en las bibliotecas se completaron secuenciando el inicio del gen en varias especies de la subfamilia *Murinae* consiguiendo así una mejor representación de las tribus de esta subfamilia. En la **Tabla 10** quedan indicadas todas las especies empleadas en el estudio, diferenciando entre aquellas cuya secuencia para *Ovgp1* se obtuvo de bases de datos o de la amplificación mediante PCR y secuenciación durante este trabajo.

V. Material y métodos

**Tabla 10.** Especies pertenecientes a la subfamilia *Murinae* empleadas para la amplificación del gen *Ovgp1* mediante PCR.

Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especie	Secuencia	
Muridae	Murinae	<i>Apodemyini</i>	<i>Apodemus</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	XM_052180919 (NC_067475)	
		<i>Arvicanthini</i>	<i>Dasymys</i>	<i>Dasymys incomtus</i>	secuencia obtenida en este estudio	
				<i>Dasymys rufulus</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Lemniscomys</i>	<i>Lemniscomys zebra</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Arvicanthis</i>	<i>Arvicanthis niloticus</i>	XM_034500638 (NC_047661)	
			<i>Grammomys</i>	<i>Grammomys surdaster</i>	XM_028755672 (NW_021620880)	
		<i>Hydromyini</i>	<i>Conilurus</i>	<i>Conilurus penicilatus</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Pseudomys</i>	<i>Pseudomys australis</i>	secuencia obtenida en este estudio	
		<i>Murini</i>	<i>Mus</i>	<i>Mus musculus</i>	NM_007696 (ENSMUSG00000074340)	
				<i>Mus caroli</i>	XM_021159142 (NC_034572)	
				<i>Mus spretus</i>	T0062152 (SPRETEIj)	
				<i>Mus spicilegus</i>	ENSMsIT00000008008 (MUSP714)	
				<i>Mus pahari</i>	XM_021197069 (NC_034593)	
		<i>Praomyini</i>	<i>Myomys</i>	<i>Myomys fumatus</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Praomys</i>	<i>Praomys rostratus</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Mastomys</i>	<i>Mastomys coucha</i>	XM_031376141 (NW_022196898)	
		<i>Millardini</i>	<i>Millardia</i>	<i>Millardia meltada</i>	secuencia obtenida en este estudio	
		<i>Otomyini</i>	<i>Myotomys</i>	<i>Myotomys unisulcatus</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Parotomys</i>	<i>Parotomys brantsii</i>	secuencia obtenida en este estudio	
		<i>Rattini</i>	<i>Bandicota</i>	<i>Bandicota bengalensis</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Berylmys</i>	<i>Berylmys bowersi</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Bunomys</i>	<i>Bunomys chrysocomus</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Chryromyscus</i>	<i>Chryromyscus chiropus</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Diplothrix</i>	<i>Diplothrix legata</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Leopoldamys</i>	<i>Leopoldamys edwardsi</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Maxomys</i>	<i>Maxomys surifer</i>	secuencia obtenida en este estudio	
			<i>Rattus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	BLAST Rnor_6.0 (chromosome 2)	
				<i>Rattus exulans</i>	secuencia obtenida en este estudio	
		<i>Rattus tanezumi</i>		secuencia obtenida en este estudio		
		<i>Deomyinae</i>	-	<i>Acomys</i>	<i>Acomys russatus</i>	XM_021658779 (NHIT1001850)
		<i>Gerbillinae</i>	-	<i>Meriones</i>	<i>Meriones unguiculatus</i>	BLAST LR877234

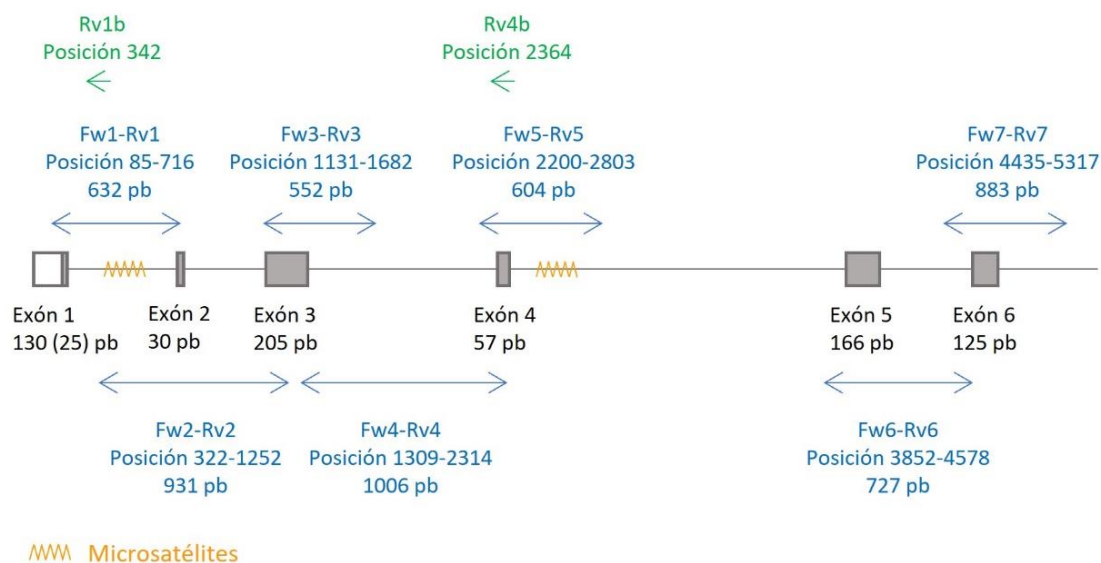
## 2.1 Diseño de cebadores

La secuencia de ADNg de *Ovgp1* de *Mus musculus* está formada por 13.622 pb (ENSMUSG00000074340) y consta de 11 exones (NM\_007696.2). Mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (blast.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul et al., 1990), se realizó una búsqueda de coincidencias con la secuencia de ARNm de *Mus musculus* (NM\_007696.2) y miembros de la familia *Muridae* en las bases de datos GenBank (Clark et al., 2016) y Ensembl (Cunningham et al., 2022). Las secuencias obtenidas (**Tabla 10**) se alinearon con el programa MUSCLE implementado en SeaView (Gouy et al., 2010) y se diseñaron cebadores en las regiones más conservadas del alineamiento. Las múltiples parejas de cebadores diseñadas abarcaron las regiones de ADNg de *Ovgp1* de los exones 1 al 6 para su amplificación y secuenciación (**Tabla 11 y Figura 26**).

**Tabla 11.** Cebadores utilizados para la amplificación de las regiones de ADNg de *Ovgp1* de los exones 1 al 6. En las diferentes columnas podemos ver: el nombre del cebador, el número de pares de bases (pb), si se trata de un cebador directo (d) o reverso (r), la secuencia (5'→3') y la temperatura de fusión del cebador (Tm).

Nombre	Pb (d/r)	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
<b>Fw1</b>	19 (d)	catagctaccaggcagttg	58
<b>Rv1</b>	21 (r)	cttcatcttgaccagttaat	58
<b>Rv1b</b>	21 (r)	attaactggtccaagatgaag	58
<b>Fw2</b>	21 (d)	cttcatcttgaccagttaat	58
<b>Rv2</b>	20 (r)	gaggcaaaggcaaatacag	58
<b>Fw3</b>	20 (d)	actgcctacaaactggtgtg	60
<b>Rv3</b>	19 (r)	ggcagttgcaagaggcaag	60
<b>Fw4</b>	21 (d)	cagagttcaacaaactcaagg	60
<b>Rv4</b>	20 (r)	ctgggaggtagagcaagatg	58
<b>Rv4b</b>	20 (r)	catcttgctctacctccag	58
<b>Fw5</b>	21 (d)	agtgacttaaggtgtccatag	60
<b>Rv5</b>	23 (r)	ctaagttcacatcagatgtcta	62
<b>Fw6</b>	19 (d)	cttgtgccaaccaagcttc	62
<b>Rv6</b>	20 (r)	ggcaaactggagctcctaag	62
<b>Fw7</b>	20 (d)	tgtctttctcatagacttgg	56
<b>Rv7</b>	19 (r)	gttacctggcaacacaaca	56

## V. Material y métodos



**Figura 26.** Localización de los cebadores en la secuencia de ADN de *Ovgp1* de ratón (ENSMUSG00000074340). Se indica el tamaño de los exones 1 al 6, los amplicones generados por cada pareja de cebadores y los microsatélites presentes en este fragmento de la secuencia. El exón 1 consta de una parte no codificante representada en blanco y la parte posterior a la metionina inicial representada en gris que sí se traduce a proteína.

## 2.2 Amplificación y análisis de las secuencias genómicas de *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae*

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l con 20-25 ng de ADN, 0,5  $\mu$ l de la enzima polimerasa AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, EE. UU), 2,5  $\mu$ l de tampón 10X, 2  $\mu$ l de dNTP (2,5 mM), 2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,25  $\mu$ l de cada cebador (10  $\mu$ M) y 8,75  $\mu$ l de agua de biología molecular libre de ADNasa y ARNasa.

Las amplificaciones se realizaron en termociclador Mastercycler® personal Thermal Cycler (Eppendorf®, Alemania), programando una fase inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos. Cada ciclo de PCR se repitió 40 veces, contando cada uno de ellos de tres fases: fase de desnaturalización a 94 °C y 30 segundos, fase de alineamiento a T<sub>m</sub> óptima según la pareja de cebadores empleados (**Tabla 11**) y 15 segundos y fase extensión de 72 °C durante 1 minuto y 30 segundos. Para concluir se llevó a cabo una extensión final a 72 °C durante 15 minutos.

Para comprobar la eficiencia de la amplificación por PCR y el tamaño de los amplicones en cada reacción se tomaron 2 µl de cada producto de PCR junto a 4 µl del colorante de carga gel Loading Dye 6x (Thermo Fisher Scientific, EE. UU). A continuación, se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con la adición de 10 µl del colorante fluorescente de ácidos nucleicos GelRed (GelRed® Nucleic Acid Stain, Biotium, EE. UU) para su posterior revelado. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de recorrido TAE 0,5X (Tris Acetate-EDTA, Sigma-Aldrich, EE. UU) a 100 V durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en soporte horizontal. Finalmente, se procedió a su revelado en un transiluminador (Alphalmager MINI, Cell Biosciences, EE. UU).

Los productos de PCR que mostraron una sola banda y suficiente ADN (> 10 ng/µl) se enviaron a la empresa Microsynth France SAS (Vaux-en-Velin, Francia) para su secuenciación.

### 2.3 Construcción del árbol filogenético

Para estudiar la historia evolutiva del gen *Ovgp1* dentro de la subfamilia *Murinae* es necesario construir su árbol filogenético.

Para la construcción del árbol filogenético se comenzó realizando un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas mediante secuenciación junto con las secuencias empleadas en el diseño de los cebadores usando el programa SeaView (Gouy et al., 2010). En el alineamiento múltiple también se incluyeron las secuencias de *Acomys russatus* (subfamilia *Deomyinae*) y *Meriones unguiculatus* (subfamilia *Gerbillinae*) como grupos externos. El alineamiento múltiple del ADN<sub>g</sub> correspondiente a los exones 1 a 6 contenía 31 secuencias de 31 especies de la familia *Muridae* (**Tabla 10**) y 6.726 pb. Para el análisis filogenético solo se utilizaron las zonas correspondientes a los exones, es decir, 626pb.

A continuación, se estimaron las filogenias utilizando el método de máxima verosimilitud con el programa Phyml 3.1 (Guindon y Gascuel, 2003) y la inferencia bayesiana con el programa MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012). El modelo de evolución que mejor se adaptaba a las secuencias obtenidas (HKY+G) se determinó, para el

método de máxima verosimilitud, con el programa jModelTest 2.1 (Darriba et al., 2012) y el criterio de información de Akaike. Para la inferencia bayesiana se utilizó en el programa MrBayes el parámetro  $Nst = mixed$  que permite muestrear diferentes modelos de sustitución. La robustez de los nodos se estimó con 1.000 *bootstraps* para el programa Phylm y probabilidades posteriores para el programa MrBayes. Para el análisis bayesiano, el número de generaciones se fijó en 20.000.000 con un árbol muestreado cada 500 generaciones. La eliminación de los árboles no óptimos, lo que se denomina *burn-in*, se determinó gráficamente con el programa Tracer v.1.7 (Rambaut et al., 2018), comprobando que los tamaños efectivos de las muestras (ESS, del inglés *effective sample sizes*) eran muy superiores a 200. Así, eliminamos el 10% de los árboles. Finalmente, para la visualización del árbol filogenético se empleó el programa Figtree v.1.4.

### 3. Análisis de la secuencia genómica de *ASTL* en lagomorfos mediante PCR

Para el análisis del gen *ASTL* en lagomorfos se emplearon muestras de ADNg de 9 especies de lagomorfos procedentes del Centro de Investigación en Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIBIO) del Campus Agrario de Vairão de la Universidad de Oporto (Vairão, Portugal). Las especies analizadas fueron: conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus cuniculus*), conejo salvaje ibérico (*Oryctolagus cuniculus algirus*), conejo pigmeo (*Brachilagus idahoensis*), conejo cola de algodón oriental (*Sylvilagus floridanus*), conejo de pincel (*Sylvilagus bachmani*), liebre europea (*Lepus europaeus*), liebre ibérica (*Lepus granatensis*), pica daúrica (*Ochotona daurica*) y pica americana (*Ochotona princeps*).

Cada una de las 9 muestras de ADNg de las especies indicadas se empleó como molde para llevar a cabo la amplificación por PCR del gen *ASTL* empleando cebadores específicos (**Anexo 1**). Para el diseño de los cebadores se tomó como referencia que, en ratón, el centro activo de *AstI* está ubicado entre los aminoácidos 182 y 192, incluyendo tres histidinas necesarias para unir el cofactor  $Zn^{2+}$  y el aminoácido del centro catalítico Glu183 (Burkart et al., 2012). El centro activo de ratón es por homología similar al del



ser humano, el cual fue localizado manualmente en el exón 6 a partir de la traducción de los exones de la secuencia canónica de ARNm de *ASTL* humano depositada en la base de datos Ensembl (ensembl.org) (Cunningham et al., 2022). Por tanto, los cebadores fueron diseñados tomando como referencia la región homóloga con conejo del exón 6 del gen *ASTL* humano, donde está presente el sitio activo de *ASTL*.

Las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de 2  $\mu$ l de ADNg y la mezcla de reactivos se llevó a cabo en cabina de flujo laminar (AV-100, AZBIL TELSTAR, S.L.U, España). La reacción de PCR contenía 2  $\mu$ l de ADNg, 1,25  $\mu$ l de cada cebador a 10  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ l de la enzima polimerasa KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems, EE. UU) y 8  $\mu$ l de agua de biología molecular libre de ADNasas y ARNasas para completar un volumen final de 25  $\mu$ l.

Las amplificaciones se efectuaron en termociclador Mastercycler® personal Thermal Cycler (Eppendorf®, Alemania), programando una fase inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos. Cada ciclo de PCR se repitió 35 veces, contando cada uno de ellos de tres fases: fase de desnaturalización a 95 °C y 15 segundos, fase de alineamiento durante 15 segundos a  $T_m$  óptima de 60 °C para el par de cebadores empleado (**Anexo 1**) y fase de extensión a 72 °C y 1 segundo. Para concluir se llevó a cabo una extensión final a 72 °C durante 1 minuto.

La eficiencia de la amplificación por PCR y el tamaño de los amplicones en cada reacción fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa siguiendo los pasos indicados en el apartado 1.6. La identidad de todos los productos amplificados fue verificada mediante secuenciación por Sanger en la sección de biología molecular del ACTI de la Universidad de Murcia previa purificación siguiendo los pasos indicados también en el apartado 1.6. Finalmente, para valorar la posible pseudogenización de *ASTL* en las especies de lagomorfos analizadas se realizó el alineamiento múltiple de todas las secuencias obtenidas mediante el programa BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul et al., 1990).



## **VI. RESULTADOS**



## 1. Modelos KO para *OVGP1* de hámster y conejo

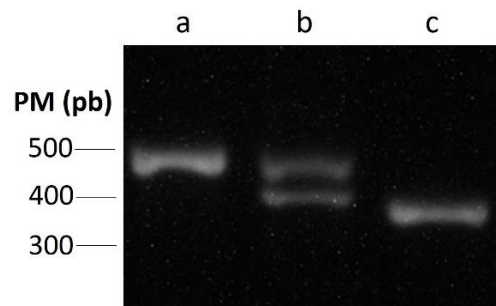
### 1.1 Caracterización de los modelos KO

#### 1.1.1 Genotipado

##### Hámster

Se confirmó el genotipo para *OVGP1* de todos los hámsteres generados (WT, Hz y KO) mediante electroforesis de los productos de PCR y estudio de los cromatogramas obtenidos tras su secuenciación.

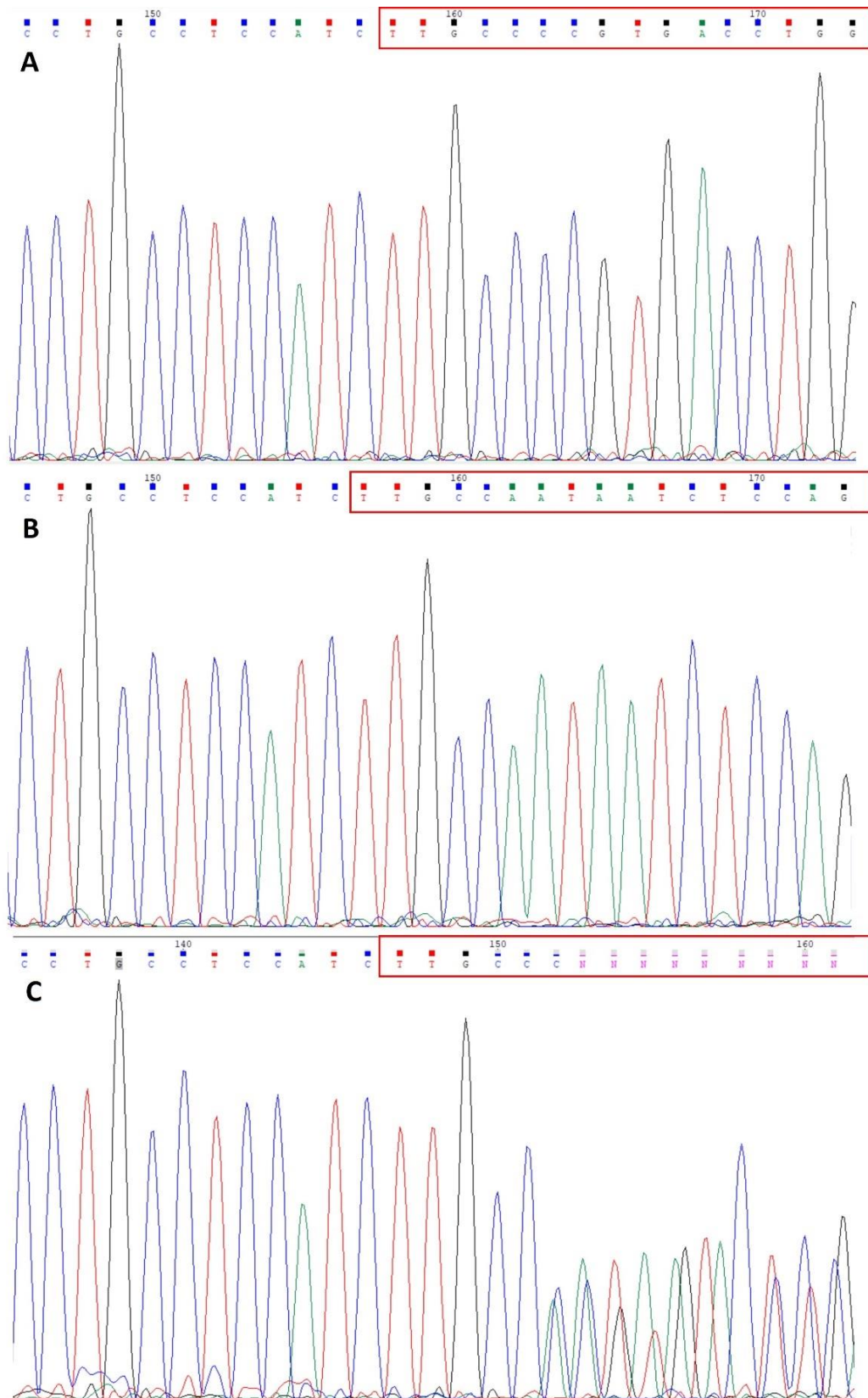
Tras la electroforesis se detectaron 2 bandas de diferente tamaño según el genotipo del animal: 467 pb en animales WT y 391 pb en KO. El menor tamaño del amplicón en los animales KO es debido a la delección de 76 pb generada mediante la tecnología CRISPR-Cas9 en el gen *OVGP1* de esta especie. En el caso de los animales Hz aparecían ambas bandas, la correspondiente al alelo WT y la correspondiente al alelo KO (**Figura 27**).



**Figura 27.** Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos por PCR correspondientes a un fragmento de ADN que abarca la zona de delección generada mediante CRISPR-Cas9 en el gen *OVGP1* de hámster. Se muestran los amplicones correspondientes a dicho fragmento en animales con genotipo WT (a), Hz (b) y KO para *OVGP1* (c). Tamaño de los amplicones 467 pb en animales WT, 391 pb en animales KO y ambas bandas en animales Hz.

La secuenciación por Sanger de los amplicones confirmó la identidad de los productos. Los animales con genotipo WT mostraron secuencias íntegras, los animales KO presentaron secuencias con la delección de 76 pb generada y los animales Hz mostraron pérdida de resolución debido al solapamiento de la secuencia WT de un alelo y la secuencia KO del otro alelo (**Figura 28**).

## VI. Resultados

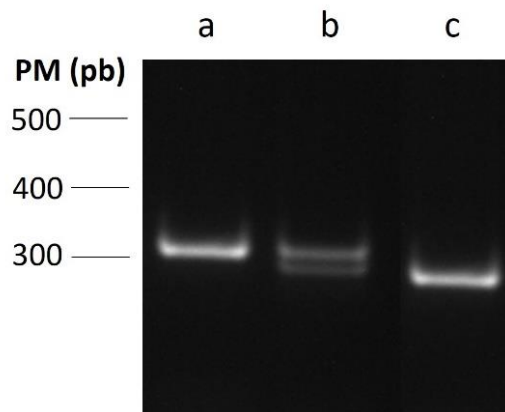


**Figura 28.** Cromatogramas obtenidos tras la secuenciación por Sanger de los amplicones correspondientes a un fragmento de ADN que abarca la zona de delección generada mediante CRISPR-Cas9 en el gen *OVGP1* de hámster. A) Los animales WT mostraron integridad en la secuencia, B) los animales KO presentaron la delección de 76 pb generada y C) los animales con genotipo Hz presentaron pérdida de resolución en el cromatograma debido al solapamiento de la secuencia WT de un alelo y la secuencia KO del otro alelo. La zona donde se ubicaría dicha delección aparece recuadrada en rojo en cada uno de los cromatogramas.

## Conejo

Se confirmó el genotipo para *OVGP1* de todos los conejos generados (WT, Hz y KO) mediante electroforesis de los productos de PCR y estudio de los cromatogramas obtenidos tras su secuenciación.

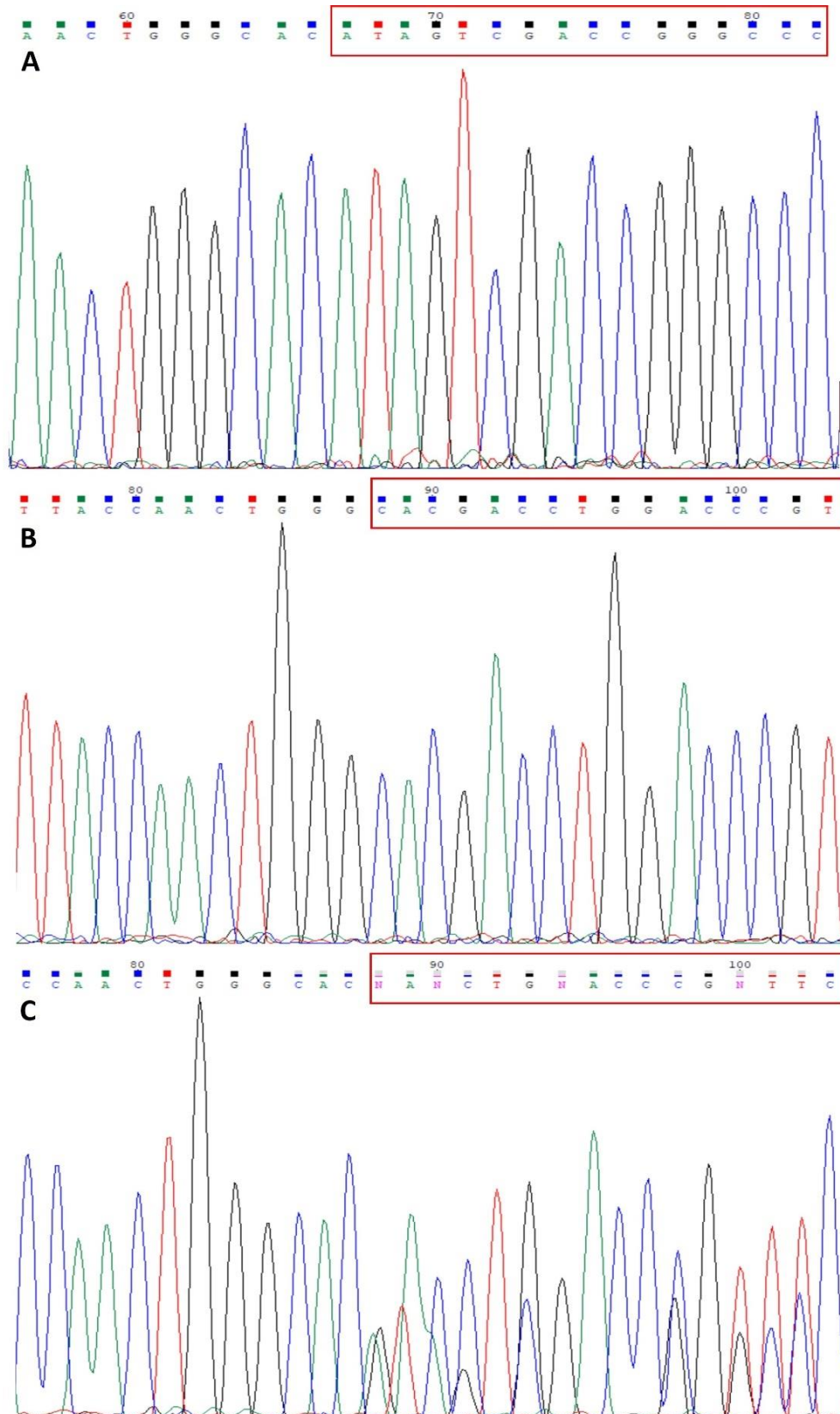
Tras la electroforesis se detectaron dos bandas de diferente tamaño según el genotipo del animal: 315 pb en animales WT y 280 pb en KO, debido a la deleción de 35 pb generada mediante la tecnología CRISPR-Cas9 en el gen *OVGP1* en los animales KO. En el caso de los animales Hz aparecían ambas bandas, la correspondiente al alelo WT y la correspondiente al alelo KO (**Figura 29**).



**Figura 29.** Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones correspondientes a un fragmento de ADN que abarca la zona de deleción generada mediante CRISPR-Cas9 en el gen *OVGP1* de conejo. Se muestran los amplicones correspondientes a dicho fragmento en animales con genotipo WT (a), Hz (b) y KO para *OVGP1* (c). Tamaño de los amplicones: 315 pb en los animales WT, 280 pb en los animales KO y ambos en los animales Hz.

La secuenciación por Sanger de los amplicones confirmó la identidad de los productos. Los animales WT mostraron secuencias íntegras, los animales KO presentaron secuencias con la deleción de 35 pb generada y los animales Hz mostraron pérdida de resolución debido al solapamiento de la secuencia WT de un alelo y la secuencia KO del otro alelo (**Figura 30**).

VI. Resultados



**Figura 30.** Cromatogramas obtenidos tras secuenciación por Sanger de los amplicones correspondientes a un fragmento de ADNq que abarca la zona de delección generada mediante CRISPR-Cas9 en el gen *OVGP1* de conejo. A) Los animales WT mostraron integridad en la secuencia, B) los animales KO presentaron la delección de 35 pb generada y C) los animales con genotipo Hz presentaron pérdida de resolución en el cromatograma debido al solapamiento de la secuencia WT de un alelo y la secuencia KO del otro alelo. La zona donde se ubicaría dicha delección aparece recuadrada en rojo en cada uno de los cromatogramas.

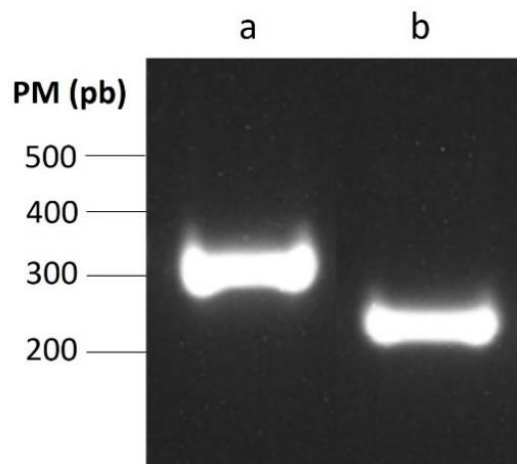


### 1.1.2 Análisis de la expresión génica de *OVGP1* en oviducto

#### Hámster

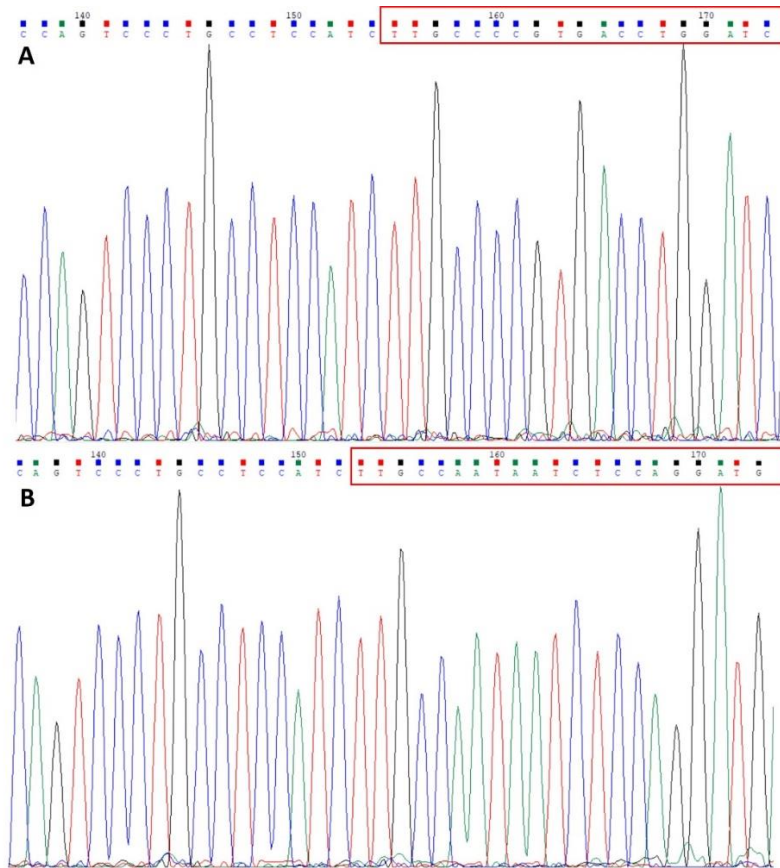
Para determinar la expresión del gen *OVGP1* en oviducto se realizó amplificación mediante RT-PCR de una región del ARNm de *OVGP1* de hámster que abarcaba la delección de 76 pb generada con la tecnología CRISPR-Cas9 en esta especie.

Tras la amplificación por RT-PCR, los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa obteniéndose dos tamaños de bandas: 299 pb en WT y 223 pb en KO, debido a la presencia de la delección de 76 pb generada en los animales KO (**Figura 31**). La secuenciación por Sanger de los amplicones confirmó la identidad de los productos de RT-PCR. Los animales con genotipo WT mostraron secuencias íntegras, los animales KO presentaron secuencias con la delección de 76 pb generada y los animales H<sub>z</sub> mostraron pérdida de resolución debido al solapamiento de la secuencia WT de un alelo y la secuencia KO del otro alelo (**Figura 32**).



**Figura 31.** Análisis de la expresión génica de *OVGP1* en oviducto de hámster mediante RT-PCR. Se muestra el gel de agarosa que nos permite visualizar el tamaño de los amplicones obtenidos en animales con genotipo WT (299 pb) (a) y KO para *OVGP1* (223 pb) (b).

## VI. Resultados



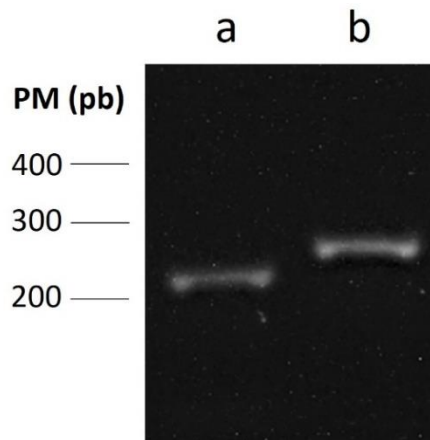
**Figura 32.** Cromatogramas obtenidos tras secuenciación por Sanger de los amplicones correspondientes a un fragmento de ARNm que abarca la zona de delección generada mediante CRISPR-Cas9 en el gen *OVGP1* de hámster. A) Los animales WT mostraron integridad en la secuencia y B) los animales KO presentaron la delección de 76 pb generada. La zona donde se ubicaría dicha delección aparece recuadrada en rojo en cada uno de los cromatogramas.

### Conejo

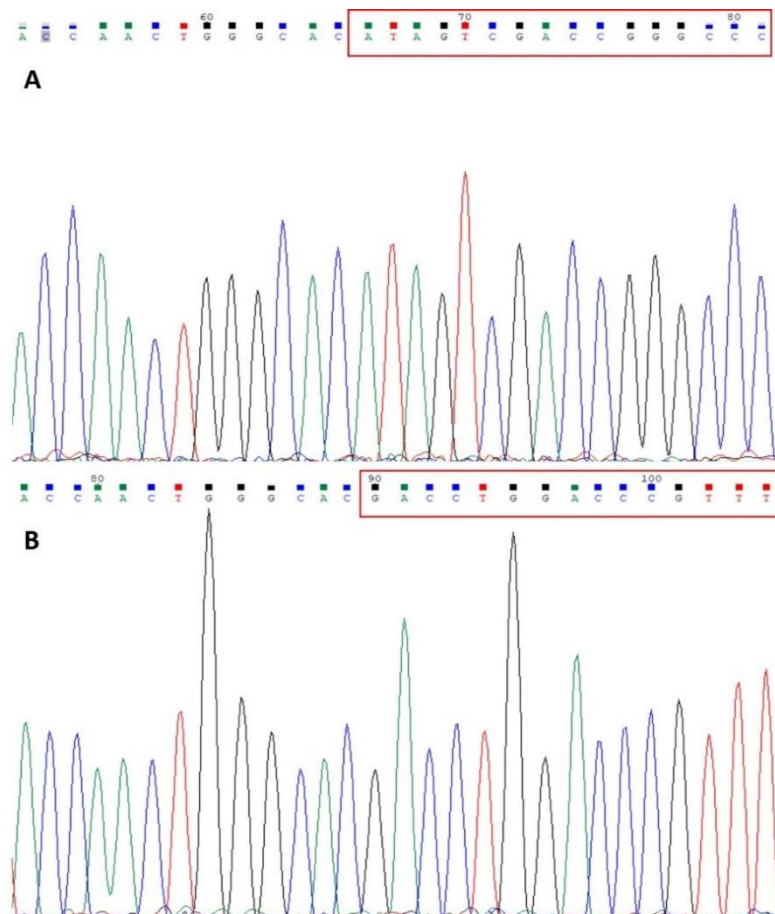
Para determinar la expresión de *OVGP1* en el oviducto de esta especie se amplificó mediante RT-PCR un fragmento de la secuencia de ARNm de *OVGP1* de conejo que abarcaba la delección generada de 35 pb mediante la tecnología CRISPR-Cas9 en esta especie.

Tras la amplificación por RT-PCR, los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa obteniéndose dos tamaños de bandas: 262 pb en WT y 227 pb en KO, debido a la presencia de la delección de 35 pb en los animales KO (**Figura 33**). La secuenciación por Sanger de los amplicones confirmó la identidad de los productos de RT-PCR. Los animales con genotipo WT mostraron secuencias íntegras, los animales KO presentaron secuencias con la delección de 35 pb generada y los animales

Hz mostraron pérdida de resolución debido al solapamiento de la secuencia WT de un alelo y la secuencia KO del otro alelo (**Figura 34**).



**Figura 33.** Análisis de la expresión génica de *OVGP1* en oviducto de coneja mediante RT-PCR. Se muestra el gel de agarosa que nos permite visualizar el tamaño de los amplicones obtenidos en animales con genotipo KO para *OVGP1* (227 pb) (a) y WT (262 pb) (b).



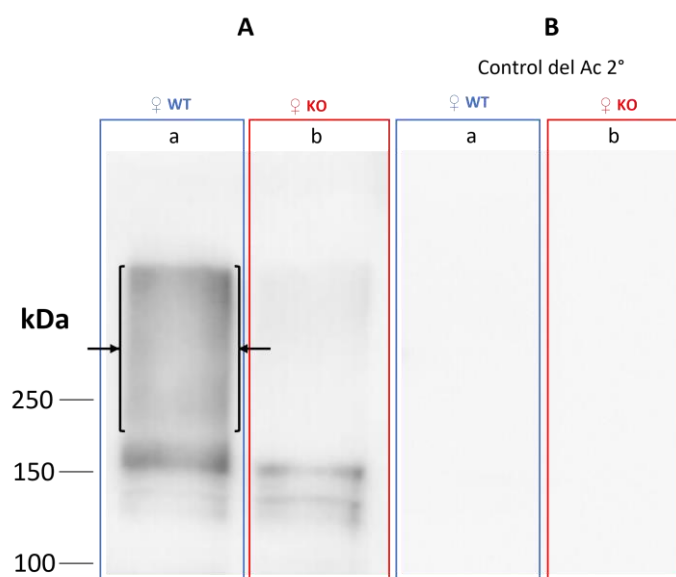
**Figura 34.** Cromatogramas obtenidos tras secuenciación por Sanger de los amplicones correspondientes a un fragmento de ARNm que abarca la zona de deleción generada mediante CRISPR-Cas9 en el gen *OVGP1* de conejo. A) Los animales WT mostraron integridad en la secuencia y B) los animales KO presentaron la deleción de 35 pb generada. La zona donde se ubicaría dicha deleción aparece recuadrada en rojo en cada uno de los chromatogramas.

### 1.1.3 Detección de la proteína oviductina

#### 1.1.3.1 Electroforesis en SDS-PAGE y Western-blot de muestras oviductales

##### Hámster

La presencia de la proteína oviductina en oviducto de hámster se comprobó mediante electroforesis en SDS-PAGE y posterior Western-blot. Los resultados mostraron una banda ancha de aproximadamente 160 a 350 kDa en hembras WT y ausencia de dicha banda en las hembras KO, confirmando la ausencia de oviductina en el oviducto de los animales KO (**Figura 35**).

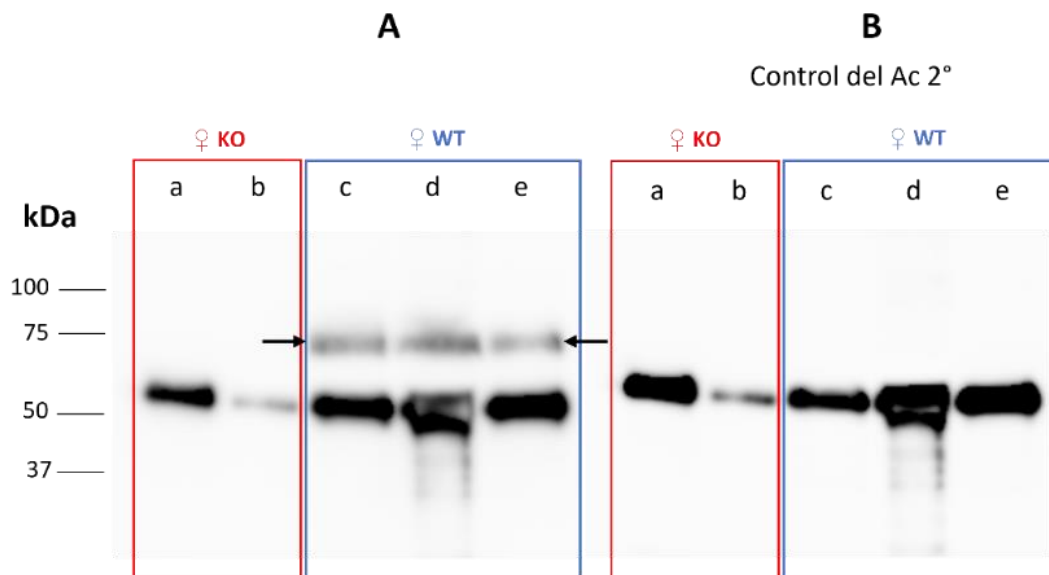


**Figura 35.** Análisis mediante SDS-PAGE y Western-blot de la presencia de la proteína oviductina en muestras oviductales de hámster. En cada calle se analizaron 50 µg de proteína total. Se empleó un anticuerpo primario policlonal anti-oviductina y un anticuerpo secundario monoclonal contra inmunoglobulina G de conejo. A) Se observa una banda ancha de aproximadamente 160 a 350 kDa (indicada con flechas negras) correspondiente a oviductina en animales WT (a) y ausencia de banda en el peso esperado en animales KO para *OVGP1* (b). Se observan otras bandas minoritarias inespecíficas que son reconocidas por el anticuerpo primario anti-oviductina utilizado. B) Control del anticuerpo secundario, no se observa ninguna banda.

##### Conejo

Se realizó electroforesis en SDS-PAGE y posterior Western-blot en muestras de FO de coneja para determinar la presencia de la proteína oviductina en el oviducto de esta especie. Los resultados mostraron una banda de aproximadamente 70 kDa en

hembras WT y ausencia de dicha banda en las hembras KO, confirmando la ausencia de la proteína oviductina en el oviducto de los animales KO (**Figura 36**).



**Figura 36.** Análisis mediante SDS-PAGE y Western-blot de la presencia de la proteína oviductina en FO de coneja. En cada calle se analizaron 10 µg de proteína total. Se empleó un anticuerpo primario policlonal anti-oviductina y un anticuerpo secundario monoclonal contra inmunoglobulina G de conejo. A) Se observa una banda de aproximadamente 70 kDa (indicada con flechas negras) correspondiente a oviductina en las hembras WT (c, d y e) y ausencia de banda en el peso esperado en las hembras KO para *OVGP1* (a y b). Se aprecian otras bandas de aproximadamente 50 kDa correspondientes a inmunoglobulina G de conejo reconocidas por el anticuerpo secundario empleado. B) Control del anticuerpo secundario donde se observan las bandas inespecíficas.

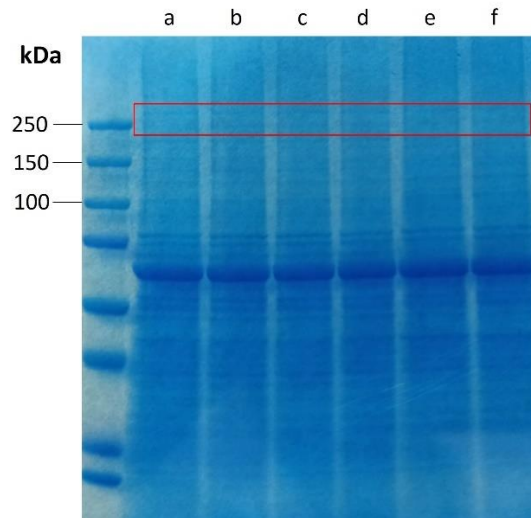
### 1.1.3.2 Análisis proteómico

#### Análisis de muestras oviductales

##### Hámster

Como otra metodología para confirmar la presencia de oviductina en oviducto de hembras WT y la ausencia de esta en hembras KO se empleó la técnica HPLC-MS/MS. Para ello las muestras oviductales se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE, tiñendo posteriormente el gel con azul de Coomassie para poder observar las diferentes bandas en las que se separaban las muestras (**Figura 37**).

## VI. Resultados



**Figura 37.** Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de muestras oviductales de hámster. Se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de proteína total en cada calle. Las calles a, b y c corresponden a muestras de hembras KO para *OVGP1* y las calles d, e y f a muestras de hembras WT. Se recortó cada calle del gel a la altura de 250 kDa (recuadro rojo) siendo a continuación estas bandas recortadas analizadas mediante HPLC-MS/MS.

El gel fue recortado a la altura de 250 kDa, tamaño detectado en WB para la oviductina en esta especie. Las muestras obtenidas a partir del gel fueron tripsinizadas y analizadas mediante HPLC-MS/MS. Un total de 12 péptidos de oviductina de hámster fueron detectados en las muestras oviductales de hembras WT (**Tabla 12 y Figura 38**). Por el contrario, no se detectó ningún péptido de dicha proteína en las muestras oviductales de hembras KO, confirmando la ausencia de la proteína oviductina en el oviducto de estos animales.

**Tabla 12.** Péptidos correspondientes a la proteína oviductina de hámster detectados mediante HPLC-MS/MS en muestras oviductales de hembras de hámster WT. *Score*: puntuación basada principalmente en la intensidad de señal. *SPI*: porcentaje de señales detectadas de cada fragmento peptídico respecto al número de señales teóricas que debería producir. *m/z*: relación masa/carga del fragmento detectado.

Péptidos	Posición en la secuencia	Score	SPI	m/z	N.º de veces detectado
ILYPEFNK	76-83	14,46	79,8	512,2791	5
TLLSVGGWNFGTSR	93-106	13,77	73,4	747,8895	1
FTTMLSTLASR	107-117	17,99	84,4	570,7983	4
FIGSVVSFLR	120-129	11,3	63	562,8273	4
THGFDGLDLFFLYPGLR	130-146	15,46	88,3	656,6719	4
GSPINDR	147-153	7,39	59,2	379,6932	1
EALLTQRPR	170-178	7,25	59,2	361,8802	1
STGHNSPLFSLPEDPK	222-237	15,79	91,1	575,953	8
NLGAPADK	248-255	9,59	71,8	393,2115	3
LLMGFPAYGR	256-265	17,85	82,9	570,7975	3
TFHLLR	266-271	13,57	76,9	262,826	3
AVVLEK	616-621	8,92	61,8	329,7108	1

1 MGRLLLWVGLVLLMKPNDGTAYKLVCFYFTNWAHSRVPASILPRDLDPFLCTHLIFAF

60 SMSNNQIVANNLQDEK**ILYPEFNK**LKERNRALK**TLLSVGGWNFGTSRFTTMLSTLASRE**

119 **KFIGSVVSFLRTHGFDGLDLFFLYPGLR**GSPINDRWNFLFLIEELQFAFEKE**EALLTQRP**

178 **R**LLLSAAVSGIPYIIQTSYDVHLLGRRDLDFINVLSYDLHGSWEK**STGHNSPLFSLPEDP**

237 **K**SSAFAMNYWR**NLGAPADKLLMGFPAYGR**TFHLLRESKNGLQAASMPASPGKYTKQAG

296 FLAYYEVCSFIQRAEKHWIDHQYVPYAYKGKEWVGYYDDAVSFSYKAMFVKKEHFGGAMV

355 WTLDMDDVRGTFCGNGPFLVHILNELLVRAEFNSTPLPQFWFTLPVNSSGPGSESLPA

414 TEELTTDTVKILPPGGEAMATEVHRKYEKVTTIPNGGFVTPAGTTSPTTHAVALERNAM

473 APGAKTTTSLDLLSETMTGMTVTVQQTQTAGRETMTTVGNQSVTPGGETMTTVGNQSVTP

532 GGETMTTVGNQSVTPGGETVTIVGNKSVTPVGETVTIVGNKSVTPGGQTTATVGSQSVT

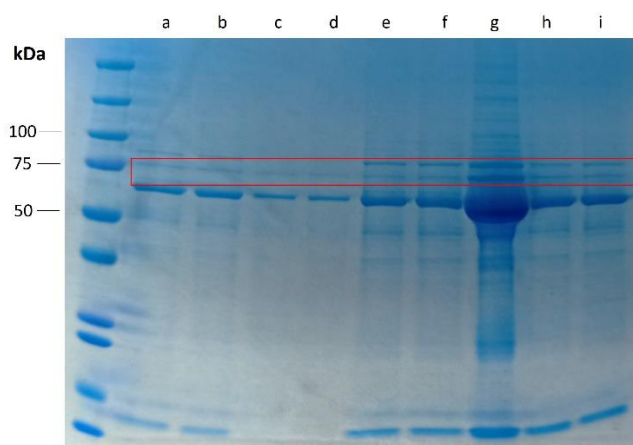
591 PPGMDTTLVYLQTMTLSEKGTSSKK**AVVLEK**VTVPPREISVMPNEQNTALNRENLIAEV

650 ESYSQDG

**Figura 38.** Secuencia de aminoácidos de la proteína oviductina de hámster (NP\_001268266.1). Los 12 péptidos de oviductina detectados mediante HPLC-MS/MS en las muestras oviductales de hembras de hámster WT aparecen en color azul.

## Conejo

Con el fin de confirmar la presencia de la proteína oviductina en FO de conejas WT y la ausencia de esta en las hembras KO se empleó la técnica HPLC-MS/MS. Para ello muestras de FO fueron sometidas a electroforesis en SDS-PAGE, tiñendo posteriormente el gel con azul de Coomassie para poder observar las diferentes bandas en las que se separaban las muestras (**Figura 39**).



**Figura 39.** Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de muestras de FO de coneja. Se cargaron de 10-20  $\mu\text{g}$  de proteína total en cada calle. Las calles a, b, c y d corresponden a muestras de conejas KO para *OVGP1* y las calles e, f, g, h e i a muestras de conejas WT. Se recortó cada calle del gel alrededor de 70 kDa (recuadro rojo) siendo a continuación estas bandas recortadas analizadas mediante HPLC-MS/MS.

El gel fue recortado a la altura de 70 kDa, tamaño detectado en WB para la oviductina en esta especie. Las muestras obtenidas del recorte de gel fueron tripsinizadas y analizadas mediante HPLC-MS/MS. Un total de 19 péptidos de oviductina de conejo fueron detectados en las muestras de FO de hembras WT (**Tabla 13 y Figura 40**). Sin embargo, no se detectó ningún péptido de oviductina en las muestras de hembras KO, confirmando la ausencia de la proteína en el FO de estos animales.



**Tabla 13.** Péptidos correspondientes a la proteína oviductina de conejo detectados mediante HPLC-MS/MS en FO de hembras WT. *Score*: puntuación basada principalmente en la intensidad de señal. *SPI*: porcentaje de señales detectadas de cada fragmento peptídico respecto al número de señales teóricas que debería producir. *m/z*: relación masa/carga del fragmento detectado.

Péptidos	Posición en la secuencia	Score	SPI	m/z	N.º de veces detectado
IFYPEFNK	76-83	13,31	77,7	529,2719	4
TLLSIGGWNFGTTR	93-106	11,07	60,2	508,2706	2
FTAMLSSFASR	107-117	18,18	91,7	609,3046	2
FINSVISLLR	120-129	11,91	67,3	581,3538	2
THNFDGLDLFFLYPGLR	130-146	11,02	65,8	675,6773	1
EALLIK	170-175	10,91	80	343,7272	2
LLLSAAVSGVPHIIQTSYDVR	179-199	16,41	76,6	747,0853	8
LLDFINVLSYDLHGSWEK	204-221	11,94	65,6	717,0348	1
FTGHNSPLFSLPEDPK	222-237	10,56	64,5	893,442	4
SSAYAMNYWR	238-247	16,55	81,3	624,7746	4
LGAPSEK	249-255	14,99	88	351,1971	1
LIMGFPTYGR	256-265	16,21	90,6	577,807	5
TFHLLK	266-271	10,7	63,9	253,4909	5
ATNHGLQAQAIGPASPGK	272-289	16,48	91,9	573,307	4
QAGFLAYYEVCSFVR	293-307	11,46	65	896,9282	2
HWIDYQYVPYAYK	312-324	12,45	63	873,4233	2
GKEWVGYYDDAISFSYK	325-340	12,91	68,3	622,2949	1
EWVGYDDAISFSYK	327-340	19,65	82,8	840,3881	4
EHFGGAMVWTLDMDDVR	347-363	13,33	60,9	665,6291	2

1 MGRLLLWLGLVVLVDCHDGAAYKLVICYFTNWAHSRPGPAAILPHDLDPFLCTHLIFAF

60 SMNDNEIVAKDVQDER**IFYPEFNK**LKERNRELK**TLLSIGGWNFGTTRFTAMLSSFASRE**

119 **KFINSVISLLRTHNFDGLDLFFLYPGLR**GSPAHDRWTFLLFLVEELLFAFQ**REALLIKRP**

178 **RLLLSAAVSGVPHIIQTSYDVR**LLG**LLDFINVLSYDLHGSWEKFTGHNSPLFSLPEDP**

237 **KSSAYAMNYWRKLGAPSEKLIMGFPTYGR**TFHLL**KATNHGLQAQAIGPASPGKYTKQAG**

296 **FLAYYEVCSFVR**KAKR**HWIDYQYVPYAYK**GKEWVGYYDDAISFSYKAMFVKR**EHFGGAMV**

355 **WTLDMDDVR**GTFCGNGPFPLVYTLNDLLVQDESTPTPLPQFWFSSAVNFSRTHLAVTEP

414 LTTDIKILPPGGEAMATESSGMSEAPRGAASVSLGKHTVAPAEKTEPPGVKPMTPGKMTM

473 TSA

**Figura 40.** Secuencia de aminoácidos de la proteína oviductina de conejo (NP\_001075574.1). Los 19 péptidos de oviductina detectados mediante HPLC-MS/MS en las muestras de FO de conejas WT aparecen en color azul.

## Análisis de zonas pelúcidas aisladas

### Hámster

La presencia de oviductina unida a la ZP de los óvulos se determinó a través del análisis de ZPs aisladas de óvulos de hembras WT y KO mediante HPLC-MS/MS.

Las ZPs aisladas fueron tripsinizadas y analizadas mediante HPLC-MS/MS. Un total de 11 péptidos pertenecientes a la proteína oviductina de esta especie fueron detectados en las muestras procedentes de hembras WT (**Tabla 14 y Figura 41**). Por el contrario, no se detectó ningún péptido perteneciente a dicha proteína en las muestras de hembras KO, confirmando la ausencia de oviductina unida a la ZP de los óvulos de estos animales.

**Tabla 14.** Péptidos correspondientes a la proteína oviductina de hámster detectados mediante HPLC-MS/MS en ZPs aisladas de óvulos de hembras WT. *Score*: puntuación basada principalmente en la intensidad de señal. *SPI*: porcentaje de señales detectadas de cada fragmento peptídico respecto al número de señales teóricas que debería producir. *m/z*: relación masa/carga del fragmento detectado.

Péptidos	Posición en la secuencia	Score	SPI	m/z	N.º de veces detectado
ILYPEFNK	76-83	15,89	81	512,2781	1
TLLSVGGWNFGTSR	93-106	19,21	88,6	747,8865	3
FTTMLSTLASR	107-117	4,37	36	614,3229	1
FIGSVVSFLR	120-129	8,14	38,8	562,8255	1
THGFDGLDLFFLYPGLR	130-146	14,3	74,6	656,6696	4
LDFINVLSDYDLHGSWEK	205-221	7,9	49,8	679,335	4
STGHNSPLFSLPEDPK	222-237	10,75	77,1	863,4186	3
NLGAPADK	248-255	8,56	62,8	393,2106	1
TFHLLR	266-271	7,07	49,9	393,7347	3
EWVGYDDAVSFSYK	327-340	13,03	63	833,3717	1
ENLIAEVESYSQDG	643-656	10,02	58,9	777,3497	1

1 MGRLLLVVGLVLLMKPNDGTAYKLVCFYFTNWAHSRVPASILPRDLDPFLCTHLIFAF  
 60 SMSNNQIVANNLQDEK**IILYPEFNK**LKERNRALK**TLLSVGGWNFGTSRFTTMLSTLASRE**  
 119 **KFIGSVVSFLRTHGFDGLDLFFLYPGLR**GSPIINDRWNFLFLIEELQFAFEKEALLTQRP  
 178 RLLLSAAVSGIPYIIQTSYDVHLLGRRL**LDFINVLSYDLHGSWEKSTGHNSPLFSLPEDP**  
 237 **KSSAFAMNYWRNLGAPADK**LLMGFPAYGR**TFHLLR**ESKNGLQAASMGPASPGKYTKQAG  
 296 FLAYYEVCSEFIQRAEKHWIDHQYVPYAYKKG**EWVGYDDAVSFSYK**AMFVKKEHFGGAMV  
 355 WTLDMDVVRGTFCGNGPFPLVHILNELLVRAEFNSTPLPQFWFTLPVNSSGPGSESLPA  
 414 TEELTTDTVKILPPGGEAMATEVHRKYEKVTTIPNGGFVTPAGTTSPTTHAVALERNAM  
 473 APGAKTTTSLDLLSETMTGMTVTVQTQTAGRETMTTVGNQSVTPGGETMTTVGNQSVTP  
 532 GGETMTTVGNQSVTPGGETVTIVGNKSVTPVGETVTIVGNKSVTPGGQTATVGSQSVT  
 591 PPGMDTTLVYLQTMTLSEKGTSSKKAVVLEKVTVPPREISVMPNEQNTALN**RENLIAEV**  
 650 **ESYSQDG**

**Figura 41.** Secuencia de la proteína oviductina de hámster (NP\_001268266.1). Los 11 péptidos de oviductina detectados mediante HPLC-MS/MS a partir de muestras de ZPs aisladas de óvulos de hembras WT se muestran en azul.

## Conejo

La presencia de oviductina unida a la ZP de óvulos se determinó a través del análisis de ZPs aisladas de óvulos de conejas WT y KO mediante HPLC-MS/MS.

Las ZPs aisladas fueron tripsinizadas y analizadas mediante HPLC-MS/MS. Un total de 16 péptidos pertenecientes a la oviductina de conejo fueron detectados en las muestras de hembras WT (**Tabla 15 y Figura 42**). No se detectó ningún péptido perteneciente a dicha proteína en las muestras procedentes de hembras KO, confirmando la ausencia de oviductina unida a los óvulos de estos animales.

VI. Resultados

**Tabla 15.** Péptidos correspondientes a la proteína oviductina de conejo detectados mediante HPLC-MS/MS en ZPs aisladas de óvulos de hembras WT. *Score*: puntuación basada principalmente en la intensidad de señal. *SPI*: porcentaje de señales detectadas de cada fragmento peptídico respecto al número de señales teóricas que debería producir. *m/z*: relación masa/carga del fragmento detectado.

Péptidos	Posición en la secuencia	Score	SPI	m/z	N.º de veces detectado
IFYPEFNK	76-83	13,58	77,8	529,2704	1
FTAMLSSFASR	107-117	13,5	80,1	609,2997	1
FINSVISLLR	120-129	12,16	71,3	581,3531	1
THNFDGLDLFFLYPGLR	130-146	15,21	75,5	675,6776	1
EALLIK	170-175	9,49	81,7	343,7263	1
LLLSAAVSGVPHIIQTSYDVR	179-199	14,62	77,5	747,0835	2
LLDFINVLSYDLHGSWEK	204-221	14,86	76,1	717,034	1
FTGHNSPLFSLPEDPK	222-237	15,76	81,8	893,4403	2
SSAYAMNYWR	238-247	17,92	87,6	624,7762	1
LIMGFPTYGR	256-265	15,32	82,9	577,802	1
TFHLLK	265-271	14,25	77,6	379,7314	3
QAGFLAYEVCVFVR	293-307	12,43	68,9	896,9184	2
HWIDYQYVPYAYK	312-324	13,2	78,8	582,6138	1
GKEWVGYYDAISFSYK	325-340	11,55	68,3	622,2975	1
EWVGYDDAISFSYK	327-340	18,44	77,9	840,3805	1
EHFGGAMVWTLDMDDVR	347-363	14,7	75,1	660,2966	1

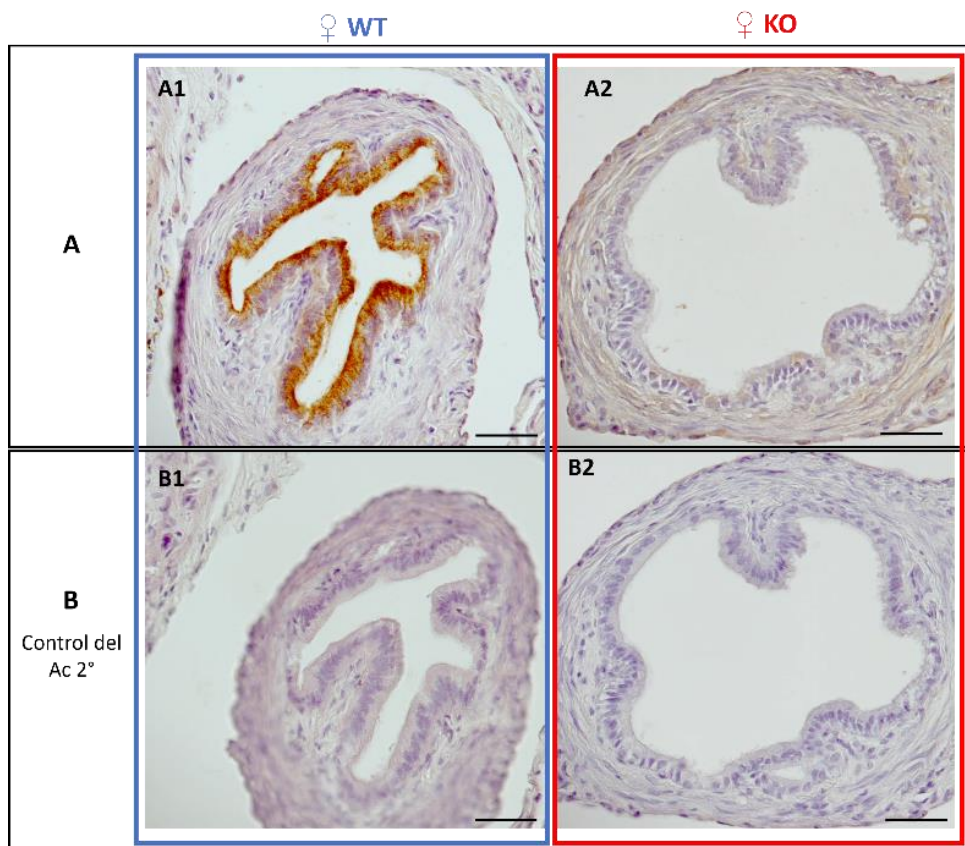
1 MGRLLLWLGLVVLVDCHDGAAYKLVCFYFTNWAHSRPGPAAILPHDLDPFLCTHLIFAF  
60 SMNDNEIVAKDVQDERIFYPEFNKLNKERNRELKTLLSIGGWNFGTTRFTAMLSSFASRE  
119 KFINVISLLRTHNFDGLDLFFLYPGLRGSAPADRWTFLFLVEELLFAFQREALLIKRP  
178 RLLLSAAVSGVPHIIQTSYDVRLLGKLLDFINVLSYDLHGSWEKFTGHNSPLFSLPEDP  
237 KSSAYAMNYWRKLGAPSEKLMIMGFPTYGRFTFHLLKATNHGLQAQAIGPASPGKYTKQAG  
296 FLAYYEVCVFVRKAKRHWIDYQYVPYAYKKGKEWVGYYDAISFSYKAMFVKREHFGGAMV  
355 WTLDMDDVRGTFCGNGPFPLVYTLNDLLVQDESTPTPLPQFWFSSAVNFSRTHLAVTEP  
414 LTTDIKILPPGGEAMATESSGMSEAPRGAASVSLGKHTVAPAEKTEPPGVKPMTPGKMTM  
473 TSA

**Figura 42.** Secuencia de aminoácidos de oviductina de conejo (NP\_001075574.1). Los 16 péptidos detectados en las muestras de ZPs aisladas de hembras WT se muestran en azul.

### 1.1.3.3 Inmunohistoquímica en oviducto

#### Hámster

La inmunohistoquímica realizada sobre cortes histológicos de oviducto de hámster confirmó la presencia de la proteína oviductina en el borde apical de las células del epitelio oviductal de las hembras WT y ausencia de la proteína en las hembras KO. Estos resultados confirman la ausencia de oviductina en el oviducto de los animales KO generados (**Figura 43**).



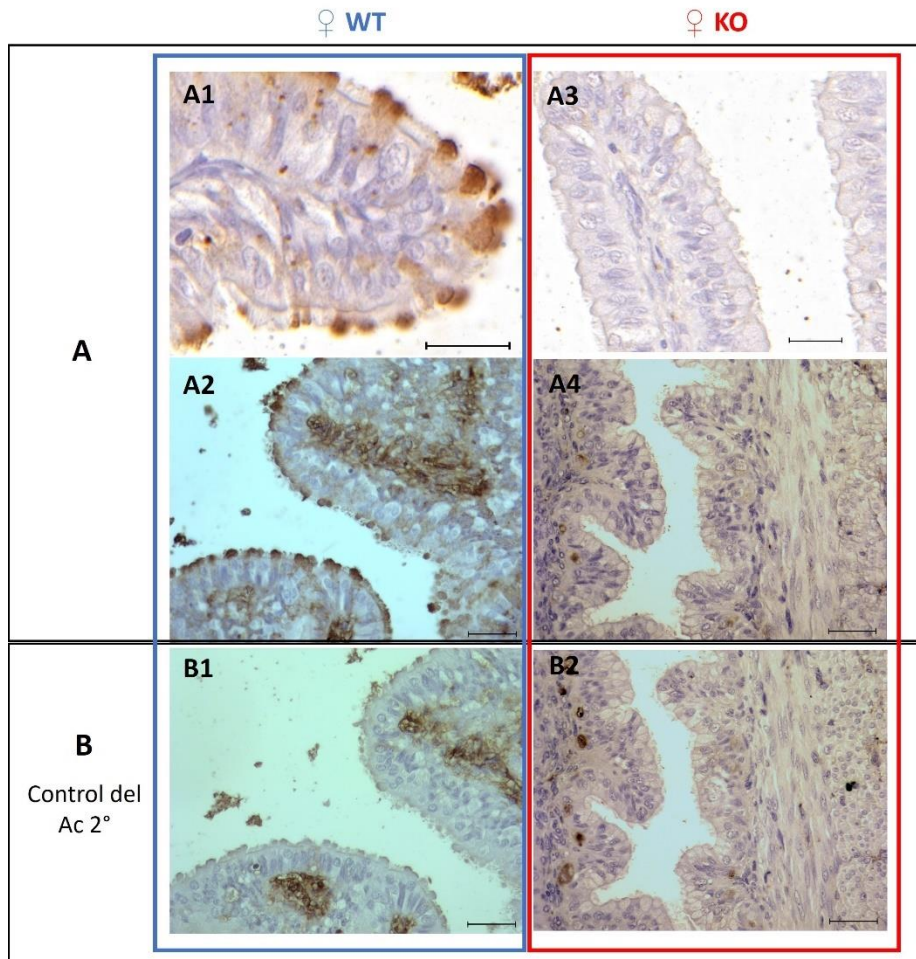
**Figura 43.** A) Inmunodetección de la proteína oviductina en secciones de parafina de oviducto de hámster utilizando un anticuerpo primario policlonal anti-oviductina. A1) Se detecta marcaje a nivel de las células del epitelio oviductal en hembras WT y A2) ausencia de marcaje en las hembras KO. B) Control del anticuerpo secundario debajo de cada imagen, B1) hembras WT y B2) KO. Barra: 50  $\mu$ m.

#### Conejo

La inmunohistoquímica realizada sobre cortes histológicos de oviducto de coneja determinó la presencia de la proteína oviductina en el borde apical de las células del epitelio oviductal de las hembras WT y ausencia de esta en las hembras KO, confirmando

## VI. Resultados

la ausencia de dicha proteína en el oviducto de estos animales. 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 el marcaje del epitelio solo aparece cuando se incuba con el anticuerpo primario, lo que indica que es una inmunotinción específica (**Figura 44**).

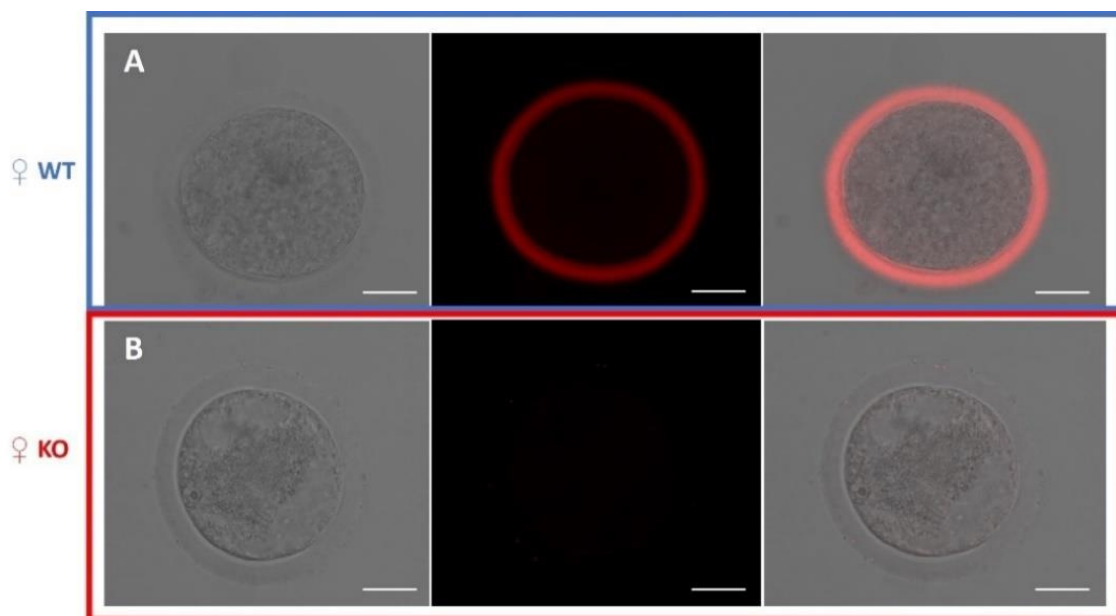


**Figura 44.** A) Inmunodetección de la proteína oviductina en secciones de parafina de oviducto de coneja utilizando un anticuerpo primario policlonal anti-oviductina. A1 y A2) Se detecta marcaje a nivel del borde apical de las células del epitelio oviductal en hembras WT y A3 y A4) ausencia de marcaje en las hembras KO. B) Control del anticuerpo secundario debajo de cada imagen, B1) hembras WT y B2) KO. Barra: 50  $\mu$ m.

### 1.1.3.4 Caracterización del patrón de unión de la lectina GSL I a la zona pelúcida de óvulos de hámster

Con el fin de determinar la unión de la proteína oviductina a la ZP de los óvulos de hámster tras su paso por el oviducto, se incubaron óvulos de hembras WT y KO con la lectina fluorescente GSL I isolectin B4, Dylight<sup>R</sup> 649, con afinidad por los residuos

terminales  $\alpha$ -D-galactosa. En un estudio previo se demostró que esta lectina se une a la ZP de óvulos, pero no a la ZP de ovocitos ováricos en hámster. Por tanto, esta lectina marca una proteína oviductal que la ZP adquiere a su paso por el oviducto (Avilés et al., 2000). Tras la incubación, se observó señal en la ZP de los óvulos de las hembras WT y ausencia de esta en los óvulos de las hembras KO (**Figura 45**). Tampoco se evidenció señal en los grupos control de ovocitos ováricos WT incubados con la lectina y óvulos WT no incubados con la lectina, descartando así la posibilidad de autofluorescencia de los óvulos y ovocitos.



**Figura 45.** Análisis del patrón de unión de la lectina GSL I isolectin B4, DylightR 649 a la ZP de óvulos de hámster. A) Se observa señal fluorescente en la ZP de los óvulos de las hembras WT y B) ausencia de señal en los óvulos de las hembras KO para *OVGP1*. Barra: 30  $\mu$ m.

## 1.2 Análisis de la fertilidad *in vivo*

### Hámster

La importancia del papel de la proteína oviductina en el proceso reproductivo en hámster fue estudiada mediante análisis de la fertilidad *in vivo* en hembras y machos con genotipo WT, Hz y KO para *OVGP1*.

Se emplearon un total de 6 hembras de cada uno de los genotipos. En el caso de las hembras KO no se produjo parto tras ninguno de los cruces realizados, mostrando

## VI. Resultados

un claro fenotipo de infertilidad. En contraposición, las hembras Hz no mostraron alteraciones reproductivas estadísticamente significativas respecto a las hembras WT, presentando tasas de gestación (100% en ambos genotipos) y tamaño medio de camada similares ( $8,42 \pm 0,62$  crías/camada en hembras WT y  $9,64 \pm 0,79$  crías/camada en Hz) (**Tabla 16**). Estos resultados indican que la función de la proteína oviductina es esencial para una correcta actividad reproductiva en las hembras de esta especie.

**Tabla 16.** Datos de fertilidad *in vivo* en hembras de hámster. Comparativa entre hembras con genotipos WT, Hz y KO para *OVGP1*. Las letras superíndice a y b indican diferencias significativas, p-valor<0,01.

Genotipo	N.º de hembras (N.º de cruces totales) <sup>1</sup>	Porcentaje de gestación	Tamaño medio de la camada (Media $\pm$ SE)
WT	6 (12)	100%	$8,42 \pm 0,62$ <sup>a</sup>
Hz	6 (14)	100%	$9,64 \pm 0,79$ <sup>a</sup>
KO	6 (40)	0%	- <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Todos los machos empleados en los cruces fueron de fertilidad probada.

También se analizó la fertilidad *in vivo* de los machos con genotipo WT, Hz y KO, empleando un total de 4, 6 y 10 machos, respectivamente. No se observaron alteraciones reproductivas estadísticamente significativas en la fertilidad de los machos Hz y KO respecto a los WT, obteniéndose tasas de gestación (100% en los tres genotipos) y tamaño medio de camada similares ( $8,25 \pm 0,85$  crías/camada en machos WT,  $9,17 \pm 1,11$  crías/camada en Hz y  $8,71 \pm 0,68$  crías/camada en KO) (**Tabla 17**).

**Tabla 17.** Datos de fertilidad *in vivo* en machos de hámster. Comparativa entre machos con genotipos WT, Hz y KO para *OVGP1*. Las letras superíndice a y b indican diferencias significativas, p-valor<0,01.

Genotipo	Número de machos (N.º de cruces totales) <sup>1</sup>	Porcentaje de gestación	Tamaño medio de la camada (Media $\pm$ SE)
WT	4 (4)	100%	$8,25 \pm 0,85$ <sup>a</sup>
Hz	6 (6)	100%	$9,17 \pm 1,11$ <sup>a</sup>
KO	10 (17)	100%	$8,71 \pm 0,68$ <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Todas las hembras empleadas en los cruces fueron de fertilidad probada.



## Conejo

La importancia del papel de la proteína oviductina en el proceso reproductivo en conejo fue estudiada mediante análisis de fertilidad *in vivo* con hembras y machos con genotipo WT, Hz y KO para *OVGP1*.

Se emplearon un total de 4 hembras WT, 3 Hz y 2 KO. Los análisis de fertilidad *in vivo* con las hembras KO mostraron tasas de gestación (100% en hembras WT, 40% en hembras KO) y tamaño medio de camada ( $6,6\pm 0,93$  crías/camada en hembras WT y  $3,57\pm 1,15$  crías/camada en hembras KO) menores a las obtenidos en hembras WT, aunque no estadísticamente significativas. El número de crías nacidas tras cada uno de los cruces de las hembras KO queda indicado en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Número de gazapos nacidos tras cada cruce de las dos conejas KO para *OVGP1* empleadas en el análisis de fertilidad *in vivo*.

Cruce	N.º de gazapos nacidos.	
	Hembras KO 1	Hembra KO 2
Primero	3	6
Segundo	1 (nacido muerto)	0
Tercero	0	-
Cuarto	8	-
Quinto	7	-

Las hembras Hz no mostraron alteraciones reproductivas estadísticamente significativas presentando tasas de gestación (100% en ambos genotipos) y tamaño medio de camada ( $6,6\pm 0,93$  crías/camada en hembras WT y  $5,80\pm 1,28$  crías/camada en Hz) similares a las hembras WT (**Tabla 19**).

Estos resultados sugieren que la ausencia de oviductina puede afectar a la función reproductiva de las hembras desencadenando un posible fenotipo de subfertilidad. Sin embargo, el pequeño número de hembras empleado y la obtención en una de las hembras de algunos partos con tamaños de camada normales (**Tabla 18**) nos indica la necesidad de ampliar el tamaño muestral de las hembras KO para obtener resultados fiables.

## VI. Resultados

**Tabla 19.** Datos de fertilidad *in vivo* en conejas. Comparativa entre hembras con genotipos WT, Hz y KO para *OVGP1*. Las letras superíndice a y b indican diferencias significativas, p-valor<0,01.

Genotipo	N.º de hembras (N.º de cruces totales) <sup>1</sup>	Porcentaje de gestación	Tamaño medio de la camada (Media ± SE)
WT	4 (5)	100%	6,60±0,93 <sup>a</sup>
Hz	3 (5)	100%	5,80±1,28 <sup>a</sup>
KO	2 (7)	40%	3,57±1,29 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Todos los machos empleados en los cruces fueron de fertilidad probada.

También se analizó la fertilidad *in vivo* de machos con genotipo WT, Hz y KO, empleando un total de 6 machos WT, 1 Hz y 2 KO. No se observaron alteraciones reproductivas estadísticamente significativas en la fertilidad de los machos Hz y KO respecto a los WT, obteniéndose tasas de gestación (100% en los tres genotipos) y tamaño medio de camada similares (8,83±0,70 crías/camada en machos WT, 5,40±1,25 crías/camada en Hz y 7,00±1,29 en KO) (**Tabla 20**).

**Tabla 20.** Datos de fertilidad *in vivo* en conejo. Comparativa entre machos con genotipos WT, Hz y KO para *OVGP1*. Las letras superíndice a y b indican diferencias significativas, p-valor<0,01.

Genotipo	Número de machos (N.º de cruces totales) <sup>1</sup>	Porcentaje de gestación	Tamaño medio de la camada (Media ± SE)
WT	6 (6)	100%	8,83±0,70 <sup>a</sup>
Hz	1 (5)	100%	5,40±1,25 <sup>a</sup>
KO	2 (4)	100%	7,00±1,29 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Todas las hembras empleadas en los cruces fueron de fertilidad probada.

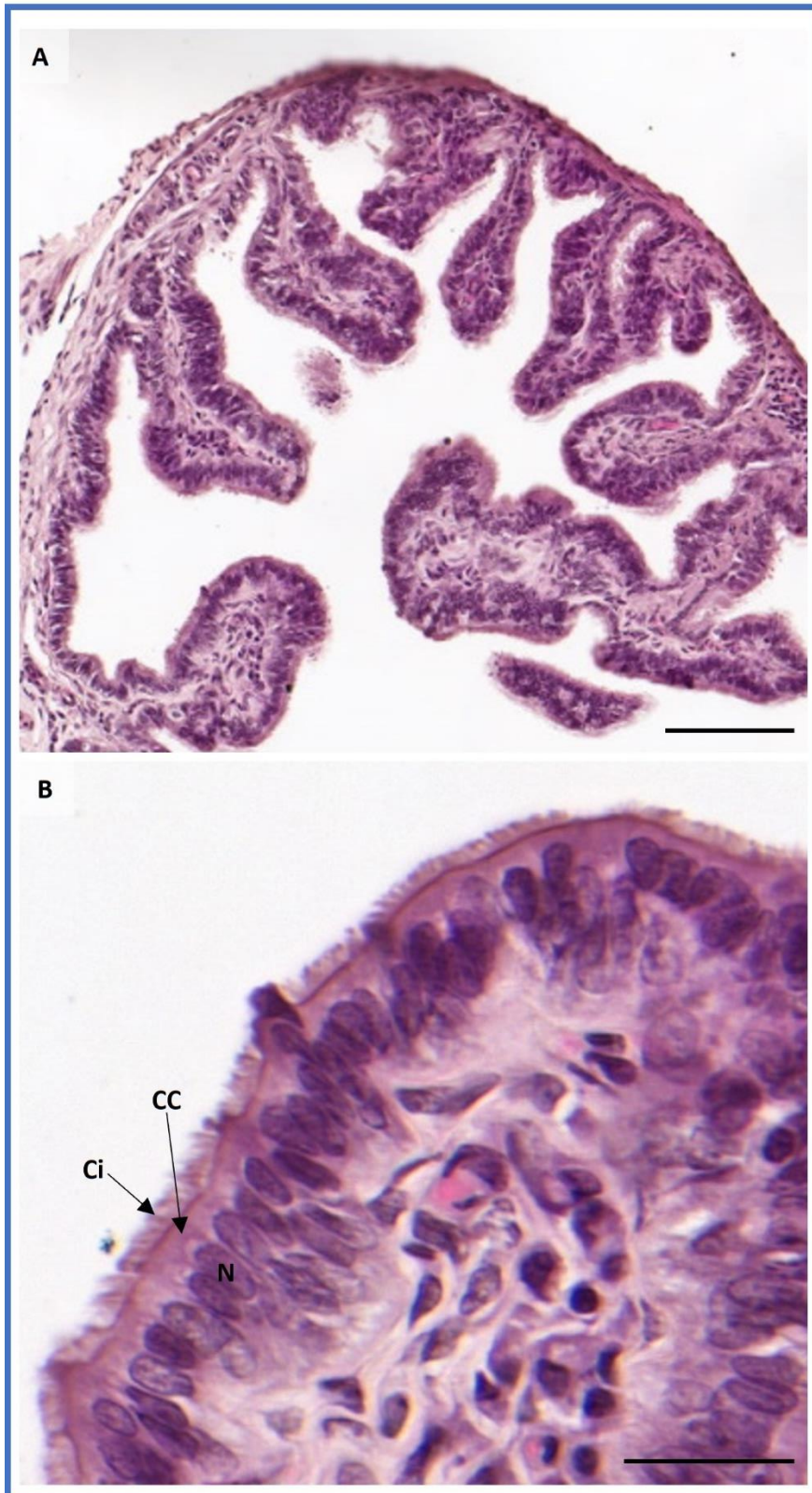
### 1.3 Análisis histológico de oviducto

#### Hámster

Para valorar las posibles modificaciones histológicas en el epitelio oviductal asociadas a la ausencia de la secreción de la proteína oviductina en oviducto se realizó un análisis detallado mediante microscopía óptica y electrónica de oviducto de hembras WT y KO. No se evidenció, en base al diferente genotipo de los animales para *OVGP1*, variación en la complejidad de los pliegues del epitelio oviductal ni en las características

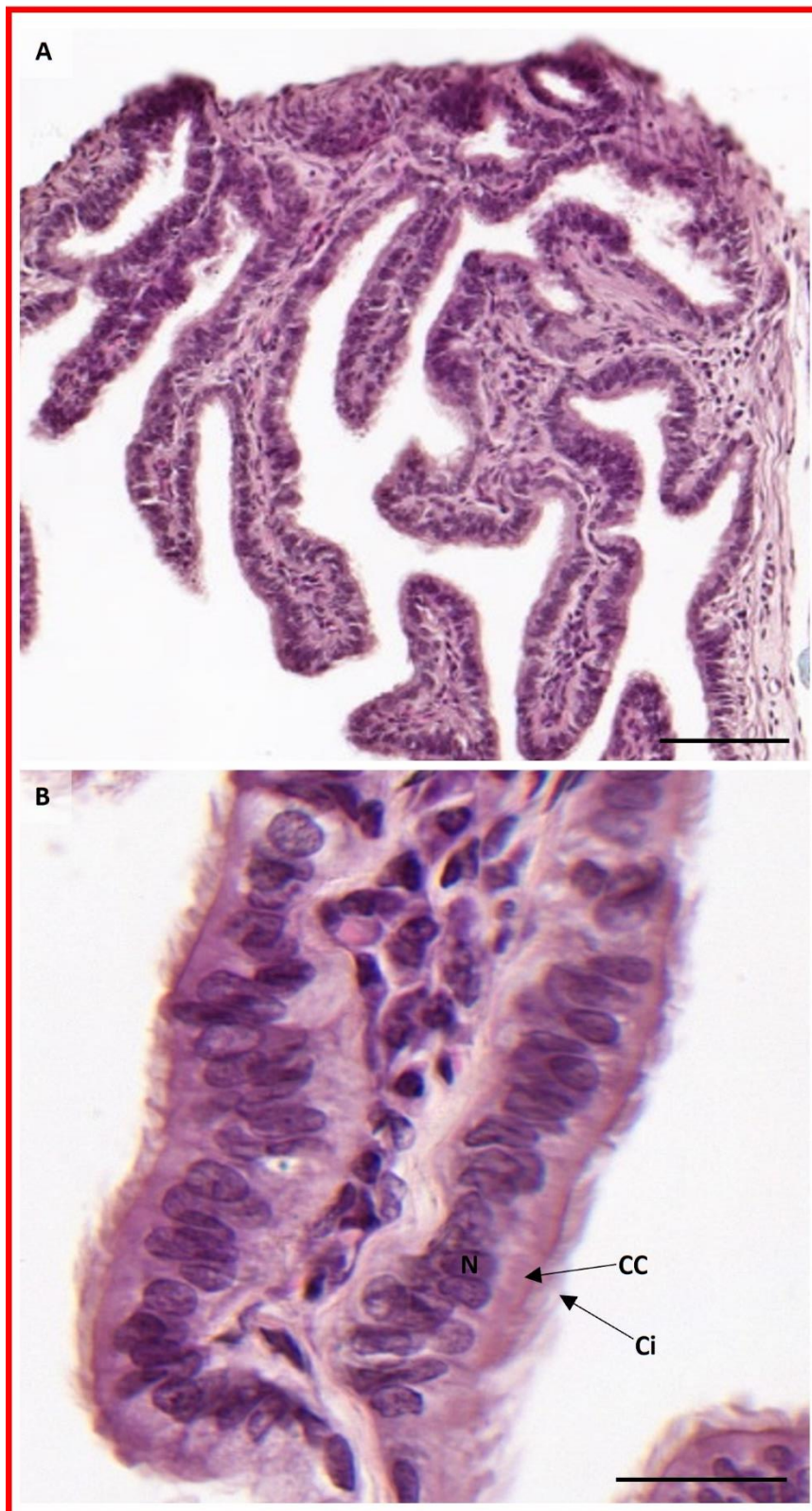
histológicas de las células que lo componen, células ciliadas y células secretoras. En las siguientes imágenes de microscopía óptica se muestran en detalle las regiones ampular e ístmica de hembras WT y KO, las cuales presentan una estructura histológica similar **(Figuras 46-51)**. Las técnicas de microscopía electrónica nos permitieron analizar más detalladamente la estructura de las células ciliadas y secretoras del epitelio oviductal, no observándose variaciones evidentes en base al genotipo de la hembra **(Figuras 50 y 51)**.

♀ WT



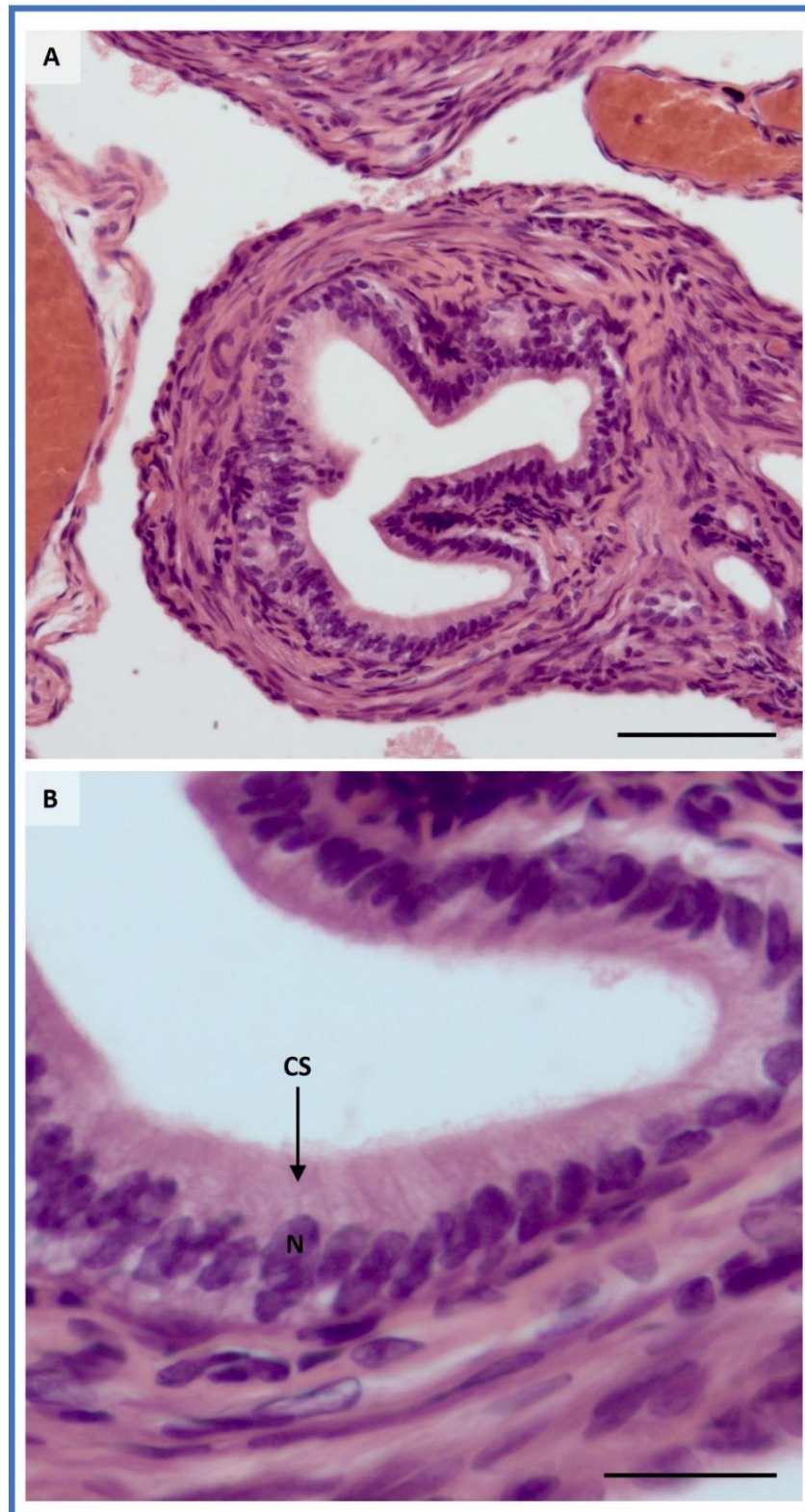
**Figura 46.** Sección de oviducto de hámster WT (región ampular) teñido con hematoxilina-eosina. A) Se muestra la complejidad de los pliegues del epitelio oviductal en la región de la ampolla. B) A mayor aumento se observa en detalle el epitelio oviductal, constituido en su mayoría por células ciliadas en esta región. Aparece señalada una célula ciliada (CC), su núcleo (N) y cilios (Ci). Barra A: 100  $\mu$ m; barra B: 25  $\mu$ m.

♀ KO

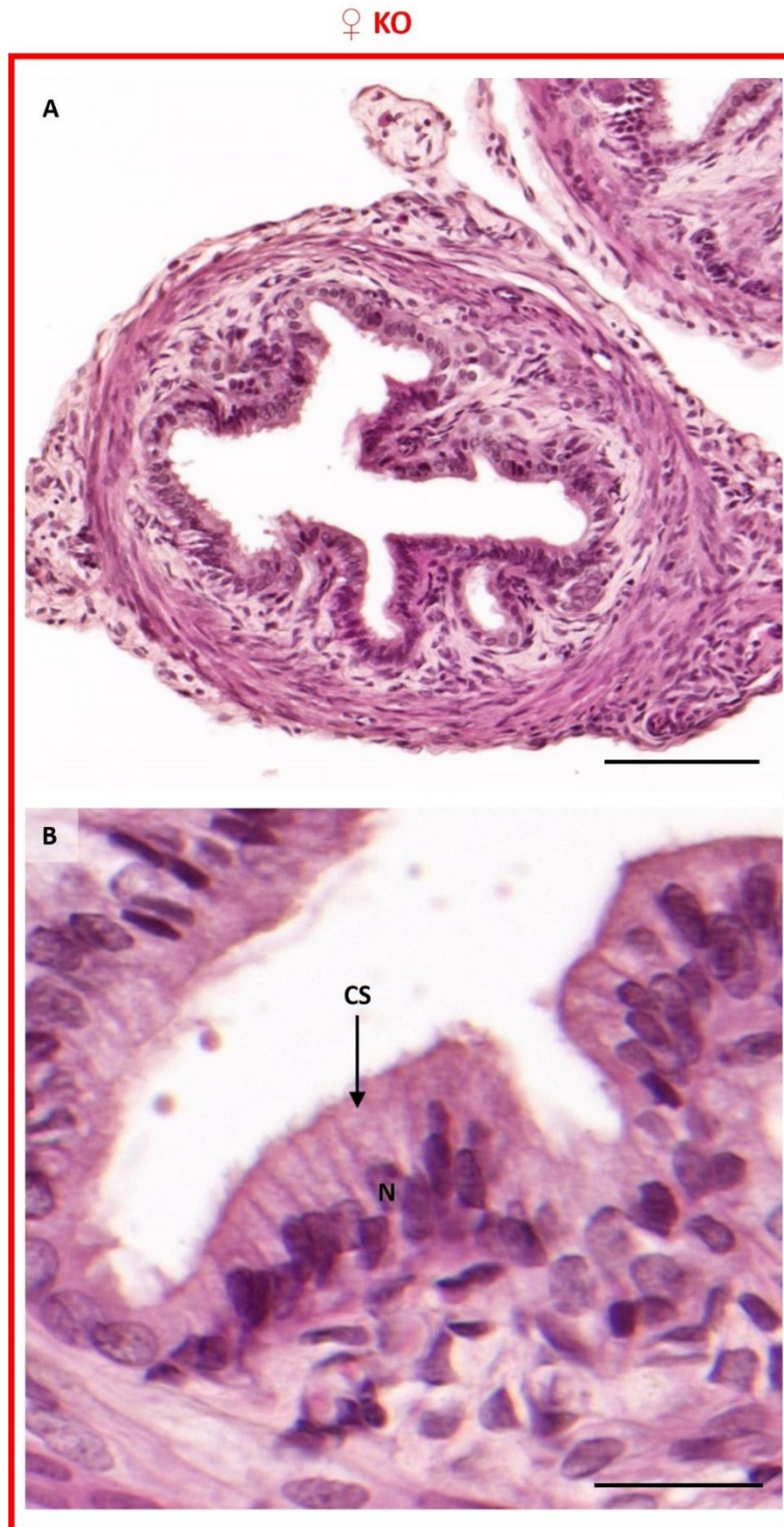


**Figura 47.** Sección de oviducto de hámster KO para *OVGP1* (región ampular) teñido con hematoxilina-eosina. A) Se muestra la complejidad de los pliegues del epitelio oviductal en la región de la ampolla. B) A mayor aumento se observa en detalle el epitelio oviductal, constituido en su mayoría por células ciliadas en esta región. Aparece señalada una célula ciliada (CC), su núcleo (N) y cilios (Ci). Barra A: 100  $\mu$ m; barra B: 25  $\mu$ m.

♀ WT

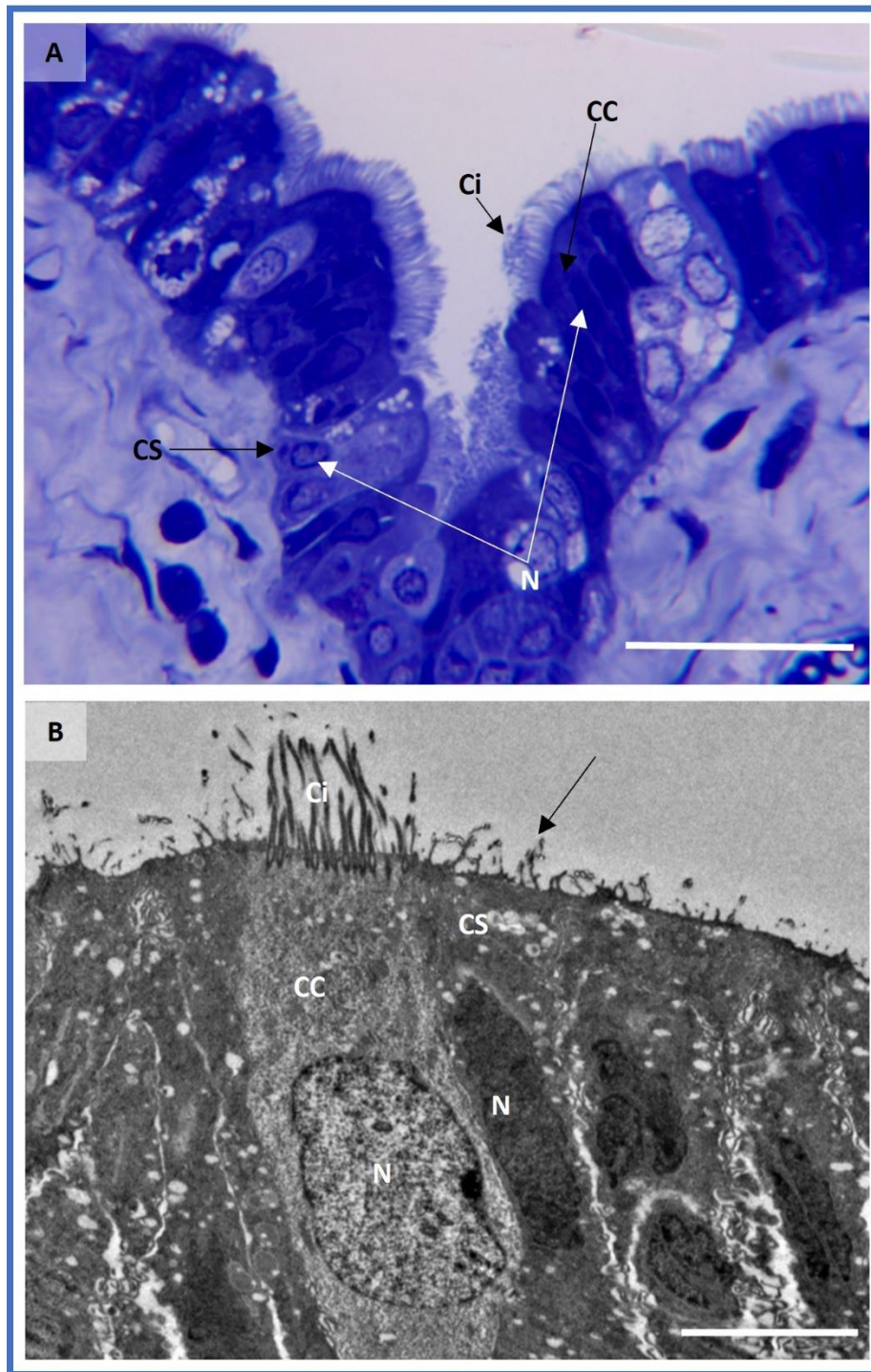


**Figura 48.** Sección de oviducto de hámster WT (región ístmica) teñido con hematoxilina-eosina. A) Se muestra la menor complejidad de los pliegues del epitelio oviductal en la región del istmo. B) A mayor aumento se observa en detalle el epitelio oviductal, constituido en su mayoría por células secretoras en esta región. Aparece señalada una célula secretora (CS) y su núcleo (N). Barra A: 100  $\mu\text{m}$ ; barra B: 25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 49.** Sección de oviducto de hámster KO para *OVGP1* (región ístmica) teñido con hematoxilina-eosina. A) Se muestra la menor complejidad de los pliegues del epitelio oviductal en la región del istmo. B) A mayor aumento se observa en detalle el epitelio oviductal, constituido en su mayoría por células secretoras en esta región. Aparece señalada una célula secretora (CS) y su núcleo (N). Barra A: 100  $\mu$ m; barra B: 25  $\mu$ m.

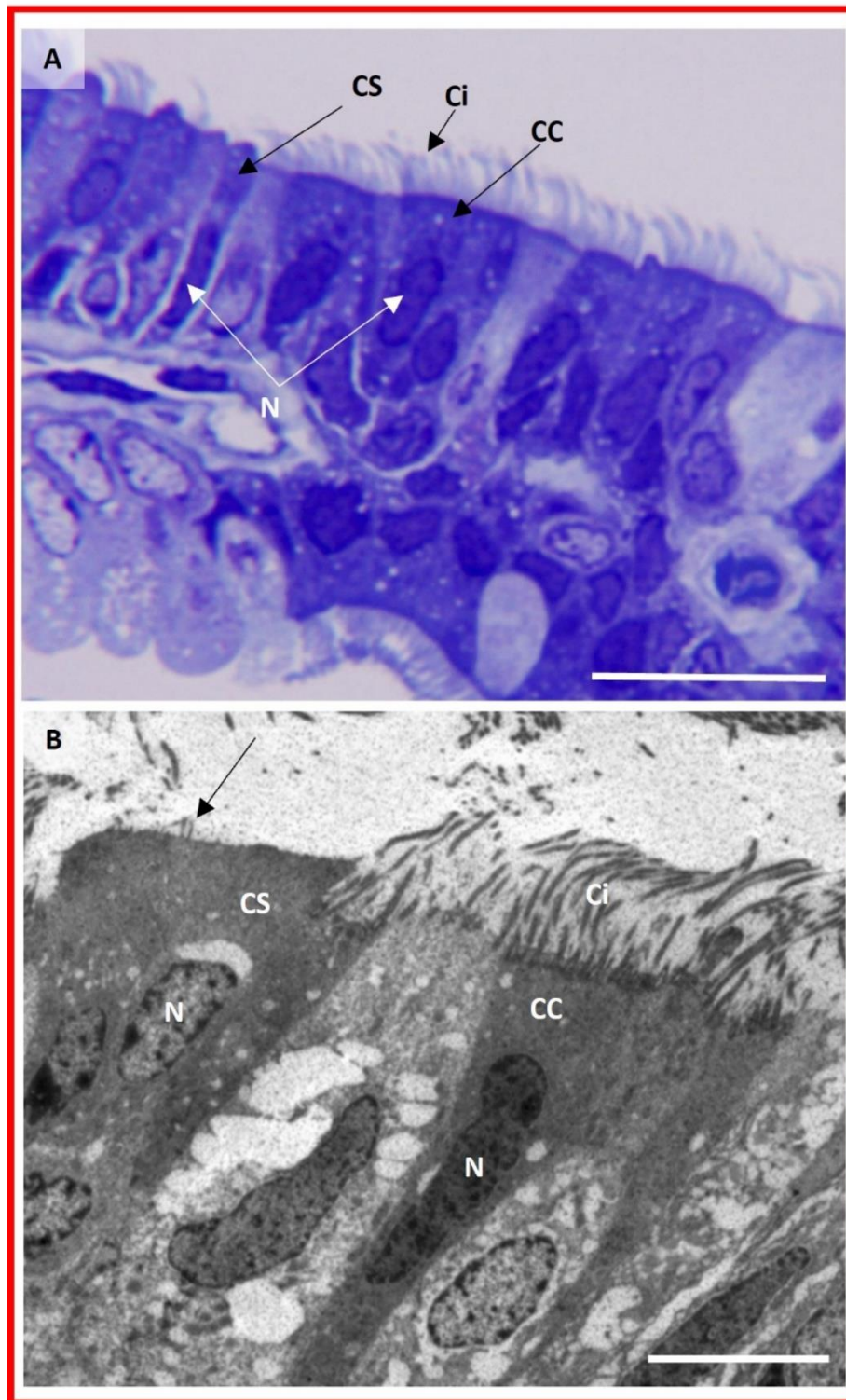
♀ WT



**Figura 50.** A) Sección de oviducto de hámster WT (corte semifino de 1 µm teñido con azul de toluidina). Se muestra en detalle el epitelio oviductal observándose células secretoras (CS) con su núcleo (N) y células ciliadas (CC) con sus cilios (Ci) y núcleo (N). Barra A: 25 µm. B) Fotomicrografía realizada mediante microscopía electrónica de transmisión de un corte ultrafino de 70 nm de grosor de oviducto de hámster WT. Se muestra en detalle el epitelio oviductal observándose células secretoras (CS) con su núcleo (N) y microvellosidades (flecha negra). Se observa igualmente una célula ciliada (CC) con sus cilios (Ci) y núcleo (N). Barra B: 5 µm.



♀ KO

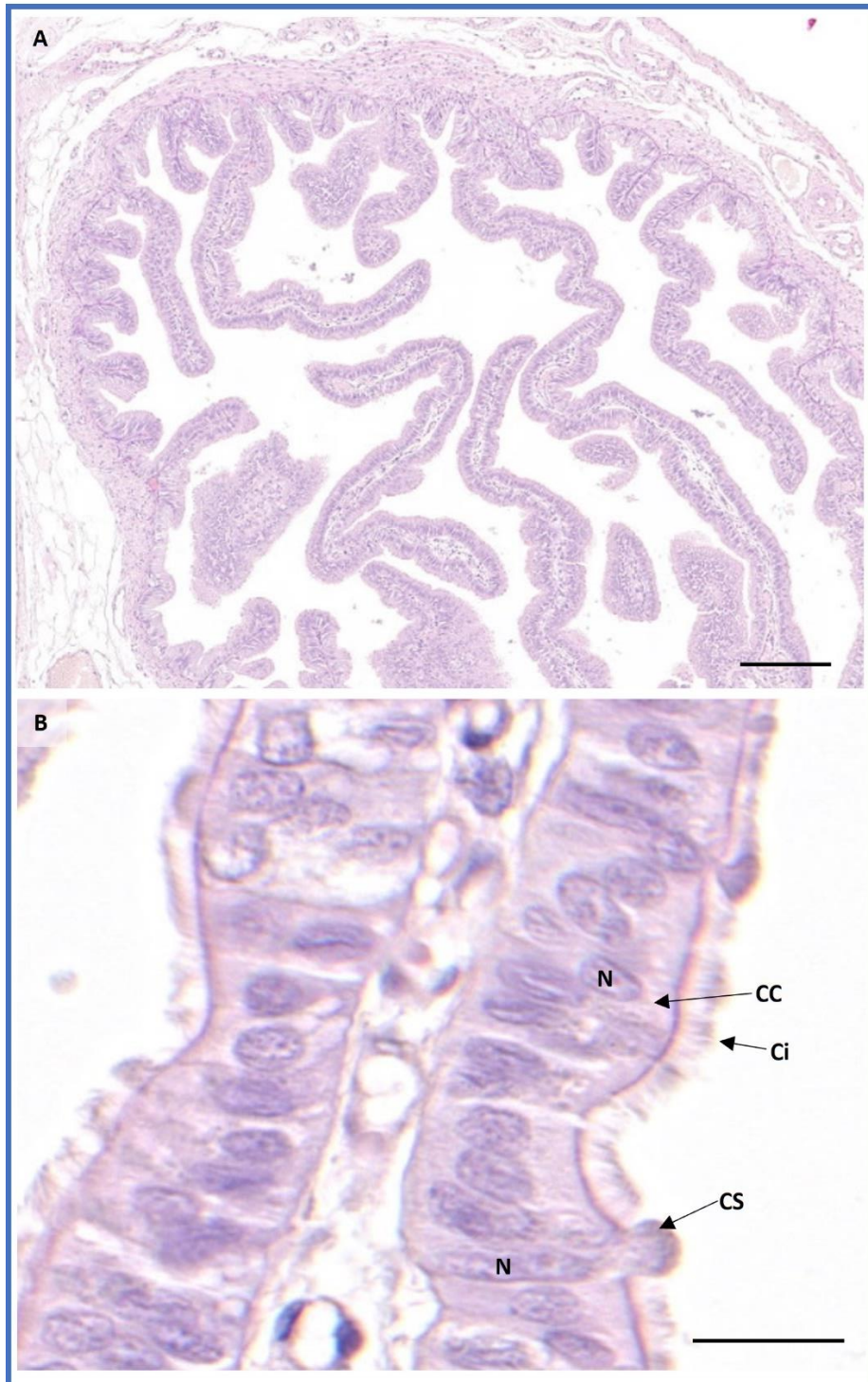


**Figura 51.** A) Sección de oviducto de hámster KO para *OVGP1* (corte semifino de 1 µm teñidos con azul de toluidina). Se muestra en detalle el epitelio oviductal observándose células secretoras (CS) con su núcleo (N) y células ciliadas (CC) con sus cilios (Ci) y núcleo (N). Barra A: 25 µm. B) Fotomicrografía realizada mediante microscopía electrónica de transmisión de corte ultrafino de 70 nm de grosor de oviducto de hámster KO para *OVGP1*. Se muestra en detalle el epitelio oviductal observándose células secretoras (CS) con su núcleo (N) y microvellosidades (flecha negra). Se observa igualmente una célula ciliada (CC) con sus cilios (Ci) y núcleo (N). Barra B: 5 µm.

## Conejo

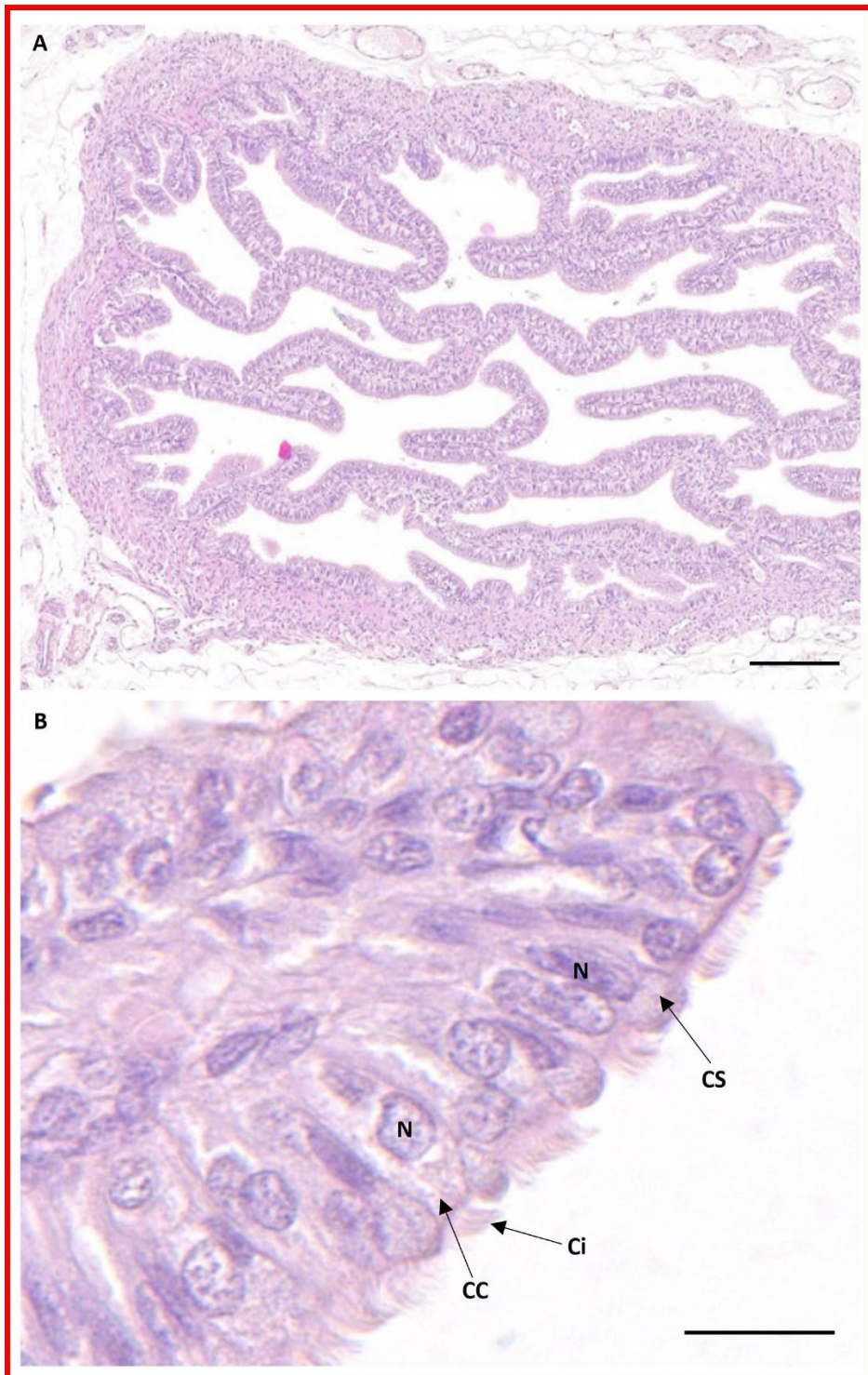
De igual modo que en el modelo de hámster, con el fin de valorar las posibles modificaciones histológicas en el epitelio oviductal asociadas a la ausencia de la secreción de oviductina en oviducto de las conejas KO, se realizó un análisis comparado mediante microscopía óptica y electrónica de oviducto. No se evidenció, en base al diferente genotipo de los animales para *OVGP1*, variación en la complejidad de los pliegues del epitelio oviductal ni en las características histológicas de las células que lo componen, células ciliadas y células secretoras. En las siguientes imágenes de microscopía óptica se muestran en detalle las regiones ampular e ístmica de conejas WT (**Figuras 52, 54 y 56**) y KO (**Figuras 53, 55 y 57**), las cuales presentan una estructura histológica similar. Las técnicas de microscopía electrónica nos permitieron analizar más detalladamente la estructura de las células ciliadas y secretoras del epitelio oviductal, no observándose variaciones evidentes en base al genotipo de la hembra (**Figuras 56 y 57**).

♀ WT



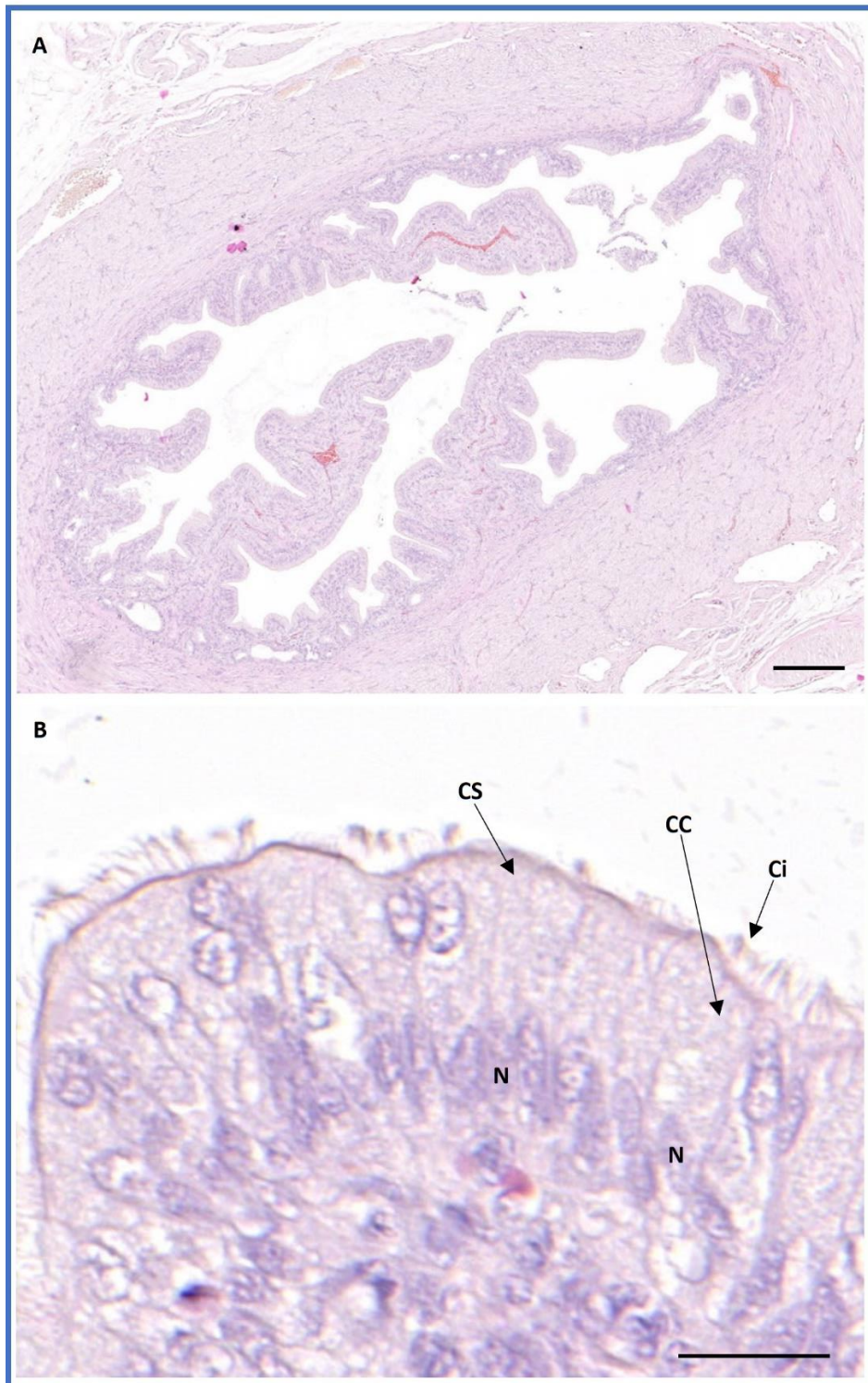
**Figura 52.** Sección de oviducto de coneja WT (región ampular) teñido con hematoxilina-eosina. A) Se muestra la complejidad de los pliegues del epitelio oviductal en la región de la ampolla. B) A mayor aumento se observa en detalle el epitelio oviductal, constituido en su mayoría por células ciliadas en esta región. Aparece señalada una célula ciliada (CC), su núcleo (N) y cilios (Ci), y una célula secretora con su protrusión apical (CS) y su núcleo (N). Barra A: 200  $\mu\text{m}$ ; barra B: 20  $\mu\text{m}$ .

♀ KO



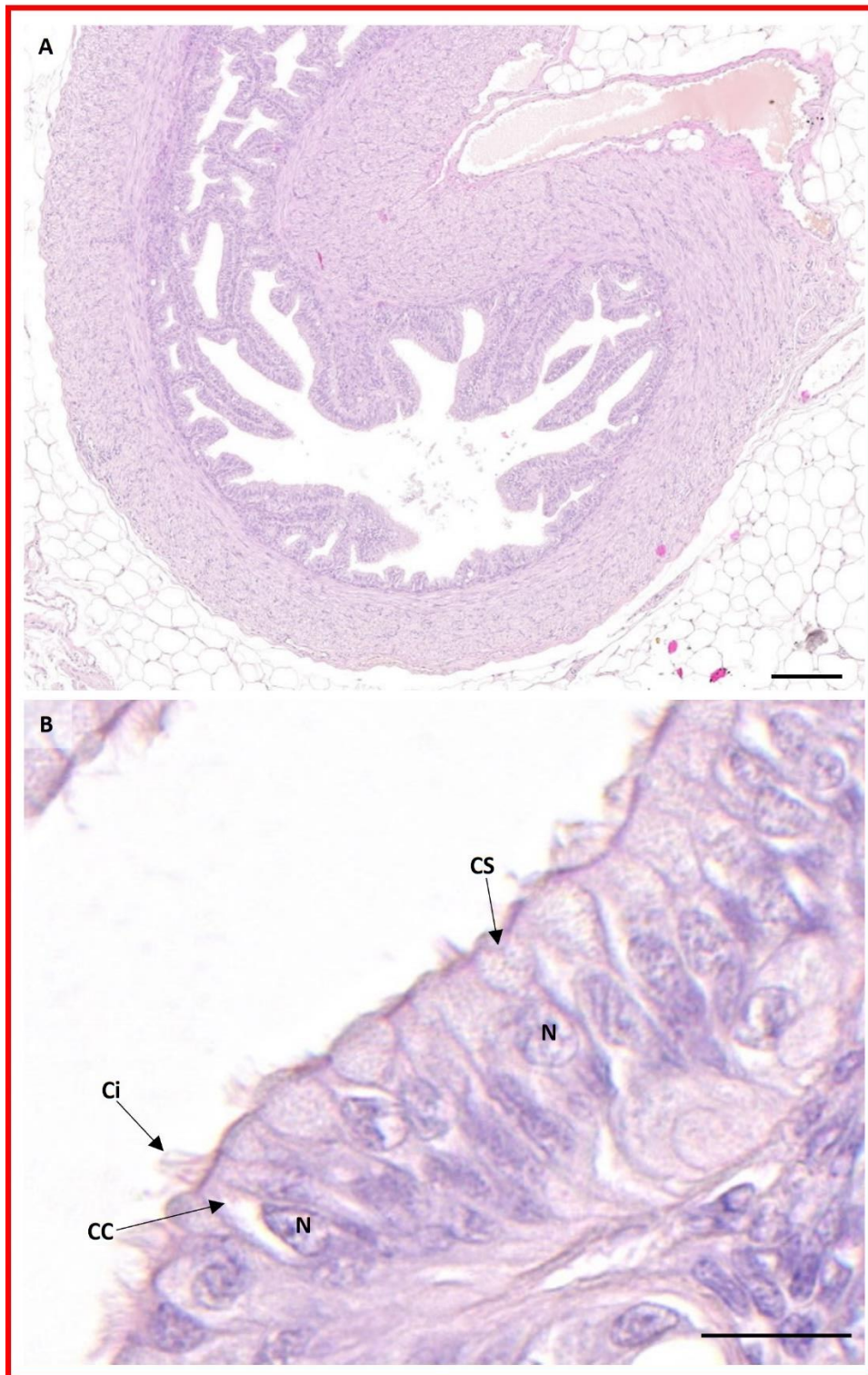
**Figura 53.** Sección de oviducto de coneja KO para *OVGP1* (región ampular) teñido con hematoxilina-eosina. A) Se muestra la complejidad de los pliegues del epitelio oviductal en la región de la ampolla. B) A mayor aumento se observa en detalle el epitelio oviductal, constituido en su mayoría por células ciliadas en esta región. Aparece señalada una célula ciliada (CC), su núcleo (N) y cilios (Ci), y una célula secretora con su protrusión apical (CS) y su núcleo (N). Barra A: 200  $\mu$ m; barra B: 20  $\mu$ m.

♀ WT

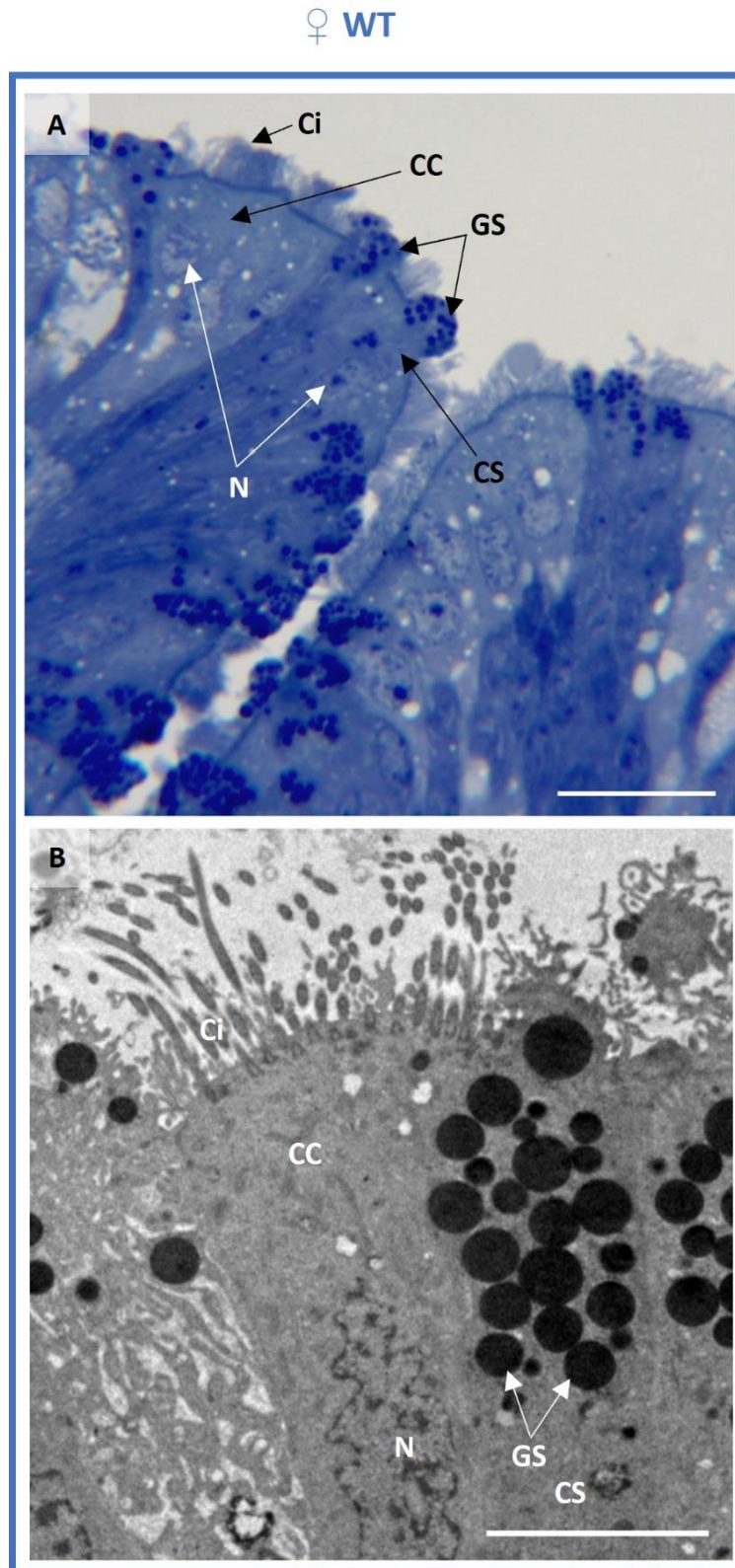


**Figura 54.** Sección de oviducto de coneja WT (región ístmica) teñido con hematoxilina-eosina. A) Se muestra la menor complejidad de los pliegues del epitelio oviductal en la región del istmo. B) A mayor aumento se observa en detalle el epitelio oviductal, constituido en su mayoría por células secretoras en esta región. Aparece señalada una célula ciliada (CC), su núcleo (N) y cilios (Ci), y una célula secretora (CS) y su núcleo (N). Barra A: 200  $\mu$ m; barra B: 20  $\mu$ m.

♀ KO

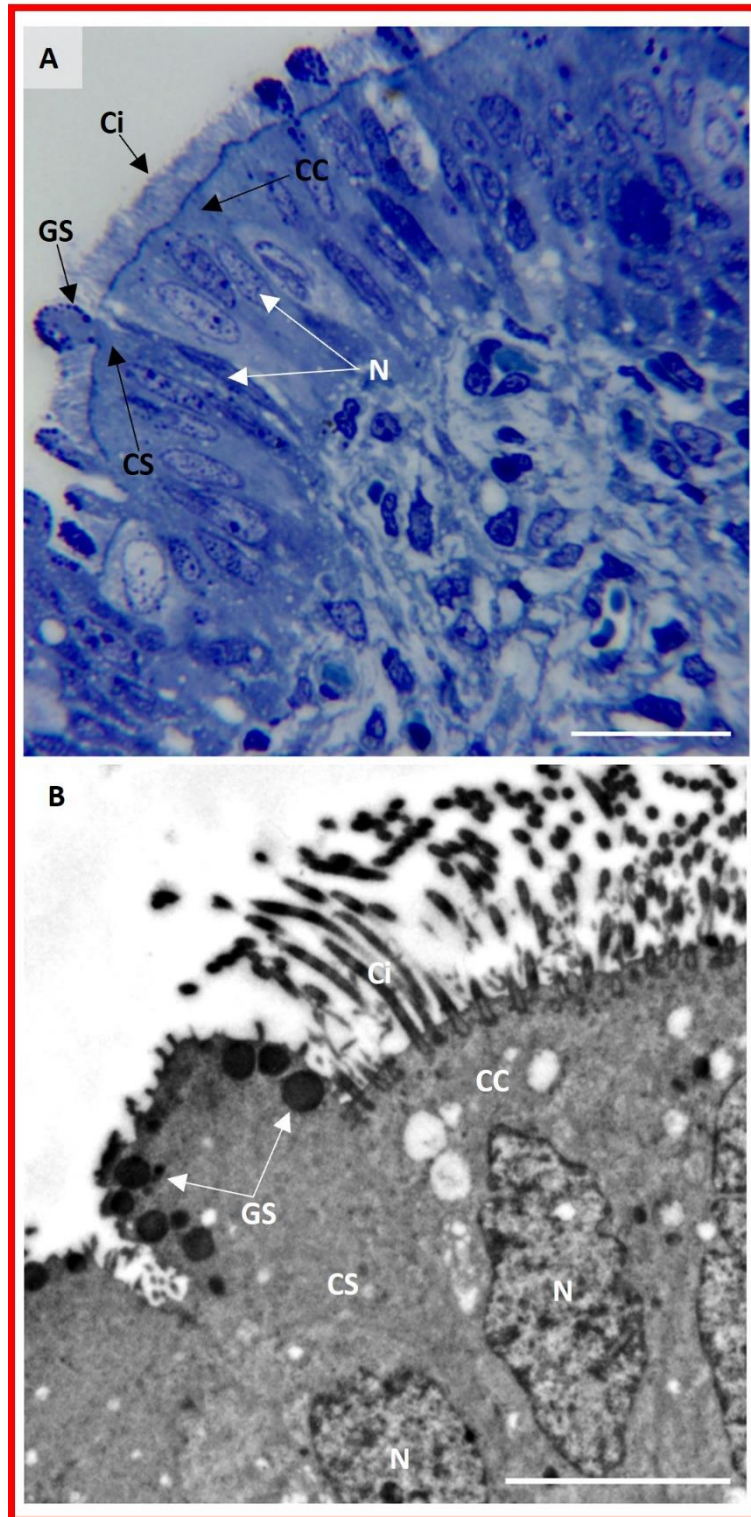


**Figura 55.** Sección de oviducto de coneja KO para *OVGP1* (región ístmica) teñido con hematoxilina-eosina. A) Se muestra la menor complejidad de los pliegues del epitelio oviductal en la región del istmo. B) A mayor aumento se observa en detalle el epitelio oviductal, constituido en su mayoría por células secretoras en esta región. Aparece señalada una célula ciliada (CC), su núcleo (N) y cilios (Ci), y una célula secretora con su protrusión apical (CS) y su núcleo (N). Barra A: 200  $\mu\text{m}$ ; barra B: 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 56.** A) Sección de oviducto de coneja WT (corte semifino de 1  $\mu\text{m}$  teñido con azul de toluidina). Se muestra en detalle el epitelio oviductal observándose células secretoras (CS) con gránulos de secreción (GS) en las protrusiones apicales de dichas células, y células ciliadas (CC) con sus cilios (Ci) y núcleo (N). Barra A: 10  $\mu\text{m}$ . B) Fotomicrografía realizada mediante microscopía electrónica de transmisión de un corte ultrafino de 70 nm de grosor de oviducto de coneja WT. Se muestra en detalle el epitelio oviductal observándose células secretoras (CS) con gránulos de secreción (GS) en sus protrusiones apicales y células ciliadas (CC) con sus cilios (Ci) y núcleo (N). Barra B: 5  $\mu\text{m}$ .

♀ KO



**Figura 57.** A) Sección de oviducto de coneja KO para *OVGP1* (corte semifino de 1 µm teñido con azul de toluidina). Se muestra en detalle el epitelio oviductal observándose células secretoras (CS) con gránulos de secreción (GS) en las protrusiones apicales de dichas células, y células ciliadas (CC) con sus cilios (Ci) y núcleo (N). Barra A: 10 µm. B) Fotomicrografía realizada mediante microscopía electrónica de transmisión de un corte ultrafino de 70 nm de grosor de oviducto de coneja KO para *OVGP1*. Se muestra en detalle el epitelio oviductal observándose células secretoras (CS) con gránulos de secreción (GS) en las protrusiones apicales de dichas células y células ciliadas (CC) con sus cilios (Ci) y núcleo (N). Barra B: 5 µm.

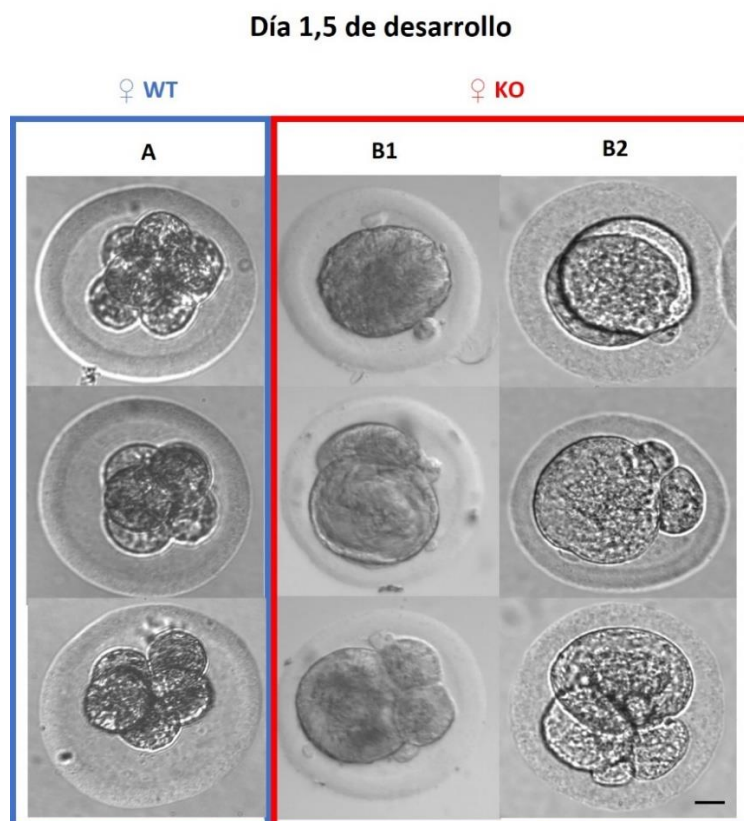


## 1.4 Análisis del desarrollo embrionario preimplantacional

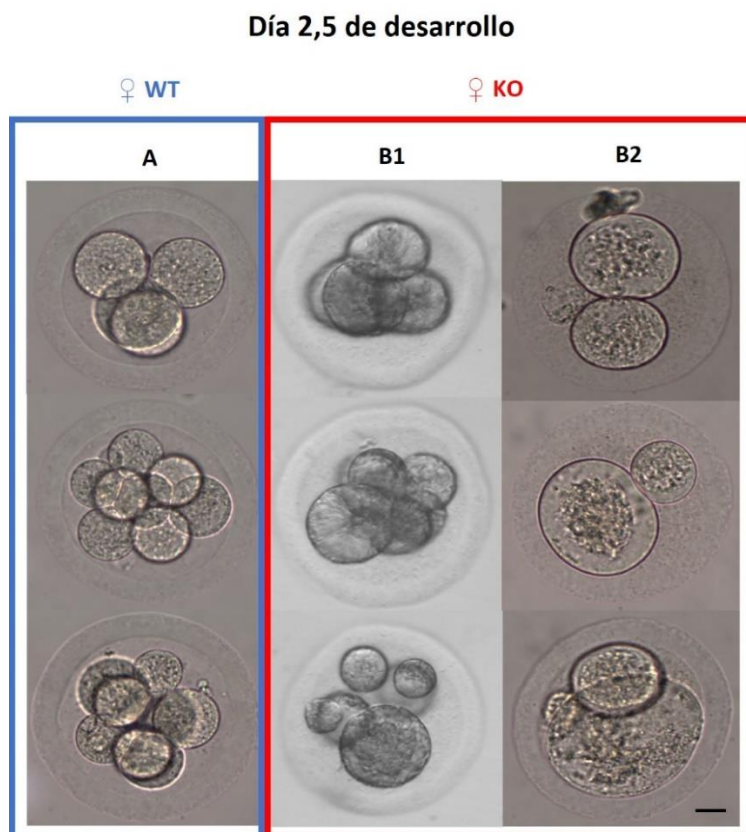
### Hámster

Con el objetivo de determinar si existían alteraciones morfológicas en los embriones procedentes de hembras de hámster KO que indicaran un incorrecto desarrollo embrionario, se realizó un estudio microscópico comparado entre embriones de hembras WT y KO. Se analizaron embriones en estadio de 1,5 y 2,5 días de desarrollo.

El análisis microscópico de los embriones procedentes de hembras KO mostró alteraciones morfológicas evidentes en los estadios analizados (**Figuras 58 y 59**).



**Figura 58.** Análisis mediante microscopía óptica de embriones de hámster WT y KO para *OVGP1*. Se muestran embriones recuperados tras apareamiento natural en día 1,5 de desarrollo. A) Embriones de hembras WT. B1 y B2) embriones de hembras KO para *OVGP1*. Se observa una clara diferencia en el número, simetría y morfología de las blastómeras de los embriones de hembras KO respecto a los de hembras WT. Barra: 10  $\mu$ m.



**Figura 59.** Análisis mediante microscopía óptica de embriones de hámster WT y KO para *OVGP1*. Se muestran embriones recuperados tras apareamiento natural en día 2,5 de desarrollo. A) Embriones de hembras WT. B1 y B2) embriones de hembras KO para *OVGP1*. Se observa una clara diferencia en el número, simetría y morfología de las blastómeras de los embriones de hembras KO respecto a los de hembras WT. Barra: 10  $\mu$ m.

Los embriones procedentes de hembras KO mostraron una marcada inferioridad, estadísticamente significativa, en el número de blastómeras respecto a los embriones procedentes de hembras WT en las mismas fases de desarrollo, con una media de  $2,67 \pm 0,5$  blastómeras en día 1,5 de desarrollo y  $3,69 \pm 0,58$  en día 2,5 de desarrollo, mientras que los embriones procedentes de hembras WT presentaban una media de  $5,25 \pm 0,30$  y  $7,08 \pm 0,37$  blastómeras respectivamente (**Tablas 21 y 22**).

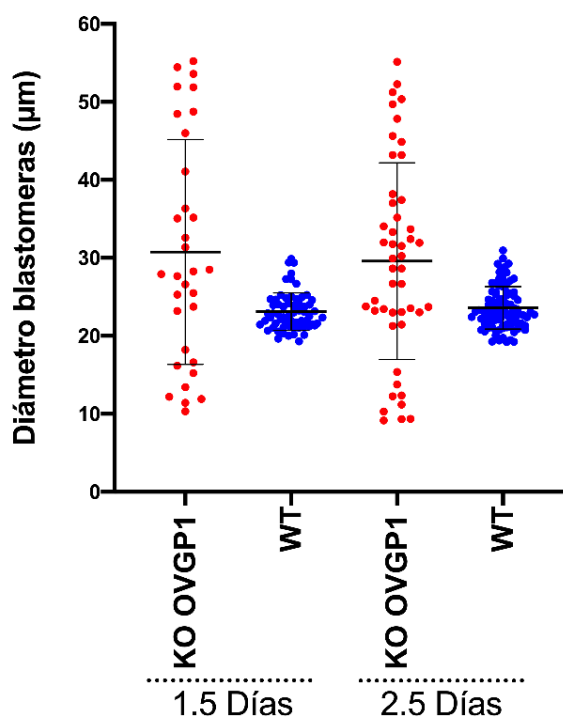
**Tabla 21.** Número medio de blastómeras presentes en embriones de hámster en estadio 1,5 días de desarrollo. Comparativa entre hembras con genotipos WT y KO para *OVGP1*. Las letras superíndice a y b indican diferencias significativas, p-valor < 0,01.

Genotipo de la hembra	Número de embriones analizados	Número de blastómeras/embrión (Media $\pm$ SE)
KO	12	$2,67 \pm 0,50^a$
WT	12	$5,25 \pm 0,30^b$

**Tabla 22.** Número medio de blastómeras presentes en embriones de hámster en estadio 2,5 días de desarrollo. Comparativa entre hembras con genotipos WT y KO para *OVGP1*. Las letras superíndice a y b indican diferencias significativas, p-valor<0,01.

Genotipo de la hembra	Número de embriones analizados	Número de blastómeras/embrión (Media $\pm$ SE)
KO	13	3,69 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>
WT	13	7,08 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>

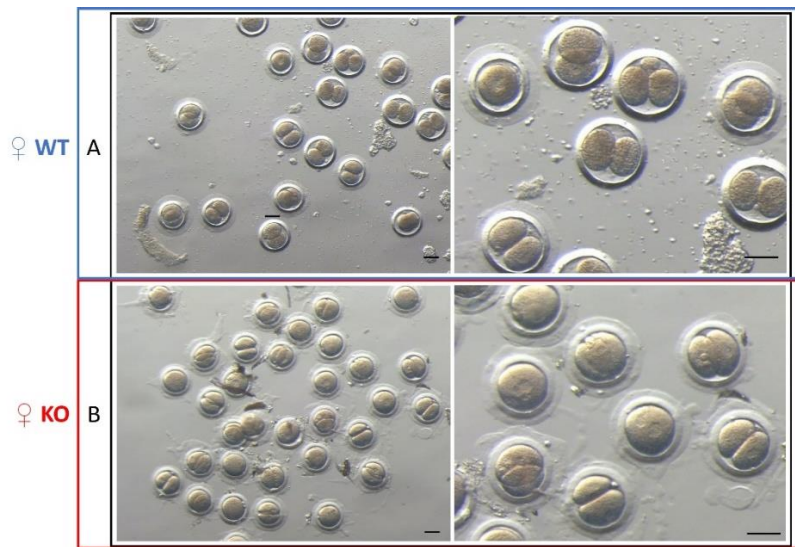
Además, estos embriones evidenciaron una clara asimetría y disparidad en el tamaño entre sus blastómeras. En ambos estadios analizados, los embriones procedentes de hembras WT presentaron blastómeras con un diámetro en torno a 20-30  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, las blastómeras de los embriones procedentes de hembras KO mostraron gran variedad de diámetros, desde 10 hasta casi 60  $\mu\text{m}$ , en ambas fases de desarrollo analizadas (**Figura 60**). Estos resultados indican una alteración en el desarrollo embrionario temprano en los embriones procedentes de hembras KO.



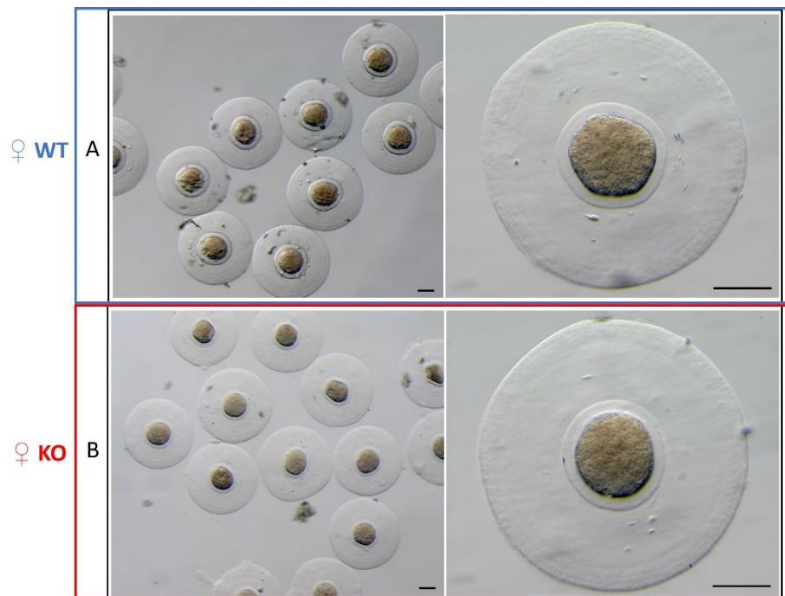
**Figura 60.** Diagrama de dispersión de los valores obtenidos en las mediciones del diámetro de las blastómeras de embriones de hámster en día 1,5 y 2,5 de desarrollo. Comparativa entre embriones procedentes de hembras WT y KO para *OVGP1*. El número de embriones analizados por grupo fue 12 para 1,5 días de desarrollo y 13 para 2,5 días de desarrollo. El grado de dispersión o variabilidad queda reflejado con el error estándar (SE), representado con las barras internas.

## Conejo

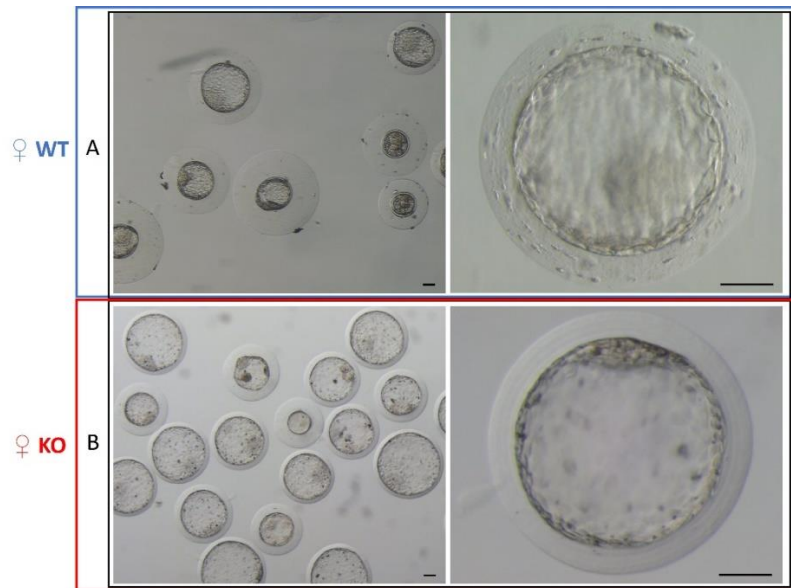
En el caso del conejo, los análisis de fertilidad *in vivo* descartaron el fenotipo de infertilidad en los animales KO para *OVGP1*. El análisis comparativo entre embriones de hembras WT y KO mediante microscopía óptica no evidenció variaciones morfológicas evidentes entre ambos grupos en ninguno de los estadios de desarrollo analizados (**Figuras 61-63**).



**Figura 61.** Análisis mediante microscopía óptica de cigotos/embriones de 2 células de coneja con genotipo WT (A) y KO para *OVGP1* (B). No se observan diferencias morfológicas entre ambos grupos analizados. Barra: 100  $\mu$ m.



**Figura 62.** Análisis mediante microscopía óptica de mórulas de coneja con genotipo WT (A) y KO para *OVGP1* (B). No se observan diferencias morfológicas entre las mórulas de ambos grupos analizados. Barra: 100  $\mu$ m.



**Figura 63.** Análisis mediante microscopía óptica de blastocistos de coneja con genotipo WT (A) y KO para *OVGP1* (B). No se observan diferencias morfológicas entre los blastocistos de ambos grupos analizados. Barra: 100  $\mu$ m.

El número medio de cigotos/embriones de 2 células, mórulas y blastocistos recuperados en conejas KO fue de:  $29,5 \pm 12,5$ ,  $24,5 \pm 5,5$  y  $17,5 \pm 6,5$  respectivamente y en conejas WT:  $35,25 \pm 6,79$ ;  $43,25 \pm 6,37$  y  $43,67 \pm 3,38$  (Tablas 23-25).

**Tabla 23.** Número medio de cigotos/embriones de 2 células recuperados mediante lavado oviductal guiado por laparoscopia tras 24 horas de la IA en coneja. Comparativa entre conejas con genotipos WT y KO para *OVGP1*.

Genotipo de la hembra	Número de hembras	Número de cigotos/embriones de 2 células recuperados (Media $\pm$ SE)
KO	2	$29,5 \pm 12,5$
WT	4	$35,25 \pm 6,79$

**Tabla 24.** Número medio de mórulas recuperadas mediante lavado oviductal guiado por laparoscopia tras 72 horas de la IA en coneja. Comparativa entre hembras con genotipos WT y KO para *OVGP1*.

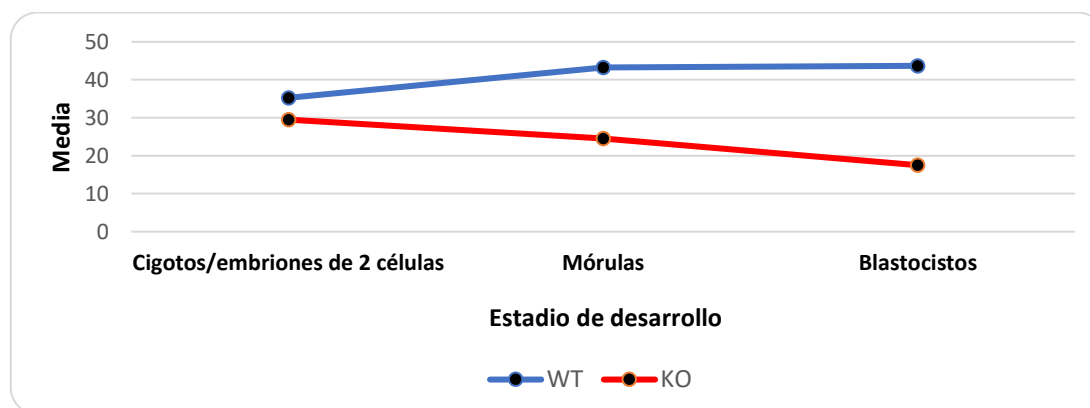
Genotipo de la hembra	Número de hembras	Número de mórulas recuperadas (Media $\pm$ SE)
KO	2	$24,5 \pm 5,5$
WT	4	$43,25 \pm 6,37$

VI. Resultados

**Tabla 25.** Número medio de blastocistos recuperados mediante lavado oviductal guiado por laparoscopia tras 96 horas de la IA en coneja. Comparativa entre hembras con genotipos WT y KO para *OVGP1*.

Genotipo de la hembra	Número de hembras	Número de blastocistos recuperados (Media± SE)
KO	2	17,5 ± 6,5
WT	3	43,67 ± 3,38

Las mayores tasas de recuperación embrionaria obtenidas en las conejas WT en comparación con las KO son debidas a que las hembras WT acababan de alcanzar la edad óptima para la reproducción (5 meses aproximadamente) y eran nulíparas, teniendo ante esta situación mayor efecto el protocolo de superovulación. Lo que sí es interesante reseñar es la tendencia a la reducción en el número de embriones recuperados en las hembras KO conforme avanzaba su desarrollo, no perceptible en las conejas WT (**Figura 64**). Estos datos junto a los obtenidos en el porcentaje de gestación y tamaño de camada en el análisis de la fertilidad *in vivo* (también menores en hembras KO que WT, aunque no estadísticamente significativos) (**Tabla 16**), sugieren un posible fenotipo de subfertilidad asociado a una posible reducción de la supervivencia embrionaria.

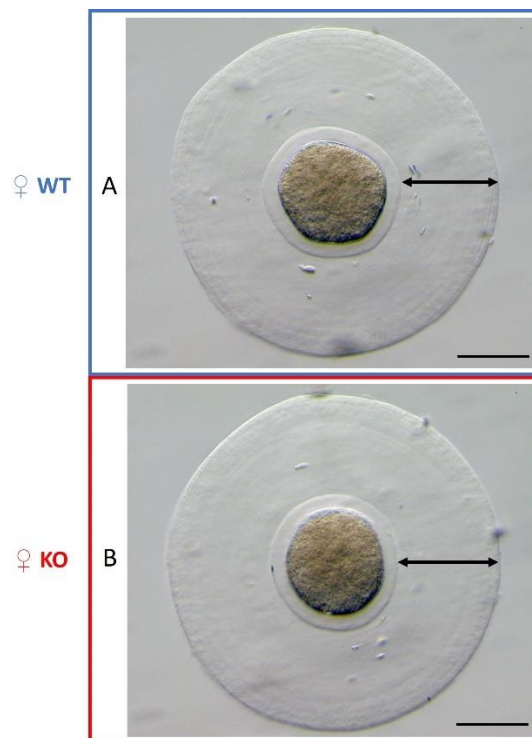


**Figura 64.** Diagrama de barras que refleja la tendencia a la reducción en el número de embriones recuperados en las hembras KO conforme avanzaba su desarrollo, no perceptible en las conejas WT. Se indica la media de cigotos/embryones de 2 células, mórulas y blastocistos recuperados mediante lavado oviductal guiado por laparoscopia en las conejas WT y KO para *OVGP1*.

### 1.5 Análisis de la formación de la capa de mucina en mórulas de conejo

Mediante el estudio microscópico de los embriones de conejo en estadio de mórula se determinó el grosor de la capa de mucina, valorando así si la ausencia de la proteína oviductina en las conejas KO condicionaba la formación o grosor final de la capa de mucina característica de los embriones esta especie.

Los resultados mostraron que la proteína oviductina es prescindible para la formación de la capa de mucina en coneja puesto que esta se forma de igual modo en hembras con genotipo WT como KO para *OVGP1* (**Figura 65**).

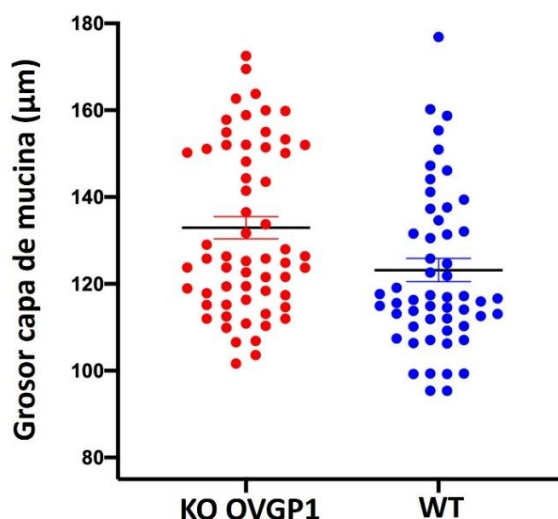


**Figura 65.** Análisis mediante microscopía óptica de la capa de mucina de embriones de coneja en estadio de mórula. No se observan diferencias morfológicas entre las mórulas procedentes de conejas con genotipo WT (A) y KO para *OVGP1* (B). El grosor de la capa de mucina queda señalado con flechas negras. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

La media del grosor de la capa de mucina en mórulas procedentes de conejas WT fue  $124,6 \pm 2,73 \mu\text{m}$  y en las de hembras KO  $132,9 \pm 2,53 \mu\text{m}$  (**Tabla 26**). El diagrama de dispersión mostrado en la **Figura 66** nos permite observar cómo ambos grupos de hembras presentan un patrón de variabilidad similar en el grosor de la capa de mucina de los embriones.

**Tabla 26.** Grosor de la capa de mucina en embriones de coneja en estadio de mórula. Comparativa entre mórulas procedentes de hembras con genotipo WT y KO para *OVGP1*. Las letras superíndice a y b indican diferencias significativas, p-valor<0,05.

Genotipo de la hembra	Número de hembras	Número de mórulas analizadas	Grosor de la capa de mucina en $\mu\text{m}$ (Media $\pm$ SE)
KO	2	61	132,9 $\pm$ 2,53 <sup>a</sup>
WT	2	51	124,6 $\pm$ 2,73 <sup>b</sup>



**Figura 66.** Diagrama de dispersión de los valores obtenidos en las mediciones del grosor de la capa de mucina de embriones de conejo en estadio de mórula. Comparativa entre conejas con genotipos WT y KO para *OVGP1*. El grado de dispersión o variabilidad queda reflejado con el error estándar (SE), representado con las barras internas.

## 1.6 Análisis transcriptómico de oviductos de hámster mediante RNA-seq

Previo al análisis transcriptómico a partir de muestras de ARN total de oviducto se procedió a determinar la calidad e integridad del ARN de partida. Los resultados mostraron una concentración y volumen adecuados para poder llevar a cabo el análisis, superando en todas las muestras los 400 ng totales necesarios para realizar la técnica de RNA-seq. En cuanto a la integridad del ARN (valor RIN), todas las muestras presentaban una integridad apropiada para poder ser analizadas correctamente (RIN  $\geq$  6,8) (Tabla 27).



**Tabla 27.** Calidad e integridad de las muestras de ARN total de oviducto de hámster WT y KO para *OVGP1*. Se indican los siguientes valores: concentración de ARN en base a  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; volumen total ( $\mu\text{l}$ ) y valor de integridad del ARN (RIN).

Muestras	[ARN] ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Volumen ( $\mu\text{l}$ )	RIN
WT1	207,09	40	9,3
WT2	114,18	41	9,6
WT3	169,59	40	8,9
KO1	83,97	34	9,1
KO2	678,53	23	9
KO3	240,80	38	9,8

El análisis de expresión génica diferencial nos permitió identificar de manera global qué genes sufrían variación significativa en su expresión en oviducto entre los dos grupos analizados, hembras de hámster WT y hembras KO.

Los resultados mostraron variación significativa en la expresión de 7 genes: ***GPR18*, *OVGP1*, *ENPEP*, *C1QTNF4*, *DERL3*, *AMY1* y *WDR95***. De estos 7 genes solo *GPR18* se encontraba sobreexpresado en las muestras oviductales de las hembras KO. Los otros 6 genes mostraron infraexpresión en dichas muestras (**Tabla 28**).

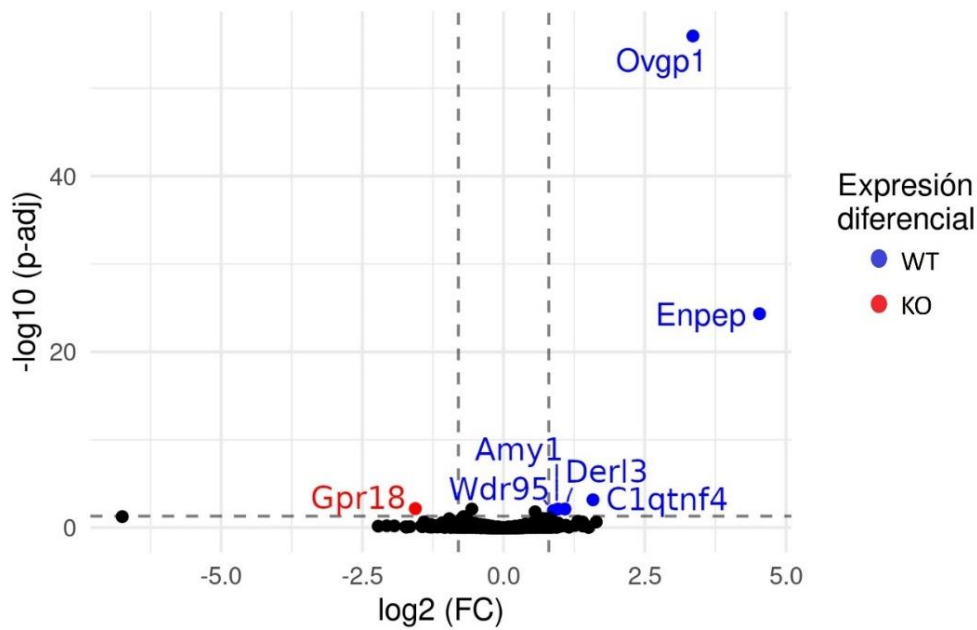
**Tabla 28.** Genes con variación significativa de su expresión en oviducto de hembras de hámster WT y KO para *OVGP1* analizadas mediante RNA-seq. Se indica el *locus* (LOC), es decir, la localización en el genoma de los genes no descritos en *Mesocricetus auratus* hasta el momento.

Gen (LOC)	FC (log2)	p.adj (FDR)	N.º medio de lecturas WT	N.º medio de lecturas KO
<i>OVGP1</i>	3,4	1,1E-56	1.328.108,67	125.919
<i>ENPEP</i> (LOC101830901)	4,5	4,7E-25	14.515	631,67
<i>C1QTNF4</i>	1,6	0,00069	213,67	69
<i>DERL3</i>	1,1	0,0077	702,33	323
<i>AMY1</i> (LOC101834678)	0,96	0,0078	15.056,67	7.629,33
<i>WDR95</i> (LOC101822514)	0,88	0,012	962	514,33
<i>GPR18</i>	-1,6	0,007	608	1.661

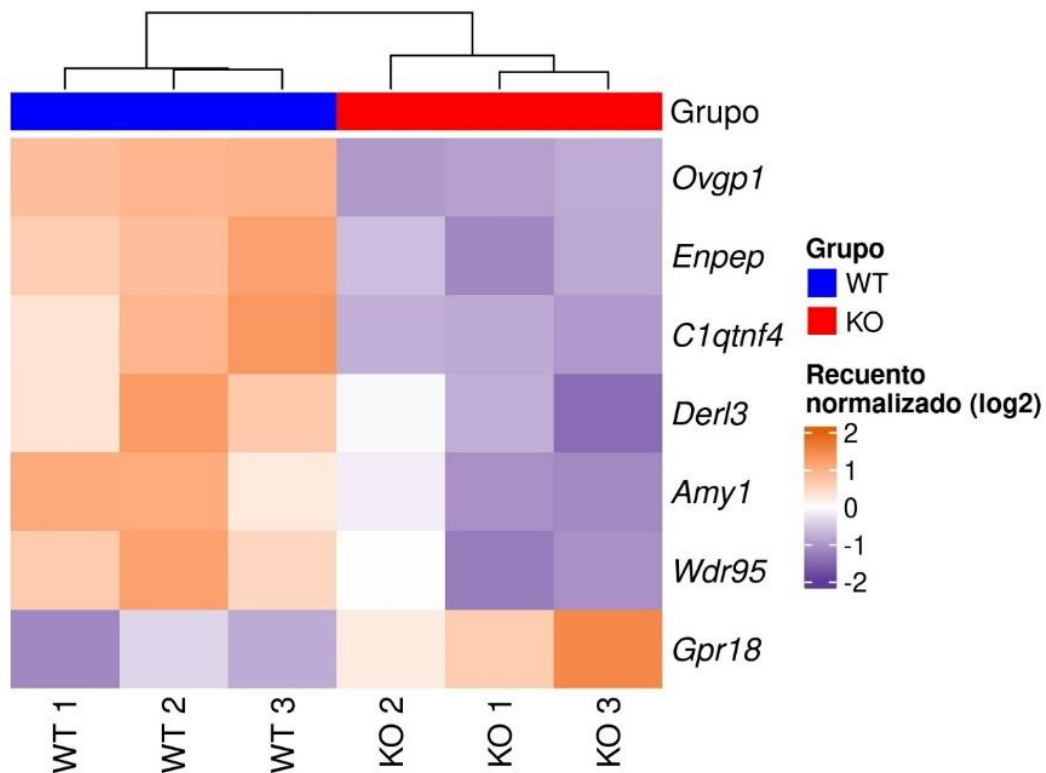
El diagrama de dispersión y el mapa de calor, mostrados en las **Figuras 67 y 68** respectivamente, nos permiten ver la variación de expresión de los 7 genes entre los dos grupos, hembras WT y KO. Así como cuáles de estos genes están más expresados en

VI. Resultados

cada grupo. El gen *OVGP1* es el que muestra mayor diferencia de expresión oviductal entre los dos grupos, seguido de *ENPEP*, *C1QTNF4*, *GPR18*, *DERL3*, *AMY1* y *WDR95*.



**Figura 67.** Diagrama de dispersión de los valores de expresión de los genes expresados diferencialmente entre muestras oviductales procedentes de hembras WT y KO para *OVGP1*. Los puntos de color negro corresponden con genes con variación de su expresión no estadísticamente significativa entre ambos grupos.



**Figura 68.** Mapa de calor de valores de expresión génica entre muestras oviductales procedentes de hembras WT y KO para *OVGP1*.

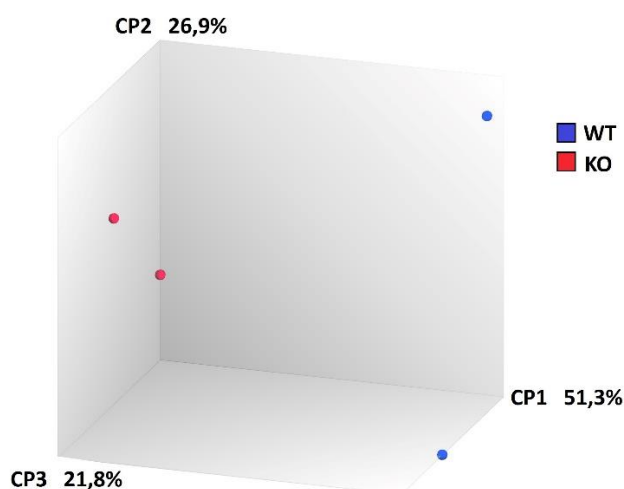
## 1.7 Análisis transcriptómico de embriones de hámster mediante la técnica de microarrays

El primer paso para el análisis transcriptómico de los embriones de hámster mediante la técnica de microarrays, fue la determinación de la calidad e integridad de las muestras. Todas presentaron una concentración de ARN en torno a 100 pg/ $\mu$ l y un volumen total de 5  $\mu$ l, valores adecuados para su análisis.

El análisis de expresión génica diferencial nos permitió identificar de manera global qué genes sufrían variación significativa de su expresión entre los embriones procedentes de los dos grupos analizados, hembras de hámster WT y hembras KO. Los resultados mostraron variación significativa en la expresión de 1.668 genes entre ambos grupos, de los cuales 658 estaban sobreexpresados y 1.010 infraexpresados en los embriones de hembras KO. Para evaluar si existía relación entre las distintas muestras analizadas dentro de cada grupo se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con todo el conjunto de genes que mostraron diferencia significativa de expresión entre los dos grupos (1.668 genes). Como se muestra en la **Figura 69**, las 2 muestras de embriones procedentes de hembras KO, en color azul, se encuentran muy próximas entre sí y distantes de las muestras de embriones procedentes de hembras WT, en color rojo. A su vez las dos muestras de embriones de hembras WT se encuentran próximas entre sí. Este resultado nos indica que los embriones de hembras KO presentan una expresión génica muy similar entre ellos, pero a su vez distinta a la de los embriones procedentes de hembras WT y viceversa.

El eje Y (eje de las ordenadas) del gráfico se describe como la primera dimensión (componente principal 1, CP1) y explica el 51,3% de la varianza, el eje Z (eje cota) se describe como la segunda dimensión (CP2) y explica el 26,9% de la varianza y el eje X (eje de las abscisas) se describe como la tercera dimensión (CP3) y explica el 21,8% de la varianza. Con las 3 dimensiones este análisis nos explica el 100% de la varianza entre la expresión de ambos grupos experimentales, diferenciándose mayoritariamente a través de la primera dimensión.

## VI. Resultados



**Figura 69.** Análisis de componentes principales (ACP) de muestras de embriones procedentes de hembras WT (en color azul) y KO para *OVGP1* (en color rojo).

De entre los 1.668 genes que mostraron variación significativa en su expresión entre los dos grupos, los 3 genes con mayor sobreexpresión (en base a su valor FC) en los embriones procedentes de hembras KO fueron: *EIF4E1B*, *BMI1* y *RNF38* (Tabla 29). Asimismo, los 3 genes con mayor infraexpresión (en base a su valor FC) en embriones procedentes de hembras KO fueron: *ASS1*, *PHB* y *LRRC59* (Tabla 30). El listado completo de genes puede verse en el Anexo 8.

**Tabla 29.** Genes sobreexpresados en embriones de hembras de hámster KO para *OVGP1*. Se muestran los 3 genes con mayor FC.

Gen	FC (log2)	p. adj (FDR)	Unidades relativas de fluorescencia WT	Unidades relativas de fluorescencia KO
<i>EIF4E1B</i>	464,94	1,73E-06	7,95	16,81
<i>BMI1</i>	139,75	1,26E-06	4,31	11,44
<i>RNF38</i>	82,84	0,0015	9,38	15,75

**Tabla 30.** Genes infraexpresados en embriones de hembras de hámster KO para *OVGP1*. Se muestran los 3 genes con menor FC.

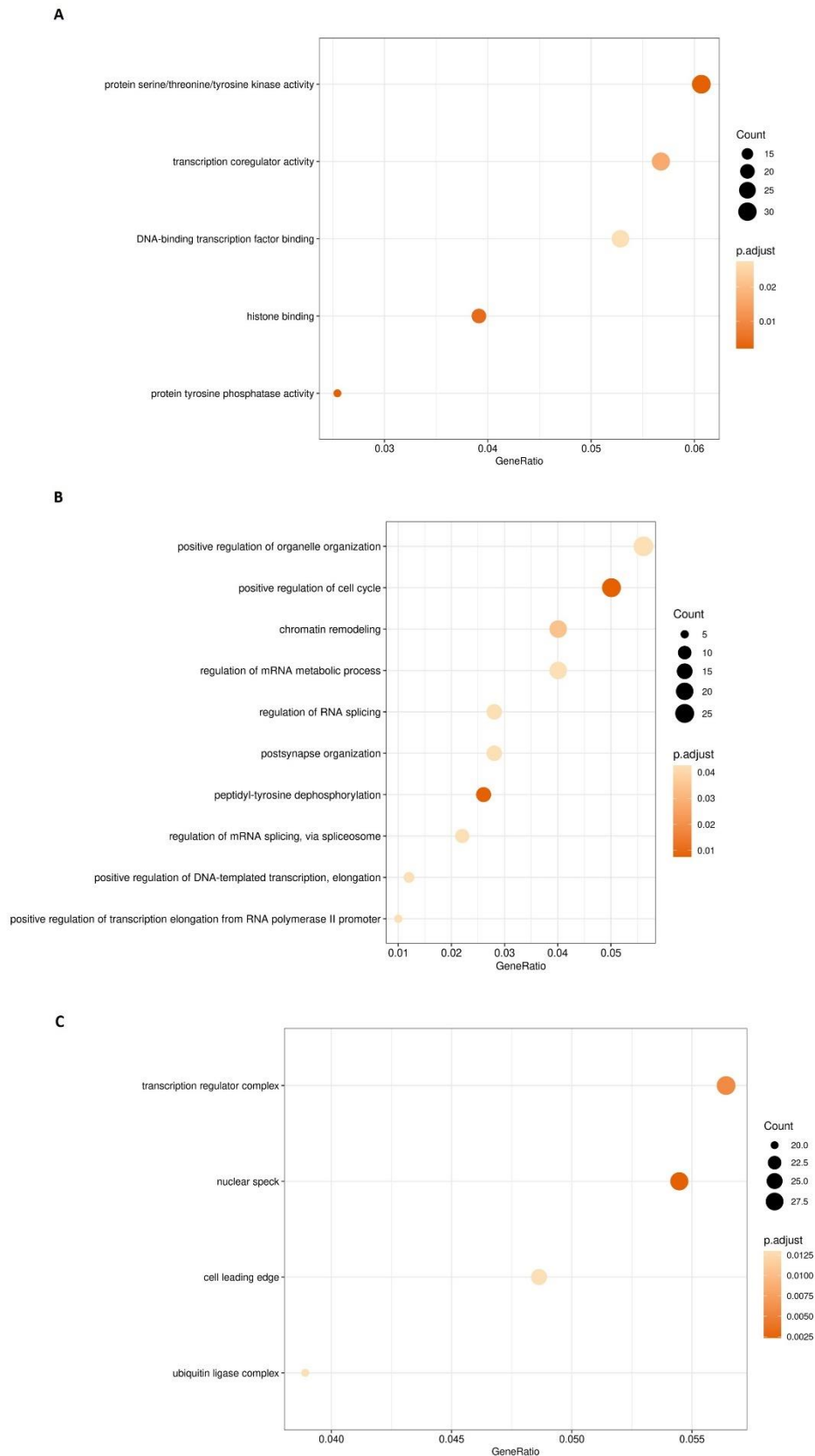
Gen	FC (log2)	p. adj (FDR)	Unidades relativas de fluorescencia WT	Unidades relativas de fluorescencia KO
<i>ASS1</i>	-211,79	2,97E-06	14,08	6,36
<i>PHB</i>	-152,61	8,33E-06	15,29	8,03
<i>LRRC59</i>	-46,62	1,18E-06	12,21	6,67

Las anotaciones biológicas enfocadas a las funciones moleculares y los procesos biológicos de los genes sobreexpresados (658) mostraron que los embriones de hembras KO presentan sobreexpresión de genes relacionados con la organización de orgánulos y la regulación positiva del ciclo celular. En cuanto a la anotación biológica referente a la compartimentación celular indicó que presentan una compartimentación enfocada en el complejo regulador de la transcripción y el complejo ubiquitina-ligasa (**Figura 70**).

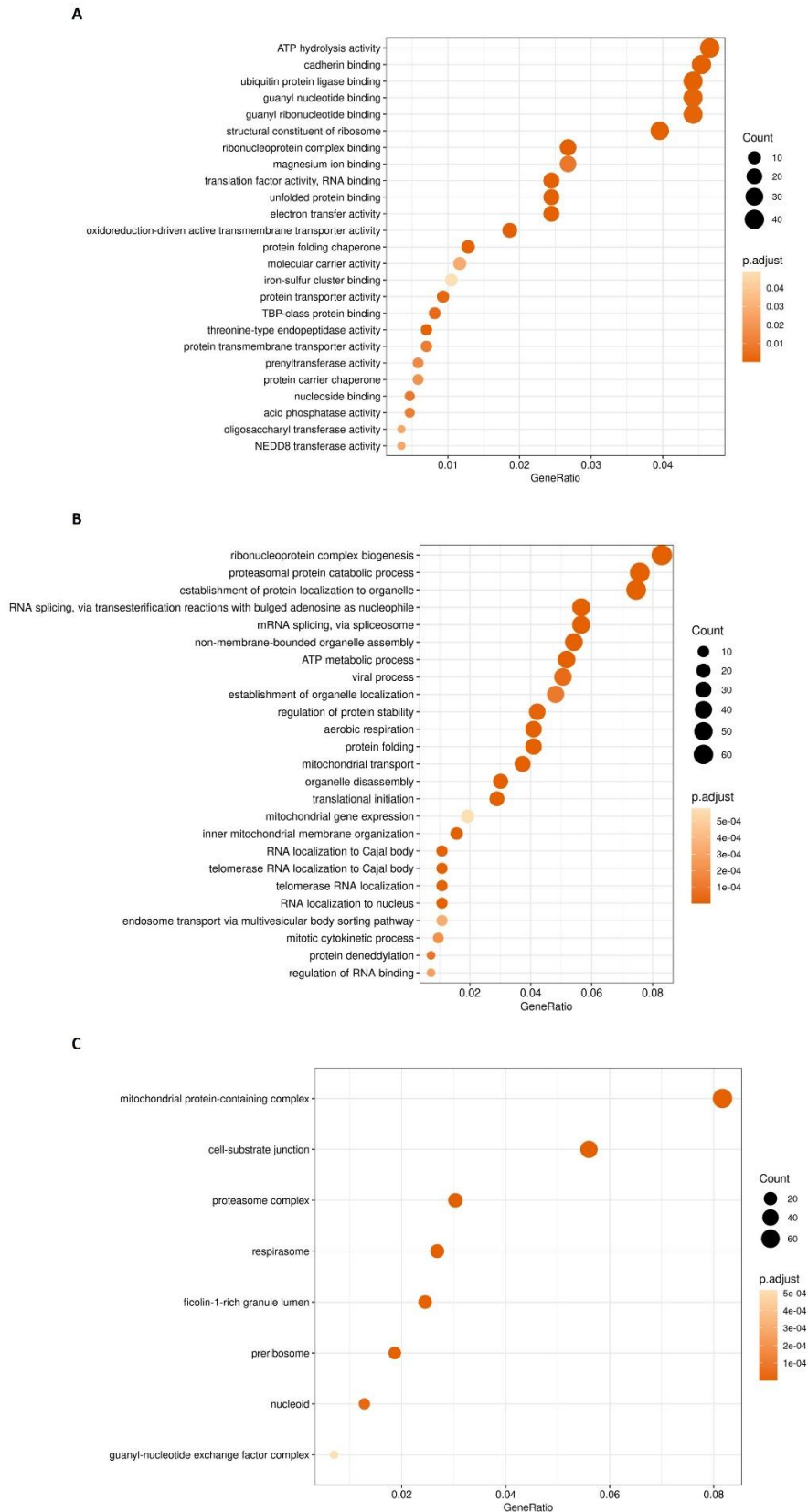
En referencia a los genes infraexpresados (1.010), las anotaciones biológicas basadas en las funciones moleculares y los procesos biológicos mostraron que los embriones de hembras KO presentan infraexpresión de genes relacionados con la regulación de la expresión génica y la degradación de proteínas. La anotación biológica referente a la compartimentación celular indicó que presentan una compartimentación enfocada en la mitocondria y el proteasoma (**Figura 71**).

Cabe destacar que entre los genes con variación en su expresión (ya sea elevada o disminuida) en embriones procedentes de hembras KO respecto a los WT encontramos un elevado número de genes relacionados con la regulación de la vía de la autofagia y el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP). En el **Anexo 9** se encuentra el listado completo de genes incluidos en cada una de las anotaciones biológicas.

## VI. Resultados



**Figura 70.** Anotaciones biológicas de las funciones moleculares (A), los procesos biológicos (B) y los compartimentos celulares (C) de los genes sobreexpresados (658) en embriones procedentes de hembras de hámster KO para *OVGP1*. El valor p adj. es equivalente al FDR, el valor *counts* determina el número medio de lecturas y el *GeneRatio* es la relación entre los genes obtenidos en nuestro estudio específicos de esa categoría entre el total de genes anotados.



**Figura 71.** Anotaciones biológicas de las funciones moleculares (A), los procesos biológicos (B) y los compartimentos celulares (C) de los genes infraexpresados en embriones procedentes de hembras de hámster KO para *OVGP1*. El valor *p* adj. es equivalente al FDR, el valor *counts* determina el número medio de lecturas y el *GeneRatio* es la relación entre los genes obtenidos en nuestro estudio específicos de esa categoría entre el total de genes anotados.

## 2. Evolución del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae*

Dependiendo de la especie, fue posible secuenciar de 3 a 6 fragmentos de los 7 fragmentos de ADN<sub>g</sub> de *Ovgp1* que abarcaban las parejas de cebadores diseñadas.

En el alineamiento múltiple realizado (**Figura 72**) se observa que la inserción en el exón 1 descrita en *Rattus norvegicus* está presente en las otras dos especies de *Rattus* analizadas: *Rattus exulans* y *Rattus tanezumi*. En estas especies también hay una delección de 4 bases en el exón 3. Por el contrario, *Rattus norvegicus* es la única especie que presenta una mutación en el codón de iniciación (ATG -> ATA) y una delección de una base en la posición 6 (exón 1). Estos indels hacen que cambie el marco de lectura desencadenando la formación de codones de parada prematuros entre los exones 1 al 6. Otros 5 géneros de la tribu *Rattini* también mostraron codones de parada prematuros entre los exones 1 al 6: *Chryromyscus*, *Berylmys*, *Bandicota*, *Bunomys* y *Diplothrix*. De ellos, *Berylmys bowersi* presenta una delección de una base en la posición 22 (exón 1). La posición de los codones de parada presentes en cada especie queda recogida en la **Tabla 31**.



	10	20	30	40	50	60	70	80
<i>Mus musculus</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mus caroli</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mus spretus</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mus spicilegus</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mus pahari</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mastomys coucha</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Myomys fumatus</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Praomys rostratus</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Lemniscomys zebra</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Dasymys incomtus</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Dasymys rufulus</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Myotomys unisulcatus</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Parotomys brantsii</i>	ATGGGGAGGCTGCTT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Conilurus penicilatus</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Pseudomys australis</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Maxomys surifer</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Millardia meltada</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Rattus norvegicus</i>	ATAAGCAGGCCGCTGAGTAAACATCCTAGCAATGGTTGGGCTGGTCTTCTGATGAAACTCAATGATGGTACTGC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Rattus exulans</i>	I G G R V H P S N G W L G W F F * * N S M M V L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Rattus tanezumi</i>	ATGGGGAGAGCCGCTGAGTATAACATCCAGCAATGGTTGGGCTGGTCTTCTGATGAAACTCAATGATGGTACTGC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Diplothrix legata</i>	M G R P L S I T S * Q W L V G L V L L M K H N D G T A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Bandicota bengalensis</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Berylmys bowersi</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Bunomys chrysocomus</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Leopoldamys edwardsi</i>	M G R L Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Chyromyscus chiropus</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Meriones unguiculatus</i>	M G R L L	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Acomys russatus</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Grammomys surdaster</i>	M G R L M	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Arvicanthis niloticus</i>	ATGGGGAGGCTGCTG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Apodemus sylvaticus</i>	M G R L Q	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

## VI. Resultados

```
          90          100         110         120         130         140         150         160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mus musculus  CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P H D L D
Mus caroli    CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P H D L D
Mus spretus   CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P H D L D
Mus spicilegus CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P H D L D
Mus pahari    CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P H D L D
Mastomys coucha CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACAGTCGGCCGGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCGATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P G D L D
Myomys fumatus CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACAGTCGGCCGGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N L A H S R P G P A S I M P H D L D
Praomys rostratus CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P R D L D
Lemniscomys zebra CTACAAATGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGNNNNNNNNNNNNNNNNNN
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I X X X X X X X
Dasymys incomtus CTACAAATGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAATCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCGTGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H N R P G P A S I M P R D L D
Dasymys rufulus  CTACAAATGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCNNNNNNNNNNNNNN
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P X X X X X
Myotomys unisulcatus CTACAAAGTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGNNNNNNNNNNNNNNNN
Y K L V C Y F T N W A H G R P G P A S I M X X X X X
Parotomys brantsii CTACAAAGTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H G R P G P A S I M P H D L D
Conilurus penicilatus CTACAAACTTGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCGGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P R D L D
Pseudomys australis CTACAAACTTGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCGGGCCCTGCCTCCATCATGCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P H D L D
Maxomys surifer   CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACAGAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCGTGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A Q S R P G P A S I M P R D L D
Millardia meltada -----NNCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCGTGACCTGGACC
X Y F T N W A H S R P G P A S I M P R D L D
Rattus norvegicus CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACAGAGTCAGCCAGGCCCTGGCCTTCCATCATGTC-----CCTGGACC
P T N W C A I S P I G H R V S Q A W P S S C P W T
Rattus exulans    CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACAGAGTCAGCCAGGCCCTGGCCTTCCATCATGTCCTCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A Q S Q P G L A F I M S H D L D
Rattus tanezumi   CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACAGAGTCAGCCAGGCCCTGGCCTTCCATCATGTCCTCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A Q S Q P G L A F I M S H D L D
Diplothrix legata CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACAGAGTCGGCCAGGCCCTGGCCTTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
L Q T G V L F H Q L G T E S A R P G G L H H A P P P G P
Bandicota bengalensis NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTGGCCTTCCATGCCCCATGACCTGGACC
X X X X X X X X X X X X X X X X X L A F I M P H D L D
Berylmys bowersi  CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACAGAGTCGGCCAGGCCCGGCCTCCATCATGCCTCATGACCTGGACC
P T N W C A I S P I G H R V G Q A R P P S C L M T W T
Bunomys chrysocomus CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACAGAGTCGGCCAGGCCCTGGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A Q S R P G P A S I M P H D L D
Leopoldamys edwardsi CTACAAACTGGTGTGCTTTTTTACCAAAATGGGCCACAGAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C F F T N W A Q S R P G P A S I M P H D L D
Chyromyscus chiropus -----NNCTATTTACCAAAATGGGCCACAGAGTCAGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCATGACCTGGACT
X Y F T N W A Q S Q P G P A S I M P C D L D
Meriones unguiculatus CTACAAAGCTGGTGTGTTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCTTCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I L P H D L D
Acomys russatus   CTACAAAGCTGGTGTGTTATTTGCCAGTTGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCGCTTCCCCGTGACCTGGACC
Y K L V C Y F A S W A H S R P G P A S V L P R D L D
Grammomys surdaster CTACAAATGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGACCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCGTGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P R D L D
Arvicanthis niloticus CTATAAATGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGGACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCATGACCTGGACC
Y K L V C Y F T N W G H S R P G P A S I M P H D L D
Apodemus sylvaticus CTACAAACTGGTGTGCTATTTACCAAAATGGGCCACATAGTCGGCCAGGCCCTGCCTCCATCATGCCCCGTGATCTGGACC
Y K L V C Y F T N W A H S R P G P A S I M P R D L D
```



VI. Resultados

250      260      270      280      290      300      310      320

*Mus musculus* AACGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAAAGGAACAGGGAGCTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N V L Y P E F N K L K E R N R E L K T L L S I G G W N  
*Mus caroli* AACATTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAAAGGAACAGGGAGCTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N I L Y P E F N K L K E R N R E L K T L L S I G G W N  
*Mus spretus* AACATTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAAAGGAACAGGGAGCTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N I L Y P E F N K L K E R N R E L K T L L S I G G W N  
*Mus spicilegus* AACATTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAAAGGAACAGGAAGCTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N I L Y P E F N K L K E R N R K L K T L L S I G G W N  
*Mus pahari* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGGAACAGGGAGCTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N V L Y P E F N K L K E R N R E L K T L L S I G G W N  
*Mastomys coucha* ACCGTTCTCTATCCAGAGTTCACAGACTCAAGGAGAGAAACAGGGAGCTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 T V L Y P E F N R L K E R N R E L K T L L S I G G W N  
*Myomys fumatus* AACGTTCTCTATCCAGAGTTCACAGACTCAAGGAGAGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N V L Y P E F N R L K E X X X X X X X X X X X X X X  
*Praomys rostratus* AACGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N V L Y P E F N K L K E X X X X X X X X X X X X X X  
*Lemniscomys zebra* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGGAACAGGGAGTGTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N V L Y P E F N K L K E R N R E L K T L L S I G G W N  
*Dasymys incompus* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAGACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 I V L Y P E F N R L K E X X X X X X X X X X X X X X  
*Dasymys rufulus* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAGACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 I V L Y P E F N R L K E X X X X X X X X X X X X X X  
*Myotomys unisulcatus* NNN  
 X  
*Parotomys brantsii* TATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 Y V L Y P E F N K L K E X X X X X X X X X X X X X X  
*Conilurus penicilatus* AACGTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGCAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N V L Y P E F N K L K Q X X X X X X X X X X X X X X  
*Pseudomys australis* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGCAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N X L Y P E F N K L K Q X X X X X X X X X X X X X X  
*Maxomys surifer* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAG  
 N V L Y P E F N K L K E X  
*Millardia meltada* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N V L Y P E F N K L K E X X X X X X X X X X X X X X  
*Rattus norvegicus* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGGACAGGGAGCCGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 M F S T R V Q Q T Q G E E Q G A E N T A V H Q R V E  
*Rattus exulans* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N I L \* S S T N S M R X X X X X X X X X X X X X X  
*Rattus tanezumi* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N V L \* S S T N S R R X X X X X X X X X X X X X X  
*Diplothrix legata* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 E C S L S R V \* \* T Q G V X X X X X X X X X X X X X X  
*Bandicota bengalensis* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N V L Y L E F N K L K E X X X X X X X X X X X X X X  
*Berylmys bowersi* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 M F S T Q S S I N S R R X X X X X X X X X X X X X X  
*Bunomys chrysocomus* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N V L Y P E F N K L K E X X X X X X X X X X X X X X  
*Leopoldamys edwardsi* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 N V L Y P E F N K L K E X X X X X X X X X X X X X X  
*Chyromyscus chiropus* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAG  
 N V L Y P E F N K L K E X  
*Meriones unguiculatus* AATTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGGACAGAGACTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N F L Y P E F N K L K E R N R E L K T L L S I G G W N  
*Acomys russatus* AAAATTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGGAACAGGGAGCTGAAGACACTGTTGTCCGTTGGAGGGTGGAA  
 K I L Y P E F N K L K E R N T E L K T L L S V G G W N  
*Grammomys surdaster* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGGAACAGGGAGTGTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N V L Y P E F N K L K E R N R E L K T L L S I G G W N  
*Arvicanthis niloticus* AATGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGGAACAGGGAGTGTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N V L Y P E F N K L K E R N R E L K T L L S I G G W N  
*Apodemus sylvaticus* AACGTTCTCTATCCAGAGTTCACAAACTCAAGGAGAGGAACAGGGAGCTGAAAACTGCTGTCCATGGAGGGTGGAA  
 N V L Y P E F N K L K E R N R E L K T L L S I G G W N





	490	500	510	520	530	540	550	560
<i>Mus musculus</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Mus caroli</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Mus spretus</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Mus spicilegus</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Mus pahari</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Mastomys coucha</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Myomys fumatus</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Praomys rostratus</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Lemniscomys zebra</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Dasymys inotmus</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Dasymys rufulus</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Myotomys unisulcatus</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L							
	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Parotomys brantsii</i>	AATTTTCTCTTCTTAATTGAA N F L F L I E							
<i>Conilurus penicilatus</i>	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Pseudomys australis</i>	X X X X X X X E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L NNNNNNNNNNNNNNNNNAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Maxomys surifer</i>	X X X X X X X E L Q F A F E K E A L L T Q H P R L L L							
<i>Millardia meltada</i>	AATTTTCTCTTCTTAATTGAA N F L F L I E							
<i>Rattus norvegicus</i>								
<i>Rattus exulans</i>	AATTTTCTCTTCTTAATTGAG I F S S * L X							
<i>Rattus tanezumi</i>	AATTTTCTCTTCTWAATTGAG I F S S X L X							
<i>Diplothrix legata</i>	AATTTTCTCTTCTTAATTGAG E F S L L N *							
<i>Bandicota bengalensis</i>	AATTTTCTCTTCTTAATTGAG N F L F L I E							
<i>Berylmys bowersi</i>	AATTTTCTCTTCTTAATTGAG I F S S * L X							
<i>Bunomys chrysocomus</i>	AATTTTCTCTTCTTAATTGAG N F L F L I E							
<i>Leopoldamys edwardsi</i>	AATTTTCTCTTCTTAATTGAG N F L F L I E							
<i>Chyromyscus chiropus</i>								
<i>Meriones unguiculatus</i>	AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Acomys russatus</i>	N F L F L I E E L Q F A F E K E A L L T Q Q P R L L L AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Grammomys surdaster</i>	N F L F L I E E L Q F A F E K E A L L T Q Q P R L L L AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Arvicanthis niloticus</i>	N F L F L I E E L Q F A F E R E A L L T Q H P R L L L AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							
<i>Apodemus sylvaticus</i>	N F L F L I E E L Q F A F K R E A L L T Q H P R L L L AATTTTCTCTTCTTAATTGAAGAGCTCCAGTTTGCCTTTCGAGAGGGAGGCCCTGCTCAGCACCCACCGGCTGCTGCT							



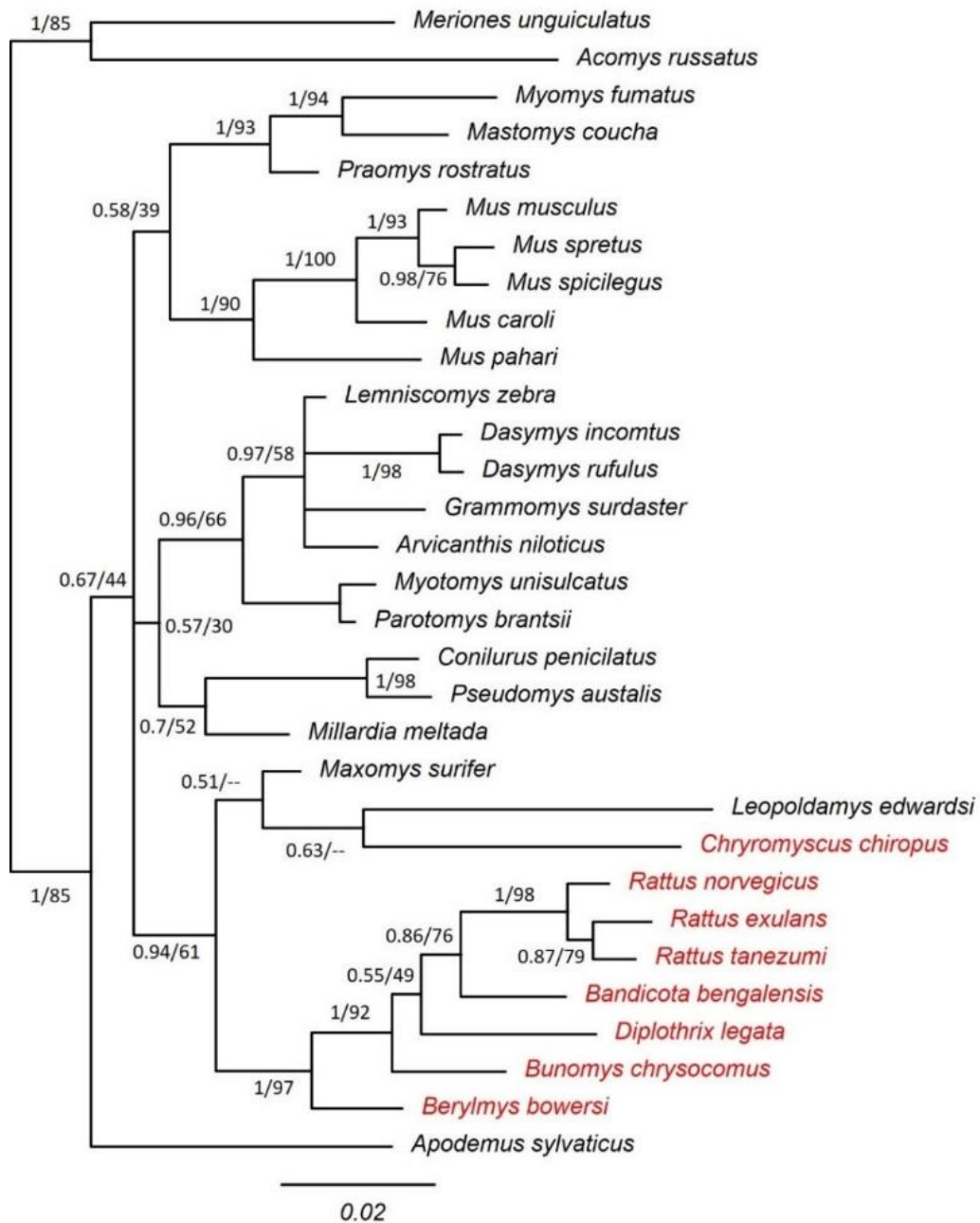


**Tabla 31.** Localización de los codones de parada en la secuencia amplificada (exones 1 al 6) de *Ovgp1*. La posición indicada está basada en el alineamiento de la Figura 72.

Género	Especie	Posición de los codones de parada
<i>Rattus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	14, 20, 56, 59, 173, 179, 200
<i>Rattus</i>	<i>Rattus exulans</i>	28, 196, 250, 494
<i>Rattus</i>	<i>Rattus tanezumi</i>	28, 196, 250, 401
<i>Chrynomyscus</i>	<i>Chrynomyscus chiropus</i>	179
<i>Berylmys</i>	<i>Berylmys bowersi</i>	56, 59, 179, 200, 494
<i>Bandicota</i>	<i>Bandicota bengalensis</i>	196, 478
<i>Bunomys</i>	<i>Bunomys chrysocomus</i>	196, 478
<i>Diplothrix</i>	<i>Diplothrix legata</i>	150, 237, 261, 264, 369, 381, 417, 426, 471, 498

La filogenia obtenida a partir de las secuencias parciales de los exones 1 al 6 se muestra en la **Figura 73**. La longitud de cada rama corresponde al número de sustituciones por sitio que acumula la secuencia. A nivel de cada rama, se indica el porcentaje de *bootstrap* del nodo al que se dirige la rama, es decir, el número de veces que se encuentra un nodo entre 1000 árboles construidos. Los nodos no soportados por el programa PhymI (indicados con el símbolo “- -”) afectan a 3 especies: *Maxomys surifer*, *Leopoldamys edwardsi* y *Chrynomyscus chiropus*. Esto quiere decir que para estas especies el programa Phylml propone diferentes relaciones entre ellas. Esto puede ser debido a que no se encontraron codones de parada en *Maxomys* y *Leopoldamys* en los fragmentos secuenciados, siendo necesario en futuros estudios completar estas secuencias para comprobar si existen codones de parada en posiciones posteriores de la secuencia.

VI. Resultados



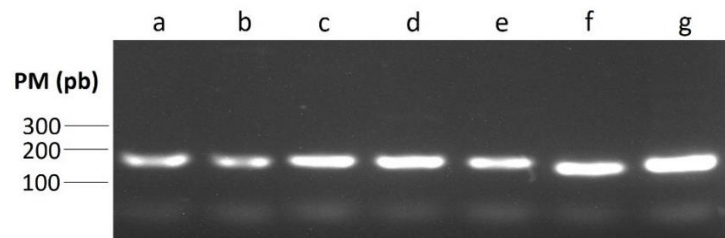
**Figura 73.** Árbol filogenético del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae* obtenido por el método de máxima verosimilitud y la inferencia bayesiana. La escala indica el número de sustituciones por sitio. A nivel de cada rama, se indica el valor *bootstrap* (bp: porcentaje *bootstrap*) del nodo al que se dirige la rama. "- -" indica que estos nodos no están soportados por el programa PhymI. En esta filogenia, posiblemente podría ser debido a la presencia de codones de parada o a la inserción presente en el exón 1 en el género *Rattus*. Las especies en las que se observaron codones de parada están coloreadas en rojo (todas pertenecen a la tribu *Rattini*).

En base a estos resultados, parece que la pseudogenización solo se produjo en los *Rattini*, es decir, después de la separación entre los *Rattini* y los otros *Murinae* hace aproximadamente 12,5 millones de años (entre 11,31-13,99) (Aghová et al., 2018). Sin

embargo, como los resultados provienen de un análisis parcial, es decir, de los 6 exones iniciales y no de los 11 que forman *Ovgp1*, sería necesario completar las secuencias para comprobar si existen codones de parada en posiciones posteriores de otras especies. El estudio completo de las secuencias permitiría determinar si los *Rattini* que divergieron antes, como es el caso de *Maxomys*, tienen una versión funcional de la proteína oviductina o no.

### 3. Análisis del gen *ASTL* en lagomorfos

Para el análisis del gen *ASTL* en lagomorfos se realizó amplificación mediante PCR de un fragmento de la secuencia de ADN<sub>g</sub> de *ASTL* en 7 especies: conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus cuniculus*), conejo salvaje ibérico (*Oryctolagus cuniculus algirus*), conejo pigmeo (*Brachilagus idahoensis*), conejo cola de algodón oriental (*Sylvilagus floridanus*), conejo de pincel (*Sylvilagus bachmani*), liebre europea (*Lepus europaeus*) y liebre ibérica (*Lepus granatensis*). Dicho fragmento de 161 pb está ubicado en el exón 6 del gen *ASTL*, donde se encuentra el centro activo de la proteína (**Figura 74**).



**Figura 74.** Análisis del gen *ASTL* de lagomorfos mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa. Se amplifica una región de interés de 161 pb. a) Amplicón de conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus cuniculus*), b) conejo salvaje ibérico (*Oryctolagus cuniculus algirus*), c) conejo pigmeo (*Brachilagus idahoensis*), d) conejo cola de algodón oriental (*Sylvilagus floridanus*), e) conejo de pincel (*Sylvilagus bachmani*), f) liebre europea (*Lepus europaeus*) y g) liebre ibérica (*Lepus granatensis*).

Tras la secuenciación por Sanger de los productos de PCR y el alineamiento múltiple de las secuencias de ADN<sub>g</sub> obtenidas se observó un alto porcentaje de identidad entre el conejo común (*Oryctolagus cuniculus*) y el resto de las especies analizadas: 84,66% con *Sylvilagus floridanus*, 93,87% con *Brachilagus idahoensis*, 94,51% con *Lepus granatensis* y *Lepus europaeus*, 94,48% con *Sylvilagus bachmani* y 100% con *Oryctolagus cuniculus algirus*. En todas las especies analizadas se identificó una mutación que genera codones de parada prematuros en el exón 6 donde se

## VI. Resultados

encuentra el centro activo de la proteína ovastacina, confirmando la pseudogenización del gen *ASTL* en lagomorfos (**Figura 75**). Este resultado confirma que la proteína ovastacina no actuaría en el clivaje de ZP2 en estas especies pudiendo estar relacionado con la pérdida del bloqueo de la polispermia a nivel de ZP.

### A

<i>Homo sapiens</i>	---TGCAGGTGCTTCTCGAGTGTGGGGCCAGTGGAGGGATGCAGGTGGTCTCCCTGGC	10389
<i>Mus Musculus</i>	GTCTTACAGGTGTTTCTCTGGTGTGGGACCGCAGTGGAGGGATGCAGGTGGTCTCCCTGGC	8560
<i>Oryctolagus cuniculus cuniculus</i>	-----TTGGCTTACTATGCGGTGGAGGGCAGCAGGTGGCGTCCCTTGGC	43
<i>Oryctolagus cuniculus algeris</i>	-----TTGGCTTACTATGCGGTGGAGGGCAGCAGGTGGCGTCCCTTGGC	43
<i>Brachilagus idahoensis</i>	-----TTGGCTTACTATGCGGTGGAGGGCAGCAGGTGGCATCCTTGGC	43
<i>Sylvilagus floridanus</i>	-----TTGGCTTACTATGCGGTGGAGGGCAGCAGGTGGGTCCCTTGGC	43
<i>Sylvilagus bachmani</i>	-----TTGGCTTACTATGCGGTGGAGGGCAGCAGGTGGCGTCCCTTGGC	43
<i>Lepus europeus</i>	-----TTGGCTTACTATGCGGTGGAGGGCAGCAGGTGGCGTCCCTTGGC	43
<i>Lepus granatensis</i>	-----TTGGCTTACTATGCGGTGGAGGGCAGCAGGTGGCGTCCCTTGGC	43
	* * * * *	
<i>Homo sapiens</i>	GCCCAGTGTCTCCAGAAGGGCCGGGCATTGTCTTCATGAGCTCATGCATGTGTGGG	10449
<i>Mus Musculus</i>	ACCCACTTGTCTCCGGAAGGGCCGAGGCATTGTCTTACATGAGCTCATGCACGTACTTGG	8620
<i>Oryctolagus cuniculus cuniculus</i>	ACC-CGCTGTCTCCAGAGGGC-AAGGGCATCATCCCGCACAAAGCTCCTTCCAGAGCTGGG	101
<i>Oryctolagus cuniculus algeris</i>	ACC-CGCTGTCTCCAGAGGGC-AAGGGCATCATCCCGCACAAAGCTCCTTCCAGAGCTGGG	101
<i>Brachilagus idahoensis</i>	ACC-CGCTGTCTCCAGAGAGC-AAGGGCATCATCCCGGTGAGCTCCTTCATGTGTGGG	101
<i>Sylvilagus floridanus</i>	ACC-CGCTGTCTCCAGAGAGC-AAGGACATCATCCCGTGTGAGCTCCTGCATGTGTGGG	101
<i>Sylvilagus bachmani</i>	ACC-CGCTGTCTCCAGAGGGC-AAGGACATCATCCTCGGTGAGCTCCTTCATGTGTGGG	101
<i>Lepus europeus</i>	ACCCGCTGTCTCCAGAGGGC-AAGAGCATCATCCCGGTGAGCTCCTTCACGTGTGGG	102
<i>Lepus granatensis</i>	ACCCGCTGTCTCCAGAGGGC-AAGAGCATCATCCCGTGTGAGCTCCTTCACGTGTGGG	102
	** * * * *	
<i>Homo sapiens</i>	CTTCTGGCAGGACACCGGGCCGACCGGGACCGCTATATCCGTGCAACTGGAACGA	10509
<i>Mus Musculus</i>	CTTCTGGCATGAGCATTACGGGGCAGTCCGGACCGCTACATCCAAGTCAACTGGAACGA	8680
<i>Oryctolagus cuniculus cuniculus</i>	CTTCTGGCAGGACCTCCCTGGACACGGGGACGG--CGACATCGTGCACCTGGAACGA	159
<i>Oryctolagus cuniculus algeris</i>	CTTCTGGCAGGACCTCCCTGGACACGGGGACGG--CGACATCGTGCACCTGGAACGA	159
<i>Brachilagus idahoensis</i>	CTTCTGGCAGGACCTCCCTGGATGAGGGGATGG--CGACATCGTGCACCTGGAACGA	159
<i>Sylvilagus floridanus</i>	CTTCTGGCAGGACCTCCCTGGACATCGTGTAC--TGAACGA-----	144
<i>Sylvilagus bachmani</i>	CTTCTGGCAGGACCTCCCTGGACACGGGGATGG--CGACATCGTGCACCTGGAACGA	159
<i>Lepus europeus</i>	CTTCTGGCAGGACCTCCCTGGACACGAGGACGG--CGACATCGTGCACCTGGAACGA	160
<i>Lepus granatensis</i>	CTTCTGGCAGGACCTCCCTGGACACGAGGACGG--CGACATCGTGCACCTGGAACGA	160
	***** * * * * *	
<i>Homo sapiens</i>	GATCCTGCCAGGTGAGCCAGGCCAC-ACGCAGGACAGGCTGTCGCCGGGAGGGGAC---	10565
<i>Mus Musculus</i>	GATCCTCCCGGTAAGTCACTGACTAGGCTGGGCCAGAGGACCCAGACACAGGCCCTCA	8740
<i>Oryctolagus cuniculus cuniculus</i>	GAGA-----	163
<i>Oryctolagus cuniculus algeris</i>	GAGA-----	163
<i>Brachilagus idahoensis</i>	GAGA-----	163
<i>Sylvilagus floridanus</i>	GAGA-----	148
<i>Sylvilagus bachmani</i>	GAGA-----	163
<i>Lepus europeus</i>	GAGA-----	164
<i>Lepus granatensis</i>	GAGAA-----	165
	**	

### B

<i>Homo sapiens</i>	LEALAEFERSTCIRFVYQDQDFISIIIPMYGCFSSVGRSGMQVVS LAPTLQKGRGIV	180
<i>Mus Musculus</i>	MDAFAEFERFTCIRFVAHYGQDFVSIILPMAGCFSGVGRSGMQVVS LAPTLRKRGRIV	180
<i>Oryctolagus cuniculus cuniculus</i>	-----LAXYAV-----EGSRWRPW-HPLSPKGGII	25
<i>Oryctolagus cuniculus algeris</i>	-----LAXYAV-----EGSRWRPW-HPLSPKGGII	25
<i>Brachilagus idahoensis</i>	-----LAXYAV-----EGSRWRPW-HPLSPKGGII	25
<i>Sylvilagus floridanus</i>	-----LAXYAV-----EGSRWRPW-HPLSPKGGII	25
<i>Sylvilagus bachmani</i>	-----LAXYAV-----EGSRWRPW-HPLSPKGGII	25
<i>Lepus europeus</i>	-----LAXYAV-----EGSRWRPW-HPPVSRGQEH	25
<i>Lepus granatensis</i>	-----LAXYAV-----EGSRWRPW-HPPVSRGQEH	25
	: . * :	
<i>Homo sapiens</i>	LHELMHVLGFWHEHTRADR---RYIRVNWNEILPGFEINFIKSSNMLTPYDYSSVM	236
<i>Mus musculus</i>	LHELMHVLGFWHEHTRADR---RYIQVNWNEILPGFEINFIKSRSTNMLVPYDYSSVM	236
<i>Oryctolagus cuniculus cuniculus</i>	PHKLLHVLGFWHEPPWTTGTATSCHLERE-----	54
<i>Oryctolagus cuniculus algeris</i>	PHKLLHVLGFWHEPPWTTGTATSCHLERE-----	54
<i>Brachilagus idahoensis</i>	PRELLHVLGFWHEPPWTRGMATSCHLERE-----	54
<i>Sylvilagus floridanus</i>	PCELLHVLGFWHEPPWT-----SCHLERE-----	49
<i>Sylvilagus bachmani</i>	PRELLHVLGFWHEPPWTTGMATSCHLERE-----	54
<i>Lepus europeus</i>	PHAPSRAGLLA-----RASLDNEDGDIVSPGTR-----	54
<i>Lepus granatensis</i>	PHAPSRAGLLA-----RSSLDDEDGDIVSPGTR-----	55
	*:	

**Figura 75.** A) Alineamiento de las secuencias de nucleótidos y B) aminoácidos del fragmento de ADN amplificado mediante PCR del gen *ASTL* en las 7 especies de lagomorfos analizadas. Se incluyen en el alineamiento las secuencias descritas para *ASTL* en la especie humana (*Homo sapiens*) (NC\_000002.12 y NP\_001002036.3) y murina (*Mus musculus*) (NC\_000068.8 y NP\_001277932.1). Los codones de parada prematuros se muestran en negro.

## **VII. DISCUSIÓN**



## 1. Implicación de la proteína oviductina en el desarrollo de los eventos reproductivos tempranos

La proteína oviductina está implicada en la fecundación y el desarrollo embrionario temprano en la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas hasta el momento (Buhi, 2002; McBride et al., 2004; Kan y Esperanzate, 2006; Yang et al., 2015). Su presencia se ha asociado a efectos positivos en la fecundación, el desarrollo embrionario y/o la implantación en diferentes mamíferos como: cabra, cerda, gata, hámster, mujer, oveja y vaca (King et al., 1994; Satoh et al., 1995; Boatman y Magnoni, 1995; O'Day-Bowman et al., 1996; Hill et al., 1996a, 1996b; Martus et al., 1998; Kouba et al., 2000; McCauley et al., 2003; Coy et al., 2008; Pradeep et al., 2011; Saccary et al., 2013; Mondéjar et al., 2013; Hribal et al., 2014; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2016; Algarra et al., 2016, 2018; Laheri et al., 2018). Concretamente se han descrito efectos positivos en: la capacitación de los espermatozoides, la RA, la movilidad y viabilidad espermática, la unión espermatozoide-óvulo, la tasa de penetración y de fecundación, la reducción de la polispermia, la calidad del embrión y las tasas de desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto (Killian, 2004, 2011; Kouba et al., 2000; Coy et al., 2008; Saccary et al., 2013; Zhao et al., 2022).

Estudios *in vitro* en hámster y en el ser humano mostraron que la coincubación de espermatozoides y ovocitos o hemizonas de la misma especie con oviductina homóloga genera una mejora en la unión espermatozoide-ZP homóloga y en la tasa de fecundación (Boatman y Magnoni, 1995; O'Day-Bowman et al., 1996). Así, el tratamiento de espermatozoides y/u ovocitos de hámster con oviductina recombinante homóloga, previamente al ensayo de unión de espermatozoides-ovocitos, aumentó significativamente el número de espermatozoides unidos a la ZP de los ovocitos (Yang et al. 2015). Sin embargo, la obtención en el presente estudio de embriones de hembras de hámster y coneja KO para *OVGP1* en diferentes estadios de desarrollo permite afirmar que la ausencia de la proteína oviductina no impide la unión entre gametos ni el bloqueo de la polispermia en estas especies.

## VII. Discusión

Estudios previos de inmunolocalización determinaron la presencia de oviductina en cigotos y embriones de hámster desde una célula hasta estadio de blastocisto no eclosionado, confirmando la captación de oviductina por parte de estos (Kan et al., 1993; Kan y Roux, 1995). Dicha captación de oviductina podría explicar su influencia en las primeras etapas del desarrollo embrionario, como se ha observado en estudios *in vitro* para otras especies de mamíferos. Así, en cabra, la incubación de óvulos y embriones con oviductina nativa purificada durante la maduración, FIV y cultivo embrionario *in vitro* conllevó a una tasa de división embrionaria del 52,1%, 75,1%, 61,8% y 57,1% a concentraciones de oviductina de 0, 10, 50 y 100 µg/ml, respectivamente. Además, la tasa de blastocistos fue del 16%, 24,5%, 15,4% y 11,5% cuando las concentraciones de oviductina fueron de 0, 10, 50 y 100 µg/ml, respectivamente. Por tanto, la concentración más baja (10 µg/ml) de oviductina aumentó la tasa de división y la formación de blastocistos de forma significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) en comparación con la concentración más alta (100 µg/ml) (Pradeep et al., 2011). En la especie porcina, la incorporación de oviductina homóloga durante la maduración y fecundación *in vitro* de los ovocitos no mostró efectos en la tasa de división embrionaria, pero sí aumentó el número de ovocitos que alcanzaron el estadio de blastocisto, lográndose el mejor dato con incubaciones de 10 µg/ml durante la maduración y 1 µg/ml durante la FIV (aproximadamente 28% de blastocistos en el grupo suplementando con oviductina homóloga y 18% en el grupo control sin suplementación) (Kouba et al., 2000).

Este potencial papel de la oviductina en el desarrollo embrionario temprano ha sido confirmado en el presente estudio en el modelo KO de hámster, mostrando las hembras de hámster KO un claro fenotipo de infertilidad *in vivo*. Sin embargo, los machos de hámster KO no muestran alteraciones en su fertilidad. El análisis morfológico de los embriones procedentes de hembras de hámster KO mediante técnicas de microscopía óptica ha evidenciado que los embriones en estadio de 4-8 células muestran de forma significativa un menor número de blastómeras, así como una marcada asimetría en el tamaño entre ellas. Dichas alteraciones en las etapas tempranas de desarrollo embrionario impiden que la gestación llegue a término. Estos resultados permiten afirmar que la oviductina es una proteína imprescindible en las hembras de hámster para el correcto desarrollo embrionario temprano. La captación de oviductina



por los embriones de hámster descrita en estudios previos (Kan et al., 1993; Kan y Roux, 1995) junto a los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la proteína oviductina puede tener un papel embriotrófico y en la proliferación celular durante el desarrollo embrionario temprano en esta especie.

El análisis *in silico* de oviductina revela un dominio en la región N-terminal que la asemeja a las proteínas quitinasas pertenecientes a la familia GH18 (Malette et al., 1995; Huang et al., 2012). Dentro de esta familia se ha descrito que la proteína HCGP-39 es responsable del incremento de la proliferación celular en tejido conectivo (Recklies et al., 2002, Ling et al., 2004), pudiendo ocurrir lo mismo con la oviductina en los embriones de hámster, lo cual cuadraría con el fenotipo observado.

A diferencia del claro fenotipo de infertilidad evidenciado en las hembras de hámster KO, en el modelo realizado en conejo, las hembras y machos KO son fértiles *in vivo*. Sin embargo, en las conejas KO se observó una disminución en las tasas de gestación (100% en conejas WT y 40% en conejas KO) y tamaño medio de la camada ( $6,6 \pm 0,93$  en conejas WT y  $3,57 \pm 1,5$  en conejas KO) aunque no estadísticamente significativa. Así pues, sería interesante ampliar en futuros estudios el tamaño muestral para obtener datos de mayor solidez y confirmar el posible fenotipo de subfertilidad en las hembras que sugieren los datos actuales. No obstante, es posible afirmar que la proteína oviductina no es esencial para que se puedan llevar a cabo procesos como la fecundación y el desarrollo embrionario en esta especie. Una conclusión similar a la obtenida en 2003 por Araki y colaboradores en el modelo de ratón, donde tanto machos como hembras KO para *Ovgp1* fueron fértiles. No observaron diferencia entre las tasas de fecundación de los óvulos de las hembras de ambos genotipos evaluados mediante FIV, pero al igual que los resultados obtenidos en el presente modelo de conejo, las ratonas KO para *Ovgp1* presentaron un tamaño de camada menor no estadísticamente significativo (Araki et al., 2003). La posible reducción del número de crías por camada en ambos modelos animales, ratón y conejo, puede estar asociada a una reducción en la supervivencia embrionaria. Se ha demostrado que la supervivencia embrionaria influye de manera directa en el tamaño de la camada en conejos y ratones (Blasco et al., 1993). En los conejos concretamente, se determinó que la supervivencia y el desarrollo del

## VII. Discusión

embrión antes de las 96 horas de gestación eran responsables de la diferencia encontrada en el tamaño de la camada (Torrès et al., 1987). Los datos obtenidos en el modelo KO de conejo apoyan esta posibilidad ya que el número medio de cigotos/embriones de 2 células, mórulas y blastocistos recuperados en conejas KO fue de:  $29,5 \pm 12,5$ ,  $24,5 \pm 5,5$  y  $17,5 \pm 6,5$  respectivamente mientras que en conejas WT fue de:  $35,25 \pm 6,79$ ;  $43,25 \pm 6,37$  y  $43,67 \pm 3,38$ , apreciándose una reducción en el número de embriones recuperados en las hembras KO conforme avanzaba su desarrollo, no perceptible en las conejas WT.

Para comprender el motivo de la posible reducción del tamaño de la camada y por consiguiente el fenotipo de subfertilidad de las conejas KO es importante analizar la secuencia completa de *OVGP1* de conejo ya que estudios anteriores sugirieron que el desarrollo embrionario temprano puede inhibirse cuando la región C-terminal de la proteína oviductina es bloqueada por el uso de un anticuerpo (Yong et al., 2002). Por ello y porque *OVGP1* se expresa principalmente en oviducto, órgano de paso durante las primeras etapas de desarrollo embrionario, estudios previos lo propusieron como gen candidato para la supervivencia embrionaria temprana y la variabilidad del tamaño de la camada en conejo (Merchán et al., 2007; Merchán et al., 2009; García et al., 2010). Se determinó un polimorfismo de nucleótido único (SNP) g.12944C>G y un microsatélite triálico g.325[(GT)<sub>15</sub>T(G)<sub>5</sub>, (GT)<sub>14</sub>T(G)<sub>5</sub> y (GT)<sub>11</sub>T(G)<sub>7</sub>] en la secuencia genómica de *OVGP1* de conejo (Merchán et al., 2007; Merchán et al., 2009). El SNP g.12944C>G estaba localizado en el exón 11 y producía un cambio aminoacídico en la región C-terminal de la proteína, la cual puede conferir especificidad de especie, mediar eventos de reconocimiento específicos y regular directamente la actividad biológica de *OVGP1* (Yong et al., 2002; Algarra et al., 2016). El microsatélite estaba localizado en la región promotora, pudiendo modificar a *OVGP1* y su expresión (Merchán et al., 2007; Merchán et al., 2009), ya que varios estudios han indicado que la presencia de polimorfismos en la región promotora de un gen puede modificar su expresión debido a alteraciones en los factores de transcripción, la estructura de la cromatina y la conformación del ADN (Kashi et al., 1997; Iglesias et al., 2004; Szalai et al., 2005; Khan et al., 2006). Los resultados concluyeron que el genotipo GG del SNP del exón 11 (g.12944C>G) y el genotipo g.325[(GT)<sub>14</sub>T(G)<sub>5</sub>] del microsatélite mostraban una asociación favorable con

el tamaño de la camada, el número de crías nacidas vivas, el número de embriones implantados, la supervivencia embrionaria, la supervivencia fetal y la supervivencia prenatal (Merchán et al., 2009). Estos resultados junto a la reducción del número de embriones recuperados en las conejas KO conforme avanzaba el desarrollo embrionario, sugieren que la eliminación de *OVGP1* mediante técnicas de edición genética podría desencadenar efectos similares a los asociados a la presencia del SNP (g.12944C>G) y el microsatélite g.325[(GT)<sub>14</sub>T(G)<sub>5</sub>] en esta especie.

La determinación del papel irremplazable de la proteína oviductina en la función reproductiva en hámster en contraposición a lo obtenido en el modelo en conejo y previamente en ratón (Araki et al., 2003), confirma la variabilidad en el impacto fisiológico que desencadena la ausencia de dicha proteína en la fertilidad entre especies. En el caso del ratón la mayor parte de la proteína oviductina secretada pasa al espacio perivitelino del óvulo quedando poca cantidad de la proteína unida a la ZP (Kapur y Johnson, 1986; Lyng y Shur, 2009), pudiendo no contribuir a su endurecimiento como en el caso del hámster. Sin embargo, en la coneja la proteína oviductina sí se une fuertemente a la ZP, pero existe una peculiaridad, la capa de mucina, la cual podría interferir en la captación de oviductina por los embriones. Estas discrepancias entre especies podrían conllevar a una variación de la localización de la proteína oviductina en el embrión en desarrollo, pudiendo este hecho ser el causante de la variabilidad en la función de la proteína y por consiguiente en el diferente fenotipo observado entre los 3 modelos KO para *OVGP1*.

Otro aspecto a tener en cuenta es la separación filogenética entre las especies, pudiendo darse patrones específicos de evolución en genes reproductivos haciéndolos no esenciales en algunas especies. La comparación *in silico* de la secuencia aminoacídica de *OVGP1* de los mamíferos revela cinco regiones distintas (A-E) que se conservan de forma diferente entre los grupos de mamíferos (Avilés et al., 2010). Estas variaciones entre especies sugieren posibles modificaciones en alguna de sus funciones durante los eventos reproductivos, siendo necesarios futuros estudios que permitan esclarecer de un modo preciso su papel biológico en cada especie. Otras diferencias fenotípicas entre modelos de roedores KO para genes implicados en la fertilidad han sido descritas, como

## VII. Discusión

es el caso de la acrosina. Los ratones y las ratas KO para acrosina fueron fértiles (Baba et al., 1994; Isotani et al., 2017), mientras que el modelo KO en hámster fue infértil (Hirose et al., 2020). Esta similitud fenotípica entre ambos modelos murinos, rata y ratón, puede ser debida a la cercanía filogenética de las dos especies. En cambio, los *Cricetidae*, donde está enmarcado el hámster, se separaron a partir de los roedores *Muridae* mucho antes que *Mus* (ratón) y *Rattus* (rata) (Blanga-Kanfi et al., 2009; Michaux et al., 2001). Esto plantea la posibilidad de que, en ratón, donde el modelo KO para *Ovgp1* es fértil y, en rata, donde *OVGP1* es un pseudogén (Tian et al., 2009), la actividad de la oviductina se vea compensada por la de otras proteínas presentes en el FO pudiendo ocurrir lo mismo en el modelo en conejo. Para valorar posibles candidatos que suplan el papel de la oviductina hay que tener en cuenta la cercanía evolutiva de oviductina con otras proteínas presentes en oviducto, tema que discutiremos más adelante en el apartado 4 sobre el análisis filogenético del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae*.

Otro aspecto abarcado en el presente estudio en relación con *OVGP1* es **la capa de mucina**, propia del conejo y la liebre, no siendo común su presencia en otros mamíferos (García et al., 2016). Se trata de una cubierta de material mucinoso derivado de las secreciones oviductales que se deposita alrededor del embrión a su paso por el oviducto durante los primeros 3 días posmonta (García et al., 2016). El presente estudio ha permitido confirmar que su formación es independiente de *OVGP1* ya que las conejas KO forman la capa de mucina de igual modo que las hembras WT. Este hallazgo hace necesario el estudio de otras mucinas presentes en el FO de la coneja y su relación con la composición de la capa de mucina. Entre los posibles candidatos presentes en el FO de la coneja cabe citar a MUC4 y MUC16, ambas mucinas muestran su expresión más alta en oviducto en presencia de cigotos, mostrando ambas un marcado descenso de su expresión a partir de las 36 horas posovulación (Tesis Doctoral González-Brusi, 2021). Esta sobreexpresión podría estar vinculada a la formación de la capa de mucina ya que como hemos indicado, esta se deposita alrededor del embrión durante los primeros 3 días posmonta (García et al., 2016) y por consiguiente 3 días posovulación ya que la coneja es una especie de ovulación inducida (Scapinello, 2014).

## 2. Repercusión de la ausencia de oviductina en el transcriptoma del oviducto de hámster

Experimentos *knock down* para *OVGP1 in vitro* con células endometriales humanas mostraron variación en la expresión de genes relacionados con la receptividad y la adhesión del trofoblasto (Laheri et al., 2018). Con el objetivo de determinar si el fallo en el desarrollo embrionario de las hembras de hámster KO para *OVGP1* estaba asociado a un cambio en el ambiente oviductal, se realizó un análisis transcriptómico comparativo de oviducto. Dicho análisis manifestó que la ausencia de oviductina genera variación significativa en la expresión de 7 genes entre los que se encuentra ***OVGP1***, gen codificante de la oviductina. Los otros 6 genes con variación significativa en su expresión fueron: ***GPR18***, ***ENPEP***, ***C1QTNF4***, ***DERL3***, ***AMY1*** y ***WDR95***. De estos 7 genes, *GPR18* fue el único que mostró sobreexpresión en las muestras oviductales de las hembras KO, los otros 6 genes se encontraban infraexpresados en dichas muestras.

***GPR18*** es el gen codificante para el receptor endocanabinoide de N-aracidonil glicina (NAGLy), también conocido como receptor 18 acoplado a proteína G (*GPR18*). La señalización por cannabinoides puede intervenir en la contracción y relajación del músculo liso para el transporte del embrión, habiéndose sugerido que una señalización cannabinoide aberrante, disminuida o aumentada, puede conducir a la retención de embriones en el oviducto (Wang et al., 2004). Estos resultados indican un posible papel del receptor *GPR18* en la señalización y transporte embrionario. En el presente estudio no se ha evidenciado alteración en el transporte embrionario, siendo interesante en futuros estudios valorar si la sobreexpresión del gen *GPR18* en el oviducto de las hembras de hámster KO conlleva realmente a una alteración en el ritmo de transporte embrionario.

***ENPEP*** fue el gen que mostró mayor diferencia de expresión entre ambos grupos. Es el gen codificante para la proteína glutamil aminopeptidasa, una aminopeptidasa de membrana que interviene en la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y en el sistema renina-angiotensina regulando la presión arterial mediante la conversión de la angiotensina II, biológicamente activa, en angiotensina III como resultado de la hidrólisis

## VII. Discusión

del aspartato presente en su extremo N-terminal (Mizutani et al., 2008; De Mota et al., 2008; Kubota et al., 2010; Kato et al., 2011; Feliciano et al., 2013; Yang et al., 2013; Chen et al., 2014; Aguirre et al., 2015; Surendran et al., 2016; Chuang et al., 2017). Los estudios relacionados con el tratamiento de la hipertensión en modelos animales utilizando inhibidores para bloquear la actividad de ENPEP han apoyado una relación directa entre dicho bloqueo y la hipertensión arterial en el organismo (Gao et al., 2014). *ENPEP* se expresa en la trompa de Falopio de la mujer (Holmes et al., 2017) y en el oviducto de la ratona (Papatheodorou et al., 2020), pudiendo desempeñar un papel en este órgano. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito su función a este nivel, siendo los ratones KO para *Enpep* viables y fértiles (Marahrens et al., 2021). En cambio, se ha demostrado que la angiogénesis inducida por isquemia está alterada en estos ratones como resultado de una menor secreción de factores de crecimiento y formación de capilares (Kubota et al., 2010). Recientes estudios *in vitro* han propuesto a ENPEP como una enzima candidata para mediar en el procesamiento N-terminal de la actina (Chen et al., 2021). La delección de ENPEP en cultivo de células humanas *in vitro* muestra un pronunciado descenso del procesamiento de las isoformas de actina. Las células KO para *ENPEP* muestran diferencias en los niveles de actina F, en la extensión celular, en la formación de filopodios y en la migración celular. Estos datos sugieren que el procesamiento selectivo N-terminal de la actina mediado por esta aminopeptidasa es importante para su función (Chen et al., 2021).

En base a los resultados publicados hasta la fecha, la reducción de la expresión de *ENPEP* a nivel oviductal observada en las hembras KO podría afectar a la angiogénesis, el procesamiento N-terminal de la actina o al correcto mantenimiento de la presión arterial y por consiguiente a la presión intraluminal en el oviducto.

El gen ***C1QTNF4*** codifica para la proteína C1q y TNF 4 (C1QTNF4), miembro de la familia C1QTNF, una familia de proteínas secretadas que presentan homología estructural tanto con el complemento C1q como con la superfamilia del factor de necrosis tumoral (Shapiro y Scherer, 1998). Se ha identificado como receptor de superficie celular de C1QTNF4 a una proteína transportadora multidominio con diversas funciones llamada nucleolina (Vester et al., 2021), internalizándose activamente ambas

tras su unión (Hovanessian et al., 2010; Vester et al., 2021). La proteína nucleolina se encuentra en el núcleo, el citoplasma y la superficie de algunas células, como las cancerosas (Hovanessian et al., 2010), las endoteliales (Christian et al., 2003) y las monocíticas (Hirano et al., 2005). Entre las posibles funciones de C1QTNF4 se ha sugerido que desempeña un papel en el proceso inflamatorio habiéndose descrito propiedades proinflamatorias *in vitro* (Li et al., 2011) y propiedades antiinflamatorias *in vivo* (Luo et al., 2016), siendo los ratones KO para *C1qtnf4* más susceptibles a inflamación sistémica (Cao et al., 2021). Otros miembros de la familia C1QTNF han sido implicados en la autoinmunidad, incluyendo C1QTNF1 (Feng et al., 2018), C1QTNF3 (Murayama et al., 2014) y C1QTNF6 (Murayama et al., 2015). Los últimos estudios señalan que C1QTNF4 interviene en el sistema inmunitario innato teniendo capacidad antiinflamatoria, lo que sugiere que la pérdida de función de C1QTNF4 puede predisponer a la autoinmunidad, al menos en el ser humano (Vester et al., 2021). Sin embargo, la eliminación de *C1qtnf4* en ratón no afecta a la composición de las células inmunitarias, lo que indica que no es necesario para el desarrollo normal del sistema inmunitario murino (Sarver et al., 2020). Por otro lado, aunque C1QTNF4 no parece estar directamente implicada en la eliminación de las células apoptóticas tempranas, podría modular la función de la nucleolina en la superficie de los macrófagos, ya que la nucleolina es un receptor de macrófagos para células apoptóticas (Hirano et al., 2005), siendo esta otra posible vía de intervención de C1QTNF4 (Vester et al., 2021).

Aunque no hay estudios previos sobre la presencia de C1QTNF4 en oviducto, se ha detectado expresión de su receptor, la nucleolina, en oviducto de ratona, así como un intenso inmunomarcaje en el epitelio de la trompa de Falopio de la mujer (Papatheodorou et al., 2020). Además, se ha evidenciado inmunomarcaje contra la nucleolina en embriones preimplantacionales de ratón (Biggiogera et al., 1990). La expresión oviductal de *C1QTNF4* detectada en este trabajo, así como, la presencia de nucleolina a estos niveles sugieren que C1QTNF4 pueda desempeñar un papel durante el desarrollo embrionario temprano en oviducto. En base a esta premisa y a las funciones sugeridas hasta el momento para C1QTNF4, el descenso de su expresión en oviducto de hembras KO podría quizás desencadenar alteraciones en el control de la inmunidad local generando problemas de autoinmunidad contra los embriones.

El gen **DERL3** codifica para la proteína DERLIN en hámster, denominada DERLIN-3 en la especie humana. Se trata de una de las múltiples proteínas del complejo funcional de degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD, del inglés *endoplasmic reticulum-associated degradation*). Estos complejos son sistemas encargados de la eliminación de las proteínas no plegadas o mal plegadas acumuladas en el retículo endoplasmático (Tsai et al., 2002; Meusser et al., 2005; Vembar et al., 2008; Hirsch et al., 2009). En el proceso participan múltiples proteínas entre las que se encuentra DERLIN-3 (Eura et al., 2012). Todos los miembros de la familia DERLIN contienen dominios transmembrana y están localizadas en la membrana del retículo endoplasmático (Lilley et al., 2004; Oda et al., 2006). La sobreexpresión de *DERLIN-3* acelera la ERAD de las glicoproteínas mal plegadas y el *knock down* de *DERLIN-2* y *DERLIN-3* en células embrionarias de riñón humano inhibió la degradación proteica *in vitro* (Oda et al., 2006). En ratón, el modelo KO para *Derlin-3* demostró que su pérdida puede ser compensada por *Derlin-1* o *Derlin-2*, no mostrando estos animales alteración de la fertilidad (Eura et al., 2012). En un reciente estudio, se observó que el gen *DERLIN-3* se sobreexpresa en el istmo oviductal de la coneja en presencia de embriones de 8 células en comparación con la presencia de mórulas (González-Brusi, 2021), pudiendo tener un papel no esclarecido hasta el momento en las primeras fases del desarrollo embrionario. También existe expresión de *DERLIN-3* en la trompa de Falopio de la mujer (Uhlén et al., 2015) y en el oviducto de la ratona (Papatheodorou et al., 2020), no habiéndose valorado hasta el momento la variación de su expresión durante la gestación.

**AMY1** es el gen codificante para la proteína  $\alpha$ -amilasa 1. Estudios inmunohistoquímicos demostraron su presencia en la parte apical de las células ciliadas de la trompa de Falopio de la mujer (Bruns et al., 1982; Hayashi et al., 1986; Uhlén et al., 2015). Aunque el papel de la  $\alpha$ -amilasa en el aparato reproductivo no está del todo claro, estudios previos sugieren que puede tener un papel embriotrófico ya que se ha propuesto que otras proteínas de la misma familia, como la  $\alpha$ -amilasa 2B codificada por el gen *AMY2B* y secretada en oviducto de los mamíferos (Li y Winuthayanon, 2017; Gatien et al., 2019), interviene a nivel oviductal en la conversión del glucógeno en un azúcar simple (glucosa), pudiendo así estas moléculas de glucosa ser utilizadas en el



metabolismo celular tanto por el oviducto como por el embrión (Li y Winuthayanon, 2017).

Aunque las concentraciones basales dependen de la especie (oscilan entre 0,5 y 3,0 mM), la glucosa está presente en el tracto reproductor femenino de todas las especies examinadas, incluidas el ratón (Gardner y Leese, 1990), el conejo (Leese, 1988), y el ser humano (Lippes et al., 1972). El metabolismo de la glucosa es bajo en las primeras fases del desarrollo embrionario (Leese, 2012; González-Fernández et al., 2020; Chen et al., 2022), sin embargo, la glucólisis aumenta significativamente en la fase de blastocisto (Leese y Barton, 1984; Gardner et al., 1993; Dean, 2019). Además, en el ratón, la glucosa es el sustrato energético preferido para la masa celular interna (Hewitson y Leese, 1993). Todos estos datos sugieren un papel fisiológico de la glucosa en el desarrollo embrionario. Varios estudios han demostrado que concentraciones elevadas de glucosa (en torno a 5,0 mM) son perjudiciales para el desarrollo embrionario *in vitro* hasta los estadios de mórula y blastocisto (Schini y Bavister, 1988; Thompson y Simpson, 1992; Quinn, 1995; Ludwig et al., 2001). Sin embargo, el cultivo a concentraciones bajas de glucosa (por debajo de 2,0 mM) desde el estadio de cigoto no afecta a la formación del blastocisto ni al número de células en los estadios de mórula y blastocisto (Summers et al., 1995; Gardner y Lane, 1996; Ludwig et al., 2001). Estos resultados cuadran con el hecho de que las concentraciones de glucosa en el tracto reproductor femenino son considerablemente inferiores a las del plasma (Leese, 1988; Gardner y Leese, 1990; Nichol et al., 1992; Ludwig et al., 2001) y descienden adicionalmente tras la ovulación, existiendo *in vivo* a nivel oviductal concentraciones de glucosa muy bajas en presencia del embrión (Nichol et al., 1992; Gardner et al., 1996). Aunque no se observa inhibición en el desarrollo embrionario, la adición de 0,5 mM de glucosa en el medio de cultivo a partir del estadio de cigoto no ha mostrado efectos beneficios en el desarrollo hasta el estadio de blastocisto (Ludwig et al., 2001). Sin embargo, sí produjo efectos beneficiosos tras la transferencia embrionaria, evidenciándose un aumento en las tasas de implantación y viabilidad fetal tras la transferencia (Hoppe y Bavister, 1984). En base a estos resultados se ha concluido que la exposición de los embriones preimplantacionales a glucosa no es necesaria para el

## VII. Discusión

desarrollo hasta blastocisto, pero es importante para que el blastocisto siga desarrollándose y pueda implantarse con éxito (Ludwig et al., 2001).

La glucosa por sí sola es incapaz de sostener el desarrollo embrionario antes del estadio de ocho células en ratón (Brinster, 1974), pero sí después de esta fase, siendo la principal fuente de energía para los embriones de mamíferos después de la compactación (Whitten, 1957; Brinster, 1974; Leese, 2012). Por tanto, es posible que el suministro adicional de glucosa durante las etapas de desarrollo embrionario previas a la implantación permita al embrión aumentar sus reservas de glucógeno, necesarias durante el periodo de producción anaeróbica de energía (Ludwig et al., 2001).

La glucosa también pueden beneficiar a los embriones al aumentar la eficacia de la síntesis de proteínas ya que es sustrato de la glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa, que limita la velocidad de la vía de la hexosamina, necesaria para la glicosilación postraducciona de proteínas (Traxinger y Marshall, 1991). La capacidad de producir eficientemente proteínas glicosiladas es ventajosa para el desarrollo embrionario, lo que puede también ayudar a explicar la ventaja conferida por la glucosa en el medio de cultivo (Ludwig et al., 2001).

Para confirmar la premisa de que *AMY1* interviene directamente en la disponibilidad de glucosa a nivel oviductal deberíamos analizar en futuros estudios la composición del FO de las hembras de hámster KO, determinando si los niveles de glucosa son realmente inferiores a los encontrados en las hembras WT.

El gen ***WDR95*** codifica para una proteína predicha con múltiples dominios WD40, siendo su ortólogo en el ser humano la proteína WDR49 (Bradford et al., 2022), cuyo gen se expresa en la trompa de Falopio de la mujer (Consortium GTEx, 2015; Bustamante-Marin et al., 2019; Lentscher et al., 2021). Los dominios WD40 facilitan la formación de complejos multiprotéicos heterotriméricos. Además, las proteínas que presentan dichos dominios WD40 participan en diferentes procesos celulares como la progresión del ciclo celular, la transducción de señales, la apoptosis y la transcripción de genes (Ito et al., 2001; Smith et al., 1999, Lv et al., 2022). Sin embargo, los modelos murinos KOs para proteínas pertenecientes a la familia WD40 son fértiles (Lv et al.,

2022). Haría falta un mayor conocimiento de las funciones desempeñadas por *WDR95* para asociar el fenotipo de infertilidad observado en las hembras KO con el descenso en su expresión oviductal.

La eliminación de *OVGP1* en el presente modelo KO de hámster no genera modificación de la expresión a nivel oviductal de ningún gen catalogado hasta el momento como esencial en los eventos reproductivos tempranos. Sin embargo, la variación significativa en la expresión de estos 6 genes (*GPR18*, *ENPEP*, *C1QTNF4*, *DERL3*, *AMY1* y *WDR95*), provocada de manera indirecta por la eliminación de *OVGP1*, podría tener un efecto sumatorio que afecte al desarrollo embrionario en las hembras de hámster KO para *OVGP1*. No obstante, en futuros estudios habría que analizar histoquímicamente la presencia de estas proteínas en cortes de oviducto y además, sería interesante determinar si la modificación en la expresión de dichos genes también provoca variación en la cantidad final de la proteína en oviducto.

### **3. Repercusión de la ausencia de oviductina en el transcriptoma de embriones de hámster**

Estudios previos han demostrado que el tratamiento de óvulos y embriones *in vitro* en diferentes especies con oviductina recombinante desencadena la modificación de la expresión de genes involucrados en el desarrollo embrionario (Hribal et al., 2014; Algarra et al., 2018). Al igual que en la realización del análisis transcriptómico de oviductos, el objetivo de realizar un análisis transcriptómico de embriones fue determinar si existía una expresión génica diferencial entre los embriones oviductales procedentes de hembras KO y WT y cuáles eran los principales genes afectados.

Dicho análisis mostró variación estadísticamente significativa en la expresión de 1.668 genes, de los cuales 658 estaban sobreexpresados y 1.010 infraexpresados en los embriones procedentes de hembras KO.

## VII. Discusión

En primer lugar, discutiremos la posible vinculación entre la alteración en el desarrollo embrionario de los embriones de hembras KO y la variación de expresión de los 6 genes más afectados (seleccionados en base a su FC). De estos 6 genes, los 3 que presentaron mayor sobreexpresión fueron: ***EIF4E1B***, ***BMI1*** y ***RNF38*** y los 3 genes más infraexpresados: ***ASS1***, ***PHB*** y ***LRRC59***.

En referencia a los genes seleccionados por su mayor expresión en los embriones procedentes de hembras KO, el gen ***EIF4E1B*** es el que ve más aumentada su expresión. Además, es el gen que muestra mayor variación de expresión entre todos los genes en general. Este gen codifica el factor de iniciación de la traducción eucariota 4E, miembro de la familia 1B (EIF4E1B) y un componente clave en la regulación de la traducción del ARNm materno para asegurar la activación del genoma cigótico (Yang et al., 2022).

Los gametos de mamíferos se fusionan en la fecundación y deben ser reprogramados para expresar genes embrionarios (Ladstätter y Tachibana, 2019). En los mamíferos, la traducción activa se produce antes de la activación de los genes cigóticos (Latham et al., 1991; Abe et al., 2018). Los productos maternos almacenados en los ovocitos dirigen las modificaciones del epigenoma (Zhang y Smith, 2015), tras lo cual el genoma embrionario dirige el desarrollo (Tadros y Lipshitz, 2009). Estos datos sugieren que la activación de la embriogénesis temprana del ratón se basa en un reajuste rápido del epigenoma embrionario controlado por la traducción del ARNm materno predefinido en las células germinales femeninas (Yang et al., 2022). Estudios previos sugieren que esta temprana ráfaga de traducción es altamente selectiva (Alizadeh et al., 2005; Wang et al., 2010) ya que la mayoría de los ARN y proteínas maternos se eliminan rápidamente durante la transición materno-cigótica (Farley y Ryder, 2008; Despici y Neugebauer, 2018).

Los embriones de ratón se detienen en la fase de cigoto si se inhibe esta traducción temprana (Aoki et al., 2003; Israel et al., 2019 Yang et al., 2022), mientras que los embriones con ablación de *eif4e1b* materno progresan hasta el estadio de 2 células, indicando que otros factores participan en la regulación de la traducción del ARN materno (Yang et al., 2022).

El hecho de que las ratonas KO para *eif4e1b* sean estériles, no desarrollándose sus embriones más allá del estadio de 2 células, posiciona a eIF4E1B materno como un componente clave y específico de la célula germinal para la traducción de ARNm almacenado en cigotos de ratón (Yang et al., 2022). EIF4E1B se une selectivamente a ARNm que codifican subunidades de complejos de remodelación de la cromatina y factores de reprogramación en óvulos en metafase II, sugiriendo que después de la fecundación, pero antes de la activación del genoma cigótico, EIF4E1B materno asegura la traducción de proteínas necesarias para el restablecimiento de la accesibilidad de la cromatina que permite la expresión de genes cigóticos tempranos (Yang et al., 2022). Un reciente perfil de ARNm maternos traducidos en cigotos de ratón apoya la importancia de la traducción selectiva de complejos de remodelación de la cromatina para la activación del genoma cigótico (Zhang et al., 2022).

Se ha detectado a la proteína EIF4E1B en ovocitos de ratón y su expresión aumenta en embriones hasta el estadio de 2 células (Yang et al., 2022). Sin embargo, la proteína EIF4E1B no se detectó en embriones de 4 células (Yang et al., 2022), lo cual coincide con la ausencia de expresión de *eif4e1b* después del estadio de 4 células (Deng et al., 2014).

La alteración de la expresión de *EIF4E1B*, ya sea elevada o disminuida (estando en el presente modelo KO elevada), podría quizás generar una mala activación del genoma cigótico en hámster desencadenando las alteraciones génicas y morfológicas observadas en los embriones de las hembras KO. Además, los genes *NANOG* y *PUF5F1*, también asociados a la activación de la expresión génica cigótica (Lee et al., 2013), se encuentran igualmente alterados en los embriones de hembras de hámster KO. *NANOG* muestra sobreexpresión y *POU5F1* infraexpresión en estos embriones. Este hecho apoya la hipótesis planteada de una mala activación del genoma cigótico.

**BMI1** es un factor pleiotrópico con funciones relacionadas con la regulación del ciclo celular (Bruggeman et al., 2007; Grinstein y Mahotka 2009), así como con la homeostasis de las células madre adultas (van der Lugt et al., 1994; Molofsky et al., 2003; Park et al., 2003; Bruggeman et al., 2007). Además, *BMI1* actúa como regulador postranscripcional clave de *GATA6*, un factor esencial para el desarrollo del endodermo extraembrionario (Koutsourakis et al., 1999; Lim et al. 2008). *BMI1* también interactúa

## VII. Discusión

con *GATA3* en células del trofoectodermo derivadas del tronco trofoectodérmico (Home et al., 2009; Ralston et al., 2010, Laval et al., 2012). La depleción de *BMI1* en células del tronco trofoectodérmico condujo a una pérdida de identidad de las células madre acompañada de una reducción rápida y drástica de los niveles de proteína *GATA3* (Laval et al., 2012). Esto indica que *BMI1* podría regular la expresión de *GATA3* en células del tronco trofoectodérmico y sugiere un papel más amplio de *BMI1* en la formación y/o mantenimiento de linajes extraembrionarios durante el desarrollo temprano, al menos en ratón (Laval et al., 2012).

El gen ***RNF38***, codifica la proteína dedo 38 que posee actividad E3 ubiquitina ligasa y puede reconocer a P53 como sustrato para ubiquitinación. P53 induce la detención del crecimiento o la apoptosis e interviene en la regulación del ciclo celular regulando negativamente la división celular mediante el control de un conjunto de genes (Consortium The UniProt, 2023). La sobreexpresión de *RNF38* aumenta la ubiquitinación de P53 y altera la distribución intracelular de esta pudiendo ser *RNF38* un regulador de P53 (Sheren y Kassenbrock, 2013).

Además de la degradación mediada por el proteasoma, la ubiquitinación de P53 también puede tener otras consecuencias. Por ejemplo, se ha descrito que la ubiquitinación puede promover la exportación nuclear, estabilizar la proteína P53 o afectar a su actividad transcripcional, pudiendo incluso la misma proteína con actividad E3 ubiquitina hacer ambas cosas, promover la ubiquitinación de P53 y su degradación y promover la ubiquitinación relacionada con otras consecuencias (Li et al., 2003; Carter et al., 2007; Kruse y Gu, 2009; Laine y Ronai, 2006; Cheng et al., 2014; Kasper et al., 2006; Andrews et al., 2006; Le Cam et al., 2006). Estas actividades, a veces incluso opuestas, pueden depender de la cantidad presente de proteína con capacidad E3 ubiquitina, de diferentes enlaces de ubiquitina, de modificaciones postraduccionales de las proteínas con capacidad E3 ubiquitina, de la presencia de otras enzimas y cofactores o del contexto celular en general (Pan y Blattner, 2021).

Se ha determinado que P53 se activa ante daños en el ADN y mantiene la integridad genómica, recibiendo el nombre de "guardián del genoma" (Lane, 1992). Así pues, también es posible que la ubiquitinación de P53 mediada por *RNF38* conduzca a su activación, lo que sería coherente con la delección de la zona cromosómica, donde se

localiza el gen *RNF38*, en varias neoplasias malignas (Sheren y Kassenbrock, 2013). Por tanto, una posible asociación entre la sobreexpresión el gen *RNF38* y el fenotipo observado en las hembras de hámster KO sería que este desencadenara una mayor activación de P53 induciendo la detención de la división celular o la apoptosis en los embriones, hecho que cuadraría con el menor número de blastómeras presenten en los embriones de hembras KO.

Los embriones KO para *Rnf38* de ratón presentan hipertrofia ventricular y letalidad embrionaria temprana (Spielmann et al., 2022).

En referencia a los genes seleccionados por su menor expresión en los embriones procedentes de hembras KO, **ASS1**, gen codificante de la enzima argininosuccinato sintetasa 1, es el que ve más reducida su expresión. La enzima ASS1 cataliza la transformación de citrulina y aspartato en argininosuccinato, este último es escindido por la argininosuccinato liasa (ASL) para producir L-Arginina y fumarato. Por consiguiente, la deficiencia de ASS1 causa la citrulinemia clásica, lo que hace que la citrulina y el amonio se acumulen en sangre (Ye et al., 2000). Los ratones deficientes en ASS1, muestran un retraso en el crecimiento y mueren a las 24-48 horas del nacimiento (Patejunas et al., 1994).

La pérdida de la enzima ASS1 se considera un biomarcador de susceptibilidad a la depleción de arginina (Szlosarek et al., 2006). Así, se ha observado que la arginina regula la expresión de *ASS1* por retroalimentación negativa para mantener su homeostasis (Huang et al., 2014). Estos resultados ponen de manifiesto que la expresión de *ASS1* está íntimamente relacionada con la concentración de arginina, siendo ASS1 la enzima clave y limitante para su suministro (Husson et al., 2003; Delage et al., 2010). La arginina, clasificada como un aminoácido semiesencial o condicional (Tapiero et al., 2002), sirve como precursor para la síntesis de diversas moléculas de enorme importancia fisiológica como el óxido nítrico (Flynn et al., 2002; Erez et al., 2011). La suplementación de arginina en la dieta de ratas incrementó la expresión de las proteínas óxido nítrico sintetasas (NOS) incrementando la síntesis de óxido nítrico y mostró un aumento en la supervivencia embrionaria, los puntos de implantación, y el tamaño de la camada al nacimiento (Zeng et al., 2008). Hasta el momento se han identificado tres

## VII. Discusión

isoformas de NOS: la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS) (Huang y Lo, 1998), existiendo expresión de las tres isoformas en todas las fases del desarrollo embrionario preimplantacional a excepción de los blastocistos, los cuales solo muestran expresión para nNOS y eNOS (Tranguch et al., 2003). La presencia de múltiples isoformas de NOS durante todo el desarrollo embrionario preimplantacional sugiere que el óxido nítrico es necesario para el correcto desarrollo del embrión temprano. Los ratones KO para una única isoforma de NOS no presentan anomalías en el desarrollo embrionario preimplantacional (Huang, 1999; Mashimo y Goyal, 1999; Gammie y Nelson, 1999; Kriegsfeld et al., 1999; Jablonka-Shariff et al., 1999; Drazen et al., 1999; Huang, 2000; Tempfer et al., 2000; Hefler et al., 2001; Sengoku et al., 2001), mientras que los ratones doble KO (iNOS/eNOS, eNOS/nNOS, iNOS/nNOS) presentan letalidad embrionaria temprana (Tranguch et al., 2003). Estudios *in vitro* con inhibidores de NOS demostraron que la producción de óxido nítrico es necesaria para el desarrollo embrionario preimplantacional del ratón. Así, el empleo de dichos inhibidores provoca la detención del desarrollo embrionario en estadio de 2 células, pudiendo estos efectos inhibidores ser revertidos mediante la adición de donantes de óxido nítrico (Gouge et al., 1998; Chen et al., 2001; Tranguch et al., 2003; Bodis et al., 2022).

Por otro lado, la suplementación de arginina en la dieta de cerdos y ratas disminuyó las concentraciones séricas de urea en las hembras suplementadas respecto a las hembras control sin suplementación (Mateo et al., 2007; Zeng et al., 2008). Este resultado sugiere que la producción de amonio se reduce en respuesta a la suplementación con arginina, siendo niveles elevados de amonio negativos para el correcto desarrollo embrionario (Gardner y Lane, 1993). Se ha demostrado que el amonio disminuye la división embrionaria y el desarrollo del blastocisto, reduce el número de células del blastocisto, altera el metabolismo y la expresión génica y aumenta la apoptosis (Gardner y Lane, 1993; Lane y Gardner, 2003). Los estadios previos a la compactación, en particular las fases de cigoto y dos células, son extremadamente sensibles al amonio, habiéndose determinado que incluso una exposición de corta duración del embrión en fase de precompactación al amonio puede provocar alteraciones significativas en la expresión génica y el posterior desarrollo (Zander et al., 2006).



Por tanto, la reducción de *ASS1* podría generar un aumento del nivel de amonio que afecte a la expresión génica del embrión. Además, en base a que la reducción de *ASS1* genera una disminución de la disponibilidad de arginina, podría conllevar a un descenso de la síntesis de óxido nítrico y por consiguiente una alteración en el desarrollo embrionario temprano. Para confirmar si estos hechos son los causantes de la alteración en el desarrollo embrionario de las hembras KO sería importante determinar si los valores de arginina, óxido nítrico y amonio en el fluido oviductal de estas hembras se encuentran realmente alterados.

El gen ***PHB*** codifica para la proteína prohibitina 1, una proteína reguladora multifuncional con múltiples localizaciones subcelulares incluyendo el núcleo, la membrana plasmática y la mitocondria (Mishra et al., 2006). La proteína prohibitina 1 pertenece a una familia de proteínas muy conservada, conocida como la familia de dominios Band-7 o inhibitina, que se ha relacionado funcionalmente con diversos procesos, como la regulación transcripcional, la proliferación celular, el desarrollo y la función mitocondrial (Mishra et al., 2005). Aunque la prohibitina 1 se localiza principalmente en las mitocondrias, su papel en las vías: Ras, quinasa activada por mitógenos (MAPK), quinasa regulada por señal extracelular (ERK), fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), proteína quinasa B (Akt) y factor de crecimiento TGF- $\beta$  y activadores y transductores de señal de transcripción (STAT), sugieren una función de señalización celular adicional, es decir, extramitocondrial (Rajalingam et al., 2005; Zhu et al., 2006; Ande et al., 2009; Ande y Mishra, 2009; Zhu et al., 2010), pudiendo ser la responsable de sus funciones embrionarias.

Los embriones murinos KO para *Phb* mueren antes del día 6,5 de desarrollo (McClung et al., 1989; He et al., 2008; Mishra et al., 2010). La presencia de bolas deciduales sin embriones en el útero de las hembras gestantes sugiere que los embriones KO para *Phb* sobreviven hasta la implantación y decidualización, pero posteriormente son reabsorbidos (He et al., 2008). Estos resultados indican que *Phb* tiene funciones esenciales *in vivo* en el control de la embriogénesis murina y que está implicado en eventos de señalización celular durante la misma. En el caso de los embriones de hembras de hámster KO para *OVGP1*, presentan alteraciones

## VII. Discusión

morfológicas en estadios de desarrollo anteriores, pudiendo en esta especie tener un papel relevante en la señalización celular en etapas previas del desarrollo embrionario.

El gen ***LRR59***, codifica para la proteína 59, una proteína integral de membrana de unión a ribosomas (Tazawa et al., 1991; Ichimura et al., 1993; Hoffman et al., 2019; Hannigan et al., 2020), localizándose en el retículo endoplasmático y en la envoltura nuclear (Zhen et al., 2012).

Estudios previos sitúan a *LRR59* en un nexo funcional para la síntesis de proteínas secretoras y de membrana a través de interacciones con proteínas de reconocimiento de señales, factores de iniciación de la traducción y proteínas de unión a ARN, teniendo *LRR59* un papel clave en la organización y regulación de la traducción local (Hannigan et al., 2020). El estado de la cromatina y muchos ARNm críticos de las células madre embrionarias están estrictamente sujetos al control de la traducción para mantener la autorrenovación y la pluripotencia, así como para controlar las vías de señalización del desarrollo, la diferenciación celular y el desarrollo embrionario (Bulut-Karslioglu et al., 2018; Fujii et al., 2017; Kondrashov et al., 2011; Lee et al., 2013; Slaidina y Lehmann, 2014).

En segundo lugar, discutiremos los resultados del análisis transcriptómico de manera general, es decir, teniendo en cuenta la variación global de los genes detectados mediante la técnica de microarrays (1.668 genes, de los cuales 658 estaban sobreexpresados y 1.010 infraexpresados en los embriones procedentes de hembras KO). Esto nos permitirá determinar si las hipótesis planteadas para los 6 genes con mayores diferencias de expresión tienen correlación con la variación del conjunto de genes.

Entre los genes con variación en su expresión en embriones procedentes de hembras KO respecto a los WT encontramos un elevado número de genes relacionados con la regulación de la vía de la autofagia y el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP). En las células eucariotas, la autofagia y el SUP son las principales vías de degradación de proteínas intracelulares (Mizushima, 2007; Tanaka, 2009; Higuchi et al., 2018), siendo ambas vías complementarias (Hara et al., 2006). La vía de la autofagia es un sistema de

degradación masiva en el que los componentes celulares, incluidas macromoléculas y orgánulos, se envían al lisosoma para su degradación (Mizushima, 2007). Por otro lado, el SUP regula la transcripción de múltiples maneras, tanto proteolíticas como no proteolíticas, que van desde la estructura de la cromatina hasta la regulación de la expresión génica (Geng et al., 2012; Howard y Tansey, 2016; Sen et al., 2016). La proteólisis dependiente del SUP es un sistema de degradación selectiva en el que la destrucción de proteínas se inicia mediante la unión de múltiples moléculas de ubiquitina a la proteína diana que posteriormente es degradada por el complejo proteasoma (Tanaka, 2009). Estas dos vías proteolíticas desempeñan un papel vital en la eliminación de proteínas maternas durante la transición materno-cigótica (Tsukamoto et al., 2008; Shin et al., 2013; DeRenzo y Seydoux, 2004).

Durante la transición materno-cigótica ocurren una serie de eventos moleculares dinámicos como cambios epigenéticos y remodelación de la cromatina regulados por ARNs/proteínas procedentes de la madre, que desencadenan una amplia reprogramación para establecer un cigoto totipotente (Schier, 2007; Zhou y Dean, 2015; Lee et al., 2014). En el ratón, la activación del genoma cigótico está estrictamente regulada por múltiples mecanismos como el ciclo celular, la modificación epigenética, la remodelación de la cromatina y las actividades de los factores de transcripción (Lee et al., 2014).

Estudios previos han determinado que tanto los inductores como los inhibidores de la autofagia pueden alterar los niveles normales de esta conduciendo a la apoptosis (Lee et al., 2011). Así, un desequilibrio de los mecanismos de autofagia puede afectar al correcto desarrollo embrionario (Tsukamoto et al., 2008; Lee et al., 2011), a la determinación del destino celular (Sharma et al., 2022) e incluso a la supervivencia en situaciones de estrés celular (Ravanan et al., 2017). Por ello, es imperativo mantener el equilibrio de esta vía para favorecer una fuerte competencia en el desarrollo y permitir la supervivencia del embrión (Leung et al., 2022).

En cuanto al SUP, se ha demostrado que es importante para el inicio de la activación del genoma cigótico, retrasándose el inicio de los genes cigóticos tras un tratamiento transitorio con el inhibidor reversible del proteasoma MG132 (Shin et al.,

2010; Higuchi et al., 2018). Por tanto, el SUP desempeña un papel clave en el recambio, control de calidad y degradación de las proteínas maternas durante la transición materno-cigótica para un correcto desarrollo embrionario (DeRenzo y Seydoux, 2004; Amm et al., 2014).

Los resultados mostrados en la presente Tesis Doctoral indican que la proteína oviductina tiene un papel esencial en la correcta actividad reproductiva de las hembras de hámster, afectando su ausencia al desarrollo embrionario temprano en esta especie. Además, la modificación del transcriptoma de los embriones de hembras KO tras la eliminación de la proteína oviductina podría desencadenar una incorrecta activación del genoma cigótico e inadecuada degradación de las proteínas maternas durante la transición materno-cigótica. Esta hipótesis se ve reforzada por la sobreexpresión del gen *EIF4E1B* en los embriones de hembras KO, así como con la variación en la expresión de otros genes asociados a la activación de la expresión génica cigótica (genes *NANOG* y *PUF5F1*) (Lee et al 2013).

#### **4. Evolución del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae***

La secuencia nucleotídica de *OVGP1* varía entre las diferentes especies de mamíferos (Verhage et al., 1997a; Buhi, 2002; Avilés et al., 2010). Estas variaciones entre especies sugieren posibles modificaciones en alguna de sus funciones durante los eventos reproductivos.

Se ha descrito que el gen *OVGP1*, está sujeto a una evolución adaptativa rápida (Swanson et al., 2001), responsable de la divergencia de esta proteína entre las especies de mamíferos. Las variaciones de *OVGP1* entre especies pueden ser demostradas mediante análisis filogenéticos. Así, en la familia de *OVGP1*, se ha demostrado selección positiva en el perro (Moros-Nicolás et al., 2018), pseudogenización en la rata (Tian et al., 2009) y el gran zorro volador y duplicación en vaca, oveja y cerda (Moros-Nicolás et al., 2018). El objetivo del presente estudio fue el análisis de la evolución molecular del gen *Ovgp1* en varias especies enmarcadas en el seno de la subfamilia *Murinae*. Dentro de esta subfamilia encontramos a la rata (*Rattus norvegicus*) donde *Ovgp1* es un

pseudogén, no existiendo una proteína funcional (Tian et al., 2009) y al ratón (*Mus musculus*) en el cual *Ovgp1* se expresa generando una proteína funcional (Kapur y Johnson, 1986; Lyng y Shur, 2009). *Ovgp1* se muestra entonces como un gen cuya expresión se ha perdido en algún punto de la evolución, tras la divergencia de la rata y el ratón a partir de un ancestro común.

El presente estudio filogenético sobre el gen *Ovgp1* dentro de la subfamilia *Murinae* arroja datos interesantes sobre su evolución. Los resultados indican que la pseudogenización no afecta únicamente a *Rattus norvegicus*, sino también al resto de especies analizadas dentro del género *Rattus*. Además, los géneros *Chryromyscus*, *Niviventer*, *Berylmys*, *Bandicota*, *Bunomys* y *Diplothrix*, enmarcados al igual que *Rattus* dentro de la tribu *Rattini*, también presentan codones de parada prematuros entre los exones 1 y 6. En base a estos resultados, parece que la pseudogenización solo se produjo en los *Rattini*, es decir, después de la separación entre los *Rattini* y los otros *Murinae* hace aproximadamente 12,5 millones de años (entre 11,31-13,99) (Aghová et al., 2018).

En las especies donde *OVGP1* ha sufrido pseudogenización y por consiguiente no presentan una proteína oviductina funcional, es esencial el estudio de las posibles proteínas presentes en oviducto que puedan realizar una función similar o equivalente. El análisis *in silico* de oviductina reveló un dominio en la región N-terminal que la asemeja a las proteínas quitinasas pertenecientes a la familia GH18. Sin embargo, el dominio catalítico de oviductina carece de un residuo esencial de ácido glutámico lo que hace que sea una quitinasa inactiva (Malette et al., 1995; Huang et al., 2012). El análisis de la relación evolutiva de *OVGP1* en varias especies animales con otros miembros de la familia GH18 mostró que los eventos de duplicación y divergencia condujeron a la aparición de múltiples formas de quitinasas activas y proteínas inactivas similares a la quitinasa. Los resultados sugirieron que *OVGP1* posee la relación evolutiva más estrecha con las quitinasas ácidas de mamíferos (AMCasas) (Choudhary et al., 2019).

Los mamíferos producen dos quitinasas pertenecientes a la familia GH18, la quitotriosidasa (CHIT1) y la quitinasa ácida de mamíferos (AMCase) (Shuhui et al., 2009). Los mamíferos también codifican varias proteínas similares a la quitinasas que carecen de actividad quitinolítica (Bussink et al., 2007; Funkhouser y Aronson, 2007; Hussain y

Wilson, 2013; Sutherland, 2018). En el genoma humano se han identificado cuatro proteínas similares a la quitinasas, incluyendo a la oviductina (Agarwal et al., 2002), la proteína humana 1 similar a la quitinasa 3 (CHI3L1; también denominada YKL40, CGP-39) (Hakala et al., 1993), la proteína humana 2 similar a la quitinasa 3 (CHI3L2; también conocida como YKL-39, CP-39) (Hu et al., 1996) y la proteína estabilina-1 que interactúa con la quitinasa (SI-CLP, también conocida como CHID1) (Kzhyshkowska et al., 2006). El ratón produce al menos siete proteínas similares a la quitinasas, incluidos los ortólogos de CHI3L1, oviductina y CHID1 en humanos, así como Ym1, Ym2, BCLP1 y BYm (Hussain y Wilson, 2013).

En un futuro podría ser interesante realizar un estudio transcriptómico y proteómico comparado entre oviducto de hámster, donde la proteína oviductina es esencial para el correcto desarrollo embrionario temprano, y rata, donde *OVGP1* es un pseudogén y por consiguiente prescindible para su correcta función reproductiva (Tian et al., 2009). Los resultados podrían dilucidar qué candidato o candidatos entre los citados podrían sustituir el papel realizado por la proteína oviductina durante la reproducción en las especies donde *OVGP1* ha sufrido pseudogenización y en aquellas donde la eliminación de *OVGP1* no conlleva a importantes alteraciones de su fertilidad. La generación de modelos KO de rata para los candidatos seleccionados sería una herramienta muy interesante para su estudio.

## 5. Pseudogenización del gen *ASTL* en lagomorfos

Poco después de la fecundación, tienen lugar los procesos de bloqueo de la polispermia. Esto impide que, tras la entrada de un espermatozoide, otros espermatozoides puedan entrar en el óvulo. Dicho bloqueo de la polispermia se puede producir a nivel de la ZP, del oolema o de ambos dependiendo de la especie (Sun, 2003; Gardner y Evans, 2005; Evans, 2020; Fahrenkamp et al., 2020; Yanagimachi, 2022). En el bloqueo a nivel de la ZP se ha demostrado que la proteína ovastacina juega un papel crucial. Inmediatamente después de la fecundación se establece un rápido y transitorio bloqueo de la penetración de los espermatozoides previo a la escisión de ZP2. Este bloqueo de la penetración se asocia con la liberación de zinc de los gránulos corticales

tras la exocitosis. Los niveles elevados de zinc afectan a la motilidad de los espermatozoides impidiendo su paso a través de la matriz de la ZP. Este bloqueo transitorio proporciona una ventana temporal para que ovastacina complete la escisión de ZP2, perdiendo su capacidad de unión al espermatozoide e induciendo el bloqueo de la polispermia necesario para un desarrollo embrionario exitoso (Burkart et al., 2012; Avella et al., 2014; Tokuhito y Dean, 2018).

Las hembras de ratón KO para *AstI* no escinden ZP2 después de la fecundación, pero son fértiles (Burkart et al., 2012), lo que sugiere que los ratones disponen de estrategias adicionales para asegurar la fecundación monospérmica. Hasta el momento se ha determinado que en los óvulos de coneja el bloqueo de la polispermia se produce principalmente a nivel del oolema, ya que se observan múltiples espermatozoides en el espacio perivitelino (Austin y Braden, 1953; Braden y Austin, 1954; Overstreet y Bedford, 1974; Oh y Brackett, 1975; Yanagimachi, 1994; Gardner y Evans, 2005). En este trabajo se demuestra la pseudogenización del gen *ASTL* en todos los lagomorfos analizados, lo cual podría explicar por qué el bloqueo de la polispermia no se produce a nivel de la ZP en estas especies al no producirse la escisión de ZP2 por la acción de la ovastacina. Para poder confirmar que en lagomorfos no existe bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP2 sería necesario determinar si esta permanece íntegra o se escinde tras la fecundación. La no escisión de ZP2 confirmaría la ausencia de otra enzima que supla la acción de la ovastacina en estas especies.

Ante la premisa de la no escisión de ZP2 tras la fecundación y por consiguiente ausencia de bloque de la polispermia a nivel de la ZP, se deben barajar qué otros mecanismos presentan los lagomorfos para asegurar la fecundación monospérmica. A nivel del oolema, el bloqueo de la polispermia parece producirse por la unión espermatozoide-óvulo. Dentro de los posibles candidatos moleculares para la interacción espermatozoide-óvulo encontramos en el óvulo la proteína JUNO cuyo receptor en el espermatozoide se llama IZUMO1 (Inoue et al., 2005; Bianchi et al., 2014). La interacción JUNO-IZUMO1 está muy conservada en los mamíferos, como se ha demostrado en el caso del ratón, el ser humano, el cerdo y la zarigüeya (Bianchi et al., 2014). La expresión superficial de JUNO se pierde rápidamente en los óvulos

fecundados, se internaliza en vesículas y se libera al espacio perivitelino donde podría participar en el rápido bloqueo de la polispermia a nivel del oolema (Burkart et al., 2012; Bianchi et al., 2014). Mientras, IZUMO1 se moviliza desde el acrosoma hasta el segmento ecuatorial, región considerada para iniciar la fusión con el oolema (Satouh et al., 2012).

Una posible estrategia adicional para mantener la fecundación monospermica puede estar vinculada directamente al espacio perivitelino. Este espacio es el área entre la membrana plasmática del ovocito y su ZP (Talbot y Dandekar 2003). Estudios previos han sugerido que el tamaño del espacio perivitelino está estrechamente relacionado con la incidencia de polispermia, teniendo los óvulos con mayor espacio perivitelino menor incidencia de polispermia (Wang et al., 1998; Kitagawa y Niimura, 2006; Ueno y Niimura, 2008; Yoshida y Niimura, 2011). El ácido hialurónico es el principal componente del espacio perivitelino (Talbot y Dandekar, 2003) y está formado por unidades repetitivas de N-Acetilglucosamina y ácido glucurónico (Schmidt et al., 2016; Current y Whitaker, 2020). Se ha descrito que el ácido hialurónico posee un efecto inhibitor sobre la fusión de membranas (Kujawa y Tepperman, 1983; Orkin et al., 1985) y que la suplementación con ácido glucurónico y N-Acetilglucosamina durante la maduración de ovocitos porcinos tiene efectos beneficiosos sobre el grosor del espacio perivitelino, la maduración citoplasmática, la exocitosis de gránulos corticales, la reducción de la polispermia y el desarrollo embrionario temprano (Schmidt et al., 2016; Current y Whitaker, 2020). Por tanto, la pseudogenización de *ASTL* en lagomorfos y por consiguiente la posible no escisión de ZP2 y ausencia de bloqueo de la polispermia a nivel de la ZP en estas especies, podría verse compensada no solo a nivel del oolema por JUNO, sino que el espacio perivitelino podría también jugar un importante papel.



## **VIII. CONCLUSIONES**



1.- La caracterización de los modelos KO para *OVGP1* en las especies hámster dorado y conejo común confirmó, mediante el empleo de técnicas de biología molecular y proteómica, la presencia de la delección generada mediante la tecnología CRISPR-Cas9 en el gen *OVGP1*, así como la ausencia de la proteína oviductina en los animales KO generados de cada especie.

2.- El análisis de la fertilidad *in vivo* mostró un claro fenotipo de infertilidad en las hembras KO para *OVGP1* de la especie hámster dorado, asociado a muerte embrionaria durante el desarrollo embrionario temprano. Los machos de hámster KO para *OVGP1* no mostraron alteraciones de los parámetros de fertilidad.

3.- El modelo de conejo KO para *OVGP1* es fértil *in vivo*, no encontrándose en machos y hembras alteraciones significativas de los parámetros de fertilidad.

4.- El análisis transcriptómico comparativo entre oviductos de hembras de hámster WT y KO para *OVGP1* mostró variación significativa en la expresión oviductal de 7 genes: ***GPR18, OVGP1, ENPEP, C1QTNF4, DERL3, AMY1*** y ***WDR95***. De ellos, solo *GPR18* estaba sobreexpresado en oviducto de hembras KO, el resto de los genes afectados mostraron infraexpresión.

5.- El análisis transcriptómico comparativo entre embriones procedentes de hembras de hámster WT y KO para *OVGP1* mostró variación significativa en la expresión embrionaria de 1.668 genes, de los cuales 658 estaban sobreexpresados y 1.010 infraexpresados en los embriones de hembras KO. De entre el total de genes destacan por su alto nivel de expresión: ***EIF4E1B, BMI1*** y ***RNF38***, y por su bajo nivel de expresión: ***ASS1, PHB*** y ***LRRC59***.

6.- El estudio de la evolución del gen *Ovgp1* en la subfamilia *Murinae* confirmó su pseudogenización en las especies analizadas dentro de la tribu *Rattini*, concretamente en los géneros *Rattus*, *Chryromyscu*, *Niviventer*, *Berylmys*, *Bandicota*, *Bunomys*, y *Diplothrix*. Estos resultados permiten confirmar que la

## VIII. Conclusiones

proteína oviductina no es esencial en estas especies para su correcta función reproductiva. La pseudogenización afecta a la tribu *Rattini*, datándose hace aproximadamente 12,5 millones de años.

**7.-** El estudio del gen *ASTL* mediante técnicas de biología molecular confirmó su pseudogenización en todas las especies de lagomorfos analizadas: conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus cuniculus*), conejo salvaje ibérico (*Oryctolagus cuniculus algirus*), conejo pigmeo (*Brachilagus idahoensis*), conejo cola de algodón oriental (*Sylvilagus floridanus*), conejo de pincel (*Sylvilagus bachmani*), liebre europea (*Lepus europaeus*), liebre ibérica (*Lepus granatensis*), pica daúrica (*Ochotona daurica*) y pica americana (*Ochotona princeps*). Estos resultados permiten confirmar que en estas especies no se produce la escisión de ZP2 por la acción de la ovastacina.

## **IX. SUMMARY**



## 1. Introduction

Infertility is a widespread clinical problem affecting 8-12% of couples worldwide. Of these, about 30% are diagnosed as idiopathic infertility, as no causal factor is found (Guerra et al., 2019). Couples with fertility problems often resort to assisted reproductive technologies (ART). However, 5-15% of these couples undergo *in vitro* fertilisation (IVF) with normal sperm quality and fail (Van der Westerlaken et al., 2005). Female factor related infertility has been reported to account for about 40-50% of all infertility cases (Ganguly and Unisa, 2010; Mascarenhas et al., 2012).

Among the possible reasons for diagnoses of idiopathic infertility are likely alterations in genes involved in fertilisation and early embryonic development. Consequently, genetic causes constitute approximately 5-10% of all causes of infertility in women (Jawad and Saeed, 2020). These can affect various cell types or structures that play a role in reproductive processes. Thus, mutations affecting the gametes (Avenarius et al., 2009; Pausch et al., 2014; Vondrakova et al., 2022) or the zona pellucida (ZP) (Liu et al., 2017; Zhou et al., 2019; Cao et al., 2020; Shen et al., 2022) have been associated with fertility problems.

The oviduct, the fallopian tube in humans, has long been regarded as a simple transport conduit for gametes and embryos. However, numerous studies have shown that the oviduct and in particular the oviductal fluid (OF) generated from the transudate of blood plasma and the secretion product of oviductal epithelial cells (Leese, 1988; Leese et al., 2001; Coy et al., 2018; Marins et al., 2022) create a microenvironment involved in important key processes for fertilisation and proper gamete and embryo physiology: gamete maturation, sperm selection, capacitation and early embryonic development (King et al., 1994; Satoh et al., 1995; Abe et al., 1995b; Boatman and Magnoni, 1995; O'Day-Bowman et al., 1996; Kouba et al., 2000; Pradeep et al., 2011; Coy et al., 2012; Hunter, 2012; Saccary et al., 2013; Hribal et al., 2014; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2016; Algarra et al., 2018; González Brusi et al., 2020). However, the proteins present in this OF and their function, which may be essential for the different processes mentioned above, are still not fully understood.

## IX. Summary

Oviductin or oviductal glycoprotein 1, encoded by the *OVGP1* gene, is the major non-serum protein in the OF. This protein has been identified in different mammalian species, including humans (Rapisarda et al., 1993; Arias et al., 1994; O'Day-Bowman et al., 1995; Briton-Jones et al., 2001; Briton-Jones et al., 2004). It is the best studied member of the reproductive tract mucin family, its secretion varies with the oviductal region and with the phase of the oestrous cycle in most species (Lee et al., 1990; Buhi et al., 1991; Donnelly et al., 1991; Arias et al., 1994; DeSouza and Murray, 1995; O'Day-Bowman et al., 1995; Komiya et al., 1996; Buhi et al., 1996; Verhage et al., 1997a, 1997b; Buhi et al., 2000; Lok et al., 2002; Merchán et al., 2007; Saint Dizier et al., 2014).

To determine the function of this protein, experiments involving the generation of genetically modified animals have been performed. The knock out (KO) model of *Ovgp1* in the mouse (*Mus musculus*) is fertile (Araki et al., 2003). In other species such as the rat (*Rattus norvegicus*) (Tian et al., 2009) or the great flying fox (*Pteropus vampyrus*) (Moros Nicolás et al., 2018) *OVGP1* is a pseudogene. These results lead some authors to conclude that *OVGP1* is an expendable gene for fertility. However, mouse *Ovgp1* is peculiar in that its expression predominates in the ampulla region, and most of the secreted oviductin protein passes into the perivitelline space of the egg, with little of the protein remaining bound to the egg's ZP in these species (Kapur and Johnson, 1986; Lyng and Shur, 2009). In contrast, the interaction of oviductin with ZP appears to play an important role in other species such as the hamster, where the use of a monoclonal antibody against oviductin inhibits sperm-ZP binding (Sakai et al., 1988; Yang et al., 2015) or the rabbit where the presence of a polymorphism in exon 11 and a microsatellite located in the promoter region of *OVPG1* showed a favorable association with litter size, number of live-born offspring, number of implanted embryos, embryonic survival, foetal survival and prenatal survival (Merchán et al., 2007; Merchán et al., 2009; García et al., 2010).

On the premise of this background, the main purpose of this Thesis is to test the role of the oviductin protein in the modulation of fertilisation and early embryonic development, using the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and common or European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) species as KO animal models.



Using CRISPR-Cas9 technology, KO animals for *OVGP1* of both species were generated. These species were used because of their following characteristics: oviductin has affinity for the ZP of the egg, previous studies suggest that oviductin may have an important reproductive role (Sakai et al., 1988; Yang et al, 2015; Merchán et al., 2007; García et al., 2010), are easy to handle reproductively and present a ZP composed of four ZP proteins (ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4) (Jiménez Movilla et al., 2009; Izquierdo-Rico et al., 2009; Stetson et al., 2012). This composition of ZP makes them more suitable for transferring the results to other species such as humans. The introduction of CRISPR-Cas9 technology is of great interest because it provides us with a very powerful tool to address scientific questions in animal models other than mice.

Another objective of this study in relation to the *Ovgp1* gene is the analysis of the molecular evolution of this gene in several species within the *Murinae* subfamily. Within this subfamily we find the rat where *OVGP1* is a pseudogene, with no functional protein (Tian et al., 2009) and the mouse in which *Ovgp1* is expressed generating a functional protein (Kapur and Johnson, 1986; Lyng and Shur, 2009). The analysis of the molecular evolution of the *Ovgp1* gene will allow us to determine at what point in evolution, after the divergence of the rat and the mouse, its expression has been lost and whether the process of pseudogenisation affects other species within the *Murinae* subfamily.

Another aspect studied in this Thesis is related to the block to polyspermy. Polyploidy (the existence of more than two sets of chromosomes) is an undesirable condition that causes the failure of embryonic development. To prevent it, blocking polyspermy prevents fertilisation of the egg by more than one sperm. Depending on the mammalian species, block to polyspermy occurs at different levels: the oolemma, the ZP or both (Sun, 2003; Gardner and Evans, 2005; Evans, 2020; Fahrenkamp et al., 2020; Yanagimachi, 2022). In addition, some factors, such as oviductin protein and some sulphated glycosaminoglycans are also necessary to control polyspermy (Coy et al., 2008; Coy and Aviles, 2010). In species such as the dog, vole and sheep, block to polyspermy takes place at the ZP level (Braden and Austin, 1954; Yanagimachi, 1994). However, in most species (mouse, rat, guinea pig, cow, pig, cat, ferret and female) this

## IX. Summary

block occurs at both levels (Austin and Braden, 1953; Braden and Austin, 1954; Hunter, 1991; Horvath et al., 1993; Miller et al., 1993; Yanagimachi, 1994; Sengoku et al., 1995; Hunter et al., 1998; Patrat et al., 2006). For species such as the rabbit, mole, pika and pocket gopher, block to polyspermy occurs at the level of the oolemma (Austin and Braden, 1953; Braden and Austin, 1954; Overstreet and Bedford, 1974; Oh and Brackett, 1975; Yanagimachi, 1994; Gardner and Evans, 2005). Block to polyspermy at the level of the oolemma appears to occur at the level of the sperm-egg junction, involving JUNO (IZUMO1R) in the egg and IZUMO1 in the sperm (Inoue et al., 2005; Bianchi et al., 2014). Whereas, in blocking polyspermy at the ZP level, the proteins ovastacin and ZP2 play a crucial role (Burkart et al., 2012). The scientific purpose of the development of this study associated with the *ASTL* gene is to demonstrate by genomic analysis whether there is pseudogenisation of this gene coding for ovastacin in lagomorphs, which would explain why block to polyspermy does not occur at the ZP level (Burkart et al., 2012).

## 2. Methods

To investigate the role of oviductin protein in modulating fertilisation and early embryonic development, the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) were used as KO animal models.

The generation of the rabbit model started with the design of different gRNAs against the start of the coding region of *OVGP1* based on the criteria of (Hsu et al., 2013) ([www.genome-engineering.org](http://www.genome-engineering.org)). The gRNAs were produced and purified using the Guide-it gRNA *In Vitro* Transcription kit (Takara Bio, USA). Polyadenylated Cas9 mRNA was generated by *in vitro* transcription using the mMMESSAGE mMACHINE® T7 ULTRA kit (Life Technologies (Thermo Fisher Scientific), USA) from plasmid pMJ920 (Addgene, USA) linearised with the restriction enzyme BbsI (NEB, UK) and treated with Antarctic phosphatase (NEB, UK). *In vitro* transcribed RNA was purified using the MegaClear kit (Ambion, USA). The two components of the system (Cas9 and gRNA) were microinjected as RNA (100 ng/μl Cas9 and 25 ng/μl gRNA) into the ooplasm of zygotes of each species obtained 14 hours after mating.

Microinjected embryos were transferred one day after microinjection into the oviduct of a pseudopregnant recipient stimulated by an intramuscular (IM) injection of 0.02 mg gonadorelin the previous day. The resulting offspring (F0) were genotyped (both ear biopsies and blood samples) by clonal sequencing as described in (Bermejo-Alvarez et al., 2015). After DNA purification, the genomic sequence including the CRISPR target site was amplified by PCR and the purified PCR product was cloned into the pMD20 vector (Takara Bio, USA) and transformed into DH5- $\alpha$  competent bacteria (Thermo Fisher Scientific, USA). Fifteen clones were sequenced to detect indels generated by the NHEJ repair pathway of CRISPR-induced DSBs in each individual. Generation of the hamster model was carried out in a similar manner as indicated for the rabbit model (Fan et al., 2014; Li et al., 2018).

In the hamster model, the carrier of a 76 bp deletion located in exon 3, position g.1.065 and c.138 of the gDNA (NW\_024429193.1) and mRNA (NM\_001281337.1) sequences, respectively, was selected as the founder male. This deletion generates a change in the reading frame at position p.44 and a premature stop codon at position p.66 of the amino acid sequence (NP\_00121268266.1).

In the rabbit model, the carrier of a 35 bp deletion located in exon 3, position g.1.046 and c.109 of the gDNA (NC\_067386.1) and mRNA (NM\_001082105.1) sequences, respectively, was selected as the founder male. This deletion generates a change in the reading frame at position p.33 and a premature stop codon at position p.53 of the amino acid sequence (NP\_00101075574.1).

Selected founder (F0) individuals were crossed with wild type (WT) females to generate F1. Individuals of F1 and successive generations were genotyped by ear biopsy polymerase chain reaction (PCR). F1 individuals heterozygous for the mutation were crossed with each other to obtain the next generations, selecting individuals with the desired genotype.

Both KO animal models were characterized by molecular experiments: oviduct gene expression analysis by reverse transcription polymerase chain reaction (RT PCR); oviductin protein detection in the oviduct by SDS-PAGE, Western blot, HPLC-MS/MS and

## IX. Summary

immunohistochemical analysis; and oviductin protein detection in the eggs by HPLC-MS/MS and lectin cytochemistry.

To determine the phenotype of *OVGP1* KO animals, *in vivo* fertility of males and females was analysed (**Tables 4-9**). Once the phenotype of these animals was determined, a detailed microscopic analysis of their oviducts and embryos was performed using light and electron microscopy techniques. To evaluate the possible changes in gene expression after the elimination of oviductin protein in hamsters, a comparative transcriptomic study of the oviduct using the RNAseq technique and of embryos at day 2.5 of development using the microarray technique was carried out.

To study the evolution of the *Ovgp1* gene in the *Murinae* subfamily, the beginning of the gene (exons 1 to 6) was studied in several species of *Muridae*, the rodent family to which *Mus* and *Rattus* belong. It was decided to study this region because previous studies of the *OVPG1* gene in *Rattus norvegicus* demonstrated the presence of an indel in exon 1 that leads to the formation of premature stop codons, with *OVGP1* being a pseudogene in this species (Tian et al., 2009). However, *Mus musculus* has a functional gene.

Using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program (blast.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul et al., 1990), we searched the GenBank (Clark et al., 2016) and Ensembl (Cunningham et al., 2022) databases for matches to the mRNA sequence of *Mus musculus* (NM\_007696.2) and members of the family *Muridae*. The obtained sequences (**Table 10**) were aligned with the MUSCLE program implemented in SeaView (Gouy et al., 2010) and primers were designed in the most conserved regions of the alignment (**Table 11 and Figure 26**). The data available in the libraries were completed by sequencing the start of the gene in several species of the *Murinae* subfamily, thus achieving a better representation of the subfamily tribes. Amplification efficiency and amplicon size were checked by agarose gel electrophoresis. The identity of the amplified products was verified by automated sequencing.

To study the evolutionary history of the *Ovgp1* gene within the *Murinae* subfamily, its phylogenetic tree was constructed. The construction of the phylogenetic

tree began by performing a multiple alignment of the sequences obtained by sequencing together with the sequences used in the primer design using the SeaView program (Gouy et al., 2010). The sequences of *Acomys russatus* (subfamily *Deomyinae*) and *Meriones unguiculatus* (subfamily *Gerbillinae*) were also included in the multiple alignment as outgroups to root the phylogeny of *Ovgp1*. Therefore, the gDNA alignment corresponding to exons 1 to 6 contained 31 sequences from 31 species of the family *Muridae* (**Table 10**) and 6,726 bp. For the phylogenetic construction, only the areas corresponding to the exons, i.e. 626bp, were retained. Phylogenies were then constructed using the maximum likelihood method with the Phyml 3.1 program (Guindon and Gascuel, 2003) and Bayesian inference with the MrBayes 3.2 program (Ronquist et al., 2012).

For the analysis of the *ASTL* gene in lagomorphs, gDNA samples from 9 lagomorph species from the Biodiversity and Genetic Resources Research Centre (CIBIO) of the Agrarian Campus of Vairão of the University of Porto (Vairão, Portugal) were used. The species analysed were: European rabbit (*Oryctolagus cuniculus cuniculus*), Iberian wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algirus*), pygmy rabbit (*Brachilagus idahoensis*), eastern cottontail rabbit (*Sylvilagus floridanus*), brush rabbit (*Sylvilagus bachmani*), European hare (*Lepus europaeus*), Iberian hare (*Lepus granatensis*), pika daurica (*Ochotona daurica*) and American pika (*Ochotona princeps*). A rabbit homologous region of exon 6 of the human *ASTL* gene, where the active site of *ASTL* is present, was amplified by PCR. Amplification efficiency and amplicon size were checked by agarose gel electrophoresis. The identity of all amplified products was verified by automated sequencing after purification. Finally, to assess the possible pseudogenisation of *ASTL* in the lagomorph species analysed, a multiple alignment of all sequences obtained was performed using BLAST software (blast.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul et al., 1990).

### 3. Results

All molecular experiments performed to characterize both KO animal models for *OVGP1* confirmed the absence of the oviductin protein in both species (**Figures 21-45 and Tables 12-15**).

## IX. Summary

The study of the phenotype of the *OVGP1* KO animals by *in vivo* fertility analysis of males and females determined a clear infertility phenotype in the KO hamster females (**Table 16**), with no alteration in the fertility parameters analysed (gestation percentage and litter size) in the males in this species (**Table 17**). In the rabbit model, both males and females were fertile, with no significant statistical alterations in the fertility parameters cited above (**Tables 18-20**). However, it is interesting to note that KO rabbits showed lower, although not statistically significant, gestation rates (100% in WT females, 40% in KO females) and litter size ( $6.6 \pm 0.93$  litters/ litter in WT females and  $3.57 \pm 1.15$  litters/ litter in KO females) than those obtained in WT females.

Histological analysis by light and electron microscopy techniques of the oviducts showed no alterations associated with the absence of oviductin in the complexity of the folds of the oviductal epithelium or its component cells (secretory cells and hair cells) in either of the two species studied (**Figures 46-57**). Analysis of pre-implantation embryonic development in the hamster model showed obvious morphological alterations in the two embryonic developmental stages analysed (1.5 and 2.5 days of development) (**Figures 58 and 59**). The embryos showed a clear asymmetry and size disparity between their blastomeres (**Figure 60**). Moreover, they showed a statistically significant inferiority in the number of blastomeres compared to WT female embryos at the same developmental stages, with a mean of  $2.67 \pm 0.5$  blastomeres at day 1.5 of development and  $3.69 \pm 0.58$  at day 2.5 of development while WT female embryos had a mean of  $5.25 \pm 0.30$  and  $7.08 \pm 0.37$  blastomeres respectively (**Tables 21 and 22**). These results are indicative of an alteration in early embryonic development in embryos derived from KO female hamsters. However, in the rabbit model the embryos did not display morphological abnormalities depending on the genotype of the mothers at any of the stages analysed (zygote/2-cell embryo, morula and blastocyst) (**Figures 61-63**). The mean number of zygotes/two-cell embryos, morulae and blastocysts recovered in KO rabbits was  $29.5 \pm 12.5$ ,  $24.5 \pm 5.5$  and  $17.5 \pm 6.5$  respectively and in WT rabbits  $35.25 \pm 6.79$ ,  $43.25 \pm 6.37$  and  $43.67 \pm 3.38$  (**Tables 23-25**). The higher embryo recovery rates obtained in WT compared to KO rabbits are due to the fact that WT females had just reached the optimal age for reproduction (approximately 5 months) and were nulliparous, so the superovulation protocol had a greater effect in this set of

circumstances. What is interesting to note is the trend towards a reduction in the number of embryos recovered in the KO females as development progressed, which was not noticeable in the WT female (**Figure 64**). These data, together with those obtained for gestation percentage and litter size in the *in vivo* fertility analysis (also lower in KO females than in WT females, although not statistically significant) (**Table 16**), suggest a possible phenotype of subfertility associated with a possible reduction in embryo survival.

To assess possible changes in gene expression in the oviductal environment and in embryos from KO hamster females after oviductin protein deletion, a comparative transcriptomic study of oviduct by RNA-seq and embryos at day 2.5 of development by microarray technique was performed. In the case of the oviduct, the results showed significant variation in the expression of 7 genes: ***GPR18***, ***OVGP1***, ***ENPEP***, ***C1QTNF4***, ***DERL3***, ***AMY1*** and ***WDR95***. Of these 7 genes only *GPR18* was overexpressed in oviductal samples from KO females. The other 6 genes were underexpressed in these samples (**Table 28**). The *OVGP1* gene showed the greatest difference in oviductal expression between the two groups, followed by *ENPEP*, *C1QTNF4*, *GPR18*, *DERL3*, *AMY1* and *WDR95*. Differential gene expression analysis of embryos at day 2.5 of development showed significant variation in the expression of 1,668 genes between the two groups, of which 658 were overexpressed and 1,010 underexpressed in embryos from KO females. Among the 1,668 genes that showed significant variation in expression between the two groups, the 3 most overexpressed genes (based on their FC value) in embryos from KO females were: ***EIF4E1B***, ***BMI1*** and ***RNF38*** (**Table 29**). Likewise, the 3 most underexpressed genes (based on their FC value) in embryos from KO females were: ***ASS1***, ***PHB*** and ***LRRC59*** (**Table 30**). The complete list of genes can be found in **Annex 8**.

The biological annotations focused on the molecular functions and biological processes of the overexpressed genes (658) showed that embryos from KO females present overexpression of genes related to organelle organisation and positive regulation of the cell cycle. Biological annotation concerning cellular compartmentalisation indicated that they show a compartmentalisation focused on the transcriptional regulatory complex and the ubiquitin-ligase complex (**Figure 70**). With

## IX. Summary

reference to under-expressed genes (1,010), biological annotations based on molecular functions and biological processes showed that embryos from KO females have underexpression of genes related to the regulation of gene expression and protein degradation. Biological annotation concerning cellular compartmentalization indicated that they present compartmentalization focused on the mitochondrion and proteasome (**Figure 71**). It is noteworthy that among the genes with variation in their expression (either elevated or decreased) in embryos from KO females with respect to WT we found a high number of genes related to the regulation of the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system (UPS). The complete list of genes included in each of the biological annotations can be found in **Annex 9**.

The phylogenetic analysis of *Ovgp1* in the *Murinae* subfamily showed that the nucleotide insertion present in exon 1 of the *OVGP1* sequence in *Rattus norvegicus* with respect to the *Mus musculus* sequence is also present in the other species of the genus *Rattus* analysed: *Rattus exulans* and *Rattus tanezumi*. In addition, other species framed within genera of the *Rattini* tribe, like *Rattus*, also presented premature stop codons between exons 1 to 6. Specifically, the species analysed within the genera *Chryromyscus*, *Niviventer*, *Berylmys*, *Bandicota*, *Bunomys*, and *Diplothrix*, (**Figure 72 and Table 31**). These results indicate that *OVGP1* has undergone pseudogenisation not only in *Rattus norvegicus*, as previously known (Tian et al., 2009), but also in the rest of the members analysed within the genus *Rattus* and in 6 other genera also framed within the *Rattini* tribe. The phylogeny obtained from the partial sequences of exons 1 to 6 is shown in **Figure 73**.

Based on these results, it appears that pseudogenisation only occurred in the *Rattini*, i.e. after the split between the *Rattini* and the other *Murinae* approximately 12.5 million years ago (between 11.31-13.99) (Aghová et al., 2018). However, as the results come from a partial analysis, i.e. of the initial 6 exons and not the 11 that form *Ovgp1*, it would be necessary to complete the sequences to check for stop codons at later positions in other species. The complete study of the sequences would make it possible to determine whether the *Rattini* that diverged earlier, such as *Maxomys*, have a functional version of the oviductin protein or not.



The analysis of the genomic sequence of *ASTL* in lagomorphs showed a high percentage of identity between the common rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and the rest of the species analysed: 84.66% with *Sylvilagus floridanus*, 93.87% with *Brachilagus idahoensis*, 94.51% with *Lepus granatensis* and *Lepus europeus*, 94.48% with *Sylvilagus bachmani* and 100% with *Oryctolagus cuniculus algirus*. In all the species analysed, a mutation was identified that generated premature stop codons in exon 6 where the active center of the ovastacin protein is located, confirming the pseudogenisation of the *ASTL* gene in the lagomorphs analysed (**Figure 75**).

## 4. Discussion

### 4.1 Involvement of the oviductin protein in the proper development of early reproductive events

Oviductin protein is involved in fertilisation and early embryonic development in most mammalian species studied so far (Buhi, 2002; McBride et al., 2004; Kan and Esperanzate, 2006; Yang et al., 2015). Its presence has been associated with positive effects on fertilisation, embryonic development and/or implantation in different mammals such as: goat, sow, cat, hamster, woman, sheep and cow (King et al., 1994; Satoh et al., 1995; Boatman and Magnoni, 1995; O'Day Bowman et al., 1996; Hill et al., 1996a, 1996b; Martus et al., 1998; Kouba et al., 2000; McCauley et al., 2003; Coy et al., 2008; Pradeep et al., 2011; Saccary et al., 2013; Mondéjar et al., 2013; Hribal et al., 2014; Yang et al., 2015; Zhao et al., 2016; Algarra et al., 2016, 2018; Laheri et al., 2018). Specifically, positive effects have been described on: sperm capacitation, AR, sperm motility and viability, sperm-egg union, penetration and fertilisation rate, reduced polyspermy, embryo quality and embryo development rates to blastocyst stage (Killian, 2004, 2011; Kouba et al., 2000; Coy et al., 2008; Saccary et al., 2013; Zhao et al., 2022).

*In vitro* studies in hamster and human showed that co-incubation of spermatozoa and eggs or haemizonemes of the same species with homologous oviductin leads to an improvement in homologous spermatozoa-ZP binding and fertilisation rate (Boatman and Magnoni, 1995; O'Day-Bowman et al., 1996). Thus, treatment of hamster

## IX. Summary

sperm and/or eggs with homologous recombinant oviductin prior to the sperm-egg binding assay significantly increased the number of sperm bound to the egg ZP (Yang et al. 2015). However, the procurement in the present study of embryos from female hamster and rabbit *OVGP1* KO at different developmental stages allows us to affirm that the absence of the oviductin protein does not prevent gamete-to-gamete binding or block to polyspermy in these species.

Previous immunolocalization studies determined the presence of oviductin in hamster zygotes and embryos from one cell to the unhatched blastocyst stage, confirming oviductin uptake (Kan et al., 1993; Kan and Roux, 1995). Such oviductin uptake could explain its influence on the early stages of embryonic development, as has been reported in *in vitro* studies for other mammalian species. In goats, incubation of eggs and embryos with purified native oviductin during maturation, IVF and *in vitro* embryo culture led to an embryo cleavage rate of 52.1%, 75.1%, 61.8% and 57.1% at oviductin concentrations of 0, 10, 50 and 100 µg/ml, respectively. In addition, the blastocyst rate was 16%, 24.5%, 15.4% and 11.5% when oviductin concentrations were 0, 10, 50 and 100 µg/ml, respectively. Therefore, the lowest concentration (10 µg/ml) of oviductin increased the division rate and blastocyst formation significantly ( $p$ -value < 0.05) compared to the highest concentration (100 µg/ml) (Pradeep et al., 2011). In the porcine system, the incorporation of homologous oviductin during egg maturation and *in vitro* fertilisation showed no effect on the rate of embryo division, but did increase the number of eggs reaching the blastocyst stage, The best data was achieved with incubations of 10 µg/ml during maturation and 1 µg/ml during IVF (approximately 28% blastocysts in the homologous oviductin-supplemented group and 18% in the unsupplemented control group) (Kouba et al., 2000).

This potential role of oviductin in early embryonic development has been confirmed in the present study in the KO hamster model, with female KO hamsters showing a clear infertility phenotype *in vivo*. However, male KO hamsters show no alterations in fertility. Morphological analysis of embryos from KO female hamsters using light microscopy techniques has shown that embryos at the 4-8 cell stage show significantly fewer blastomeres, as well as a marked asymmetry in the size between

them. These alterations in the early stages of embryonic development prevent gestation from reaching term.

These results allow us to affirm that oviductin is an essential protein in female hamsters for proper early embryonic development. The uptake of oviductin by hamster embryos described in previous studies (Kan et al., 1993; Kan and Roux, 1995) together with the results obtained in the present study indicate that oviductin protein may play a role in embryotrophic and cell proliferation during early embryonic development in this species.

*In silico* analysis of oviductin reveals a domain in the N-terminal region that resembles chitinase proteins belonging to the GH18 family (Malette et al., 1995; Huang et al., 2012). Within this family, HCGP 39 protein has been reported to be responsible for increased cell proliferation in connective tissue (Recklies et al., 2002, Ling et al., 2004). Perhaps oviductin can generate the same effect in hamster embryos, which would be consistent with the observed phenotype.

In contrast to the clear infertility phenotype of KO female hamsters, in the rabbit model, KO females and males are fertile *in vivo*. However, KO female rabbits showed non-statistically significant decrease in gestation rates (100% in WT and 40% in KO rabbits) and mean litter size ( $6.6 \pm 0.93$  in WT and  $3.57 \pm 1.5$  in KO rabbits). It would be interesting to extend the number of animals tested in future studies to obtain more robust data and to confirm the possible subfertility phenotype in females suggested by the present data. However, it is possible to state that the oviductin protein is not essential for processes such as fertilisation and embryonic development to take place in this species. A similar conclusion was reached in 2003 by Araki and collaborators in the mouse model, where both males and females *Ovgp1* KO were fertile, suggesting that *Ovgp1* is dispensable for fertility. They observed no difference between the fertilisation rates of eggs from females of both genotypes tested by IVF, but like the results obtained in the present rabbit model, *Ovgp1* KO female mice had a non-statistically significant smaller litter size (Araki et al., 2003). The possible reduction in the number of offspring per litter in both mouse and rabbit animal models may be associated with a reduction in embryonic survival. Embryonic survival has been shown to directly influence litter size in rabbits and mice (Blasco et al., 1993). In rabbits, specifically, embryo survival and

## IX. Summary

development before 96 hours of gestation was found to be accountable for the difference in litter size found (Torres et al., 1987). Data obtained in the KO rabbit model support this possibility as the mean number of zygotes/2-cell embryos, morulae and blastocysts recovered in KO rabbits was:  $29.5 \pm 12.5$ ,  $24.5 \pm 5.5$  and  $17.5 \pm 6.5$  respectively while in WT rabbits it was:  $35.25 \pm 6.79$ ;  $43.25 \pm 6.37$  and  $43.67 \pm 3.38$ , showing a reduction in the number of embryos recovered in KO females as development progressed, not noticeable in WT rabbits.

To understand the reason for the possible reduction in litter size and hence the subfertility phenotype of KO rabbits it is important to analyse the complete sequence of rabbit *OVPG1* as previous studies suggested that early embryonic development can be inhibited when the C-terminal region of the oviductin protein is blocked by the use of an antibody (Yong et al., 2002). As a result of this and because *OVGP1* is mainly expressed in the oviduct, an organ of passage during the early stages of embryonic development, previous studies proposed it as a candidate gene for early embryonic survival and litter size variability in rabbits (Merchán et al., 2007; Merchán et al., 2009; García et al., 2010). A single nucleotide polymorphism (SNP) g.12944C>G and a triallelic microsatellite g.325[(GT)15T(G)5, (GT)14T(G)5 and (GT)11T(G)7] were determined in the genomic sequence of rabbit *OVGP1* (Merchán et al., 2007; Merchán et al., 2009). The g.12944C>G SNP was located in exon 11 and produced an aminoacid change in the C-terminal region of the protein, which may confer species specificity, mediate specific recognition events and directly regulate the biological activity of *OVGP1* (Yong et al., 2002; Algarra et al., 2016).

The microsatellite was located in the promoter region and could modify *OVGP1* and its expression (Merchán et al., 2007; Merchán et al., 2009), as several studies have indicated that the presence of polymorphisms in the promoter region of a gene can modify its expression due to alterations in transcription factors, chromatin structure and DNA conformation (Kashi et al., 1997; Iglesias et al., 2004; Szalai et al., 2005; Khan et al., 2006). The results concluded that the GG genotype of the exon 11 SNP (g.12944C>G) and the g.325[(GT)14T(G)5] genotype of the microsatellite showed a favorable association with litter size, number of live-born offspring, number of implanted embryos, embryonic survival, fetal survival and prenatal survival (Merchán et al., 2009).

These results, together with the reduction in the number of embryos recovered in KO rabbits as embryonic development progressed, suggest that deletion of *OVGP1* by gene editing techniques could trigger effects similar to those associated with the presence of the SNP (g.12944C>G) and the microsatellite g.325[(GT)14T(G)5] in this species.

The determination of the irreplaceable role of the oviductin protein in reproductive function in hamsters, in contrast to that obtained in the rabbit model and previously in mice (Araki et al., 2003), confirms the variability in the physiological impact that the absence of this protein triggers in fertility between species. In the mouse, most of the secreted oviductin protein passes into the perivitelline space of the egg with little of the protein remaining bound to the ZP (Kapur and Johnson, 1986; Lyng and Shur, 2009), and therefore perhaps not contributing to its hardening as in the hamster. Yet, in the rabbit the oviductin protein does bind strongly to the ZP, but there is a peculiarity, the mucin layer, which could interfere with the uptake of oviductin by embryos. These discrepancies between species could lead to a variation in the localisation of the oviductin protein in the developing embryo, which could be the cause of the variability in the function of the protein and consequently in the different phenotype observed between the 3 KO models for *OVGP1*.

Another aspect to consider is the phylogenetic separation between species, as specific patterns of evolution may occur in reproductive genes making them non-essential in some species. *In silico* comparison of the mammalian *OVGP1* amino acid sequence reveals five distinct regions (A-E) that are conserved differently between mammalian groups (Avilés et al., 2010). These variations between species suggest possible modifications in some of its functions during reproductive events, and future studies are needed to clarify the precise biological role of the oviductin protein in each species. Other phenotypic differences between KO rodent models for genes involved in fertility have been described, such as acrosin. Mice and rats acrosin KO were fertile (Baba et al., 1994; Isotani et al., 2017), whereas the hamster KO model was infertile (Hirose et al., 2020). This phenotypic similarity between the two murine rat and mouse models may be due to the phylogenetic closeness of the two species. In contrast, the *Cricetidae*, which includes the hamster, diverged from the rodent *Muridae* long before *Mus* (mouse) and *Rattus* (rat) (Blanga Kanfi et al., 2009; Michaux et al., 2001). This raises

the possibility that, in mouse, where the KO model for *Ovgp1* is fertile, and in rat, where *OVGP1* is a pseudogene (Tian et al., 2009), the activity of oviductin is compensated by that of other proteins present in the FO, with the same perhaps occurring in the rabbit model. In order to evaluate possible candidates to replace the role of oviductin, the evolutionary proximity of oviductin to other proteins present in the oviduct must be well-thought-out, a topic that we will discuss later in section 4.4 on the phylogenetic analysis of *Ovgp1* in the *Murinae* subfamily.

Another aspect covered in the present study in relation to *OVGP1* is the **mucin coat**, which is characteristic of rabbits and hares and is not common in other mammals (García et al., 2016). This is a coating of mucinous material derived from oviductal secretions that is deposited around the embryo as it passes through the oviduct during the first 3 days post-insemination (García et al., 2016). This study has confirmed that its formation is independent of *OVGP1* since KO female rabbits form the mucin layer in the same way as WT females.

This finding makes it necessary to study other mucins present in the rabbit FO and their relationship with the composition of the mucin layer. Among the possible candidates present in the FO of the doe are MUC4 and MUC16, both mucins show their highest expression in the oviduct in the presence of zygotes, both showing a marked decrease in their expression after 36 hours post-ovulation (González-Brusi Thesis, 2021). This overexpression could be linked to the formation of the mucin layer since, as we have indicated, this is deposited around the embryo during the first 3 days post-insemination (García et al., 2016) and therefore 3 days post-ovulation as the rabbit is a species with induced ovulation (Scapinello, 2014).

## **4.2 Impact of the absence of oviductin on the hamster oviductal transcriptome**

*In vitro* *OVGP1* knock down experiments with human endometrial cells showed variation in the expression of genes related to trophoblast receptivity and adhesion (Laheri et al., 2018). In order to determine whether failure of embryonic development in female hamster *OVGP1* KO was associated with a change in the oviductal

environment, a comparative transcriptomic analysis of the oviduct was performed. This analysis showed that the absence of oviductin generates significant variation in the expression of 7 genes including, *OVGP1*, gene encoding oviductin protein. The other 6 genes with significant variation in expression were: *GPR18*, *ENPEP*, *C1QTNF4*, *DERL3*, *AMY1* and *WDR95*. Of these 7 genes, *GPR18* was the only one that showed overexpression in oviductal samples from KO females, the other 6 genes were underexpressed in these samples.

None of the genes with variation in expression at the oviductal level in KO females is so far cataloged as essential in early reproductive events. However, the significant variation in the expression of these 6 genes (*GPR18*, *ENPEP*, *C1QTNF4*, *DERL3*, *AMY1* and *WDR95*), directly caused by the deletion of *OVGP1*, could have a summative effect affecting embryonic development in *OVGP1* KO female hamsters. Nevertheless, in future studies it would be necessary to histochemically analyse the presence of these proteins in oviduct sections and it would also be interesting to determine whether the modification in the expression of these genes also causes variation in the final amount of protein in the oviduct.

### **4.3 Impact of the absence of oviductin on the transcriptome of hamster embryos**

Previous studies have shown that treatment of eggs and embryos *in vitro* in different species with recombinant oviductin triggers modification of the expression of genes involved in embryonic development (Hribal et al., 2014; Algarra et al., 2018). As with the oviductal transcriptomic analysis, the aim of performing a transcriptomic analysis of embryos was to determine whether there was differential gene expression between oviductal embryos from KO and WT females and which were the main genes affected. This analysis showed statistically significant variation in the expression of 1,668 genes, of which 658 were overexpressed and 1,010 underexpressed in embryos from KO females.

The study of the results of the transcriptomic analysis in a general way, that is, considering the global variation of the genes detected by the microarray technique

## *IX. Summary*

(1,668 genes, of which 658 were overexpressed and 1,010 underexpressed in embryos from KO females) reveals variation in the expression in embryos from KO females of a high number of genes related to the regulation of the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system (UPS).

In eukaryotic cells, autophagy and the UPS are the main intracellular protein degradation pathways (Mizushima, 2007; Tanaka, 2009; Higuchi et al., 2018), with both pathways being complementary (Hara et al., 2006). The autophagy pathway is a massive degradation system in which cellular components, including macromolecules and organelles, are sent to the lysosome for degradation (Mizushima, 2007). On the other hand, the UPS regulates transcription in multiple ways, both proteolytic and non-proteolytic, ranging from chromatin structure to regulation of gene expression (Geng et al., 2012; Howard and Tansey, 2016; Sen et al., 2016). UPS-dependent proteolysis is a selective degradation system in which protein destruction is initiated by the binding of multiple ubiquitin molecules to the target protein that is subsequently degraded by the proteasome complex (Tanaka, 2009). These two proteolytic pathways play a vital role in the removal of maternal proteins during the maternal-zygotic transition (Tsukamoto et al., 2008; Shin et al., 2013; DeRenzo and Seydoux, 2004).

During the maternal-zygotic transition, a series of dynamic molecular events such as epigenetic changes and chromatin remodeling regulated by maternally derived RNAs/proteins occur, triggering extensive reprogramming to establish a totipotent zygote (Schier, 2007; Zhou and Dean, 2015; Lee et al., 2014). In the mouse, zygotic genome activation is tightly regulated by multiple mechanisms such as cell cycle, epigenetic modification, chromatin remodeling and transcription factor activities (Lee et al., 2014).

Previous studies have determined that both inducers and inhibitors of autophagy can alter normal levels of autophagy leading to apoptosis (Lee et al., 2011). Thus, an imbalance of autophagy mechanisms can affect proper embryonic development (Tsukamoto et al., 2008; Lee et al., 2011), cell fate determination (Sharma et al., 2022) and even survival under cellular stress (Ravanan et al., 2017). It is therefore imperative



to maintain the balance of this pathway to favour strong developmental competence and enable embryo survival (Leung et al., 2022).

In terms of the UPS, it has been shown to be important for the initiation of zygotic genome activation, with delayed initiation of zygotic genes following transient treatment with the reversible proteasome inhibitor MG132 (Shin et al., 2010; Higuchi et al., 2018). Thus, the UPS plays a key role in the turnover, quality control and degradation of maternal proteins during the maternal-zygotic transition for proper embryonic development (DeRenzo and Seydoux, 2004; Amm et al., 2014).

The results shown in this study indicate that oviductin protein plays an essential role in the correct reproductive activity of female hamsters, and its absence affects early embryonic development in this species. Moreover, the modification of the transcriptome of KO female embryos after oviductin protein deletion could trigger an incorrect activation of the zygotic genome and inadequate degradation of maternal proteins during the maternal-zygotic transition. This hypothesis is supported by the overexpression of the *EIF4E1B* gene in KO female embryos.

*EIF4E1B* gene encodes the eukaryotic translation initiation factor 4E, a member of the 1B family (EIF4E1B) and a key component in the regulation of maternal mRNA translation to ensure zygotic genome activation (Yang et al., 2022). *eif4e1b* KO mice are sterile, with embryos not developing beyond the 2-cell stage (Yang et al., 2022). EIF4E1B selectively binds mRNAs encoding subunits of chromatin remodeling complexes and reprogramming factors in metaphase II eggs, suggesting that after fertilisation, but prior to zygotic genome activation, maternal EIF4E1B ensures translation of proteins required for the restoration of chromatin accessibility that allows expression of early zygotic genes (Yang et al., 2022).

EIF4E1B protein has been detected in mouse eggs and its expression is increased in embryos up to the 2-cell stage (Yang et al., 2022). However, EIF4E1B protein was not detected in 4-cell embryos (Yang et al., 2022), consistent with the absence of *eif4e1b* expression after the 4-cell stage (Deng et al., 2014).

Hence, altered expression of *EIF4E1B*, either elevated or decreased (being in the present KO model elevated), could perhaps generate misactivation of the zygotic genome in hamsters triggering the gene and morphological alterations observed in embryos of female hamster KO. In addition, the *NANOG* and *PUF5F1* genes, also associated with the activation of zygotic gene expression (Lee et al., 2013), also show alterations in their expression in embryos of female hamster KO. *NANOG* is overexpressed and *POU5F1* underexpressed in these embryos.

#### **4.4 Evolution of the *Ovgp1* gene in the *Murinae* subfamily**

The nucleotide sequence of *OVGP1* varies between mammalian species (Verhage et al., 1997a; Buhi, 2002; Avilés et al., 2010). These interspecies variations suggest possible modifications in some of their functions during reproductive events.

The *OVGP1* gene has been described to be subject to rapid adaptive evolution (Swanson et al., 2001), which is responsible for the divergence of this protein between mammalian species. Variations in *OVGP1* between species can be demonstrated by phylogenetic analysis. Thus, within the *OVGP1* family, positive selection has been demonstrated in the dog (Moros-Nicolás et al., 2018), with pseudogenisation having occurred in the rat (Tian et al., 2009) and the great flying fox and duplication in cow, sheep and sow (Moros Nicolás et al., 2018). The aim of this study was to analyse the molecular evolution of the *Ovgp1* gene in several species belonging to the *Murinae* subfamily. Within this subfamily we find the rat (*Rattus norvegicus*) where *Ovgp1* is a pseudogene, with no functional protein (Tian et al., 2009) and the mouse (*Mus musculus*) in which *Ovgp1* is expressed generating a functional protein (Kapur and Johnson, 1986; Lyng and Shur, 2009). Therefore, *Ovgp1* is a gene whose expression was lost at some point in evolution, following the divergence of the rat and mouse from a common ancestor.

The present phylogenetic study of the *Ovgp1* gene within the subfamily *Murinae* yields interesting insights into its evolution. The results indicate that pseudogenisation does not only affect *Rattus norvegicus*, but also the rest of the species analysed within the genus *Rattus*. In addition, the genera *Chryromyscus*, *Niviventer*, *Berylmys*,

*Bandicota*, *Bunomys* and *Diplothrix*, which, like *Rattus*, belong to the *Rattini* tribe, also present premature stop codons between exons 1 and 6. Based on these results, it appears that pseudogenisation only occurred in the *Rattini*, i.e. after the separation between the *Rattini* and the other *Murinae* approximately 12.5 million years ago (between 11.31-13.99) (Aghová et al., 2018).

In species where *OVGP1* has undergone pseudogenisation and therefore do not present a functional oviductin protein, it is essential to study the possible proteins present in the oviduct that could perform a similar or equivalent function. *In silico* analysis of oviductin revealed a domain in the N-terminal region that resembles the chitinase proteins belonging to the GH18 family. However, the catalytic domain of oviductin lacks an essential glutamic acid residue making it an inactive chitinase (Malette et al., 1995; Huang et al., 2012). Analysis of the evolutionary relationship of *OVGP1* in several animal species with other members of the GH18 family showed that duplication and divergence events led to the emergence of multiple forms of active chitinases and inactive chitinase-like proteins. The results suggested that *OVGP1* possesses the closest evolutionary relationship with mammalian acid chitinases (AMCases) (Choudhary et al., 2019).

Mammals produce two chitinases belonging to the GH18 family, chitotriosidase (CHIT1) and mammalian acid chitinase (AMCase) (Shuhui et al., 2009). Mammals also encode several chitinase-like proteins that lack chitinolytic activity (Bussink et al., 2007; Funkhouser and Aronson Jr., 2007; Hussain and Wilson, 2013; Sutherland, 2018). Four chitinase-like proteins have been identified in the human genome, including oviductin (Agarwal et al., 2002), human chitinase-like protein 3-like protein 1 (CHI3L1; also referred to as YKL40, CGP 39) (Hakala et al., 1993), human chitinase 3-like protein 2 (CHI3L2; also known as YKL-39, CP-39) (Hu et al., 1996) and chitinase-interacting protein stabilin-1 (SI-CLP, also known as CHID1) (Kzhyshkowska et al., 2006). The mouse produces at least seven chitinase-like proteins, including orthologues of CHI3L1, oviductin and CHID1 in humans, as well as Ym1, Ym2, BCLP1 and BYm (Hussain and Wilson, 2013).

A comparative transcriptomic and proteomic study between hamster oviductin, where oviductin protein is essential for proper early embryonic development, and rat,

where *OVGP1* is a pseudogene and therefore dispensable for proper reproductive function, could be of interest in the future (Tian et al., 2009). The results could elucidate which candidate or candidates among the above-mentioned could replace the role performed by the oviductin protein during reproduction in species where *OVGP1* has undergone pseudogenisation and in those where *OVGP1* deletion does not lead to significant alterations in fertility. The generation of rat KO models for the selected candidates would be a very interesting tool for their study.

#### **4.5 Pseudogenisation of the *ASTL* gene in lagomorphs**

Shortly after fertilisation, block to polyspermy take place. This prevents other sperm from entering the egg after the entry of one sperm. Such block to polyspermy can occur at the level of the ZP, the oolemma or both, depending on the species (Sun, 2003; Gardner and Evans, 2005; Evans, 2020; Fahrenkamp et al., 2020; Yanagimachi, 2022). The protein ovastacin has been shown to play a crucial role in the blockade at the ZP level. Immediately after fertilisation, a rapid and transient blockade of sperm penetration is established prior to ZP2 cleavage. This penetration block is associated with the release of zinc from cortical granules after exocytosis. Elevated zinc levels affect sperm motility, thus preventing sperm from passing through the ZP matrix. This transient blockade provides a temporary window for ovastacin to complete ZP2 cleavage, losing its ability to bind to sperm and inducing the block to polyspermy necessary for successful embryonic development (Burkart et al., 2012; Avella et al., 2014; Tokuhiko and Dean, 2018).

*Astl* KO female mice do not cleave ZP2 after fertilisation, but are fertile (Burkart et al., 2012), suggesting that mice have additional strategies to ensure monospermic fertilisation. So far, it has been determined that in rabbit eggs, block to polyspermy occurs mainly at the level of the oolemma, as multiple spermatozoa are observed in the perivitelline space (Austin and Braden, 1953; Braden and Austin, 1954; Overstreet and Bedford, 1974; Oh and Brackett, 1975; Yanagimachi, 1994; Gardner and Evans, 2005). This work demonstrates pseudogenisation of the *ASTL* gene in all the lagomorphs analysed, which could explain why the block to polyspermy does not occur at the ZP

level in these species as ZP2 is not cleaved by the action of ovastacin. In order to confirm that there is no block to polyspermy at the ZP2 level in lagomorphs, it would be necessary to determine whether ZP2 remains intact or is cleaved after fertilisation. The lack of cleavage of ZP2 would confirm the absence of another enzyme that replace the action of ovastacin in these species.

Given the premise that ZP2 is not cleaved after fertilisation and therefore has no block to polyspermy at the ZP level, it must be considered what other mechanisms are present in lagomorphs to ensure monospermic fertilisation. At the level of the oolemma, polyspermy block appears to be produced by sperm-egg binding. Possible molecular candidates for sperm-egg interaction include the JUNO protein in the egg whose receptor on the sperm is called IZUMO1 (Inoue et al., 2005; Bianchi et al., 2014).

The JUNO-IZUMO1 interaction is highly conserved in mammals, as demonstrated in mouse, human, pig and opossum (Bianchi et al., 2014). JUNO surface expression is rapidly lost in fertilised eggs, internalised in vesicles and released into the perivitelline space where it could be involved in the rapid block to polyspermy at the level of the oolemma (Burkart et al., 2012; Bianchi et al., 2014). Meanwhile, IZUMO1 mobilises from the acrosome to the equatorial segment, a region considered to initiate fusion with the oolemma (Satouh et al., 2012).

A possible additional strategy to maintain monospermic fertilisation may be directly linked to the perivitelline space. This space is the area between the plasma membrane of the egg and its ZP (Talbot and Dandekar 2003).

Previous studies have suggested that the size of the perivitelline space is closely related to the incidence of polyspermy, with eggs with larger perivitelline space having a lower incidence of polyspermy (Wang et al., 1998; Kitagawa and Niimura, 2006; Ueno and Niimura, 2008; Yoshida and Niimura, 2011). Hyaluronic acid is the main component of the perivitelline space (Talbot and Dandekar, 2003) and consists of repeating units of N-acetylglucosamine and glucuronic acid (Schmidt et al., 2016; Current and Whitaker, 2020). Hyaluronic acid has been reported to have an inhibitory effect on membrane fusion (Kujawa and Tepperman, 1983; Orkin et al, 1985) and that supplementation with glucuronic acid and N-acetylglucosamine during porcine egg maturation has beneficial

effects on perivitelline space thickness, cytoplasmic maturation, cortical granule exocytosis, reduced polyspermy and early embryonic development (Schmidt et al., 2016; Current and Whitaker, 2020).

So, the pseudogenisation of *ASTL* in lagomorphs and thus the possible non-scission of ZP2 and lack of polyspermy block at the level of the ZP in these species could be compensated not only at the level of the oolemma by the above-mentioned possible candidates, but the perivitelline space could also play an important role.

## 5. Conclusions

1.- The characterization of the *OVGP1* KO models of the golden hamster and common rabbit species confirmed, by means of molecular biology and proteomic techniques, the presence of the deletion generated by the CRISPR-Cas9 technique in *OVGP1* gene, as well as the absence of the oviductin protein in the KO animals generated in each species.

2.- *In vivo* fertility analysis showed a clear infertility phenotype in *OVGP1* KO females of the golden hamster species, associated with embryonic death during early embryonic development. The KO hamster males did not show altered fertility.

3.- The *OVGP1* KO rabbit model is fertile *in vivo*, with no significant alterations in fertility parameters were found in males and females.

4.- Comparative transcriptomic analysis between oviducts of WT and *OVGP1* KO female hamsters showed significant variation in oviductal expression of 7 genes: ***GPR18***, ***OVGP1***, ***ENPEP***, ***C1QTNF4***, ***DERL3***, ***AMY1*** and ***WDR95***. Of these, only ***GPR18*** was overexpressed in the oviduct of KO females, the rest of the affected genes showed underexpression.

5.- Comparative transcriptomic analysis between embryos from WT and *OVGP1* KO female hamsters showed significant variation in embryonic expression of 1,668 genes, of which 658 were overexpressed and 1,010 underexpressed in embryos from KO females. Among the total number of genes, the following stand out for their high level of expression: ***EIF4E1B***, ***BMI1*** and ***RNF38*** and for their low level of expression: ***ASS1***, ***PHB*** and ***LRRC59***.

6.- The study of the evolution of the *Ovgp1* gene in the *Murinae* subfamily confirmed its pseudogenisation in the species analysed within the *Rattini* tribe, specifically in the genera *Rattus*, *Chryromyscu*, *Niviventer*, *Berylmys*, *Bandicota*, *Bunomys*, and *Diplothrix*. These results confirm that the oviductin protein is not essential for proper reproductive function in these species. Pseudogenisation affects the *Rattini* tribe, dating back approximately 12.5 million years.

7.- The study of the *ASTL* gene by molecular biology techniques confirmed its pseudogenisation in all the lagomorph species analysed: European rabbit (*Oryctolagus cuniculus cuniculus*), Iberian wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus algerus*), pygmy rabbit (*Brachilagus idahoensis*), eastern cottontail rabbit (*Sylvilagus floridanus*), brush rabbit (*Sylvilagus bachmani*), European hare (*Lepus europaeus*), Iberian hare (*Lepus granatensis*), Daurian hare (*Ochotona daurica*) and American hare (*Ochotona princeps*). These results confirm that ZP2 cleavage by ovastacin does not occur in these species.





## **X. ABREVIATURAS**



**aa:** aminoácidos

**ACTI:** Área Científica y Técnica de Investigación

**ADNc:** ADN complementario

**ADNg:** ADN genómico

**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico

**ARNcr:** ARN CRISPR

**ARNg:** ARN guía

**ARNm:** ARN mensajero

**ARNtracr:** del inglés, *trans-activating* ARNcr

**BSA:** albúmina sérica bovina

**CARM:** Comunidad Autónoma de la Región de Murcia

**Cas:** genes altamente conservados denominados asociados a CRISPR, del inglés *CRISPRassociated*

**CEEA:** Comité Ético de Experimentación Animal

**CIBIO:** Centro de Investigación en Biodiversidad y Recursos Genéticos

**CL:** cuerpo lúteo

**Cl-:** iones cloro

**CRISPR:** repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (del inglés, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

**DSB:** rotura de doble cadena (del inglés, *double-strand break*)

**E2:** estradiol

**ERAD:** complejo funcional de degradación asociada al retículo endoplasmático, del inglés *endoplasmic reticulum-associated degradation*

**Er $\beta$ :** receptor de estrógenos  $\beta$

**Er $\alpha$ :** receptor de estrógenos  $\alpha$

**ESS:** tamaños efectivos de las muestras, del inglés *effective sample sizes*

**FC:** del inglés, *Fold Change*

**FDR:** ratio de falsos positivos, del inglés *False Discovery Rate*

**FIV:** fecundación *in vitro*

**FO:** fluido oviductal

X. Abreviaturas

**FSH:** hormona folículo estimulante

**GH18:** glicosil-hidrolasas 18

**GnRH:** hormona liberadora de gonadotropina

**GSL I:** lectina fluorescente Griffonia Simplicifolia Lectin I

**hCG:** gonadotropina coriónica humana

**HDR:** ruta de reparación dirigida por homología

**HPLC-MS/MS:** técnica de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas, del inglés *high performance liquid chromatography-mass spectrometry*

**HRP:** peroxidasa de rábado, del inglés *horseradish peroxidase*

**HuOVGP1:** gen humano *OVGP1*

**H<sub>z</sub>:** heterocigotas, del inglés *heterozygous*

**IA:** inseminación artificial

**iERE:** elemento incompleto de respuesta a los estrógenos

**Indel:** inserciones y deleciones aleatorias de nucleótidos en la secuencia de un gen

**INIA:** Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

**IM:** intramuscular

**IV:** intravenosa

**KD:** del inglés, *knock down*

**KO:** del inglés, *knock out*

**LH:** hormona luteinizante

**m/z:** relación masa/carga del fragmento detectado

**NHEJ:** ruta de unión de extremos no homólogos

**NOS:** proteínas óxido nítrico sintetasas

**OVGP1:** gen codificante de la glicoproteína específica del oviducto

**PAF:** paraformaldehído

**PAS:** ácido periódico de Schiff

**PBS:** tampón fosfato salino

**ACP:** análisis de componentes principales

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

**PM:** peso molecular

**P4:** progesterona

**RA:** reacción acrosómica

**RIN:** del inglés, *RNA Integrity Number*

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa, del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*

**SC:** subcutánea

**Score:** puntuación basada principalmente en la intensidad de señal.

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

**SE:** error estándar, del inglés *standard error*

**SNP:** polimorfismo de nucleótido único

**SPI:** porcentaje de señales detectadas de cada fragmento peptídico respecto al número de señales teóricas que debería producir.

**Tm:** temperatura de fusión

**TRA:** técnicas de reproducción asistida

**UI:** unidades internacionales

**SUP:** sistema ubiquitina-proteasoma

**VE:** vesículas extracelulares

**WT:** del inglés, *Wild type*

**ZP:** zona pelúcida



## **XI. ANEXOS**





**Anexo 1.** Cebadores empleados en este trabajo. En las diferentes columnas podemos ver: el nombre del cebador, el número de acceso de la secuencia empleada para su diseño, el número de pares de bases (pb), si se trata de un cebador directo (d) o reverso (r), la secuencia (5'→3'), su temperatura de fusión (Tm) y la longitud en pb del amplicón.

Nombre del cebador	Número de acceso	Pb (d/r)	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)	Longitud del amplicón (pb)
Fw <i>OVGP1</i> -h genotyping	NW_024429193.1	20 (d)	AGGAGTGGGCTGTTACAGTG	55	467
Rv <i>OVGP1</i> -h genotyping	NW_024429193.1	20 (r)	TCTCAACTGGGGATCTGAGC	55	467
Fw <i>OVGP1</i> -r genotyping	NC_067386.1	20 (d)	ACTGCATTCCCACTGCTCTC	60	311
Rv <i>OVGP1</i> -r genotyping	NC_067386.1	20 (r)	ATTAGCCCTGGGGGTCAGAT	60	311
Fw <i>OVGP1</i> -h expresión	NM_001281337.1	22 (d)	GGTTGGGCTGGTTCTTCTGATG	60	223
Rv <i>OVGP1</i> -h expresión	NM_001281337.1	20 (r)	GAACTTCGGCACATCACGGT	60	223
Fw <i>OVGP1</i> -r expresión	NM_001082105.1	20 (d)	TTGTGCTGGATTGCCACGAT	58	262
Rv <i>OVGP1</i> -r expresión	NM_001082105.1	20 (r)	ACACTGCTGTCCATTGGAGG	58	262
Fw <i>ASTL</i> -r	NC_013670.1	20 (d)	TGGCTTAGTATGCGGTGGAG	60	161
Rv <i>ASTL</i> -r	NC_013670.1	20 (r)	CTCTCGTTCCAGGTGACACG	60	161

**Anexo 2.** Medio de manejo embrionario usado en conejo.

Medio de manejo embrionario conejo	
Componentes	Concentración
PBS sin Calcio y Magnesio (10x)	100 ml
H <sub>2</sub> O miliQ	900 ml
CaCl <sub>2</sub> (2 H <sub>2</sub> O)	0,123 g
MgCl <sub>2</sub> (6 H <sub>2</sub> O)	0,100 g
BSA	2 g
Penicilina-streptomycina	10 ml

**Anexo 3.** Tampón STES. El pH del tampón tras disolver todos los componentes debe ser 8. Se añade 2 mg/ml de proteinasa K para la solución de trabajo.

<b>Tampón STES</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
TrisHCl Ph8 50 Mm	99 ml
NaCl (concentración final 20 Mm)	0,1169 g
EDTA (concentración final 1 Mm)	0,0372 g
SDS 10% (concentración final 0,1 %)	1 ml

**Anexo 4.** Tampón de recorrido (10X). El pH del tampón tras disolver todos los componentes debe ser 8,3. Se diluye hasta una concentración 1X para su uso rutinario.

<b>Tampón de recorrido 10x</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
Tris Base	30,00 g/l
Glicina	144 g/l
SDS	10,0 g/l

**Anexo 5.** Tampón de transferencia (10X). Se diluye hasta una concentración 1X para su uso rutinario.

<b>Tampón de transferencia 10x</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
Tris Base	5,8 g/l
Glicina	2,9 g/l
SDS	0,37, g/l
Metanol	200ml/l

**Anexo 6.** TBST (10X). El pH del tampón antes de añadir el Tween 20 debe ser de 7,6. Se diluye a una concentración 1X para su uso rutinario.

<b>Tampón TBST 10x</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
Tris Base	24 g/l
NaCl	88 g/l
Tween 20	10 g/l

**Anexo 7.** Referencias de los anticuerpos empleados en Western-blot e inmunohistoquímica.

Inmunógeno	Clase	Dilución	Casa comercial	Referencia	Procedencia
<b>Western blot</b>					
Anti-oviductina	Policlonal de conejo	1:2500 en hámster dorado y conejo	Abcam	ab118590	Cambridge, Gran Bretaña
Anti-IgG de conejo-HRP	Monoclonal de ratón conjugado a Horseradish Peroxidase (HRP)	1:10000 en hámster dorado y conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-2357	Heidelberg, Alemania
<b>Inmunohistoquímica</b>					
Anti-oviductina	Policlonal de conejo	1:300 en hámster dorado 1:400 en conejo	Abcam	ab118590	Cambridge, Gran Bretaña
Anti-IgG de conejo-HRP	Polímero de anticuerpos secundarios de conejo	Listo para usar	Vector Laboratories	MP-7801	Peterborough, United Kingdom

**Anexo 8.** Listado de genes expresados diferencialmente entre embriones procedentes de hembras de hámster WT y KO para *OVGP1*. Un FC positivo indica sobreexpresión y un FC negativo infraexpresión en embriones procedentes de hembras KO.

Dado el elevado número de datos, esta tabla solo se encuentra disponible en formato electrónico. En el siguiente código QR podrá consultar o descargar el documento .xlsx donde aparece el listado de todos los genes expresados diferencialmente entre ambos grupos.



**Anexo 9.** Anotaciones biológicas de los genes expresados diferencialmente entre embriones procedentes de hembras de hámster WT y KO para *OVGP1*.

Dado el elevado número de datos, esta tabla solo se encuentra disponible en formato electrónico. En el siguiente código QR podrá consultar o descargar el documento .xlsx donde aparece el listado de genes incluidos en cada anotación biológica.



## **XII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abe, H. (1994). Regional variations in the ultrastructural features of secretory cells in the rat oviductal epithelium. *The Anatomical Record*, 240(1), 77–85. <https://doi.org/10.1002/AR.1092400108>
- Abe, H. (1996). The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histology and Histopathology*, 11(3), 743–768. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8839764/>
- Abe, H., & Hoshi, H. (2008). Morphometric and ultrastructural changes in ciliated cells of the oviductal epithelium in prolific Chinese Meishan and Large White pigs during the oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 43(1), 66–73. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2007.00856.X>
- Abe, H., & Oikawa, T. (1989). Differentiation of the golden hamster oviduct epithelial cells during postnatal development: an electron microscopic study. *The Journal of Experimental Zoology*, 252(1), 43–52. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402520107>
- Abe, H., & Oikawa, T. (1990). Ultrastructural evidence for an association between an oviductal glycoprotein and the zona pellucida of the golden hamster egg. *The Journal of Experimental Zoology*, 256(2), 210–221. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402560211>
- Abe, H., & Oikawa, T. (1991). Regional differences in the ultrastructural features of secretory cells in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviductal epithelium. *Journal of Anatomy*, 175, 147–158. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2050560/>
- Abe, H., & Oikawa, T. (1993). Effects of estradiol and progesterone on the cytodifferentiation of epithelial cells in the oviduct of the newborn golden hamster. *The Anatomical Record*, 235(3), 390–398. <https://doi.org/10.1002/AR.1092350308>
- Abe, H., Onodera, M., & Sugawara, S. (1995a). Immunological detection and characterization of an estrus-associated antigen in the goat oviduct. *The Journal of Experimental Zoology*, 272(2), 134–141. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402720207>
- Abe, H., Satoh, T., & Hoshi, H. (1998). Primary modulation by oestradiol of the production of an oviduct-specific glycoprotein by the epithelial cells in the oviduct of newborn golden hamsters. *Journal of Reproduction and Fertility*, 112(1), 157–163. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.1120157>
- Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T., & Hoshi, H. (1995b). Secretory products of bovine oviductal epithelial cells support the viability and motility of bovine spermatozoa in culture *in vitro*. *The Journal of Experimental Zoology*, 272(1), 54–61. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402720107>
- Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T., & Hoshi, H. (1995c). Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 42(2), 226–232. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080420212>

- Abe, K. ichiro, Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., Schultz, R. M., & Aoki, F. (2018). Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(29), E6780–E6788. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1804309115>
- Acuña, O. S., Avilés, M., López-Úbeda, R., Guillén-Martínez, A., Soriano-Úbeda, C., Torrecillas, A., Coy, P., Izquierdo-Rico, M. J., 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>
- Agarwal, A., Yeung, W. S. B., & Lee, K. F. (2002). Cloning and characterization of the human oviduct-specific glycoprotein (HuOGP) gene promoter. *Molecular Human Reproduction*, *8*(2), 167–175. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/8.2.167>
- Aghová, T., Kimura, Y., Bryja, J., Dobigny, G., Granjon, L., & Kergoat, G. J. (2018). Fossils know it best: Using a new set of fossil calibrations to improve the temporal phylogenetic framework of murid rodents (Rodentia: Muridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *128*, 98–111. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2018.07.017>
- Aguilar, J., & Reyley, M. (2005). The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Animal Reproduction (AR)*, *2*(2), 91–105. <http://animal-reproduction.org/journal/animreprod/article/5b5a6085f7783717068b47ed>
- Aguirre, L. A., Alonso, M. E., Badía-Careaga, C., Rollán, I., Arias, C., Fernández-Miñán, A., López-Jiménez, E., Aránega, A., Gómez-Skarmeta, J. L., Franco, D., & Manzanares, M. (2015). Long-range regulatory interactions at the 4q25 atrial fibrillation risk locus involve PITX2c and ENPEP. *BMC Biology*, *13*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12915-015-0138-0/FIGURES/5>
- 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). *The 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. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *21*(6), 1278–1285. <https://doi.org/10.2741/4456>
- Al-Dossary, A. A., Strehler, E. E., & Martin-DeLeon, P. A. (2013). Expression and secretion of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PloS One*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0080181>
- 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*). Proyecto de Investigación: <http://hdl.handle.net/10201/50633>



- Algarra, B., Han, L., Soriano-Úbeda, C., Avilés, M., Coy, P., Jovine, L., & Jiménez-Movilla, M. (2016). The C-terminal region of OVGP1 remodels the zona pellucida and modifies fertility parameters. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP32556>
- Algarra, B., Maillo, V., Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., Rizos, D., & Jiménez-Movilla, M. (2018). Effects of recombinant OVGP1 protein on *in vitro* bovine embryo development. *The Journal of Reproduction and Development*, 64(5), 433–443. <https://doi.org/10.1262/JRD.2018-058>
- Alizadeh, Z., Kageyama, S. I., & Aoki, F. (2005). Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilisation. *Molecular Reproduction and Development*, 72(3), 281–290. <https://doi.org/10.1002/MRD.20340>
- Almiñana, C., Corbin, E., Tsikis, G., Alcântara-Neto, A. S., Labas, V., Reynaud, K., Galio, L., Uzbekov, R., Garanina, A. S., Druart, X., & Mermillod, P. (2017). Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(3), 253–268. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0054>
- 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). <https://doi.org/10.1186/S12864-018-4982-5>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amm, I., Sommer, T., & Wolf, D. H. (2014). Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, 1843(1), 182–196. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.06.031>
- Ande, S. R., Gu, Y., Nyomba, B. L. G., & Mishra, S. (2009). Insulin induced phosphorylation of prohibitin at tyrosine 114 recruits Shp1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(8), 1372–1378. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2009.05.008>
- Ande, S. R., & Mishra, S. (2009). Prohibitin interacts with phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) and modulates insulin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 1023–1028. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2009.10.101>
- Andrews, P., He, Y. J., & Xiong, Y. (2006). Cytoplasmic localized ubiquitin ligase cullin 7 binds to p53 and promotes cell growth by antagonizing p53 function. *Oncogene* 2006 25:33, 25(33), 4534–4548. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209490>
- Aoki, F., Hara, K. T., & Schultz, R. M. (2003). Acquisition of transcriptional competence in the 1-cell mouse embryo: requirement for recruitment of maternal mRNAs. *Molecular Reproduction and Development*, 64(3), 270–274. <https://doi.org/10.1002/MRD.10227>
- Araki, Y., Kurata, S., Oikawa, T., Yamashita, T., Hiroi, M., Naiki, M., & Sendo, F. (1987). A monoclonal antibody reacting with the zona pellucida of the oviductal egg but not with that of the ovarian egg of the golden hamster. *Journal of Reproductive Immunology*, 11(3), 193–208. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(87\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0165-0378(87)90057-X)

- Araki, Y., Nohara, M., Yoshida-Komiya, H., Kuramochi, T., Ito, M., Hoshi, H., Shinkai, Y., & Sendai, Y. (2003). Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilisation. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 2), 551–557. <https://doi.org/10.1042/BJ20030466>
- Arias, E. B., Verhage, H. G., & Jaffe, R. C. (1994). Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biology of Reproduction*, 51(4), 685–694. <https://doi.org/10.1095/BiolReprod51.4.685>
- Armbrust, E. V., & Galindo, H. M. (2001). Rapid Evolution of a Sexual Reproduction Gene in Centric Diatoms of the Genus *Thalassiosira*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3501–3513. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3501-3513.2001/ASSET/DCCD22C6-12F4-42E7-8B13-AA15C9773B0B/ASSETS/GRAPHIC/AM0810176003.JPEG>
- Arun Kumar, R., Josephs, E. B., Williamson, R. J., & Wright, S. I. (2013). Pollen-Specific, but Not Sperm-Specific, Genes Show Stronger Purifying Selection and Higher Rates of Positive Selection Than Sporophytic Genes in *Capsella grandiflora*. *Molecular Biology and Evolution*, 30(11), 2475–2486. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MST149>
- Ashworth, C. J., Toma, L. M., & Hunter, M. G. (2009). Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1534), 3351–3361. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2009.0184>
- Austin, C. R. (1956). Ovulation, fertilisation, and early cleavage in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal. Royal Microscopical Society (Great Britain)*, 75(3), 141–154. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2818.1955.TB00421.X>
- Austin, C. R., & Braden, A. W. H. (1953). An investigation of polyspermy in the rat and rabbit. *Australian Journal of Biological Sciences*, 6(4), 674–692. <https://doi.org/10.1071/BI9530674>
- Avella, M. A., Baibakov, B., & Dean, J. (2014). A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *Journal of Cell Biology*, 205(6), 801–809. <https://doi.org/10.1083/JCB.201404025>
- Avenarius, M. R., Hildebrand, M. S., Zhang, Y., Meyer, N. C., Smith, L. L. H., Kahrizi, K., Najmabadi, H., & Smith, R. J. H. (2009). Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *American Journal of Human Genetics*, 84(4), 505–510. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2009.03.004>
- Avilés, M., Coy, P., & Rizos, D. (2015). The oviduct: A key organ for the success of early reproductive events. *Animal Frontiers*, 5(1), 25–31. <https://doi.org/10.2527/AF.2015-0005>
- 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>

- Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S. I., & Toyoda, Y. (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilisation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31845–31849. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)31772-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)31772-1)
- Bakker, J., & Baum, M. J. (2000). Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(3), 220–262. <https://doi.org/10.1006/FRNE.2000.0198>
- Banliat, C., Tomas, D., Teixeira-Gomes, A. P., Uzbekova, S., Guyonnet, B., Labas, V., & Saint-Dizier, M. (2019). Stage-dependent changes in oviductal phospholipid profiles throughout the estrous cycle in cattle. *Theriogenology*, 135, 65–72. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.06.011>
- Battalia, D. E., & Yanagimachi, R. (1979). Enhanced and co-ordinated movement of the hamster oviduct during the periovulatory period. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56(2), 515–520. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0560515>
- Bavister, B. D., Leibfried, M. L., & Lieberman, G. (1983). Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction*, 28(1), 235–247. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD28.1.235>
- Bermejo-Álvarez, P., Ramos-Ibeas, P., Park, K. E., Powell, A. P., Vansandt, L., Derek, B., Ramirez, M. A., Gutiérrez-Adán, A., & Telugu, B. P. (2015). Tet-mediated imprinting erasure in H19 locus following reprogramming of spermatogonial stem cells to induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports 2015 5:1*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep13691>
- Beyer, C., Hoffman, K. L., & González-Flores, O. (2007). Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Hormones and Behavior*, 52(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2007.03.027>
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., & Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilisation. *Nature*, 508(7497), 483–487. <https://doi.org/10.1038/NATURE13203>
- Bianchi, E., Sun, Y., Almansa-Ordóñez, A., Woods, M., Goulding, D., Martínez-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). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-21512-W>
- Biggiogera, M., Burki, K., Kaufmann, S. H., Shaper, J. H., Gas, N., Amalric, F., & Fakan, S. (1990). Nucleolar distribution of proteins B23 and nucleolin in mouse preimplantation embryos as visualized by immunoelectron microscopy. *Development*, 110(4), 1263–1270. <https://doi.org/10.1242/DEV.110.4.1263>
- Bishop, D. W. (1956). Active secretion in the rabbit oviduct. *The American Journal of Physiology*, 187(2), 347–352. <https://doi.org/10.1152/AJPLEGACY.1956.187.2.347>
- Bivin, W. S., Olsen, G. A., & Murray, K. A. (1987). Morphophysiology. In G. L. J. Van Hoosier & C. W. Mcpherson (Eds.), *Laboratory Hamsters* (pp. 10–35). Harcourt Brace Jovanovich Academic Press, Inc.

- Blanga-Kanfi, S., Miranda, H., Penn, O., Pupko, T., Debry, R. W., & Huchon, D. (2009). Rodent phylogeny revised: analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. *BMC Evolutionary Biology*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-71>
- Blasco, A., Santacreu, M. A., Thompson, R., & Haley, C. S. (1993). Estimates of genetic parameters for ovulation rate, prenatal survival and litter size in rabbits from an elliptical selection experiment. *Livestock Production Science*, *34*(1–2), 163–174. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(93\)90044-I](https://doi.org/10.1016/0301-6226(93)90044-I)
- Boatman, D. E., & Magnoni, G. E. (1995). Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster. *Biology of Reproduction*, *52*(1), 199–207. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD52.1.199>
- Bodis, J., Farkas, B., Nagy, B., Kovacs, K., & Sulyok, E. (2022). The Role of L-Arginine-NO System in Female Reproduction: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS232314908>
- Bodmer, M., & Ashburner, M. (1984). Conservation and change in the DNA sequences coding for alcohol dehydrogenase in sibling species of *Drosophila*. *Nature*, *309*(5967), 425–430. <https://doi.org/10.1038/309425A0>
- Boice, M. L., Geisert, R. D., Blair, R. M., & Verhage, H. G. (1990a). Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biology of Reproduction*, *43*(3), 457–465. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD43.3.457>
- Boice, M. L., McCarthy, T. J., Mavrogianis, P. A., Fazleabas, A. T., & Verhage, H. G. (1990b). Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*Papio anubis*). *Biology of Reproduction*, *43*(2), 340–346. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD43.2.340>
- Braden, A. W. H., & Austin, C. R. (1954). The Number of Sperms About the Eggs in Mammals and its Significance for Normal Fertilisation. *Australian Journal of Biological Sciences*, *7*(4), 543–551. <https://doi.org/10.1071/BI9540543>
- Bradford, Y. M., Van Slyke, C. E., Ruzicka, L., Singer, A., Eagle, A., Fashena, D., Howe, D. G., Frazer, K., Martin, R., Paddock, H., Pich, C., Ramachandran, S., & Westerfield, M. (2022). Zebrafish information network, the knowledgebase for *Danio rerio* research. *Genetics*, *220*(4). <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAC016>
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* *2016* *34*:5, *34*(5), 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Brenner, R. M. (1969). Renewal of oviduct cilia during the menstrual cycle of the rhesus monkey. *Fertility and Sterility*, *20*(4), 599–611. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)37086-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)37086-8)
- Brinster, R. L. (1974). Embryo Development. *Journal of Animal Science*, *38*(5), 1003–1012. <https://doi.org/10.2527/JAS1974.3851003X>

- Briton-Jones, C., Hung Lok, I., Mo Yuen, P., Tak Yu Chiu, T., Ping Cheung, L., & Haines, C. (2001). Regulation of human oviductin mRNA expression *in vivo*. *Fertility and Sterility*, *75*(5), 942–946. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)01696-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)01696-X)
- Briton-Jones, C., Lok, I. H., Cheung, C. K., Chiu, T. T. Y., Cheung, L. P., & Haines, C. (2004). Estradiol regulation of oviductin/oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid expression in human oviduct mucosal cells *in vitro*. *Fertility and Sterility*, *81 Suppl 1*(SUPPL. 1), 749–756. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2003.08.016>
- Brown, S. G., Publicover, S. J., Barratt, C. L. R., & Martins da Silva, S. J. (2019). Human sperm ion channel (dys)function: implications for fertilisation. *Human Reproduction Update*, *25*(6), 758–776. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMZ032>
- Bruggeman, S. W. M., Hulsman, D., Tanger, E., Buckle, T., Blom, M., Zevenhoven, J., van Tellingen, O., & van Lohuizen, M. (2007). Bmi1 Controls Tumor Development in an Ink4a/Arf-Independent Manner in a Mouse Model for Glioma. *Cancer Cell*, *12*(4), 328–341. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2007.08.032>
- Bruns, D. E., Mills, S. E., & Savory, J. (1982). Amylase in fallopian tube and serous ovarian neoplasms: immunohistochemical localization. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *106*(1), 17–20. <https://europepmc.org/article/med/6172088>
- Buhi, W. C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction (Cambridge, England)*, *123*(3), 355–362. <https://doi.org/10.1530/REP.0.1230355>
- Buhi, W. C., Alvarez, I. M., Choi, I., Cleaver, B. D., & Simmen, F. A. (1996). Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biology of Reproduction*, *55*(6), 1305–1314. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD55.6.1305>
- 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>
- Buhi, W. C., Alvarez, I. M., Sudhipong, V., & Dones-Smith, M. M. (1990). Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. *Biology of Reproduction*, *43*(6), 929–938. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD43.6.929>
- Buhi, W. C., Bazer, F. W., Alvarez, I. M., Mirando, M. A., & Buhi, W. C. (1991). *In Vitro* Synthesis of Oviductal Proteins Associated with Estrus and 17 $\beta$ -Estradiol-Treated Ovariectomized Ewes. *Endocrinology*, *128*(6), 3086–3095. <https://doi.org/10.1210/ENDO-128-6-3086>
- Buhi, W. C., O'Brien, B., Alvarez, I. M., Erdos, G., & Dubois, D. (1993). Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biology of Reproduction*, *48*(6), 1274–1283. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD48.6.1274>
- Buhi, W. C., Vallet, J. L., & Bazer, F. W. (1989). De novo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture. *The Journal of Experimental Zoology*, *252*(1), 79–88. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402520111>

- Bulut-Karslioglu, A., Macrae, T. A., Osés-Prieto, J. A., Covarrubias, S., Percharde, M., Ku, G., Diaz, A., McManus, M. T., Burlingame, A. L., & Ramalho-Santos, M. (2018). The Transcriptionally Permissive Chromatin State of Embryonic Stem Cells Is Acutely Tuned to Translational Output. *Cell Stem Cell*, 22(3), 369-383.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.004>
- 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. *The Journal of Cell Biology*, 197(1), 37-44. <https://doi.org/10.1083/JCB.201112094>
- Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M. F. G., & Boot, R. G. (2007). Evolution of Mammalian Chitinase(-Like) Members of Family 18 Glycosyl Hydrolases. *Genetics*, 177(2), 959-970. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.107.075846>
- Bustamante-Marin, X. M., Horani, A., Stoyanova, M., Charng, W.-L., Bottier, M., Sears, P. R., Daniels, L. A., Bowen, H., Conrad, D. F., Knowles, M. R., Ostrowski, L. E., Zariwala, M. A., & Dutcher, S. K. (2019). Mutation of CFAP57 causes primary ciliary dyskinesia by disrupting the asymmetric targeting of a subset of ciliary inner dynein arms. *BioRxiv*, 773028. <https://doi.org/10.1101/773028>
- Butler, H. (1970). The formation of the allantoic placenta in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Zeitschrift Fur Anatomie Und Entwicklungsgeschichte*, 131(1), 68-85. <https://doi.org/10.1007/BF00518816>
- Cadwell, K., Liu, J. Y., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J. K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J. A., Hunt, S., Stone, C. D., Brunt, E. M., Xavier, R. J., Sleckman, B. P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T. S., & Virgin IV, H. W. (2008). A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 456(7219), 259-263. <https://doi.org/10.1038/NATURE07416>
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J. (2021). eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Molecular Biology and Evolution*, 38(12), 5825-5829. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB293>
- Cao, L., Tan, W., Chen, W., Huang, H., He, M., Li, Q., Zhu, X., & Wang, L. (2021). CTRP4 acts as an anti-inflammatory factor in macrophages and protects against endotoxemic shock. *European Journal of Immunology*, 51(2), 380-392. <https://doi.org/10.1002/EJI.202048617>
- Cao, Q., Zhao, C., Zhang, X., Zhang, H., Lu, Q., Wang, C., Hu, Y., Ling, X., Zhang, J., & Huo, R. (2020). Heterozygous mutations in ZP1 and ZP3 cause formation disorder of ZP and female infertility in human. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(15), 8557-8566. <https://doi.org/10.1111/JCMM.15482>
- Carter, S., Bischof, O., Dejean, A., & Vousden, K. H. (2007). C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nature Cell Biology* 2007 9:4, 9(4), 428-435. <https://doi.org/10.1038/ncb1562>
- Chanut, F. J. A., & Williams, A. M. (2016). The Syrian Golden Hamster Estrous Cycle: Unique Characteristics, Visual Guide to Staging, and Comparison with the Rat. *Toxicologic Pathology*, 44(1), 43-50. <https://doi.org/10.1177/0192623315607668>

- Chen, H. W., Jiang, W. S., & Tzeng, C. R. (2001). Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertility and Sterility*, 75(6), 1163–1171. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)01780-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)01780-0)
- Chen, L., Tang, H.-Y., & Kashina, A. (2021). Differential N-terminal processing of beta and gamma actin *in vivo*. *BioRxiv*, 2021.12.07.471626. <https://doi.org/10.1101/2021.12.07.471626>
- Chen, Y., Tang, H., Seibel, W., Papoian, R., Oh, K., Li, X., Zhang, J., Golczak, M., Palczewski, K., & Kiser, P. D. (2014). Identification and Characterization of Novel Inhibitors of Mammalian Aspartyl Aminopeptidase. *Molecular Pharmacology*, 86(2), 231–242. <https://doi.org/10.1124/MOL.114.093070>
- Chen, Z., Sandoval, K., & Dean, M. (2022). Endometrial glycogen metabolism during early pregnancy in mice. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/MRD.23634>
- Cheng, Q., Cao, X., Yuan, F., Li, G., & Tong, T. (2014). Knock down of WWP1 inhibits growth and induces apoptosis in hepatoma carcinoma cells through the activation of caspase3 and p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 448(3), 248–254. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.04.117>
- Choudhary, S., Janjanam, J., Kumar, S., Kaushik, J. K., & Mohanty, A. K. (2019). Structural and functional characterization of buffalo oviduct-specific glycoprotein (OVGP1) expressed during estrous cycle. *Bioscience Reports*, 39(12), 20191501. <https://doi.org/10.1042/BSR20191501/221320>
- Christian, S., Pilch, J., Akerman, M. E., Porkka, K., Laakkonen, P., & Ruoslahti, E. (2003). Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *Journal of Cell Biology*, 163(4), 871–878. <https://doi.org/10.1083/JCB.200304132>
- Chuang, H. Y., Jiang, J. K., Yang, M. H., Wang, H. W., Li, M. C., Tsai, C. Y., Jhang, Y. Y., & Huang, J. C. (2017). Aminopeptidase A initiates tumorigenesis and enhances tumor cell stemness via TWIST1 upregulation in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(13), 21266. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15072>
- Clark, N. L., Aagaard, J. E., & Swanson, W. J. (2006). Evolution of reproductive proteins from animals and plants. *Reproduction*, 131(1), 11–22. <https://doi.org/10.1530/REP.1.00357>
- Claw, K. G., George, R. D., & Swanson, W. J. (2014). Detecting coevolution in mammalian sperm-egg fusion proteins. *Molecular Reproduction and Development*, 81(6), 531–538. <https://doi.org/10.1002/MRD.22321>
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 44(Database issue), D67. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1276>
- Consortium, Gte. (2015). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science*, 348(6235), 648–660. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1262110/SUPPL\\_FILE/GTEX.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1262110/SUPPL_FILE/GTEX.SM.PDF)
- Consortium, T. U. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC1052>

- Cortell, C., Vicente, J. S., Mocé, E., Marco-Jiménez, F., & Viudes de Castro, M. P. (2010). Efficiency of repeated *in vivo* oocyte and embryo recovery after rhFSH treatment in rabbits. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 45(1), 155–159. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2008.01294.X>
- Coutinho, E. M., & Maia, H. S. (1971). The contractile response of the human uterus, fallopian tubes, and ovary to prostaglandins *in vivo*. *Fertility and Sterility*, 22(9), 539–543. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)38460-6](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)38460-6)
- Coy, P., & Avilés, M. (2010). What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biological Reviews*, 85(3), 593–605. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.2009.00117.X>
- Coy, P., Avilés, M., & Latorre Reviriego, R. (2018). Fallopian tube/oviduct. *Encyclopedia of Reproduction*, 276–281. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64400-8>
- 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 fertilisation and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), 15809–15814. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0804422105>
- Coy, P., García-Vázquez, F. A., Visconti, P. E., & Avilés, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilisation. *Reproduction (Cambridge, England)*, 144(6), 649–660. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0279>
- Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., ... Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D988–D995. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB1049>
- Current, J. Z., & Whitaker, B. D. (2020). Effects of glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine supplementation on the perivitelline space during the IVM of pig oocytes. *Reproduction, Fertility, and Development*, 32(10), 941–947. <https://doi.org/10.1071/RD20109>
- Dapper, A. L., & Wade, M. J. (2020). Relaxed Selection and the Rapid Evolution of Reproductive Genes. *Trends in Genetics*, 36(9), 640–649. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2020.06.014>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 2012 9:8, 9(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- De Mota, N., Iturrioz, X., Claperon, C., Bodineau, L., Fassot, C., Roques, B. P., Palkovits, M., & Llorens-Cortes, C. (2008). Human brain aminopeptidase A: biochemical properties and distribution in brain nuclei. *Journal of Neurochemistry*, 106(1), 416–428. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05402.X>
- Dean, M. (2019). Glycogen in the uterus and fallopian tubes is an important source of glucose during early pregnancy. *Biology of Reproduction*, 101(2), 297–305. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOZ102>



- Dean, R., & Mank, J. E. (2016). Tissue Specificity and Sex-Specific Regulatory Variation Permit the Evolution of Sex-Biased Gene Expression. *https://doi.org/10.1086/687526*, 188(3), E74–E84. <https://doi.org/10.1086/687526>
- Deanesly, R. (1960). Normal implantation in ovariectomized guinea pigs. *Nature*, 186(4721), 327–328. <https://doi.org/10.1038/186327B0>
- Delage, B., Fennell, D. A., Nicholson, L., McNeish, I., Lemoine, N. R., Crook, T., & Szlosarek, P. W. (2010). Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *International Journal of Cancer*, 126(12), 2762–2772. <https://doi.org/10.1002/IJC.25202>
- Deng, Q., Ramsköld, D., Reinius, B., & Sandberg, R. (2014). Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6167), 193–196. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1245316>
- Denker, H. W. (2000). Structural dynamics and function of early embryonic coats. *Cells, Tissues, Organs*, 166(2), 180–207. <https://doi.org/10.1159/000016732>
- DeRenzo, C., & Seydoux, G. (2004). A clean start: degradation of maternal proteins at the oocyte-to-embryo transition. *Trends in Cell Biology*, 14(8), 420–426. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2004.07.005>
- DeSelm, C. J., Miller, B. C., Zou, W., Beatty, W. L., van Meel, H., Takahata, Y., Klumperman, J., Tooze, S. A., Teitelbaum, S. L., & Virgin, H. W. (2011). Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. *Developmental Cell*, 21(5), 966–974. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2011.08.016>
- Desouza, M. M., & Murray, M. K. (1995). An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilisation and embryo development. *Endocrinology*, 136(6), 2485–2496. <https://doi.org/10.1210/ENDO.136.6.7750470>
- Despic, V., & Neugebauer, K. M. (2018). RNA tales - how embryos read and discard messages from mom. *Journal of Cell Science*, 131(5). <https://doi.org/10.1242/JCS.201996>
- Diamond, M., & Yanagimachi, R. (1970). Reproductive development in the female golden hamster in relation to spontaneous estrus. *Biology of Reproduction*, 2(2), 223–229. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD2.2.223>
- 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 (Oxford, England)*, 11(1), 212–217. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A019021>
- Dickens, C. J., Maguiness, S. D., Comer, M. T., Palmer, A., Rutherford, A. J., & Leese, H. J. (1995). Human tubal fluid: formation and composition during vascular perfusion of the fallopian tube. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 10(3), 505–508. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A135978>

- Dickens, C. J., Southgate, J., & Leese, H. J. (1993). Use of primary cultures of rabbit oviduct epithelial cells to study the ionic basis of tubal fluid formation. *Journal of Reproduction and Fertility*, *98*(2), 603–610. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0980603>
- Donnelly, K. M., Fazleabas, A. T., Verhage, H. G., Mavrogianis, P. A., & Jaffe, R. C. (1991). Cloning of a recombinant complementary DNA to a baboon (*Papio anubis*) estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *5*(3), 356–364. <https://doi.org/10.1210/MEND-5-3-356>
- Drazen, D. L., Klein, S. L., Burnett, A. L., Wallach, E. E., Crone, J. K., Huang, P. L., & Nelson, R. J. (1999). Reproductive function in female mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, *3*(5), 366–374. <https://doi.org/10.1006/NIOX.1999.0251>
- Drews, B., Milojevic, V., Giller, K., & Ulbrich, S. E. (2018). Fatty acid profile of blood plasma and oviduct and uterine fluid during early and late luteal phase in the horse. *Theriogenology*, *114*, 258–265. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.04.003>
- Durinck, S., Moreau, Y., Kasprzyk, A., Davis, S., De Moor, B., Brazma, A., & Huber, W. (2005). BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics*, *21*(16), 3439–3440. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTI525>
- Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., Kawamori, R., Fujitani, Y., & Watada, H. (2008). Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metabolism*, *8*(4), 325–332. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2008.08.009>
- El-Mounadi, K., Morales-Floriano, M. L., & Garcia-Ruiz, H. (2020). Principles, Applications, and Biosafety of Plant Genome Editing Using CRISPR-Cas9. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 56. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00056/BIBTEX>
- Erez, A., Nagamani, S. C. S., Shchelochkov, O. A., Premkumar, M. H., Campeau, P. M., Chen, Y., Garg, H. K., Li, L., Mian, A., Bertin, T. K., Black, J. O., Zeng, H., Tang, Y., Reddy, A. K., Summar, M., O'Brien, W. E., Harrison, D. G., Mitch, W. E., Marini, J. C., ... Lee, B. (2011). Requirement of argininosuccinate lyase for systemic nitric oxide production. *Nature Medicine* *2011* *17*:12, *17*(12), 1619–1626. <https://doi.org/10.1038/nm.2544>
- Eura, Y., Yanamoto, H., Arai, Y., Okuda, T., Miyata, T., & Kokame, K. (2012). Derlin-1 Deficiency Is Embryonic Lethal, Derlin-3 Deficiency Appears Normal, and Herp Deficiency Is Intolerant to Glucose Load and Ischemia in Mice. *PLOS ONE*, *7*(3), e34298. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0034298>
- Evans, J. P. (2020). Preventing polyspermy in mammalian eggs—Contributions of the membrane block and other mechanisms. *Molecular Reproduction and Development*, *87*(3), 341–349. <https://doi.org/10.1002/MRD.23331>
- Fahrenkamp, E., Algarra, B., & Jovine, L. (2020). Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy. *Molecular Reproduction and Development*, *87*(3), 326–340. <https://doi.org/10.1002/MRD.23320>

- Fan, Z., Li, W., Lee, S. R., Meng, Q., Shi, B., Bunch, T. D., White, K. L., Kong, I. K., & Wang, Z. (2014). Efficient gene targeting in golden Syrian hamsters by the CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0109755>
- Farley, B. M., & Ryder, S. P. (2008). Regulation of maternal mRNAs in early development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(2), 135–162. <https://doi.org/10.1080/10409230801921338>
- Fazleabas, A. T., & Verhage, H. G. (1986). The detection of oviduct-specific proteins in the baboon (*Papio anubis*). *Biology of Reproduction*, 35(2), 455–462. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD35.2.455>
- Feliciano, A., Castellvi, J., Artero-Castro, A., Leal, J. A., Romagosa, C., Hernández-Losa, J., Peg, V., Fabra, A., Vidal, F., Kondoh, H., Ramón y Cajal, S., & Lleona, M. E. (2013). miR-125b Acts as a Tumor Suppressor in Breast Tumorigenesis via Its Novel Direct Targets ENPEP, CK2- $\alpha$ , CCNJ, and MEGF9. *PLOS ONE*, 8(10), e76247. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076247>
- Feng, S., Su, Y., Luo, L., Jing, F., & Yi, Q. (2018). Serum levels of C1q/tumor necrosis factor-related protein-1 in children with Kawasaki disease. *Pediatric Research* 2018 83:5, 83(5), 999–1003. <https://doi.org/10.1038/pr.2018.16>
- Ferguson, E. M., & Leese, H. J. (2006). A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 73(9), 1195–1201. <https://doi.org/10.1002/MRD.20494>
- Fernández-Hernández, P., Marinero, F., Sánchez-Calabuig, M. J., García-Marín, L. J., Bragado, M. J., González-Fernández, L., & Macías-García, B. (2021). The Proteome of Equine Oviductal Fluid Varies Before and After Ovulation: A Comparative Study. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.694247>
- Ferris, P. J., Pavlovic, C., Fabry, S., & Goodenough, U. W. (1997). Rapid evolution of sex-related genes in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16), 8634–8639. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.16.8634>
- Finseth, F. R., & Harrison, R. G. (2018). Genes integral to the reproductive function of male reproductive tissues drive heterogeneity in evolutionary rates in Japanese quail. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(1), 39–51. <https://doi.org/10.1534/G3.117.300095/-/DC1>
- Fitzgerald, K. M., & Zucker, I. (1976). Circadian organization of the estrous cycle of the golden hamster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(8), 2933–2927. <https://doi.org/10.1073/PNAS.73.8.2923>
- Flynn, N. E., Meininger, C. J., Haynes, T. E., & Wu, G. (2002). The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(9), 427–438. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00273-1](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00273-1)
- Fuentes-Paredes, F., Mendoza-Yanavilca, R. A., Rivera-Rodríguez, R., & Vara-Márquez, M. D. (2010). *Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: Conejo*. [postmaster@ins.gob.pe](mailto:postmaster@ins.gob.pe)

- Fujii, K., Shi, Z., Zhulyn, O., Denans, N., & Barna, M. (2017). Pervasive translational regulation of the cell signalling circuitry underlies mammalian development. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS14443>
- Funkhouser, J. D., & Aronson, N. N. (2007). Chitinase family GH18: Evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-96/FIGURES/8>
- Gańska, E. ;, Wrzeczńska, M. ;, Kowalczyk, A. ;, & Araujo, J. P. (2022). Reproductive Consequences of Electrolyte Disturbances in Domestic Animals. *Biology* 2022, Vol. 11, Page 1006, 11(7), 1006. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11071006>
- Gammie, S. C., & Nelson, R. J. (1999). Maternal aggression is reduced in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(18), 8027–8035. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-08027.1999>
- Gandolfi, F. (1995). Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. *Microscopy Research and Technique*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/JEMT.1070320102>
- Gandolfi, F., Brevini, T. A. L., Richardson, L., Brown, C. R., & Moor, R. M. (1989). Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development (Cambridge, England)*, 106(2), 303–312. <https://doi.org/10.1242/DEV.106.2.303>
- Gandolfi, F., Modena, S., Brevini, T. A., Galli, C., Moor, R. M., & Lauria, A. (1991). Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *European Journal of Basic and Applied Histochemistry*, 35(4), 383–392. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1801932/>
- Ganguly, S., & Unisa, S. (2010). Trends of Infertility and Childlessness in India: Findings from NFHS Data. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, 2(2), 131. </pmc/articles/PMC4188020/>
- Gao, J., Marc, Y., Iturrioz, X., Leroux, V., Balavoine, F., & Llorens-Cortes, C. (2014). A new strategy for treating hypertension by blocking the activity of the brain renin–angiotensin system with aminopeptidase A inhibitors. *Clinical Science*, 127(3), 135–148. <https://doi.org/10.1042/CS20130396>
- García, M. L., Blasco, A., & Argente, M. J. (2016). Embryologic changes in rabbit lines selected for litter size variability. *Theriogenology*, 86(5), 1247–1250. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.065>
- 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>
- García-Domínguez, X., Marco-Jiménez, F., Viudes-de-Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2019). Minimally invasive embryo transfer and embryo vitrification at the optimal embryo stage in rabbit model. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(147). <https://doi.org/10.3791/58055>

- Gardner, A. J., & Evans, J. P. (2005). Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(2), 53–61. <https://doi.org/10.1071/RD05122>
- Gardner, D. K., & Lane, M. (1993). Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biology of Reproduction*, 48(2), 377–385. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD48.2.377>
- Gardner, D. K., & Lane, M. (1996). Alleviation of the “2-cell block” and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 11(12), 2703–2712. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A019195>
- Gardner, D. K., Lane, M., & Batt, P. (1993). Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed *in vivo*. *Molecular Reproduction and Development*, 36(3), 313–319. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080360305>
- Gardner, D. K., Lane, M., Calderon, I., & Leeton, J. (1996). Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and Sterility*, 65(2), 349–353. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)58097-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)58097-2)
- Gardner, D. K., & Leese, H. J. (1990). Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(1), 361–368. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0880361>
- Gatien, J., Mermillod, P., Tsikis, G., Bernardi, O., Idrissi, S. J., Uzbekov, R., Le Bourhis, D., Salvetti, P., Almiñana, C., & Saint-Dizier, M. (2019). Metabolomic Profile of Oviductal Extracellular Vesicles across the Estrous Cycle in Cattle. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 6339, 20(24), 6339. <https://doi.org/10.3390/IJMS20246339>
- Geng, F., Wenzel, S., & Tansey, W. P. (2012). Ubiquitin and Proteasomes in Transcription. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Biochem-052110-120012>, 81, 177–201. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-052110-120012>
- George, F. W., & Wilson, J. D. (1978). Estrogen formation in the early rabbit embryo. *Science (New York, N.Y.)*, 199(4325), 200–201. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.579477>
- 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 proteome. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 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 (Cambridge, England)*, 144(17), 3031–3041. <https://doi.org/10.1242/DEV.149989>
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84–97. <https://doi.org/10.1002/BDRB.20106>

- Gomis-Rüth, F. X., Trillo-Muyo, S., & Stöcker, W. (2012). Functional and structural insights into astacin metallopeptidases. *Biological Chemistry*, 393(10), 1027–1041. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2012-0149/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Gonzales, D. S., Boatman, D. E., & Bavister, B. D. (1996). Kinematics of Trophectoderm Projections and Locomotion in the Peri-Implantation Hamster Blastocyst. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 2, 0–5. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199604\)205:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199604)205:4)
- González Brusi, L. (2021). El oviducto: análisis transcriptómico, identificación de proteínas secretadas y aplicaciones en reproducción artificial [Universidad de Murcia]. In *Proyecto de investigación*: <http://hdl.handle.net/10201/110782>
- González-Brusi, L., Algarra, B., Moros-Nicolás, C., Izquierdo-Rico, M. J., Avilés, M., & Jiménez-Movilla, M. (2020). A Comparative View on the Oviductal Environment during the Periconception Period. *Biomolecules*, 10(12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/BIOM10121690>
- González-Fernández, L., Sánchez-Calabuig, M. J., Calle-Guisado, V., García-Marín, L. J., Bragado, M. J., Fernández-Hernández, P., Gutiérrez-Adán, A., & Macías-García, B. (2020). Stage-specific metabolomic changes in equine oviductal fluid: New insights into the equine fertilisation environment. *Theriogenology*, 143, 35–43. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.11.035>
- Gott, A. L., Gray, S. M., James, A. F., & Leese, H. J. (1988). The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. *Biology of Reproduction*, 39(4), 758–763. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD39.4.758>
- Gouge, R. C., Marshburn, P., Gordon, B. E., Nunley, W., & Huet-Hudson, Y. M. (1998). Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biology of Reproduction*, 58(4), 875–879. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD58.4.875>
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221–224. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSP259>
- Greenwald, G. S. (1985). Endocrinology of the Pregnant Hamster. In H. Siegel (Ed.), *The Hamster* (pp. 53–72). Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0815-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0815-8_3)
- Griffiths, G. S., Miller, K. A., Galileo, D. S., & Martin-DeLeon, P. A. (2008). Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(3), 293–301. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0340>
- Grinstein, E., & Mahotka, C. (2009). Stem cell divisions controlled by the proto-oncogene BMI-1. *Journal of Stem Cells*, 4(3), 141–146. <https://europepmc.org/article/med/20232599>
- Grippo, A. A., Henault, M. A., Anderson, S. H., & Killian, G. J. (1992). Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *Journal of Dairy Science*, 75(1), 58–65. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(92\)77738-8](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(92)77738-8)

- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, *32*(18), 2847–2849. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTW313>
- Guérin, P., & Ménézo, Y. (1995). Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. *Zygote (Cambridge, England)*, *3*(4), 333–343. <https://doi.org/10.1017/S0967199400002768>
- Guérin, P., Rosset, E., Rey, M., Febvay, G., Bruyère, P., Corrao, N., Neto, V., & Buff, S. (2012). Amino acids in cat fallopian tube and follicular fluids. *Theriogenology*, *77*(3), 558–562. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.08.031>
- Guerri, G., Maniscalchi, T., Barati, S., Busetto, G. M., Del Giudice, F., De Berardinis, E., Cannarella, R., Calogero, A. E., & Bertelli, M. (2019). Non-syndromic monogenic male infertility. *Acta Bio-Medica : Atenei Parmensis*, *90*(10-S), 62–67. <https://doi.org/10.23750/ABM.V90I10-S.8762>
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, *52*(5), 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Hachen, A., Jewgenow, K., & Braun, B. C. (2012). Sequence analysis of feline oviductin and its expression during the estrous cycle in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, *77*(3), 539–549. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.08.029>
- Hadjadj, I., Hankele, A. K., Armero, E., Argente, M. J., & García, M. de la L. (2021). Fatty Acid Profile of Blood Plasma at Mating and Early Gestation in Rabbit. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/ANI11113200>
- Haerty, W., Jagadeeshan, S., Kulathinal, R. J., Wong, A., Ram, K. R., Sirot, L. K., Levesque, L., Artieri, C. G., Wolfner, M. F., Civetta, A., & Singh, R. S. (2007). Evolution in the Fast Lane: Rapidly Evolving Sex-Related Genes in *Drosophila*. *Genetics*, *177*(3), 1321–1335. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.107.078865>
- Hakala, B. E., White, C., & Recklies, A. D. (1993). Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(34), 25803–25810. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)74461-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)74461-5)
- Hannigan, M. M., Hoffman, A. M., Thompson, J. W., Zheng, T., & Nicchitta, C. V. (2020). Quantitative Proteomics Links the LRR59 Interactome to mRNA Translation on the ER Membrane. *Molecular and Cellular Proteomics*, *19*(11), 1826–1849. <https://doi.org/10.1074/MCP.RA120.002228/ATTACHMENT/8A5E0E19-3BDC-43A4-9E0A-960D3587C38B/MMC1.PDF>
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* *2006* *441*:7095, *441*(7095), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature04724>

- Harcourt-Brown, F. M. (2017). Disorders of the Reproductive Tract of Rabbits. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 20(2), 555–587. <https://doi.org/10.1016/J.CVEX.2016.11.010>
- Harper, M. J., Dowd, D., & Elliott, A. S. (1969). Implantation and embryonic development in the ovariectomized-adrenalectomized hamster. *Biology of Reproduction*, 1(3), 253–257. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD1.3.253>
- Harris, S. E., Gopichandran, N., Picton, H. M., Leese, H. J., & Orsi, N. M. (2005). Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology*, 64(4), 992–1006. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.01.004>
- Hayashi, Y., Fukayama, M., Koike, M., & Nakayama, T. (1986). Amylase in human lungs and the female genital tract. *Histochemistry* 1986 85:6, 85(6), 491–496. <https://doi.org/10.1007/BF00508431>
- He, B., Feng, Q., Mukherjee, A., Lonard, D. M., DeMayo, F. J., Katzenellenbogen, B. S., Lydon, J. P., & O'Malley, B. W. (2008). A Repressive Role for Prohibitin in Estrogen Signaling. *Molecular Endocrinology*, 22(2), 344–360. <https://doi.org/10.1210/ME.2007-0400>
- Hefler, L. A., Reyes, C. A., O'Brien, W. E., & Gregg, A. R. (2001). Perinatal Development of Endothelial Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice. *Biology of Reproduction*, 64(2), 666–673. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD64.2.666>
- Hellberg, M. E., & Vacquier, V. D. (1999). Rapid evolution of fertilisation selectivity and lysin cDNA sequences in teguline gastropods. *Molecular Biology and Evolution*, 16(6), 839–848. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A026168>
- Hendrix, E., Hewetson, A., Mansharamani, M., & Chilton, B. S. (2001). Oviductin (Muc9) is expressed in rabbit endocervix. *Endocrinology*, 142(5), 2151–2154. <https://doi.org/10.1210/ENDO.142.5.8285>
- Hewitson, L. C., & Leese, H. J. (1993). Energy metabolism of the trophectoderm and inner cell mass of the mouse blastocyst. *Journal of Experimental Zoology*, 267(3), 337–343. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402670310>
- Higuchi, C., Shimizu, N., Shin, S. W., Morita, K., Nagai, K., Anzai, M., Kato, H., Mitani, T., Yamagata, K., Hosoi, Y., Miyamoto, K., & Matsumoto, K. (2018). Ubiquitin-proteasome system modulates zygotic genome activation in early mouse embryos and influences full-term development. *The Journal of Reproduction and Development*, 64(1), 65–74. <https://doi.org/10.1262/JRD.2017-127>
- Hill, J. L., Wade, M. G., Nancarrow, C. D., Kelleher, D. L., & Boland, M. P. (1997). Influence of ovine oviducal amino acid concentrations and an ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 47, 164–165. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/3087352>
- Hill, J. L., Walker, S. K., Brown, G. H., & Nancarrow, C. D. (1996a). The effects of an estrus-associated oviductal glycoprotein on the *in vitro* fertilisation and development of ovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 46(8), 1379–1388. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00317-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00317-2)



- Hill, J. L., Walker, S. K., Brown, G. H., & Nancarrow, C. D. (1996b). The effects of an ovine oviductal estrus-associated glycoprotein on early embryo development. *Theriogenology*, *46*(8), 1367–1377. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00316-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00316-0)
- Hirano, K., Miki, Y., Hirai, Y., Sato, R., Itoh, T., Hayashi, A., Yamanaka, M., Eda, S., & Beppu, M. (2005). A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(47), 39284–39293. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505275200>
- Hirose, M., Honda, A., Fulka, H., Tamura-Nakano, M., Matoba, S., Tomishima, T., Mochida, K., Hasegawa, A., Nagashima, K., Inoue, K., Ohtsuka, M., Baba, T., Yanagimachi, R., & Ogura, A. (2020). Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(5), 2513–2518. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1917595117/SUPPL\\_FILE/PNAS.1917595117.SM03.MP4](https://doi.org/10.1073/PNAS.1917595117/SUPPL_FILE/PNAS.1917595117.SM03.MP4)
- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S. C., Neuber, O., & Sommer, T. (2009). The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature*, *458*(7237), 453–460. <https://doi.org/10.1038/NATURE07962>
- Hoffman, A. M., Chen, Q., Zheng, T., & Nicchitta, C. V. (2019). Heterogeneous translational landscape of the endoplasmic reticulum revealed by ribosome proximity labeling and transcriptome analysis. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(22), 8942–8958. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.007996/ATTACHMENT/OC3D544D-E5CF-45FA-B77C-88B7FF46DDF4/MMC1.ZIP>
- Hoffman, L. H., Olson, G. E., Carson, D. D., & Chilton, B. S. (1998). Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology*, *139*(1), 266–271. <https://doi.org/10.1210/ENDO.139.1.5750>
- Holmes, R. S., Spradling Reeves, K. D., & Cox, L. A. (2017). Mammalian Glutamyl Aminopeptidase Genes (ENPEP) and Proteins: Comparative Studies of a Major Contributor to Arterial Hypertension. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, *8*(2). <https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000211>
- Holt, W. V., & Fazeli, A. (2010). The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Molecular Reproduction and Development*, *77*(11), 934–943. <https://doi.org/10.1002/MRD.21234>
- Home, P., Ray, S., Dutta, D., Bronshteyn, I., Larson, M., & Paul, S. (2009). GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(42), 28729–28737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016840>
- Hoppe, R. W., & Bavister, B. D. (1984). Evaluation of the fluorescein diacetate (FDA) vital dye viability test with hamster and bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, *6*(4), 323–335. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(84\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0378-4320(84)90010-1)
- Horvath, P. M., Kellom, T., Caulfield, J., & Boldt, J. (1993). Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Molecular Reproduction and Development*, *34*(1), 65–72. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080340111>

- Hovanessian, A. G., Soundaramourty, C., El Khoury, D., Nondier, I., Svab, J., & Krust, B. (2010). Surface Expressed Nucleolin Is Constantly Induced in Tumor Cells to Mediate Calcium-Dependent Ligand Internalization. *PLOS ONE*, 5(12), e15787. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015787>
- Howard, G. C., & Tansey, W. P. (2016). Interaction of Gcn4 with target gene chromatin is modulated by proteasome function. *Molecular Biology of the Cell*, 27(17), 2735–2741. <https://doi.org/10.1091/MBC.E16-03-0192/ASSET/IMAGES/LARGE/MBC-27-2735-G004.JPEG>
- Hribal, R., Hachen, A., Jewgenow, K., Zahmel, J., Fernandez-Gonzalez, L., & Braun, B. C. (2014). The influence of recombinant feline oviductin on different aspects of domestic cat (*Felis catus*) IVF and embryo quality. *Theriogenology*, 82(5), 742–749. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2014.06.009>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* 2013 31:9, 31(9), 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Hu, B., Trinh, K., Figueira, W. F., & Price, P. A. (1996). Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19415–19420. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19415>
- 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 (Oxford, England)*, 19(12), 2907–2912. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEH520>
- Huang, P. L. (1999). Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 32(11), 1353–1359. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1999001100005>
- Huang, P. L. (2000). Lessons learned from nitric oxide synthase knockout animals. *Seminars in Perinatology*, 24(1), 87–90. [https://doi.org/10.1016/S0146-0005\(00\)80064-6](https://doi.org/10.1016/S0146-0005(00)80064-6)
- Huang, P. L., & Lo, E. H. (1998). Genetic analysis of NOS isoforms using nNOS and eNOS knockout animals. *Progress in Brain Research*, 118, 13–25. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)63197-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63197-0)
- Huang, Q. S., Xie, X. L., Liang, G., Gong, F., Wang, Y., Wei, X. Q., Wang, Q., Ji, Z. L., & Chen, Q. X. (2012). The GH18 family of chitinases: their domain architectures, functions and evolutions. *Glycobiology*, 22(1), 23–34. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWR092>
- Huang, Z., Wang, T. S., Zhao, Y. C., Zuo, R. J., Deng, W. B., Chi, Y. J., & Yang, Z. M. (2014). Cyclic adenosine monophosphate-induced argininosuccinate synthase 1 expression is essential during mouse decidualization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 388(1–2), 20–31. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2014.02.005>

- Hugentobler, S. A., Diskin, M. G., Leese, H. J., Humpherson, P. G., Watson, T., Sreenan, J. M., & Morris, D. G. (2007). Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Molecular Reproduction and Development*, *74*(4), 445–454. <https://doi.org/10.1002/MRD.20607>
- Hugentobler, S. A., Humpherson, P. G., Leese, H. J., Sreenan, J. M., & Morris, D. G. (2008). Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Molecular Reproduction and Development*, *75*(3), 496–503. <https://doi.org/10.1002/MRD.20760>
- 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. (1994). Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development*, *39*(2), 176–181. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080390209>
- Hunter, R. H. F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *87*(1), 244–255. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.2011.00196.X>
- Hunter, R. H. F., Cicinelli, E., & Einer-Jensen, N. (2007). Peritoneal fluid as an unrecognised vector between female reproductive tissues. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *86*(3), 260–265. <https://doi.org/10.1080/00016340601155098>
- Hunter, R. H. F., Fléchon, B., & Fléchon, J. E. (1991). Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue & Cell*, *23*(5), 641–656. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(91\)90020-T](https://doi.org/10.1016/0040-8166(91)90020-T)
- Hunter, R. H. F., Vajta, G., & Hyttel, P. (1998). Long-term stability of the bovine block to polyspermy. *The Journal of Experimental Zoology*, *280*(2), 182–188. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19980201\)280:2<182::aid-jez9>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19980201)280:2<182::aid-jez9>3.0.co;2-k)
- Hussain, M., & Wilson, J. B. (2013). New Paralogues and Revised Time Line in the Expansion of the Vertebrate GH18 Family. *Journal of Molecular Evolution* *2013* *76*:4, *76*(4), 240–260. <https://doi.org/10.1007/S00239-013-9553-4>
- Husson, A., Brasse-Lagnel, C., Fairand, A., Renouf, S., & Lavoine, A. (2003). Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline–NO cycle. *European Journal of Biochemistry*, *270*(9), 1887–1899. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2003.03559.X>
- Hwang, T. S., & Song, J. (2004). Morphometrical changes of the human uterine tubes according to aging and menstrual cycle. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, *186*(3), 263–269. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(04\)80014-1](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(04)80014-1)

- Ichimura, T., Shindo, Y., Uda, Y., Ohsumi, T., Omata, S., & Sugano, H. (1993). Anti-(p34 protein) antibodies inhibit ribosome binding to and protein translocation across the rough microsomal membrane. *FEBS Letters*, *326*(1–3), 241–245. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81799-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81799-6)
- Iglesias, A. R., Kindlund, E., Tammi, M., & Wadelius, C. (2004). Some microsatellites may act as novel polymorphic cis-regulatory elements through transcription factor binding. *Gene*, *341*(1–2), 149–165. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2004.06.035>
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., & Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, *434*(7030), 234–238. <https://doi.org/10.1038/NATURE03362>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakamura, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, *169*(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/JB.169.12.5429-5433.1987>
- Isotani, A., Matsumura, T., Ogawa, M., Tanaka, T., Yamagata, K., Ikawa, M., & Okabe, M. (2017). A delayed sperm penetration of cumulus layers by disruption of acrosin gene in rats. *Biology of Reproduction*, *97*(1), 61–68. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOX066>
- Israel, S., Ernst, M., Psathaki, O. E., Drexler, H. C. A., Casser, E., Suzuki, Y., Makalowski, W., Boiani, M., Fuellen, G., & Taher, L. (2019). An integrated genome-wide multi-omics analysis of gene expression dynamics in the preimplantation mouse embryo. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-49817-3>
- Ito, S., Sakai, A., Nomura, T., Miki, Y., Ouchida, M., Sasaki, J., & Shimizu, K. (2001). A Novel WD40 Repeat Protein, WDC146, Highly Expressed during Spermatogenesis in a Stage-Specific Manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *280*(3), 656–663. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.4163>
- Itze-Mayrhofer, C., & Brem, G. (2020). Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: Female reproductive fluids. *Journal of Proteomics*, *225*. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2020.103884>
- Izquierdo-Rico, M. J., Jiménez-Movilla, M., Llop, E., Pérez-Oliva, A. B., Ballesta, J., Gutiérrez-Gallego, R., Jiménez-Cervantes, C., & Avilés, M. (2009). Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *Journal of Proteome Research*, *8*(2), 926–941. <https://doi.org/10.1021/PR800568X>
- Jablonka-Shariff, A., Ravi, S., Beltsos, A. N., Murphy, L. L., & Olson, L. M. (1999). Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biology of Reproduction*, *61*(1), 171–177. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD61.1.171>
- Jankovic, S. M., Protic, B. A., & Jankovic, S. V. (2004). Contractile effect of acetylcholine on isolated isthmic segment of fallopian tubes. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, *26*(2), 87–91. <https://doi.org/10.1358/MF.2004.26.2.800059>

- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, *43*(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2002.02839.X>
- Jawad, E. S., & Saeed, M. N. (2020). Screening of CD8 Gene in Females with Idiopathic Infertility: A Cross Sectional Study in Thi-Qar. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, *7*(2), 38–42. <https://doi.org/10.31838/ejmcm.07.02.05>
- Jiménez-Movilla, M., Martínez-Alonso, E., Castells, M. T., Izquierdo-Rico, M. J., Saavedra, M. D., Gutiérrez-Gallego, R., Fayrer-Hosken, R., Ballesta, J., & Avilés, M. (2009). Cytochemical and biochemical evidences for a complex tridimensional structure of the hamster zona pellucida. *Histology and Histopathology*, *24*(5), 599–609. <https://doi.org/10.14670/HH-24.599>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829>
- Johnson, A. D., & Foley, C. W. (1974). *The Oviduct and its functions*. (A. D. Johnson & C. W. Foley (eds.)). Academic Press.
- Jung, H. S., Chung, K. W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y. H., Kang, T. M., Yoon, K. H., Kim, J. W., Jeong, Y. T., Han, M. S., Lee, M. K., Kim, K. W., Shin, J., & Lee, M. S. (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metabolism*, *8*(4), 318–324. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2008.08.013>
- Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V. C., Borràs, F. E., Breakefield, X., Budnik, V., Buzas, E., Camussi, G., Clayton, A., Cocucci, E., Falcon-Perez, J. M., Gabrielsson, S., Ghossein, Y. S., Gupta, D., Harsha, H. C., ... Mathivanan, S. (2012). Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLOS Biology*, *10*(12), e1001450. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001450>
- Kan, F. W. K., & Esperanzate, P. W. B. (2006). Surface mapping of binding of oviductin to the plasma membrane of golden hamster spermatozoa during *in vitro* capacitation and acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development*, *73*(6), 756–766. <https://doi.org/10.1002/MRD.20459>
- Kan, F. W. K., & Roux, E. (1995). Elaboration of an oviductin by the oviductal epithelium in relation to embryo development as visualized by immunocytochemistry. *Microscopy Research and Technique*, *31*(6), 478–487. <https://doi.org/10.1002/JEMT.1070310604>
- Kan, F. W. K., Roux, E., & Bleau, G. (1993). Immunolocalization of oviductin in endocytic compartments in the blastomeres of developing embryos in the golden hamster. *Biology of Reproduction*, *48*(1), 77–88. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD48.1.77>
- Kan, F. W. K., Roux, E., St.-Jacques, S., & Bleau, G. (1990). Demonstration by lectin-gold cytochemistry of transfer of glycoconjugates of oviductal origin to the zona pellucida of oocytes after ovulation in hamsters. *The Anatomical Record*, *226*(1), 37–47. <https://doi.org/10.1002/AR.1092260106>

- Kan, F. W. K., St-Jacques, S., & Bleau, G. (1988). Immunoelectron microscopic localization of an oviductal antigen in hamster zona pellucida by use of a monoclonal antibody. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 36(11), 1441–1447. <https://doi.org/10.1177/36.11.3171167>
- Kan, F. W. K., St-Jacques, S., & Bleau, G. (1989). Immunocytochemical evidence for the transfer of an oviductal antigen to the zona pellucida of hamster ova after ovulation. *Biology of Reproduction*, 40(3), 585–598. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD40.3.585>
- Kane, M. T. (1979). Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. *Biology of Reproduction*, 20(2), 323–332. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD20.2.323>
- Kashi, Y., King, D., & Soller, M. (1997). Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics: TIG*, 13(2), 74–78. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)01008-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01008-1)
- Khan IA, Mort M, Buckland PR, O'Donovan MC, Cooper DN, Chuzhanova NA. (2006). In silico discrimination of single nucleotide polymorphisms and pathological mutations in human gene promoter regions by means of local DNA sequence context and regularity. *In Silico Biol.*, 6(1-2):23-34. PMID: 16789908.
- Kapur, R. P., & Johnson, L. V. (1985). An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Developmental Biology*, 112(1), 89–93. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90122-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90122-8)
- Kapur, R. P., & Johnson, L. V. (1986). Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *The Journal of Experimental Zoology*, 238(2), 249–260. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402380215>
- Kasper, J. S., Arai, T., & DeCaprio, J. A. (2006). A novel p53-binding domain in CUL7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(1), 132–138. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2006.07.013>
- Kato, N., Takeuchi, F., Tabara, Y., Kelly, T. N., Go, M. J., Sim, X., Tay, W. T., Chen, C. H., Zhang, Y., Yamamoto, K., Katsuya, T., Yokota, M., Kim, Y. J., Ong, R. T. H., Nabika, T., Gu, D., Chang, L. C., Kokubo, Y., Huang, W., ... He, J. (2011). Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nature Genetics* 2011 43:6, 43(6), 531–538. <https://doi.org/10.1038/ng.834>
- Killian, G. (2011). Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. *Journal of Animal Science*, 89(5), 1315–1322. <https://doi.org/10.2527/JAS.2010-3349>
- Killian, G. J. (2004). Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilisation and embryo development. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 141–153. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.04.028>

- Kim, R. N., Kim, D. W., Choi, S. H., Chae, S. H., Nam, S. H., Kim, D. W., Kim, A., Kang, A., Park, K. H., Lee, Y. S., Hirai, M., Suzuki, Y., Sugano, S., Hashimoto, K., Kim, D. S., & Park, H. S. (2011). Major chimpanzee-specific structural changes in sperm development-associated genes. *Functional & Integrative Genomics*, *11*(3), 507–517. <https://doi.org/10.1007/S10142-011-0220-9>
- King, R. S., Anderson, S. H., & Killian, G. J. (1994). Effect of Bovine Oviductal Estrus-Associated Protein on the Ability of Sperm to Capacitate and Fertilize Oocytes. *Journal of Andrology*, *15*(5), 468–478. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.1994.TB00482.X>
- Kitagawa, T., & Niimura, S. (2006). Relationship between the size of perivitelline space and the incidence of polyspermy in porcine oocytes. *Niigata-u.Repo.Nii.Ac.Jp*. Retrieved December 28, 2022, from [https://niigata-u.repo.nii.ac.jp/record/28435/file\\_preview/17\\_0049.pdf](https://niigata-u.repo.nii.ac.jp/record/28435/file_preview/17_0049.pdf)
- Komiya, H., Onuma, T., Hiroi, M., & Araki, Y. (1996). In situ localization of messenger ribonucleic acid for an oviduct-specific glycoprotein during various hormonal conditions in the golden hamster. *Biology of Reproduction*, *55*(5), 1107–1118. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD55.5.1107>
- Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C. R., Shimizu, K., Hsieh, A. C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., & Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell*, *145*(3), 383–397. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.028>
- Körschgen, H., Kuske, M., Karmilin, K., Yiallourous, I., Balbach, M., Floehr, J., Wachten, D., Jahnen-Dechent, W., & Stöcker, W. (2017). Intracellular activation of ovastacin mediates pre-fertilisation hardening of the zona pellucida. *Molecular Human Reproduction*, *23*(9), 607–616. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAX040>
- Kouba, A. J., Abeydeera, L. R., Alvarez, I. M., Day, B. N., & Buhi, W. C. (2000). Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilisation, polyspermy, and embryonic development *in vitro*. *Biology of Reproduction*, *63*(1), 242–250. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD63.1.242>
- Koutsourakis, M., Langeveld, A., Patient, R., Beddington, R., & Grosveld, F. (1999). The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development*, *126*(4), 723–732. <https://doi.org/10.1242/DEV.126.4.723>
- Kranc, W., Jankowski, M., Budna, J., Celichowski, P., Khozmi, R., Bryja, A., Borys, S., Dyszkiewicz-Konwińska, M., Jeseta, M., Magas, M., Bukowska, D., Antosik, P., Brüssow, K. P., Bruska, M., Nowicki, M., Zabel, M., & Kempisty, B. (2018). Amino acids metabolism and degradation is regulated during porcine oviductal epithelial cells (OECs) primary culture *in vitro* – A signaling pathways activation approach. *Medical Journal of Cell Biology*, *6*(1), 18–26. <https://doi.org/10.2478/ACB-2018-0004>
- Kriegsfeld, L. J., Demas, G. E., Huang, P. L., Burnett, A. L., & Nelson, R. J. (1999). Ejaculatory abnormalities in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase (eNOS<sup>-/-</sup>). *Physiology & Behavior*, *67*(4), 561–566. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(99\)00100-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(99)00100-6)

- Kruse, J. P., & Gu, W. (2009). MSL2 promotes Mdm2-independent cytoplasmic localization of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 3250–3263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805658200>
- Kubota, R., Numaguchi, Y., Ishii, M., Niwa, M., Okumura, K., Naruse, K., & Murohara, T. (2010). Ischemia-induced angiogenesis is impaired in aminopeptidase A deficient mice via down-regulation of HIF-1 $\alpha$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(2), 396–401. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.10.043>
- Kujawa, M. J., & Tepperman, K. (1983). Culturing chick muscle cells on glycosaminoglycan substrates: attachment and differentiation. *Developmental Biology*, 99(2), 277–286. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90277-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90277-4)
- Kzhyshkowska, J., Mamidi, S., Gratchev, A., Kremmer, E., Schmuttermaier, C., Krusell, L., Haus, G., Utikal, J., Schledzewski, K., Scholtze, J., & Goerdts, S. (2006). Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood*, 107(8), 3221–3228. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2005-07-2843>
- Ladstätter, S., & Tachibana, K. (2019). Genomic insights into chromatin reprogramming to totipotency in embryos. *The Journal of Cell Biology*, 218(1), 70–82. <https://doi.org/10.1083/JCB.201807044>
- Laheri, S., Ashary, N., Bhatt, P., & Modi, D. (2018). Oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) is expressed by endometrial epithelium that regulates receptivity and trophoblast adhesion. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(8), 1419–1429. <https://doi.org/10.1007/S10815-018-1231-4>
- Laine, A., & Ronai, Z. (2006). Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1. *Oncogene* 2007 26:10, 26(10), 1477–1483. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209924>
- Lamas-Toranzo, I., Guerrero-Sánchez, J., Miralles-Bover, H., Alegre-Cid, G., Pericuesta, E., & Bermejo-Álvarez, P. (2017). CRISPR is knocking on barn door. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 39–47. <https://doi.org/10.1111/RDA.13047>
- 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 (Cambridge, England)*, 154(4), 497–508. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0328>
- Lamy, J., Gatien, J., Dubuisson, F., Nadal-Desbarats, L., Salvetti, P., Mermillod, P., & Saint-Dizier, M. (2018). Metabolomic profiling of bovine oviductal fluid across the oestrous cycle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Reproduction, Fertility, and Development*, 30(7), 1021–1028. <https://doi.org/10.1071/RD17389>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.086>
- Lane, D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* 1992 358:6381, 358(6381), 15–16. <https://doi.org/10.1038/358015a0>



- Lane, M., & Gardner, D. K. (2003). Ammonium Induces Aberrant Blastocyst Differentiation, Metabolism, pH Regulation, Gene Expression and Subsequently Alters Fetal Development in the Mouse. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1109–1117. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.103.018093>
- Lapensée, L., Paquette, Y., & Bleau, G. (1997). Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertility and Sterility*, 68(4), 702–708. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00317-8)
- Latham, K. E., Garrels, J. I., Chang, C., & Solter, D. (1991). Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development (Cambridge, England)*, 112(4), 921–932. <https://doi.org/10.1242/DEV.112.4.921>
- Lavial, F., Bessonard, S., Ohnishi, Y., Tsumura, A., Chandrashekrana, A., Fenwick, M. A., Tomaz, R. A., Hosokawa, H., Nakayama, T., Chambers, I., Hiiragi, T., Chazaud, C., & Azuara, V. (2012). Bmi1 facilitates primitive endoderm formation by stabilizing Gata6 during early mouse development. *Genes & Development*, 26(13), 1445–1458. <https://doi.org/10.1101/GAD.188193.112>
- Le Cam, L., Linares, L. K., Paul, C., Julien, E., Lacroix, M., Hatchi, E., Triboulet, R., Bossis, G., Shmueli, A., Rodriguez, M. S., Coux, O., & Sardet, C. (2006). E4F1 Is an Atypical Ubiquitin Ligase that Modulates p53 Effector Functions Independently of Degradation. *Cell*, 127(4), 775–788. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.09.031>
- Léandri, R. D., Archilla, C., Bui, L. C., Peynot, N., Liu, Z., Cabau, C., Chastellier, A., Renard, J. P., & Duranthon, V. (2009). Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. *Physiological Genomics*, 36(2), 98–113. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.90310.2008>
- Lecompte, E., Aplin, K., Denys, C., Catzeflis, F., Chades, M., & Chevret, P. (2008). Phylogeny and biogeography of African Murinae based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with a new tribal classification of the subfamily. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-199/TABLES/3>
- Lee, M. T., Bonneau, A. R., & Giraldez, A. J. (2014). Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 581. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-100913-013027>
- Lee, M. T., Bonneau, A. R., Takacs, C. M., Bazzini, A. A., Divito, K. R., Fleming, E. S., & Giraldez, A. J. (2013). Nanog, Pou5f1 and SoxB1 activate zygotic gene expression during the maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 503(7476), 360–364. <https://doi.org/10.1038/NATURE12632>
- Lee, S. E., Hwang, K. C., Sun, S. C., Xu, Y. N., & Kim, N. H. (2011). Modulation of autophagy influences development and apoptosis in mouse embryos developing *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 78(7), 498–509. <https://doi.org/10.1002/MRD.21331>
- 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. (2012). Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction (Cambridge, England)*, 143(4), 417–427. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0484>
- Leese, H. J., Aldridge, S., & Jeffries, K. S. (1979). The movement of amino acids into rabbit oviductal fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, 56(2), 623–626. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0560623>
- Leese, H. J., & Barton, A. M. (1984). Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 72(1), 9–13. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0720009>
- Leese, H. J., & Gray, S. M. (1985). Vascular perfusion: a novel means of studying oviduct function. *The American Journal of Physiology*, 248(5 Pt 1). <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1985.248.5.E624>
- Leese, H. J., Hugentobler, S. A., Gray, S. M., Morris, D. G., Sturmey, R. G., Whitear, S. L., & Sreenan, J. M. (2008). Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reproduction, Fertility, and Development*, 20(1), 1–8. <https://doi.org/10.1071/RD07153>
- Leese, H. J., Tay, J. I., Reischl, J., & Downing, S. J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction (Cambridge, England)*, 121(3), 339–346. <https://doi.org/10.1530/REP.0.1210339>
- Lentscher, J. A., Colburn, Z. T., Ortogero, N., Gillette, L., Leonard, G. T., Burney, R. O., & Chow, G. E. (2021). An intrauterine genomic classifier reliably delineates the location of nonviable pregnancies. *Fertility and Sterility*, 116(1), 138–146. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2021.02.005>
- Leung, Z. C. L., Hunter, H. L. M., Rafea, A., Watson, A. J., Betts, D. H., & Rafea, B. A. (2022). Evaluating Autophagy in Preimplantation Embryos. <https://doi.org/10.1080/27694127.2022.2101335>, 1(1), 309–337. <https://doi.org/10.1080/27694127.2022.2101335>
- Léveillé, M. C., Roberts, K. D., Chevalier, S., Chapdelaine, A., & Bleau, G. (1987). Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biology of Reproduction*, 36(1), 227–238. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD36.1.227>
- Li, M., Brooks, C. L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., & Gu, W. (2003). Mono- Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2. *Science*, 302(5652), 1972–1975. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1091362/SUPPL\\_FILE/M.LI.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1091362/SUPPL_FILE/M.LI.SOM.PDF)
- Li, Q., Wang, L., Tan, W., Peng, Z., Luo, Y., Zhang, Y., Zhang, G., Na, D., Jin, P., Shi, T., Ma, D., & Wang, L. (2011). Identification of C1qTNF-related protein 4 as a potential cytokine that stimulates the STAT3 and NF-κB pathways and promotes cell survival in human cancer cells. *Cancer Letters*, 308(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2011.05.005>
- Li, R., Miao, J., Fan, Z., Song, S., Kong, I. K., Wang, Y., & Wang, Z. (2018). Production of Genetically Engineered Golden Syrian Hamsters by Pronuclear Injection of the CRISPR/Cas9 Complex. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2018(131), 56263. <https://doi.org/10.3791/56263>

- Li, R., Whitworth, K., Lai, L., Wax, D., Spate, L., Murphy, C. N., Rieke, A., Isom, C., Hao, Y., Zhong, Z., Katayama, M., Schatten, H., & Prather, R. S. (2007). Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Molecular Reproduction and Development*, *74*(9), 1228–1235. <https://doi.org/10.1002/MRD.20682>
- Li, S., & Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: roles in fertilisation and early embryo development. *The Journal of Endocrinology*, *232*(1), R1–R26. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0302>
- Li, W. H., Gojobori, T., & Nei, M. (1981). Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature*, *292*(5820), 237–239. <https://doi.org/10.1038/292237A0>
- Li, Y., Glass, Z., Huang, M., Chen, Z. Y., & Xu, Q. (2020). Ex vivo cell-based CRISPR/Cas9 genome editing for therapeutic applications. *Biomaterials*, *234*, 119711. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.119711>
- Libersky, E. A., & Boatman, D. E. (1995). Progesterone concentrations in serum, follicular fluid, and oviductal fluid of the golden hamster during the periovulatory period. *Biology of Reproduction*, *53*(3), 477–482. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD53.3.477>
- Lilley, B. N., & Ploegh, H. L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*, *429*(6994), 834–840. <https://doi.org/10.1038/NATURE02592>
- Lim, C. Y., Tam, W. L., Zhang, J., Ang, H. S., Jia, H., Lipovich, L., Ng, H. H., Wei, C. L., Sung, W. K., Robson, P., Yang, H., & Lim, B. (2008). Sall4 Regulates Distinct Transcription Circuitries in Different Blastocyst-Derived Stem Cell Lineages. *Cell Stem Cell*, *3*(5), 543–554. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.08.004>
- Ling, H., & Recklies, A. D. (2004). The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Biochemical Journal*, *380*(3), 651–659. <https://doi.org/10.1042/BJ20040099>
- Lippes, J., Enders, R. G., Pragay, D. A., & Bartholomew, W. R. (1972). The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception*, *5*(2), 85–103. [https://doi.org/10.1016/0010-7824\(72\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0010-7824(72)90021-2)
- Lippes, J., & Wagh, P. V. (1989). Human oviductal fluid (hOF) proteins. IV. Evidence for hOF proteins binding to human sperm. *Fertility and Sterility*, *51*(1), 89–94. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)60434-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60434-X)
- Lisk, R. D. (1985). Reproduction and Behavior. The estrous cycle. In H. Siegel (Ed.), *The hamster* (pp. 23–45). Springer, Boston, MA.
- Liu, W., Li, K., Bai, D., Yin, J., Tang, Y., Chi, F., Zhang, L., Wang, Y., Pan, J., Liang, S., Guo, Y., Ruan, J., Kou, X., Zhao, Y., Wang, H., Chen, J., Teng, X., & Gao, S. (2017). Dosage effects of ZP2 and ZP3 heterozygous mutations cause human infertility. *Human Genetics*, *136*(8), 975–985. <https://doi.org/10.1007/S00439-017-1822-7>

- Lok, I. H., Briton-Jones, C. M., Yuen, P. M., & Haines, C. J. (2002). Variable expression of oviductin mRNA at different stages of human reproductive cycle. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *19*(12), 569–576. <https://doi.org/10.1023/A:1021263132176>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9>
- Ludwig, T. E., Lane, M., & Bavister, B. D. (2001). Differential Effect of Hexoses on Hamster Embryo Development in Culture. *Biology of Reproduction*, *64*(5), 1366–1374. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD64.5.1366>
- Luo, Y., Wu, X., Ma, Z., Tan, W., Weng, L., Na, D., Zhang, G., Yin, A., Huang, H., Xia, D., Zhang, Y., Shi, X., & Wang, L. (2016). Expression of the novel adipokine C1qTNF-related protein 4 (CTRP4) suppresses colitis and colitis-associated colorectal cancer in mice. *Cellular & Molecular Immunology* *2016* *13*:5, *13*(5), 688–699. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.16>
- Lv, C., Xiong, M., Guo, S., Gui, Y., Liu, X., Wang, X., Wu, Y., Feng, S., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, Y., Qin, W., & Yuan, S. (2022). WDFY1, a WD40 repeat protein, is not essential for spermatogenesis and male fertility in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *596*, 71–75. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2022.01.084>
- Lyng, R., & Shur, B. D. (2009). Mouse oviduct-specific glycoprotein is an egg-associated ZP3-independent sperm-adhesion ligand. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 21), 3894–3906. <https://doi.org/10.1242/JCS.058776>
- Maddirevula, S., Coskun, S., Al-Qahtani, M., Aboyousef, O., Alhassan, S., Aldeery, M., & Alkuraya, F. S. (2021). ASTL is mutated in female infertility. *Human Genetics* *2021* *141*:1, *141*(1), 49–54. <https://doi.org/10.1007/S00439-021-02388-8>
- Malayer, J. R., Hansen, P. J., & Buhi, W. C. (1988). Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *The Journal of Experimental Zoology*, *248*(3), 345–353. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402480313>
- Malette, B., Paquette, Y., Merlen, Y., & Bleau, G. (1995). Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development*, *41*(3), 384–397. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080410315>
- Marahrens, B., Schulze, A., Wysocki, J., Lin, M. H., Ye, M., Kanwar, Y. S., Bader, M., Velez, J. C. Q., Miner, J. H., & Batlle, D. (2021). Knockout of aminopeptidase A in mice causes functional alterations and morphological glomerular basement membrane changes in the kidneys. *Kidney International*, *99*(4), 900–913. <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2020.11.012>
- Marguerat, S., & Bähler, J. (2010). RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* *2009* *67*:4, *67*(4), 569–579. <https://doi.org/10.1007/S00018-009-0180-6>
- Marins, N., Ferst, J. G., Goulart, R. S., & da Silveira, J. C. (2022). The role of the oviduct and extracellular vesicles during early embryo development in bovine. *Animal Reproduction*, *19*(1). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0015>

- Mariño, G., Fernández, A. F., Cabrera, S., Lundberg, Y. W., Cabanillas, R., Rodríguez, F., Salvador-Montoliu, N., Vega, J. A., Germanà, A., Fueyo, A., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2010). Autophagy is essential for mouse sense of balance. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(7), 2331–2344. <https://doi.org/10.1172/JCI42601>
- Martinez-Lage, M., Puig-Serra, P., Menendez, P., Torres-Ruiz, R., & Rodriguez-Perales, S. (2018). CRISPR/Cas9 for Cancer Therapy: Hopes and Challenges. *Biomedicines* *2018*, Vol. 6, Page 105, 6(4), 105. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES6040105>
- Martus, N. S., Verhage, H. G., Mavrogianis, P. A., & Thibodeaux, J. K. (1998). Enhancement of bovine oocyte fertilisation *in vitro* with a bovine oviductal specific glycoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, *113*(2), 323–329. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.1130323>
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLOS Medicine*, *9*(12), e1001356. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1001356>
- Mashimo, H., & Goyal, R. K. (1999). Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *The American Journal of Physiology*, *277*(4). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1999.277.4.G745>
- Mastroianni, L., Beer, F., Shah, U., & Clewe, T. H. (1961). Endocrine regulation of oviduct secretions in the rabbit. *Endocrinology*, *68*, 92–100. <https://doi.org/10.1210/ENDO-68-1-92>
- Mateo, R. D., Wu, G., Bazer, F. W., Park, J. C., Shinzato, I., & Sung, W. K. (2007). Dietary l-Arginine Supplementation Enhances the Reproductive Performance of Gilts. *The Journal of Nutrition*, *137*(3), 652–656. <https://doi.org/10.1093/JN/137.3.652>
- McBride, D. S., Boisvert, C., Bleau, G., & Kan, F. W. K. (2004). Detection of nascent and/or mature forms of oviductin in the female reproductive tract and post-ovulatory oocytes by use of a polyclonal antibody against recombinant hamster oviductin. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *52*(8), 1001–1009. <https://doi.org/10.1369/JHC.3A6201.2004>
- McBride, D. S., Brockhausen, I., & Kan, F. W. K. (2005). Detection of glycosyltransferases in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviduct and evidence for the regulation of O-glycan biosynthesis during the estrous cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1721*(1–3), 107–115. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2004.07.009>
- McCauley, T. C., Buhi, W. C., Wu, G. M., Mao, J., Caamaño, J. N., Didion, B. A., & Day, B. N. (2003). Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilisation *in vitro*. *Biology of Reproduction*, *69*(3), 828–834. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.103.016444>
- McClung, J. K., Danner, D. B., Stewart, D. A., Smith, J. R., Schneider, E. L., Lumpkin, C. K., Dell'Orco, R. T., & Nuell, M. J. (1989). Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *164*(3), 1316–1322. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91813-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91813-5)

- McComb, P., & Gomel, V. (1979). The influence of fallopian tube length on fertility in the rabbit. *Fertility and Sterility*, 31(6), 673–676. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)44060-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)44060-4)
- McCormack, J. T., & Greenwald, G. S. (1974). Evidence for a preimplantation rise in oestradiol-17beta levels on day 4 of pregnancy in the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*, 41(2), 297–301. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0410297>
- Mckiernan, S. H., & Bavister, B. D. (1994). Fertilisation and early embryology: Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Human Reproduction*, 9(11), 2123–2129. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A138403>
- Menezo, Y., & Guerin, P. (1997). The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 73(1), 99–104. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(97\)02729-2](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(97)02729-2)
- Merchán, M., Peiró, R., Argente, M. J., Santacreu, M. A., García, M. L., Blasco, A., & Folch, J. M. (2009). Analysis of the oviductal glycoprotein 1 polymorphisms and their effects on components of litter size in rabbits. *Animal Genetics*, 40(5), 756–758. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2052.2009.01898.X>
- Merchán, M., Peiró, R., Santacreu, M. A., Francino, O., & Folch, J. M. (2007). Rabbit oviductal glycoprotein 1 gene: genomic organization polymorphism analysis and mRNA expression. *Molecular Reproduction and Development*, 74(6), 687–693. <https://doi.org/10.1002/MRD.20650>
- Merchán, M., Rendón, M., & Folch, J. M. (2006). Assignment of the oviductal glycoprotein 1 gene (OVGP1) to porcine chromosome 4q22-->q23 by radiation hybrid panel mapping. *Cytogenetic and Genome Research*, 114(1). <https://doi.org/10.1159/000091937>
- Meslin, C., Laurin, M., Callebaut, I., Druart, X., & Monget, P. (2015). Evolution of species-specific major seminal fluid proteins in placental mammals by gene death and positive selection. *Contributions to Zoology*, 84(3), 217–235. <https://doi.org/10.1163/18759866-08403003>
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., & Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nature Cell Biology*, 7(8), 766–772. <https://doi.org/10.1038/NCB0805-766>
- Michaux, J., Reyes, A., & Catzeflis, F. (2001). Evolutionary history of the most speciose mammals: molecular phylogeny of muroid rodents. *Molecular Biology and Evolution*, 18(11), 2017–2031. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A003743>
- Miller, D. J., Gong, X., Decker, G., & Shur, B. D. (1993). Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *Journal of Cell Biology*, 123(6), 1431–1440. <https://doi.org/10.1083/JCB.123.6.1431>
- Mishra, S., Ande, S. R., & Nyomba, B. L. G. (2010). The role of prohibitin in cell signaling. *The FEBS Journal*, 277(19), 3937–3946. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2010.07809.X>
- Mishra, S., Murphy, L. C., & Murphy, L. J. (2006). The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 353–363. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2006.TB00404.X>

- Mishra, S., Murphy, L. C., Nyomba, B. L. G., & Murphy, L. J. (2005). Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, *11*(4), 192–197. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2005.02.004>
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Development*, *21*(22), 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/GAD.1599207>
- Mizutani, S., Ishii, M., Hattori, A., Nomura, S., Numaguchi, Y., Tsujimoto, M., Kobayashi, H., Murohara, T., & Wright, J. W. (2008). New insights into the importance of aminopeptidase A in hypertension. *Heart Failure Reviews*, *13*(3), 273–284. <https://doi.org/10.1007/S10741-007-9065-7/FIGURES/7>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution* *2005* *60*:2, *60*(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/S00239-004-0046-3>
- Mojica, F. J. M., & Montoliu, L. (2016). On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends in Microbiology*, *24*(10), 811–820. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2016.06.005>
- Molofsky, A. V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I. K., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* *2003* *425*:6961, *425*(6961), 962–967. <https://doi.org/10.1038/nature02060>
- 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 = Zuchthygiene*, *47* Suppl 3(SUPPL.3), 22–29. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2012.02027.X>
- Mondéjar, I., Avilés, M., & Coy, P. (2013). The human is an exception to the evolutionarily-conserved phenomenon of pre-fertilisation zona pellucida resistance to proteolysis induced by oviductal fluid. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *28*(3), 718–728. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DES423>
- Moros-Nicolás, C., Fouchécourt, S., Goudet, G., & Monget, P. (2018). Genes Encoding Mammalian Oviductal Proteins Involved in Fertilisation are Subjected to Gene Death and Positive Selection. *Journal of Molecular Evolution*, *86*(9), 655–667. <https://doi.org/10.1007/S00239-018-9878-0>
- Murayama, M. A., Kakuta, S., Inoue, A., Umeda, N., Yonezawa, T., Maruhashi, T., Tateishi, K., Ishigame, H., Yabe, R., Ikeda, S., Seno, A., Chi, S. H., Hashiguchi, Y., Kurata, R., Tada, T., Kubo, S., Sato, N., Liu, Y., Hattori, M., ... Iwakura, Y. (2015). CTRP6 is an endogenous complement regulator that can effectively treat induced arthritis. *Nature Communications* *2015* *6*:1, *6*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms9483>
- Murayama, M. A., Kakuta, S., Maruhashi, T., Shimizu, K., Seno, A., Kubo, S., Sato, N., Saijo, S., Hattori, M., & Iwakura, Y. (2014). CTRP3 plays an important role in the development of collagen-induced arthritis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *443*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.11.040>

- Murray, M. K., & DeSouza, M. M. (1995). Messenger RNA encoding an estrogen-dependent oviduct secretory protein in the sheep is localized in the apical tips and basal compartments of fimbria and ampulla epithelial cells implying translation at unique cytoplasmic foci. *Molecular Reproduction and Development*, 42(3), 268–283. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080420303>
- Newcomer, C. E., Fitts, D. A., Goldman, B. D., Murphy, M. R., Rao, G. N., Shklar, G., & Schwartz, J. L. (1987). Experimental Biology: Other Research Uses of Syrian Hamsters. In G. L. J. Van Hoosier & C. W. Mcpherson (Eds.), *Laboratory Hamsters* (pp. 264–288). Harcourt Brace Jovanovich Academic Press, Inc.
- Nichol, R., Hunter, R. H. F., Gardner, D. K., Leese, H. J., & Cooke, G. M. (1992). Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96(2), 699–707. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0960699>
- Nishizono, H., Darwish, M., Endo, T. A., Uno, K., Abe, H., & Yasuda, R. (2020). Glycine receptor  $\alpha 4$  subunit facilitates the early embryonic development in mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, 159(1), 41–48. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0312>
- Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R. J., Nagata, K., & Mori, K. (2006). Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *Journal of Cell Biology*, 172(3), 383–393. <https://doi.org/10.1083/JCB.200507057>
- O’day-Bowman, M. B., Mavrogianis, P. A., Fazleabas, A. T., & Verhage, H. G. (1995). A human oviduct-specific glycoprotein: synthesis, secretion, and localization during the menstrual cycle. *Microscopy Research and Technique*, 32(1), 57–69. <https://doi.org/10.1002/JEMT.1070320106>
- O’Day-Bowman, M. B., Mavrogianis, P. A., Minshall, R. D., & Verhage, H. G. (2002). *In vivo* versus *in vitro* oviductal glycoprotein (OGP) association with the zona pellucida (ZP) in the hamster and baboon. *Molecular Reproduction and Development*, 62(2), 248–256. <https://doi.org/10.1002/MRD.10091>
- O’Day-Bowman, M. B., Mavrogianis, P. A., Reuter, L. M., Johnson, D. E., Fazleabas, A. T., & Verhage, H. G. (1996). Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following *in vitro* incubation. *Biology of Reproduction*, 54(1), 60–69. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD54.1.60>
- Odor, D. L., & Augustine, J. R. (1995). Morphological study of changes in the baboon oviductal epithelium during the menstrual cycle. *Microscopy Research and Technique*, 32(1), 13–28. <https://doi.org/10.1002/JEMT.1070320103>
- Odor, D. L., & Blandau, R. J. (1973). EGG transport over the fimbrial surface of the rabbit oviduct under experimental conditions. *Fertility and Sterility*, 24(4), 292–300. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)39614-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)39614-5)



- Odor, D. L., Gaddum-Rosse, P., Rumery, R. E., & Blandau, R. J. (1980). Cyclic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual cycle and after estrogen treatment in the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*. *The Anatomical Record*, *198*(1), 35–57. <https://doi.org/10.1002/AR.1091980104>
- Oh, Y. K., & Brackett, B. G. (1975). Ultrastructure of rabbit ova recovered from ovarian follicles and inseminated *in vitro*. *Fertility and Sterility*, *26*(7), 665–685. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)41235-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)41235-5)
- Oikawa, T., Sendai, Y., Kurata, S. -I, & Yanagimachi, R. (1988). A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete Research*, *19*(2), 113–122. <https://doi.org/10.1002/MRD.1120190202>
- Oliphant, G. (1986). Biochemistry and immunology of oviductal. In S. A. M. (ed). (Ed.), *The Fallopian tube: basic studies and clinical contributions* (pp. 129–145).
- Oliphant, G., Reynolds, A. B., Smith, P. F., Ross, P. R., & Marta, J. S. (1984). Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. *Biology of Reproduction*, *31*(1), 165–174. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD31.1.165>
- Oliphant, G., & Ross, P. R. (1982). Demonstration of production and isolation of three sulfated glycoproteins from the rabbit oviduct. *Biology of Reproduction*, *26*(3), 537–544. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD26.3.537>
- Orkin, R. W., Knudson, W., & Toole, B. P. (1985). Loss of hyaluronate-dependent coat during myoblast fusion. *Developmental Biology*, *107*(2), 527–530. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(85\)90333-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90333-1)
- Overstreet, J. W., & Bedford, J. M. (1974). Comparison of the penetrability of the egg vestments in follicular oocytes, unfertilized and fertilized ova of the rabbit. *Developmental Biology*, *41*(1), 185–192. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(74\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(74)90292-9)
- Overstreet, J. W., & Cooper, G. W. (1978). Sperm Transport in the Reproductive Tract of the Female Rabbit: I. The Rapid Transit Phase of Transport1. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, *19*, 101–114. <https://academic.oup.com/biolreprod/article/19/1/101/2767645>
- Özen, A., Ergün, E., & Kürüm, A. (2010). Histomorphology of the oviduct epithelium in the Angora rabbit. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *34*(3), 219–226. <https://doi.org/10.3906/vet-0710-39>
- Pagès, M., Fabre, P. H., Chaval, Y., Mortelliti, A., Nicolas, V., Wells, K., Michaux, J. R., & Lazzari, V. (2016). Molecular phylogeny of South-East Asian arboreal murine rodents. *Zoologica Scripta*, *45*(4), 349–364. <https://doi.org/10.1111/ZSC.12161>
- Pan, M., & Blattner, C. (2021). Regulation of p53 by E3s. *Cancers 2021, Vol. 13, Page 745*, *13*(4), 745. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13040745>
- Pan, X., Kong, D., Liu, L., Gao, F., Zhang, X., Tang, B., & Li, Z. (2014). Development block of golden hamster ICSI embryos is associated with decreased expression of HDAC1, HSPA1A and MYC. *Cell Biology International*, *38*(11), 1280–1290. <https://doi.org/10.1002/CBIN.10319>

- Papatheodorou, I., Moreno, P., Manning, J., Fuentes, A. M. P., George, N., Fexova, S., Fonseca, N. A., Füllgrabe, A., Green, M., Huang, N., Huerta, L., Iqbal, H., Jianu, M., Mohammed, S., Zhao, L., Jarnuczak, A. F., Jupp, S., Marioni, J., Meyer, K., ... Brazma, A. (2020). Expression Atlas update: from tissues to single cells. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D77–D83. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ947>
- Paquette, Y., Merlen, Y., Malette, B., & Bleau, G. (1995). Allelic polymorphism in the hamster oviductin gene is due to a variable number of mucin-like tandem repeats. *Molecular Reproduction and Development*, *42*(4), 388–396. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080420404>
- Paria, B. C., Huet-Hudson, Y. M., & Dey, S. K. (1993). Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(21), 10159–10162. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.21.10159>
- Park, I. K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* *2003* *423:6937*, *423*(6937), 302–305. <https://doi.org/10.1038/nature01587>
- Patejunas, G., Bradley, A., Beaudet, A. L., & O'Brien, W. E. (1994). Generation of a mouse model for citrullinemia by targeted disruption of the argininosuccinate synthetase gene. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, *20*(1), 55–60. <https://doi.org/10.1007/BF02257486>
- Patel, K. K., Miyoshi, H., Beatty, W. L., Head, R. D., Malvin, N. P., Cadwell, K., Guan, J. L., Saitoh, T., Akira, S., Seglen, P. O., Dinauer, M. C., Virgin, H. W., & Stappenbeck, T. S. (2013). Autophagy proteins control goblet cell function by potentiating reactive oxygen species production. *EMBO Journal*, *32*(24), 3130–3144. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2013.233>
- Patrat, C., Auer, J., Fauque, P., Leandri, R. L., Jouannet, P., & Serres, C. (2006). Zona pellucida from fertilised human oocytes induces a voltage-dependent calcium influx and the acrosome reaction in spermatozoa, but cannot be penetrated by sperm. *BMC Developmental Biology*, *6*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-6-59/TABLES/4>
- Patton, N. (1994). Colony husbandry. In P. Manning, D. Ringler, & C. Newcomer (Eds.), *The Biology of the Laboratory Rabbit* (2nd ed., pp. 27–45). Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124692350500105>
- Pausch, H., Kölle, S., Wurmser, C., Schwarzenbacher, H., Emmerling, R., Jansen, S., Trottmann, M., Fuerst, C., Götz, K. U., & Fries, R. (2014). A nonsense mutation in TMEM95 encoding a nondescript transmembrane protein causes idiopathic male subfertility in cattle. *PLoS Genetics*, *10*(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004044>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2013.09.011>

- Pérez-Cerezales, S., Ramos-Ibeas, P., Acuna, O. S., Avilés, M., Coy, P., Rizo, 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>
- Perry, J. S., Heap, R. B., & Amoroso, E. C. (1973). Steroid hormone production by pig blastocysts. *Nature*, *245*(5419), 45–47. <https://doi.org/10.1038/245045A0>
- 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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0188105>
- Pradeep, M. A., Jagadeesh, J., De, A. K., Kaushik, J. K., Malakar, D., Kumar, S., Dang, A. K., Das, S. K., & Mohanty, A. K. (2011). Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on *in vitro* embryo development. *Theriogenology*, *75*(6), 1005–1015. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.11.007>
- Psychoyos, A. (1961). Nidation in the rat and the necessary dose of estrogen. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances de l'Academie Des Sciences*, *253*, 1616–1617. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14489090/>
- Quinn, P. (1995). Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *12*(2), 97–105. <https://doi.org/10.1007/BF02211377>
- Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U. R., & Rudel, T. (2005). Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nature Cell Biology*, *7*(8), 837–843. <https://doi.org/10.1038/NCB1283>
- Ralston, A., Cox, B. J., Nishioka, N., Sasaki, H., Chea, E., Rugg-Gunn, P., Guo, G., Robson, P., Draper, J. S., & Rossant, J. (2010). Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development*, *137*(3), 395–403. <https://doi.org/10.1242/DEV.038828>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, *67*(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYY032>
- Ramm, S. A., Oliver, P. L., Ponting, C. P., Stockley, P., & Emes, R. D. (2008). Sexual selection and the adaptive evolution of mammalian ejaculate proteins. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(1), 207–219. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSM242>
- Rapisarda, J. J., Mavrogianis, P. A., O'day-Bowman, M. B., Fazleabas, A. T., & Verhage, H. G. (1993). Immunological characterization and immunocytochemical localization of an oviduct-specific glycoprotein in the human. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *76*(6), 1483–1488. <https://doi.org/10.1210/JCEM.76.6.8501154>
- Ravanan, P., Srikumar, I. F., & Talwar, P. (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sciences*, *188*, 53–67. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2017.08.029>

- Recklies, A. D., White, C., & Ling, H. (2002). The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways. *Biochemical Journal*, *365*(1), 119–126. <https://doi.org/10.1042/BJ20020075>
- Reese, J., Wang, H., Ding, T., & Paria, B. C. (2008). The hamster as a model for embryo implantation: insights into a multifaceted process. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *19*(2), 194–203. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2007.11.001>
- Rémy, S., Tesson, L., Ménoret, S., Usal, C., Scharenberg, A. M., & Anegon, I. (2010). Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Research*, *19*(3), 363–371. <https://doi.org/10.1007/S11248-009-9323-7>
- Reynaud, K., Saint-Dizier, M., Tahir, M. Z., Havard, T., Harichaux, G., Labas, V., Thoumire, S., Fontbonne, A., Grimard, B., & Chastant-Maillard, S. (2015). Progesterone plays a critical role in canine oocyte maturation and fertilisation. *Biology of Reproduction*, *93*(4). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.115.130955>
- Richardson, L. L., & Oliphant, G. (1981). Steroid concentrations in rabbit oviducal fluid during oestrus and pseudopregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, *62*(2), 427–431. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0620427>
- Roberson, E. C., Battenhouse, A. M., Garge, R. K., Tran, N. K., Marcotte, E. M., & Wallingford, J. B. (2021). Spatiotemporal transcriptional dynamics of the cycling mouse oviduct. *Developmental Biology*, *476*, 240–248. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2021.03.018>
- Robitaille, G., St-Jacques, S., Potier, M., & Bleau, G. (1988). Characterization of an oviducal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biology of Reproduction*, *38*(3), 687–694. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD38.3.687>
- Rodríguez, M., García-García, R. M., Arias-Álvarez, M., Millán, P., Febrel, N., Formoso-Rafferty, N., López-Tello, J., Lorenzo, P. L., & Rebollar, P. G. (2018). Improvements in the conception rate, milk composition and embryo quality of rabbit does after dietary enrichment with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Animal*, *12*(10), 2080–2088. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003706>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYS029>
- Roskams, J., Rodgers, L., & Mellick, A. (2006). Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench. *Undefined*, 5.
- Roux, E., Bleau, G., & Kan, F. W. K. (1997). Fate of hamster oviductin in the oviduct and uterus during early gestation. *Molecular Reproduction & Development*, *46*(3), 306–317. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199703\)46:3<306::AID-MRD9>3.3.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<306::AID-MRD9>3.3.CO;2-E)

- Roux, E., & Kan, F. W. K. (1995). Stage-specific immunolabeling for oviductin in the secretory granules of the oviductal epithelium of the golden hamster during the estrous cycle. *The Anatomical Record*, *241*(3), 369–376. <https://doi.org/10.1002/AR.1092410311>
- Rumery, R. E., & Eddy, E. M. (1974). Scanning electron microscopy of the fimbriae and ampullae of rabbit oviducts. *The Anatomical Record*, *178*(1), 83–101. <https://doi.org/10.1002/AR.1091780108>
- Saccary, L., She, Y. M., Oko, R., & Kan, F. W. K. (2013). Hamster oviductin regulates tyrosine phosphorylation of sperm proteins during *in vitro* capacitation. *Biology of Reproduction*, *89*(2). <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.113.109314>
- 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., & Herr, J. C. (2012). Oocyte specific oolemmal SAS1B involved in sperm binding through intra-acrosomal SLLP1 during fertilisation. *Developmental Biology*, *363*(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2011.12.021>
- Saint-Dizier, M., Marnier, C., Tahir, M. Z., Grimard, B., Thoumire, S., Chastant-Maillard, S., & Reynaud, K. (2014). OVGP1 is expressed in the canine oviduct at the time and place of oocyte maturation and fertilisation. *Molecular Reproduction and Development*, *81*(11), 972–982. <https://doi.org/10.1002/MRD.22417>
- Saint-Dizier, M., Schoen, J., Chen, S., Banliat, C., & Mermillod, P. (2019). Composing the Early Embryonic Microenvironment: Physiology and Regulation of Oviductal Secretions. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS21010223>
- Sakai, Y., Araki, Y., Yamashita, T., Kurata, S., Oikawa, T., Hiroi, M., & Sendo, F. (1988). Inhibition of *in vitro* fertilisation by a monoclonal antibody reacting with the zona pellucida of the oviductal egg but not with that of the ovarian egg of the golden hamster. *Journal of Reproductive Immunology*, *14*(2), 177–189. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(88\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0165-0378(88)90068-X)
- Sarver, D. C., Stewart, A. N., Rodriguez, S., Little, H. C., Aja, S., & Wong, G. W. (2020). Loss of CTRP4 alters adiposity and food intake behaviors in obese mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *319*(6), E1084–E1100. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00448.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJ-AEND200060F07B.JPEG>
- Sathanawongs, A., Nganvongpanit, K., & Mekchay, S. (2012). *Expression Patterns of Cell Adhesion Molecules in Bovine Preimplantation Embryos Cultured in vitro*. *42*(4), 455–461.
- Sato, A., & Yanagimachi, R. (1972). Transplantation of preimplantation hamster embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, *30*(2), 329–332. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0300329>
- Sato, K., Nishio, T., Kimura, R., Kusaba, M., Suzuki, T., Hatakeyama, K., Ockendon, D. J., & Satta, Y. (2002). Coevolution of the S-Locus Genes SRK, SLG and SP11/SCR in Brassica oleracea and B. rapa. *Genetics*, *162*(2), 931–940. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/162.2.931>

- Satoh, T., Abe, H., Sendai, Y., Iwata, H., & Hoshi, H. (1995). Biochemical characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1266*(2), 117–123. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)00208-V](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)00208-V)
- Satouh, Y., Inoue, N., Ikawa, M., & Okabe, M. (2012). Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *Journal of Cell Science*, *125*(21), 4985–4990. <https://doi.org/10.1242/JCS.100867/263151/AM/VISUALIZATION-OF-THE-MOMENT-OF-MOUSE-SPERM-EGG>
- Scapinello, C. (2014). Tecnología de producción de conejos para carne. Reproducción: aspectos fisiológicos y de manejo en la cunicultura. In O. Blumetto & G. Capra (Eds.), *INIA Serie técnica* (p. Julio). <https://doi.org/10.35676/inia/st.216>
- Schier, A. F. (2007). The Maternal-Zygotic Transition: Death and Birth of RNAs. *Science*, *316*(5823), 406–407. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1140693>
- Schini, S. A., & Bavister, B. D. (1988). Two-Cell Block to Development of Cultured Hamster Embryos is Caused by Phosphate and Glucose. *Biology of Reproduction*, *39*(5), 1183–1192. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD39.5.1183>
- Schmidt, A., Mavrogianis, P. A., O'Day-Bowman, M. B., Jaffe, R. C., & Verhage, H. G. (1997). Characterization of antibodies generated against a conserved portion of oviductal glycoprotein (OGP) and endogenous hamster OGP and their ability to decrease sperm binding to the zona pellucida *in vitro*. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, *38*(6), 377–383. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.1997.TB00316.X>
- Schmidt, K., Clark, A., Mello, A., Durfey, C., Buck, A., Boyd, K., Whitaker, B. D., Schmidt, K., Clark, A., Mello, A., Durfey, C., Buck, A., Boyd, K., & Whitaker, B. D. (2016). The effects of glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine on *in vitro* fertilisation of porcine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, *28*(8), 1223–1231. <https://doi.org/10.1071/RD14226>
- Sen, R., Ferdoush, J., Kaja, A., & Bhaumik, S. R. (2016). Fine-Tuning of FACT by the Ubiquitin Proteasome System in Regulation of Transcriptional Elongation. *Molecular and Cellular Biology*, *36*(11), 1691–1703. [https://doi.org/10.1128/MCB.01112-15/SUPPL\\_FILE/ZMB999101236SO1.PDF](https://doi.org/10.1128/MCB.01112-15/SUPPL_FILE/ZMB999101236SO1.PDF)
- Sen Roy, S., & Seshagiri, P. B. (2013). Expression and function of cyclooxygenase-2 is necessary for hamster blastocyst hatching. *Molecular Human Reproduction*, *19*(12), 838–851. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAT063>
- Sendai, Y., Komiya, H., Suzuki, K., Onuma, T., Kikuchi, M., Hoshi, H., & Araki, Y. (1995). Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biology of Reproduction*, *53*(2), 285–294. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD53.2.285>
- Sengoku, K., Tamate, K., Horikawa, M., Takaoka, Y., Ishikawa, M., & Dukelow, W. R. (1995). Plasma membrane block to polyspermy in human oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*, *105*(1), 85–90. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.1050085>

- Sengoku, K., Takuma, N., Horikawa, M., Tsuchiya, K., Komori, H., Sharifa, D., & Tamate, K. (2001). Requirement of Nitric Oxide for Murine Oocyte Maturation, Embryo Development, and Trophoblast Outgrowth *In Vitro*. *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT*, *58*, 262–268. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200103\)58:3](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200103)58:3)
- Seshagiri, P. B., McKenzie, D. I., Bavister, B. D., Williamson, J. L., & Aiken, J. M. (1992). Golden hamster embryonic genome activation occurs at the two-cell stage: correlation with major developmental changes. *Molecular Reproduction and Development*, *32*(3), 229–235. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080320307>
- Seshagiri, P. B., Mishra, A., Ramesh, G., & Rao, R. P. (2002). Regulation of peri-attachment embryo development in the golden hamster: Role of growth factors. *Journal of Reproductive Immunology*, *53*(1–2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(01\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(01)00086-9)
- Seshagiri, P. B., Sen Roy, S., Sireesha, G., & Rao, R. P. (2009). Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *Journal of Reproductive Immunology*, *83*(1–2), 79–84. <https://doi.org/10.1016/J.JRI.2009.06.264>
- Seshagiri, P. B., & Vani, V. (2019). Enabling Hamster Embryo Culture System: Development of Preimplantation Embryos. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2006*, 45–61. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9566-0_4)
- Shapiro, L., & Scherer, P. E. (1998). The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Current Biology*, *8*(6), 335–340. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70133-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70133-2)
- Sharma, K., Asp, N. T., Harrison, S., Siller, R., Baumgarten, S. F., Gupta, S., Chollet, M. E., Andersen, E., Sullivan, G. J., & Simonsen, A. (2022). Autophagy modulates cell fate decisions during lineage commitment. *Autophagy*, *18*(8), 1915–1931. [https://doi.org/10.1080/15548627.2021.2008691/SUPPL\\_FILE/KAUP\\_A\\_2008691\\_SM7698.ZIP](https://doi.org/10.1080/15548627.2021.2008691/SUPPL_FILE/KAUP_A_2008691_SM7698.ZIP)
- Shen, Y., Guo, J., Zhang, X., Wang, X., Zhu, S., Chen, D., Xiong, W., Lu, G., Liu, X., Dai, C., Gong, F., Wang, Y., Lin, G., Wang, Z., & Xu, W. (2022). Identification of a heterozygous variant of ZP2 as a novel cause of empty follicle syndrome in humans and mice. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *37*(4), 859–872. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAC026>
- Shen, Y., Ward, N. C., Hodgson, J. M., Puddey, I. B., Wang, Y., Zhang, D., Maghzal, G. J., Stocker, R., & Croft, K. D. (2013). Dietary quercetin attenuates oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice fed a high-fat diet: a critical role for heme oxygenase-1. *Free Radical Biology & Medicine*, *65*, 908–915. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.08.185>
- Sheren, J. E., & Kassenbrock, C. K. (2013). RNF38 encodes a nuclear ubiquitin protein ligase that modifies p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *440*(4), 473–478. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2013.08.031>

- Shin, S. W., Shimizu, N., Tokoro, M., Nishikawa, S., Hatanaka, Y., Anzai, M., Hamazaki, J., Kishigami, S., Saeki, K., Hosoi, Y., Iritani, A., Murata, S., & Matsumoto, K. (2013). Mouse zygote-specific proteasome assembly chaperone important for maternal-to-zygotic transition. *Biology Open*, *2*(2), 170–182. <https://doi.org/10.1242/BIO.20123020>
- Shin, S. W., Tokoro, M., Nishikawa, S., Lee, H. H., Hatanaka, Y., Nishihara, T., Amano, T., Anzai, M., Kato, H., Mitani, T., Kishigami, S., Saeki, K., Hosoi, Y., Iritani, A., & Matsumoto, K. (2010). Inhibition of the Ubiquitin-proteasome System Leads to Delay of the Onset of ZGA Gene Expression. *Journal of Reproduction and Development*, *56*(6), 1008250300–1008250300. <https://doi.org/10.1262/JRD.10-104M>
- Shuhui, L., Mok, Y. K., & Wong, W. S. F. (2009). Role of Mammalian Chitinases in Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, *149*(4), 369–377. <https://doi.org/10.1159/000205583>
- Singh, R. S., & Kulathinal, R. J. (2000). PROCEEDINGS OF FUKUOKA INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON POPULATION GENETICS Sex gene pool evolution and speciation: A new paradigm. *Genes Genet. Syst*, *75*, 119–130.
- Slaidina, M., & Lehmann, R. (2014). Translational control in germline stem cell development. *Journal of Cell Biology*, *207*(1), 13–21. <https://doi.org/10.1083/JCB.201407102>
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., & Neer, E. J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(5), 181–185. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01384-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01384-5)
- Smith, T. T., & Yanagimachi, R. (1989). Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *Journal of Reproduction and Fertility*, *86*(1), 255–261. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0860255>
- 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>
- 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 & Cellular Proteomics: MCP*, *15*(1), 93–108. <https://doi.org/10.1074/MCP.M115.052332>
- Sommer, D., Peters, A. E., Baumgart, A. K., & Beyer, M. (2015). TALEN-mediated genome engineering to generate targeted mice. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, *23*(1), 43–55. <https://doi.org/10.1007/S10577-014-9457-1>
- Soneson, C., Love, M. I., & Robinson, M. D. (2015). Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research*, *4*. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7563.2>



- Spielmann, N., Miller, G., Oprea, T. I., Hsu, C.-W., Fobo, G., Frishman, G., Montrone, C., Haseli Mashhadi, H., Mason, J., Munoz Fuentes, V., Leuchtenberger, S., Ruepp, A., Wagner, M., Westphal, D. S., Wolf, C., Görlach, A., Sanz-Moreno, A., Cho, Y.-L., Teperino, R., ... Hrabe de Angelis, M. (2022). Extensive identification of genes involved in congenital and structural heart disorders and cardiomyopathy. *Nature Cardiovascular Research* 2022 1:2, 1(2), 157–173. <https://doi.org/10.1038/s44161-022-00018-8>
- Steinberger, B., Yu, H., Brodmann, T., Milovanovic, D., Reichart, U., Besenfelder, U., Artemenko, K., Razzazi-Fazeli, E., Brem, G., & Mayrhofer, C. (2017). Semen modulated secretory activity of oviductal epithelial cells is linked to cellular proteostasis network remodeling: Proteomic insights into the early phase of interaction in the oviduct *in vivo*. *Journal of Proteomics*, 163, 14–27. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2017.05.006>
- Stetson, I., Izquierdo-Rico, M. J., Moros, C., Chevret, P., Lorenzo, P. L., Ballesta, J., Rebollar, P. G., Gutiérrez-Gallego, R., & Avilés, M. (2012). Rabbit zona pellucida composition: a molecular, proteomic and phylogenetic approach. *Journal of Proteomics*, 75(18), 5920–5935. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2012.07.027>
- St-Jacques, S., & Bleau, G. (1988). Monoclonal antibodies specific for an oviductal component associated with the hamster zona pellucida. *Journal of Reproductive Immunology*, 12(4), 247–261. [https://doi.org/10.1016/0165-0378\(88\)90011-3](https://doi.org/10.1016/0165-0378(88)90011-3)
- Stubbs, C. D., & Smith, A. D. (1984). The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 779(1), 89–137. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0304-4157(84)90005-4)
- Sturmei, R. G., Reis, A., Leese, H. J., & McEvoy, T. G. (2009). Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 44 Suppl 3(SUPPL. 3), 50–58. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2009.01402.X>
- Suarez, S. S. (2016). Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell and Tissue Research*, 363(1), 185–194. <https://doi.org/10.1007/S00441-015-2244-2>
- Suarez, S. S., & Wolfner, M. F. (2021). Cilia take the egg on a magic carpet ride. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(27). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2108887118>
- Summers, M. C., Bhatnagar, P. R., Lawitts, J. A., & Biggers, J. D. (1995). Fertilisation *in vitro* of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biology of Reproduction*, 53(2), 431–437. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD53.2.431>
- Sun, Q. Y. (2003). Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy Research and Technique*, 61(4), 342–348. <https://doi.org/10.1002/JEMT.10347>

- Surendran, P., Drenos, F., Young, R., Warren, H., Cook, J. P., Manning, A. K., Grarup, N., Sim, X., Barnes, D. R., Witkowska, K., Staley, J. R., Tragante, V., Tukiainen, T., Yaghootkar, H., Masca, N., Freitag, D. F., Ferreira, T., Giannakopoulou, O., Tinker, A., ... Munroe, P. B. (2016). Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. *Nature Genetics* 2016 48:10, 48(10), 1151–1161. <https://doi.org/10.1038/ng.3654>
- Sutherland, T. E. (2018). Chitinase-like proteins as regulators of innate immunity and tissue repair: helpful lessons for asthma? *Biochemical Society Transactions*, 46(1), 141–151. <https://doi.org/10.1042/BST20170108>
- Sutton, R., Nancarrow, C. D., Wallace, A. L. C., & Rigby, N. W. (1984). Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of the sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 72(2), 415–422. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0720415>
- Sutton-McDowall, M. L., Feil, D., Robker, R. L., Thompson, J. G., & Dunning, K. R. (2012). Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 77(8), 1632–1641. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2011.12.008>
- Suzuki, K., Sendai, Y., Onuma, T., Hoshi, H., Hiroi, M., & Araki, Y. (1995). Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biology of Reproduction*, 53(2), 345–354. <https://doi.org/10.1095/BiolReprod53.2.345>
- Swanson, W. J., & Vacquier, V. D. (2002). The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews. Genetics*, 3(2), 137–144. <https://doi.org/10.1038/NRG733>
- Swanson, W. J., Yang, Z., Wolfner, M. F., & Aquadro, C. F. (2001). Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2509–2514. <https://doi.org/10.1073/PNAS.051605998>
- Szalai, A. J., Wu, J., Lange, E. M., McCrory, M. A., Langefeld, C. D., Williams, A., Zakharkin, S. O., George, V., Allison, D. B., Cooper, G. S., Xie, F., Fan, Z., Edberg, J. C., & Kimberly, R. P. (2005). Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level. *Journal of Molecular Medicine*, 83(6), 440–447. <https://doi.org/10.1007/S00109-005-0658-0/FIGURES/4>
- Szlosarek, P. W., Klabatsa, A., Pallaska, A., Sheaff, M., Smith, P., Crook, T., Grimshaw, M. J., Steele, J. P., Rudd, R. M., Balkwill, F. R., & Fennell, D. A. (2006). *In vivo* Loss of Expression of Argininosuccinate Synthetase in Malignant Pleural Mesothelioma Is a Biomarker for Susceptibility to Arginine Depletion. *Clinical Cancer Research*, 12(23), 7126–7131. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1101>
- Tadros, W., & Lipshitz, H. D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development (Cambridge, England)*, 136(18), 3033–3042. <https://doi.org/10.1242/DEV.033183>
- Talbot, P., & Dandekar, P. (2003). Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Wiley Online Library*, 61(4), 349–357. <https://doi.org/10.1002/jemt.10348>

- Tanaka, K. (2009). The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 85(1), 12–36. <https://doi.org/10.2183/PJAB.85.12>
- Tapiero, H., Mathé, G., Couvreur, P., & Tew, K. D. (2002). I. Arginine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(9), 439–445. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00284-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00284-6)
- Tazawa, S., Unuma, M., Tondokoro, N., Asano, Y., Ohsumi, T., Ichimura, T., & Sugano, H. (1991). Identification of a Membrane Protein Responsible for Ribosome Binding in Rough Microsomal Membranes. *The Journal of Biochemistry*, 109(1), 89–98. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A123359>
- Tempfer, C., Moreno, R. M., O'Brien, W. E., & Gregg, A. R. (2000). Genetic contributions of the endothelial nitric oxide synthase gene to ovulation and menopause in a mouse model. *Fertility and Sterility*, 73(5), 1025–1031. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00417-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00417-9)
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology*, 2(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/NRI855>
- Thompson, J. G., Simpson, A. C., Pugh, P. A., & Tervit, H. R. (1992). Requirement for glucose during *in vitro* culture of sheep preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 31(4), 253–257. <https://doi.org/10.1002/MRD.1080310405>
- 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. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.108.073684>
- Tokuhiro, K., & Dean, J. (2018). Glycan-Independent Gamete Recognition Triggers Egg Zinc Sparks and ZP2 Cleavage to Prevent Polyspermy. *Developmental Cell*, 46(5), 627-640.e5. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2018.07.020>
- Torrès, S., Hulot, F., Meunier, M., & Sevellec, C. (n.d.). Comparative study of preimplantation development and embryonic loss in two rabbit strains.
- Tranguch, S., Steuerwald, N., & Huet-Hudson, Y. M. (2003). Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biology of Reproduction*, 68(5), 1538–1544. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.102.009282>
- Traxinger, R. R., & Marshall, S. (1991). Coordinated regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine. Role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16), 10148–10154. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99202-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99202-1)
- Trejo, C. A., Navarro, M. C., Ambriz, G. D., & Rosado, A. (2005). Effect of maternal age and parity on preimplantation embryo development and transport in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Laboratory Animals*, 39(3), 290–297. <https://doi.org/10.1258/0023677054306999>
- Tricarico, C., Clancy, J., & D'Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, 8(4), 220–232. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283>

- Tsai, B., Ye, Y., & Rapoport, T. A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(4), 246–255. <https://doi.org/10.1038/NRM780>
- Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A., & Mizushima, N. (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science*, 321(5885), 117–120. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1154822/SUPPL\\_FILE/TSUKAMOTO.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1154822/SUPPL_FILE/TSUKAMOTO.SOM.PDF)
- Ueno, S., & Niimura, S. (2008). Size of perivitelline space and incidence of polyspermy in mouse oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Mammalian Ova Research*, 25(1), 44–49. <https://doi.org/10.1274/JMOR.25.44>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6220). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260419>
- Umezū, T., & Tomooka, Y. (2004). An evidence of stromal cell populations functionally linked with epithelial cell populations in the mouse oviduct. *Zoological Science*, 21(3), 319–326. <https://doi.org/10.2108/ZSJ.21.319>
- Ushio, H., Ueno, T., Kojima, Y., Komatsu, M., Tanaka, S., Yamamoto, A., Ichimura, Y., Ezaki, J., Nishida, K., Komazawa-Sakon, S., Niyonsaba, F., Ishii, T., Yanagawa, T., Kominami, E., Ogawa, H., Okumura, K., & Nakano, H. (2011). Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(5), 1267-1276.e6. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2010.12.1078>
- Vacquier, V. D., & Swanson, W. J. (2011). Selection in the Rapid Evolution of Gamete Recognition Proteins in Marine Invertebrates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a002931. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A002931>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/NCB1596>
- Van der Lugt, N. M. T., Domen, J., Linders, K., Van Roon, M., Robanus-Maandag, E., Te Riele, H., Van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., Van Lohuizen, M., & Berns, A. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes & Development*, 8(7), 757–769. <https://doi.org/10.1101/GAD.8.7.757>
- Van Der Westerlaken, L., Helmerhorst, F., Dieben, S., & Naaktgeboren, N. (2005). Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilisation failure or low fertilisation after conventional *in vitro* fertilisation. *Fertility and Sterility*, 83(3), 612–617. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2004.08.029>
- 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), 213–228. <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.125>

- Vargas Miranda, B., Ambriz García, D., Navarro Maldonado, M. del C., Trejo Córdova, A., Rodríguez Esquivel, G., & González Vieira, M. del R. (2018). Manejo de animales del Bioterio de la UAM-I. In *Manejo de animales del Bioterio de la UAM-I* (Primera). <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/BIOTERIO.pdf>
- Vembar, S. S., & Brodsky, J. L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(12), 944–957. <https://doi.org/10.1038/NRM2546>
- Verhage, H. G., Bareither, M. L., Jaffe, R. C., & Akbar, M. (1979). Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *The American Journal of Anatomy*, *156*(4), 505–521. <https://doi.org/10.1002/AJA.1001560405>
- Verhage, H. G., & Fazleabas, A. T. (1988). The *in vitro* synthesis of estrogen-dependent proteins by the baboon (*Papio anubis*) oviduct. *Endocrinology*, *123*(1), 552–558. <https://doi.org/10.1210/ENDO-123-1-552>
- Verhage, H. G., Fazleabas, A. T., Mavrogianis, P. A., O'Day-Bowman, M. B., Donnelly, K. M., Arias, E. B., & Jaffe, R. C. (1997a). The baboon oviduct: characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Human Reproduction Update*, *3*(6), 541–552. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/3.6.541>
- Verhage, H. G., Mavrogianis, P. A., Boice, M. L., Li, W., & Fazleabas, A. T. (1990). Oviductal epithelium of the baboon: hormonal control and the immuno-gold localization of oviduct-specific glycoproteins. *The American Journal of Anatomy*, *187*(1), 81–90. <https://doi.org/10.1002/AJA.1001870109>
- Verhage, H. G., Mavrogianis, P. A., Boomsma, R. A., Schmidt, A., Brenner, R. M., Slayden, O. V., & Jaffe, R. C. (1997b). Immunologic and molecular characterization of an estrogen-dependent glycoprotein in the rhesus (*Macaca mulatta*) oviduct. *Biology of Reproduction*, *57*(3), 525–531. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD57.3.525>
- Vester, S. K., Beavil, R. L., Lynham, S., Beavil, A. J., Cunninghame Graham, D. S., McDonnell, J. M., & Vyse, T. J. (2021). Nucleolin acts as the receptor for C1QTNF4 and supports C1QTNF4-mediated innate immunity modulation. *Journal of Biological Chemistry*, *296*. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100513>
- Vicente, J. S., Lavara, R., Castro, M. P. V. de, & Marco Jiménez, F. (2014). Tecnología de producción de conejos para carne. Técnicas y manejo reproductivo del conejo. In O. Blumetto & G. Capra (Eds.), *INIA Serie técnica* (Issue Julio, pp. 47–62). <https://doi.org/10.35676/inia/st.216>
- Vicente, J. S., Marco-Jiménez, F., Pérez-García, M., Naturil-Alfonso, C., Peñaranda, D. S., & Viudes-de-Castro, M. P. (2022). Oocyte quality and *in vivo* embryo survival after ovarian stimulation in nulliparous and multiparous rabbit does. *Theriogenology*, *189*, 53–58. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2022.06.003>
- Viudes-de-Castro, M. P., Marco-Jiménez, F., Cedano-Castro, J. I., & Vicente, J. S. (2017). Effect of corifollitropin alfa supplemented with or without LH on ovarian stimulation and embryo viability in rabbit. *Theriogenology*, *98*, 68–74. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.05.005>

- Viudes-de-Castro, M. P., Marco-Jiménez, F., Más Pellicer, A., García-Domínguez, X., Talaván, A. M., & Vicente, J. S. (2019). A single injection of corifollitropin alfa supplemented with human chorionic gonadotropin increases follicular recruitment and transferable embryos in the rabbit. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *54*(4), 696–701. <https://doi.org/10.1111/RDA.13411>
- Viudes-de-Castro, M. P., Pomares, A., Saenz de Juano i Ribes, M. D., Marco-Jiménez, F., & Vicente, J. S. (2015). Effect of luteinizing hormone on rabbit ovarian superstimulation and embryo developmental potential. *Theriogenology*, *84*(3), 446–451. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.04.001>
- Vondrakova, J., Frolikova, M., Ded, L., Cerny, J., Postlerova, P., Palenikova, V., Simonik, O., Nahacka, Z., Basus, K., Valaskova, E., Machan, R., Pacey, A., Holubcova, Z., Koubek, P., Ezrova, Z., Park, S., Liu, R., Partha, R., Clark, N., ... Komrskova, K. (2022). MAIA, Fc receptor-like 3, supersedes JUNO as IZUMO1 receptor during human fertilisation. *Science Advances*, *8*(36). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABN0047>
- Wang, H., Guo, Y., Wang, D., Kingsley, P. J., Marnett, L. J., Das, S. K., DuBois, R. N., & Dey, S. K. (2004). Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nature Medicine*, *10*(10), 1074–1080. <https://doi.org/10.1038/NM1104>
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*, *153*(4), 910–918. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.04.025>
- Wang, S., Kou, Z., Jing, Z., Zhang, Y., Guo, X., Dong, M., Wilmut, I., & Gao, S. (2010). Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(41), 17639–17644. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1013185107>
- Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Prather, R. S., & Day, B. N. (1998). Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilisation. *Molecular Reproduction and Development*, *49*(3), 308–316. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199803\)49:3<308::aid-mrd11>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199803)49:3<308::aid-mrd11>3.0.co;2-s)
- Wang, W. H., Day, B. N., & Wu, G. M. (2003). How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microscopy Research and Technique*, *61*(4), 335–341. <https://doi.org/10.1002/JEMT.10346>
- Warzych, E., & Lipinska, P. (2020). Energy metabolism of follicular environment during oocyte growth and maturation. *The Journal of Reproduction and Development*, *66*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1262/JRD.2019-102>
- Waterman, R. A., & Wall, R. J. (1988). Lipid interactions with *in vitro* development of mammalian zygotes. *Gamete Research*, *21*(3), 243–254. <https://doi.org/10.1002/MRD.1120210306>
- Weber, A. A. T., Abi-Rached, L., Galtier, N., Bernard, A., Montoya-Burgos, J. I., & Chenuil, A. (2017). Positive selection on sperm ion channels in a brooding brittle star: consequence of life-history traits evolution. *Molecular Ecology*, *26*(14), 3744–3759. <https://doi.org/10.1111/MEC.14024>

- Weber, J. A., Freeman, D. A., Vanderwall, D. K., & Woods, G. L. (1991). Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biology of Reproduction*, *45*(4), 540–543. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD45.4.540>
- Whitten, W. K. (1957). Culture of Tubal Ova. *Nature* 1957 179:4569, *179*(4569), 1081–1082. <https://doi.org/10.1038/1791081a0>
- Whittle, C. A., & Extavour, C. G. (2017). Rapid evolution of ovarian-biased genes in the yellow fever mosquito (*Aedes Aegypti*). *Genetics*, *206*(4), 2119–2137. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.117.201343/-/DC1>
- Wickham, M. H. (2014). Package “ggplot2.” *Cran.Microsoft.Com*. <https://cran.microsoft.com/snapshot/2015-01-06/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf>
- Wijayagunawardane, M. P. B., Miyamoto, A., Taquahashi, Y., Gabler, C., Acosta, T. J., Nishimura, M., Killian, G., & Sato, K. (2001). *In vitro* regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. *The Journal of Endocrinology*, *168*(1), 117–130. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.1680117>
- Wik, L., Karlsson, M., & Johannesson, H. (2008). The evolutionary trajectory of the mating-type (mat) genes in *Neurospora* relates to reproductive behavior of taxa. *BMC Evolutionary Biology*, *8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-109/TABLES/1>
- Wilburn, D. B., & Swanson, W. J. (2016). From molecules to mating: Rapid evolution and biochemical studies of reproductive proteins. *Journal of Proteomics*, *135*, 12–25. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2015.06.007>
- Wilburn, D. B., Tuttle, L. M., Klevit, R. E., & Swanson, W. J. (2019). Indirect sexual selection drives rapid sperm protein evolution in abalone. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.52628>
- Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., Fu, X., Liu, S., Bo, X., & Yu, G. (2021). clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, *2*(3), 100141. <https://doi.org/10.1016/J.XINN.2021.100141>
- Wyckoff, G. J., Wang, W., & Wu, C. I. (2000). Rapid evolution of male reproductive genes in the descent of man. *Nature*, *403*(6767), 304–309. <https://doi.org/10.1038/35002070>
- Xiong, B., Zhao, Y., Beall, S., Sadusky, A. B., & Dean, J. (2017). A Unique Egg Cortical Granule Localization Motif Is Required for Ovastacin Sequestration to Prevent Premature ZP2 Cleavage and Ensure Female Fertility in Mice. *PLOS Genetics*, *13*(1), e1006580. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006580>
- Yamanouchi, H., Umezu, T., & Tomooka, Y. (2010). Reconstruction of oviduct and demonstration of epithelial fate determination in mice. *Biology of Reproduction*, *82*(3), 528–533. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.109.078329>

- Yan, G., Zhang, G., Fang, X., Zhang, Y., Li, C., Ling, F., Cooper, D. N., Li, Q., Li, Y., Van Gool, A. J., Du, H., Chen, J., Chen, R., Zhang, P., Huang, Z., Thompson, J. R., Meng, Y., Bai, Y., Wang, J. (2011). Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques. *Nature Biotechnology*, *29*(11), 1019–1023. <https://doi.org/10.1038/NBT.1992>
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, *2*(4), 371–372. <https://doi.org/10.1017/S0967199400002240>
- Yanagimachi, R. (2022). Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilisation and related topics. *Biology of Reproduction*, *106*(4), 644–675. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAC037>
- Yang, G., Xin, Q., Feng, I., & Dean, J. (2022). Germ-cell specific eIF4E1B regulates maternal RNA translation to ensure zygotic genome activation. *BioRxiv*, 2022.07.27.501690. <https://doi.org/10.1101/2022.07.27.501690>
- Yang, X., Zhao, Y., Yang, X., & Kan, F. W. K. (2015). Recombinant hamster oviductin is biologically active and exerts positive effects on sperm functions and sperm-oocyte binding. *PLoS One*, *10*(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0123003>
- Yang, Y., Liu, C., Lin, Y. L., & Li, F. (2013). Structural insights into central hypertension regulation by human aminopeptidase A. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(35), 25638–25645. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.494955>
- Yániz, J. L., Lopez-Gatius, F., & Hunter, R. H. F. (2006). Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *35*(1), 28–34. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0264.2005.00634.X>
- Yániz, J. L., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., & Mullins, K. J. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *The Anatomical Record*, *260*(3), 268–278. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20001101\)260:3<268::aid-ar60>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20001101)260:3<268::aid-ar60>3.0.co;2-l)
- Ye, X., Whiteman, B., Jerebtsova, M., & Batshaw, M. L. (2000). Correction of argininosuccinate synthetase (AS) deficiency in a murine model of citrullinemia with recombinant adenovirus carrying human AS cDNA. *Gene Therapy* *2000 7:20*, *7*(20), 1777–1782. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301303>
- Yong, P., Gu, Z., Luo, J. P., Wang, J. R., & Tso, J. K. (2002). Antibodies against the C-terminal peptide of rabbit oviductin inhibit mouse early embryo development to pass 2-cell stage. *Cell Research*, *12*(1), 69–78. <https://doi.org/10.1038/SJ.CR.7290112>
- Yoshida, N., & Niimura, S. (2011). Size of the perivitelline space and incidence of polyspermy in rabbit and hamster oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*, *10*(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s12522-010-0067-0>
- Yu, H., Hackenbroch, L., Meyer, F. R. L., 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-Fertilisation Processes by Quantitative Proteomics. *PROTEOMICS*, *19*(5), 1800319. <https://doi.org/10.1002/PMIC.201800319>



- Yu, H., Reiser, J., Besenfelder, U., Razzazi-Fazeli, E., Bergquist, J., Brem, G., Artemenko, K., & Mayrhofer, C. (2016). Exploring the oviductal fluid proteome by a lectin-based affinity approach. *Proteomics*, *16*(23), 2962–2966. <https://doi.org/10.1002/PMIC.201600315>
- Zander, D. L., Thompson, J. G., & Lane, M. (2006). Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages. *Biology of Reproduction*, *74*(2), 288–294. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.105.046235>
- Zeng, X., Wang, F., Fan, X., Yang, W., Zhou, B., Li, P., Yin, Y., Wu, G., & Wang, J. (2008). Dietary Arginine Supplementation during Early Pregnancy Enhances Embryonic Survival in Rats. *The Journal of Nutrition*, *138*(8), 1421–1425. <https://doi.org/10.1093/JN/138.8.1421>
- Zhang, C., Wang, M., Li, Y., & Zhang, Y. (2022). Profiling and functional characterization of maternal mRNA translation during mouse maternal-to-zygotic transition. *Science Advances*, *8*(5). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABJ3967>
- Zhang, K., & Smith, G. W. (2015). Maternal control of early embryogenesis in mammals. *Reproduction, Fertility, and Development*, *27*(6), 880–896. <https://doi.org/10.1071/RD14441>
- Zhao, Y., Vanderkooi, S., & Kan, F. W. K. (2022). The role of oviduct-specific glycoprotein (OVGP1) in modulating biological functions of gametes and embryos. *Histochemistry and Cell Biology*, *157*(3), 371–388. <https://doi.org/10.1007/S00418-021-02065-X>
- Zhao, Y., Yang, X., Jia, Z., Reid, R. L., Leclerc, P., & Kan, F. W. K. (2016). Recombinant human oviductin regulates protein tyrosine phosphorylation and acrosome reaction. *Reproduction (Cambridge, England)*, *152*(5), 561–573. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0177>
- Zhen, Y., Sørensen, V., Skjerpen, C. S., Haugsten, E. M., Jin, Y., Wälchli, S., Olsnes, S., & Wiedlocha, A. (2012). Nuclear import of exogenous FGF1 requires the ER-protein LRRC59 and the importins Kpn $\alpha$ 1 and Kpn $\beta$ 1. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *13*(5), 650–664. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0854.2012.01341.X>
- Zhou, L. quan, & Dean, J. (2015). Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos. *Trends in Cell Biology*, *25*(2), 82–91. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2014.09.006>
- Zhou, Z., Ni, C., Wu, L., Chen, B., Xu, Y., Zhang, Z., Mu, J., Li, B., Yan, Z., Fu, J., Wang, W., Zhao, L., Dong, J., Sun, X., Kuang, Y., Sang, Q., & Wang, L. (2019). Novel mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation. *Human Genetics*, *138*(4), 327–337. <https://doi.org/10.1007/S00439-019-01990-1>
- Zhu, B., Fukada, K., Zhu, H., & Kyprianou, N. (2006). Prohibitin and cofilin are intracellular effectors of transforming growth factor beta signaling in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, *66*(17), 8640–8647. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1443>
- Zhu, B., Zhai, J., Zhu, H., & Kyprianou, N. (2010). Prohibitin regulates TGF-beta induced apoptosis as a downstream effector of Smad-dependent and -independent signaling. *The Prostate*, *70*(1), 17–26. <https://doi.org/10.1002/PROS.21033>