

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Estudio de la expresión génica y de la composición proteica del oviducto. Efectos del fluido oviductal sobre la resistencia de la zona pelúcida a la digestión enzimática en diferentes mamíferos.

Irene Mondéjar Corbalán

2011



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Pilar Coy Fuster, Catedrática de Universidad del Área de Fisiología Veterinaria en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la expresión génica y de la composición proteica del oviducto. Efectos del fluido oviductal sobre la resistencia de la zona pelúcida a la digestión enzimática en diferentes mamíferos”, realizada por D^a. Irene Mondéjar Corbalán , bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia con Mención Europea.

En Murcia, a 13 de Octubre de 2011



UNIVERSIDAD
DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
Facultad de Veterinaria

Pilar Coy Fuster
Facultad de Veterinaria
Departamento de Fisiología

Campus Universitario de Espinardo 30071 Murcia
T. 868 884 789 – F. 868 884 147 Email: pcoy@um.es – www.um.es/grupo-fisiovet



Esta tesis doctoral ha sido propuesta para Mención de Doctorado Europeo en virtud de la siguiente estancia de investigación e informes:

Estancia de Investigación:

Dipartimento di Scienze Animali, Laboratorio di Embriologia Biomedica. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli Studi di Milano. Italia.

Dr. Fulvio Gandolfi, Full Professor of Anatomy and Embryology Faculty of Veterinary. Periodo 24/04/2010 – 24/07/2010.

Informes de Tesis:

Dr. Klaus-Peter-Brüssow. Email: bruessou@fhn-dummerstorf.de
Department of Reproductive Biology. Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Germany.

Dr. Carlo Tamanini. Email: tamanini@vet.unibo.it
Sezione di Fisiologia. Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie. Università di Medicina Veterinaria. Bologna. Italia.



CERTIFICADO DE REALIZACIÓN DE ESTANCIA

CERTIFICADO DE ESTANCIA EN EL CENTRO RECEPTOR

Apellidos, nombre:	MONDEJAR CORBALÁN, IRENE	NIF/NIE:	23260863C
Referencia de la ayuda:	BES-2007-16287	Referencia del proyecto:	AGL-2006-03495

ORGANISMO: Università degli Studi di Milano
CENTRO: Facultad de Medicina Veterinaria
DEPARTAMENTO: Departamento de ciencia Animal, Laboratorio de Embriología Biomédica
PAÍS: Italia

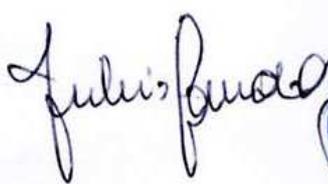
El abajo firmante certifica que el/la investigador/a en formación a quien se refiere el presente documento ha permanecido en el centro de trabajo desde el día 24 de Abril de 2010 hasta el día 24 de Julio de 2010 (*)

Nombre y apellidos del firmante: Fulvio Gandolfi

Cargo: Catedrático de Anatomía y Embriología de la Facultad de Veterinaria

Fecha: 24 /07/2010

Firma y sello




(*) TO BE COMPLETED BY THE HOST RESEARCH DIRECTOR

The undersigned certifies that the scholar has remained in this centre from (day) of (month) of 200- until (day) of (month) of 200-

MEMORIA DESPUÉS DE FINALIZAR LA ESTANCIA BREVE

CORREO ELECTRONICO

becasfpl@mec.es



2011/08/01

Informa:

El documento de Tesis Doctoral titulado "Estudio de la expresión génica y de la composición proteica del oviducto y sus efectos sobre la resistencia de la zona pelúcida a la digestión enzimática en diferentes mamíferos", presentado por **Irene Mondéjar Corbalán** bajo la dirección de la Dra. Pilar Coy Fuster y el Dr. Manuel Avilés Sánchez *es evaluado positivamente* para su próxima defensa pública y evaluación por un tribunal para la obtención del grado académico de Doctor por la Universidad de Murcia con la mención de "Doctorado europeo".

El presente documento aborda un interesante tema en el campo de la fisiología de la reproducción y los resultados mejorarán considerablemente el conocimiento sobre los procesos que ocurren específicamente en el oviducto.

(Prof. Dr. Klaus-Peter Brüssow)

Contact

Prof. Dr. K.-P. Brüssow

Phone: +49 38208 68 770

Fax: +49 38208 68 752

bruessow@fbn-dummerstorf.de

www.fbn-dummerstorf.de

**Foundation under public
law of the land M-V
Jurisdiction Rostock**

Landeszentalkasse Schwerin

KTO: 140 015 18

BLZ: 130 000 00

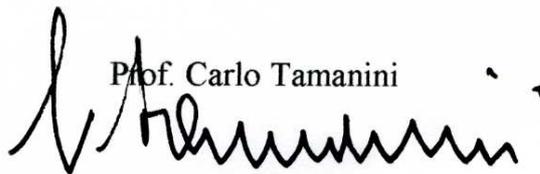
Prof. Carlo Tamanini
Sezione di Fisiologia
Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie
Via Tolara di Sopra, 50
40064 Ozzano Emilia (BO)
Italia

Inform

The project of Doctoral Thesis entitled “Estudio de la expresión génica y de la composición proteica del oviducto y sus efectos sobre la resistencia de la zona pelúcida a la digestión enzimática en diferentes mamíferos” presented by **Irene Mondéjar Corbalán** under the research supervision of Dr. Pilar Coy Fuster and Dr. Manuel Avilés Sánchez *is evaluated positively* for the next public defense and evaluation by a jury to obtain the academic degree of Doctor by the University of Murcia with the mention “European Doctorate”

Informa:

El proyecto de tesis doctoral titulada: “Estudio de la expresión génica y de la composición proteica del oviducto y sus efectos sobre la resistencia de la zona pelúcida a la digestión enzimática en diferentes mamíferos” presentado por **Irene Mondéjar Corbalán** bajo la dirección de los doctores Pilar Coy Fuster y Manuel Avilés Sánchez *es evaluado positivamente*, para ser defendido en acto público ante un tribunal para obtener el grado académico de Doctor por la Universidad de Murcia con mención de “Doctorado Europeo”.


Prof. Carlo Tamanini

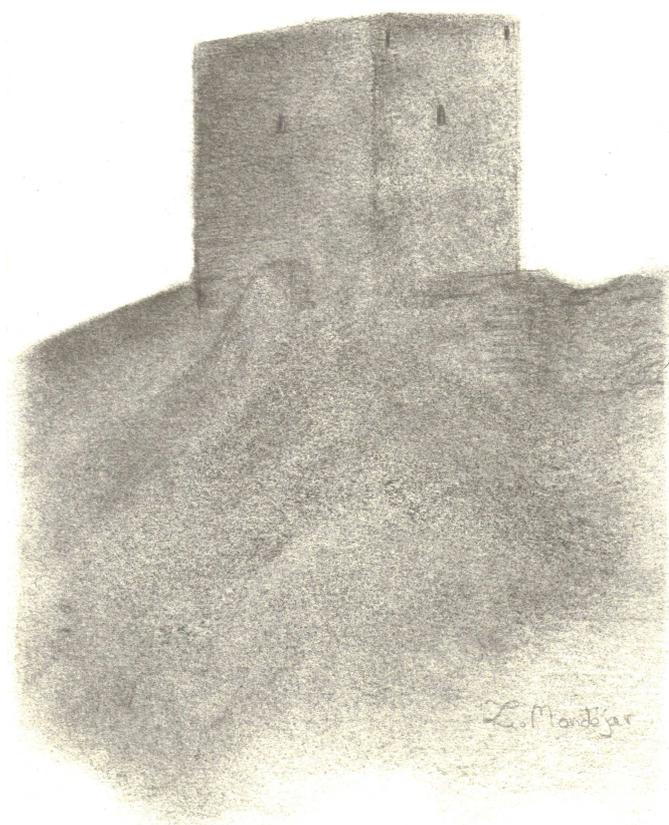
Ozzano Emilia, August 20, 2011

Este trabajo experimental ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia y cofinanciado por el Fondo Social Europeo.

Irene Mondéjar Corbalán disfrutó de una ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador asociada al proyecto de investigación AGL2006-03495 del Ministerio de Educación y Ciencia desde el curso 2007-2008 hasta el curso 2010-2011.

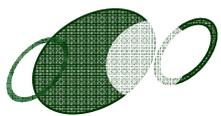
Irene Mondéjar Corbalán disfrutó de una subvención del Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2007-16287) para la realización de una estancia breve en el extranjero para la obtención de la Mención Europea en el título de doctor durante el curso 2009-2010.

A Lorca



No sufras niña bonita,
no sufras mi bella flor maltrecha.
Volverá...,
volverá la luz y el gentío,
¡Volverá la algarabía!
El tiempo alejará el polvo de nuestros corazones
derrumbados.
Volverá la vida
y se olvidará esta oscura primavera.

I. Mondéjar



AGRADECIMIENTOS

Es de bien nacido ser agradecido, sobre todo si la experiencia ha sido tan grata como la mía. Lo repetiría todo, incluso los peores momentos.

Agradecer muy especialmente a Pilar Coy Fuster, directora de esta tesis, por confiar en mi trabajo y por ayudarme en situaciones que debieron ser de su descanso. Gracias Pilar por mantenerme ocupada haciendo lo que más me apasiona y por desarrollar en mí gran entusiasmo por la investigación.

Quiero agradecer también de un modo muy especial a Manuel Avilés Sánchez, director de esta tesis, y mi padre en ciencia, que me permitiera trabajar en esta línea de investigación que tanto me apasiona. Gracias por todos tus consejos y por escucharme siempre.

A ambos, gracias por dedicarme vuestro valioso y escaso tiempo y por todo lo que me habéis ayudado y enseñado.

Gracias a todo el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia por haberme permitido formar parte de una estupenda “familia” y por cultivar en mí el entusiasmo por la investigación y por la docencia. Gracias a todos y a cada uno de vosotros puedo decir que he acudido con una sonrisa a mis jornadas diarias. Por vuestra ayuda incondicional, por acompañarme en los largos días de laboratorio y por hacerme saber que todos somos parte importante de esta historia.

Quiero dar las gracias a todos aquellos con los que he compartido cualquier pequeño instante de esta experiencia porque todos forman parte, de un modo u otro, de esta tesis.

A los profesores:

Carmen Matás, gracias por toda tu ayuda y por poner la salsa en esos “buenos ratos”.

Francisco Alberto García, gracias por enseñarme a no ser tan confiada, por tu paciencia y consejos.

Joaquín Gadea, gracias por mostrarme otra visión de la vida y por el apoyo ofrecido.

Raquel Romar, gracias por todo lo que me has enseñado y por estar ahí siempre para todo lo que necesitara.

Salvador Ruiz, muchas gracias por todas tus enseñanzas, apoyo y ayuda.

Muchísimas gracias a mis compañeros de despacho y batallas:

A Karen Guadalupe Avilés gracias por todos los buenos momentos que han sido muchos. Te voy a añorar un montón.

A Jon Romero, gracias por ser tan buen compañero como buena gente.

A Luis Vieira, gracias “morenito”. Todo es mejor con un poco de salsa en buena compañía.

Aitor de Ondíz, gracias por ilustrarme tan bien en todas mis dudas y por tus sanos y buenos consejos.

A Cristina Soriano y Rebeca López por transmitir las ganas de aquellos que empiezan.

A compañeros que andan por otros mundos:

M^a Dolores Saavedra, gracias por tu compañía y aliento aún en la distancia.

Luis Alberto Grullón, gracias por mostrarme otro modo de vivir la ciencia, “algunas cosas necesitan madurar”....

Sebastián Canovas, muchas gracias por ayudarme en mis primeros pasos en el departamento.

También a Manuel Sansegundo, por transmitir alegría con la sola presencia.

A Carlos de Jódar, muchas gracias por el soporte técnico y, sobre todo, por hacerme reír.

A mis compañeros asociados, Iván Hernández y Marco Antonio, muchas gracias por vuestras enseñanzas veterinarias.

A Darío Abril, Juan Antonio Carvajal y Soledad Rodríguez. Las piezas del puzzle no encajan sin vosotros, gracias por toda vuestra ayuda. Muchas gracias por todo Sole, gracias por ser tan buena persona y por tener el corazón más grande del mundo.

Todos vosotros me habéis hecho crecer muchísimo como persona. Me habéis dado mucho, seguro que mucho más de lo que os he podido ofrecer yo. Os puedo decir incluso, ahora que no podéis ver que me “sonrojo”, que os quiero mucho a todos.

Gracias a todos los profesores del Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia: Adelina Zuasti, Concepción Ferrer, Emilio Gómez, Francisco Hernández, Jose Ángel Martínez, José Ballesta, Juan Francisco Madrid, María Teresa Castells, M^a Teresa Hernández y Luis Miguel Pastor por acogerme en mis inicios.

A mis chicas de medicina ya profesoras Emma Martínez, María José Izquierdo, María Jiménez y Mónica Tomás, muchas gracias por vuestra ayuda incondicional y consejos.

Gracias también a todos aquellos con los que compartí experiencias en Medicina, David Gumbao, Ester Beltrán, Julián Marcos, M^a del Carmen González, M^a Teresa Zomeño, Verónica Hernández y más recientemente Carla Moros, Diana Turmo, Irene Stenson, Luis Miguel Rodríguez, Lilliana López, Omar Salvador, Wilson Orlando, Narcisca Martínez, y Vicente Seco.

Gracias a todos los componentes del INIA de Madrid, especialmente a los Drs. Alfonso Gutiérrez y Miguel Ángel Ramírez, por hacerme un hueco en su laboratorio y en sus agendas. Muchísimas gracias a Juan De Dios Hourcade, Míriam Pérez y María Clemente por hacerme sentir como en casa.

Gracias también al Dr. Fulvio Gandolfi por permitirme la realización de mi estancia en su laboratorio.

A todas las personas con las que he tenido el gusto de encontrarme en el desarrollo de esta tesis y que me han ayudado tanto: Fara Sáez y Antonio Espinosa del servicio de análisis de imagen; Maruja García, Manuela Bernal, Jose Joaquín Clares, Paco Asensio y Francisca Calderón del servicio de Microscopía; Pepe Rodríguez del servicio de instrumentación científica; Alejandro Tordesillas del servicio de biología molecular; Antonio Maurandi del servicio de estadística, Carmen Lagares del servicio de animales de laboratorio; a los administrativos Ángel Fernández y Ángel Ginés de Paco; a Antonia y a Inmaculada Torres de la Clínica Tahe Fertilidad. A todos muchas gracias.

A Elena Butaité por ser tan especial y darme todo el apoyo que necesité.

Gracias a todos los que han realizado estancias en el departamento, Alejandra Mejía, Gabriel, Guilherme Oberlender, Sara Succu, Masanobu Okuyama, Masanori Yabusaki, Claudia Vallorani y Lenka Tumova, por mostrarme otras formas de vivir y de ver las cosas.

Muchas gracias a mis amigas Antonia M^a Paredes, Inmaculada González, Pilar Elvira, M^a José Llamas, Florentina Tobar y Verónica Alacid. No os he podido dedicar el tiempo que os merecéis y habéis seguido ahí, sois lo mejor del mundo.

A mis amigos de Arboleas: Ginés Felipe Gómez, Gema Riquelme, Pedro Párraga, Juana Mena, Abel Salmerón, Sonia Pérez, Pepe Campoy, Bibiano García y Domingo Quiles.

A mis suegros Antonio Mellado y Ana Domínguez; a mis cuñadas y cuñados Ana M^a y Jose M^a, Esther y Carlos, Diego y Piedad y Eva, gracias por apoyarme siempre y por acompañarme allá donde vaya.

Gracias a mis sobrinos Lydia, Antonio Benito, Ester, Alejandro, Isabel M^a y a mi ahijado Javier, por mostrarme facetas muy importantes de la vida que había olvidado y por vuestro cariño incondicional.

A toda mi familia, gracias por entenderme y apoyarme.

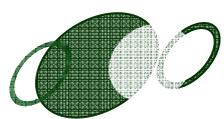
Agradecer a mi abuela Francisca Martínez y, sobre todo, a mi abuelo Asensio Mondéjar que siempre soñó con una “doctora” en la familia.

A mis padrinos Irene Mondéjar y Jose M^a Palomino, de corazón muchas gracias por estar ahí siempre.

A mis hermanos Julia y Asensio Mondéjar, muchas gracias por acompañarme y animarme en este camino, qué pena no haberos tenido más cerca. Gordiqui, te quiero mucho.

A mis padres, Trinidad Mondéjar y Julia Corbalán. Muchas gracias por darme tanto, tanto de todo y lo mejor que habéis podido. Nunca hubiera llegado hasta aquí sin vuestro estímulo y ayuda. Gracias por vuestro apoyo en todo momento.

A Pascual Mellado, gracias por compartir tu vida conmigo. Esta tesis es también fruto de tu esfuerzo, paciencia y apoyo incondicional.



ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	9
3. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	20
4.1. FECUNDACIÓN	21
4.1.1. OVOCITO.....	22
4.1.1.1. Maduración ovárica	23
4.1.1.2. Ovulación	28
4.1.1.3. El ovocito en el oviducto	29
4.1.1.3.1. Maduración oviductal.....	30
4.1.1.3.2. Vida media y envejecimiento.....	31
4.1.1.3.3. Transporte.....	32
4.1.2. CÉLULAS DEL CÚMULO.....	33
4.1.3. ESPERMATOZOIDES.....	34
4.1.3.1. Formación del espermatozoide maduro	35
4.1.3.2. Capacitación espermática	38
4.1.3.3. Reacción acrosómica (RA)	44
4.1.4. INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO Y FECUNDACIÓN.....	46
4.1.4.1. Zona pelúcida (ZP)	47
4.1.4.2. Interacción espermatozoide-ovocito	49
4.1.4.3. Bloqueo de la polispermia	51
4.2. OVIDUCTO	55
4.2.1. ANATOMÍA.....	55
4.2.1.1. Vascularización	56
4.2.1.2. Inervación	58
4.2.2. HISTOLOGÍA.....	60
4.2.3. FISIOLÓGÍA.....	63
4.3. FLUIDO OVIDUCTAL	64
4.3.1. FORMACIÓN.....	64
4.3.2. OBTENCIÓN.....	65

4.3.3. PROPIEDADES FÍSICAS.....	70
4.3.3.1. Tasa de secreción y volumen	70
4.3.3.2. Temperatura	71
4.3.3.3. Viscosidad	72
4.3.4. PROPIEDADES QUÍMICAS.....	73
4.3.4.1. pH	73
4.3.4.2. Osmolaridad	74
4.3.4.3. Tensión de oxígeno	74
4.3.5. COMPOSICIÓN.....	74
4.3.5.1. Agua y electrolitos	75
4.3.5.2. Componentes energéticos	77
4.3.5.3. Lípidos	79
4.3.5.4. Aminoácidos	79
4.3.5.5. Proteínas	81
4.3.6. FUNCIONES	93
4.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN OVIDUCTAL	97
4.4.1. PROTEÓMICA, GENÓMICA Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	97
4.4.2. RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA (RDE) E INTERACCIONES HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS.....	99
5. MATERIAL Y MÉTODOS	101
5.1. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO	102
5.1.1. OVARIOS.....	102
5.1.1.1. Obtención	102
5.1.1.2. Transporte	103
5.1.1.3. Lavado	103
5.1.2. OVOCITOS.....	104
5.1.2.1. Coneja (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	104
5.1.2.2. Ratona (<i>Mus musculus</i>)	105
5.1.2.3. Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	106

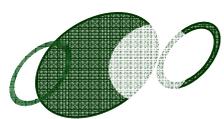
5.1.2.4. Hámster (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	106
5.1.2.5. Cerda (<i>Sus scrofa domestica</i>).....	107
5.1.2.6. Vaca (<i>bos taurus</i>), oveja (<i>ovis aries</i>) y cabra (<i>capra hircus</i>).....	109
5.1.3. ZONAS PELÚCIDAS.....	110
5.1.4. OVIDUCTOS Y FLUIDO OVIDUCTAL.....	110
5.2. MADURACIÓN IN VITRO	112
5.2.1. ESPECIE PORCINA.....	113
5.2.1. ESPECIE BOVINA, CAPRINA Y OVINA.....	114
5.3. INCUBACIÓN EN FLUIDO OVIDUCTAL	115
5.3.1. OVOCITOS.....	115
5.3.2. ZONAS PELÚCIDAS.....	115
5.4. DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA	117
5.5. OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA MEDIANTE COLUMNA DE HEPARINA	118
5.6. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA DEL FLUIDO OVIDUCTAL (BOVINO Y PORCINO)	121
5.6.1. ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	121
5.6.2. TINCIÓN DE PLATA.....	123
5.6.3. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS BANDAS.....	124
5.6. 5. ANÁLISIS DE DATOS.....	127
5.7. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA OVIDUCTAL PORCINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA	127
5.7.1. RECOGIDA DE MUESTRAS.....	127
5.7.2. PROCESAMIENTO Y OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.....	128
5.7.2.1. Extracción del ARN total	128
5.7.2.2. Análisis de la cantidad e integridad del ARN	129
5.7.2.3. Hibridación con micromatrices	129
5.7.2.4. Análisis de los datos	130
5.8. DISEÑO EXPERIMENTAL	130
5.8.1. FASE EXPERIMENTAL 1. ANÁLISIS DEL EFECTO QUE PRODUCE EL FLUIDO OVIDUCTAL DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LA RESISTENCIA	

DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN USANDO LA ENZIMA PRONASA.....	131
5.8.1.1. Análisis de la cinética enzimática de la enzima pronasa.....	131
5.8.1.1.1. Efecto del tiempo de permanencia de la enzima en incubación sobre su actividad en la digestión de la zona pelúcida.....	131
5.8.1.1.2. Efecto de la dilución de la solución enzimática y/o del gasto enzimático sobre la capacidad de digestión de la zona pelúcida.....	132
5.8.1.2. Análisis de la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de cerda en diferentes diluciones del fluido oviductal bovino en fase folicular tardía.....	132
5.8.1.3. Efecto relativo de la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de nueve especies diferentes (coneja, ratona, rata, hámster, mujer, cerda, vaca, oveja y cabra) mediada por el fluido oviductal de cinco especies diferentes (cunícola, porcina, bovina, ovina y caprina) en la fase folicular tardía.....	133
5.8.1.3.1 Análisis del efecto producido por cinco tipos de fluido oviductal en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de diferentes especies.....	134
5.8.1.3.2 Análisis del efecto producido en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de nueve especies diferentes por el fluido oviductal de cinco especies diferentes.....	135
5.8.1.4. Análisis de la resistencia a la digestión por pronasa de la zona pelúcida de ovocitos porcinos incubados con fluido oviductal carente de oviductina.....	135
5.8.2. FASE EXPERIMENTAL 2. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DEL EFECTO SOBRE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LA ZONA PELÚCIDA DEL FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA FRACCIONADO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HEPARINA...	137
5.8.2.1. Cromatografía de afinidad.....	137
5.8.2.2. Análisis del efecto sobre la resistencia a la digestión enzimática (RDE) provocada por las diferentes fracciones obtenidas.....	137
5.8.2.3. Electroforesis y tinción de plata.....	138
5.8.3. FASE EXPERIMENTAL 3. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y GENÓMICO DEL CONTENIDO DEL FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO Y PORCINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA.....	139
5.8.3.1. Análisis proteómico.....	139
5.8.3.2. Análisis genómico.....	140
6. RESULTADOS.....	143

6.1. ANÁLISIS DEL EFECTO QUE PRODUCE EL FLUIDO OVIDUCTAL DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN USANDO LA ENZIMA PRONASA.....	144
6.1.1. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA PRONASA.....	144
6.1.1.1. Efecto del tiempo de permanencia de la enzima en incubación sobre su actividad en la digestión de la zona pelúcida.....	144
6.1.1.2. Efecto de la dilución de la solución enzimática y/o del gasto enzimático sobre la capacidad de digestión de la zona pelúcida.....	145
6.1.2. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA DE LA CERDA EN DIFERENTES DILUCIONES DEL FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA.....	147
6.1.3. EFECTO RELATIVO DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA DE NUEVE ESPECIES DIFERENTES TRAS LA INCUBACIÓN EN EL FLUIDO OVIDUCTAL EN LA FASE FOLICULAR TARDÍA DE CINCO ESPECIES.....	149
6.1.3.1. Análisis del efecto producido por cinco tipos de fluido oviductal en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de especies diferentes.....	151
6.1.3.1.1. Control.....	151
6.1.3.1.2. Fluido oviductal de coneja.....	152
6.1.3.1.3. Fluido oviductal porcino.....	156
6.1.3.1.4. Fluido oviductal bovino.....	158
6.1.3.1.5. Fluido oviductal ovino.....	159
6.1.3.1.6. Fluido oviductal caprino.....	161
6.1.3.2. Análisis del efecto producido en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de 9 especies diferentes por el fluido oviductal de 5 especies diferentes.....	164
6.1.3.2.1. Ovocito de coneja.....	164
6.1.3.2.2. Ovocito de ratona.....	168
6.1.3.2.3. Ovocito de rata.....	169
6.1.3.2.4. Ovocito de hámster.....	170
6.1.3.2.5. Ovocito de mujer.....	171
6.1.3.2.6. Ovocito de cerda.....	172
6.1.3.2.7. Ovocito de vaca.....	173
6.1.3.2.8. Ovocito de oveja.....	175
6.1.3.2.9. Ovocito de cabra.....	177
6.1.4. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN POR PRONASA DE LA ZONA PELÚCIDA DE OVOCITOS PORCINOS INCUBADOS CON FLUIDO OVIDUCTAL CARENTE DE OVIDUCTINA.....	178

6.2. OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HEPARINA Y ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS MISMOS SOBRE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LA ZONA PELÚCIDA.....	178
6.2.1. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	178
6.2.2. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA (RDE) PROVOCADA POR LAS DIFERENTES FRACCIONES OBTENIDAS.....	180
6.2.3. ELECTROFORESIS Y TINCIÓN DE PLATA.....	182
6.3. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y GENÓMICO DEL OVIDUCTO PORCINO Y BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA.....	183
6.3.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO.....	183
6.3.1.1. Análisis proteómico del fluidooviductal porcino.....	184
6.3.1.2. Análisis proteómico del fluidooviductal bovino.....	188
6.3.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	191
6.3.3. ANÁLISIS DE COINCIDENCIAS.....	193
7. DISCUSIÓN.....	195
7.1. ANÁLISIS DEL EFECTO QUE PRODUCE EL FLUIDO OVIDUCTAL DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN USANDO LA ENZIMA PRONASA.....	197
7.1.1. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA PRONASA.....	197
7.1.2. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA DE LA CERDA EN DIFERENTES DILUCIONES DEL FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA.....	198
7.1.3. EFECTO RELATIVO DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA DE NUEVE ESPECIES DIFERENTES TRAS LA INCUBACIÓN EN EL FLUIDO OVIDUCTAL EN LA FASE FOLICULAR TARDÍA DE CINCO ESPECIES.....	200
7.1.3.1. Análisis del efecto producido por cinco tipos de fluido oviductal en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de especies diferentes.....	200
7.1.3.1.1. Control.....	200
7.1.3.1.2. Fluido oviductal de coneja.....	203
7.1.3.1.3. Fluido oviductal porcino.....	205
7.1.3.1.4. Fluido oviductal bovino.....	208
7.1.3.1.5. Fluido oviductal ovino.....	209
7.1.3.1.6. Fluido oviductal caprino.....	210
7.1.3.2. Análisis del efecto producido en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de 9 especies diferentes por el fluido oviductal de 5 especies diferentes.....	211
7.1.3.2.1. Ovocito de coneja.....	211

7.1.3.2.2. Ovocito de ratona.....	212
7.1.3.2.3. Ovocito de rata.....	213
7.1.3.2.4. Ovocito de hámster.....	214
7.1.3.2.5. Ovocito de mujer.....	215
7.1.3.2.6. Ovocito de cerda.....	216
7.1.3.2.7. Ovocito de vaca.....	217
7.1.3.2.8. Ovocito de oveja.....	218
7.1.3.2.9. Ovocito de cabra.....	218
7.2. OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA MEDIANTE COLUMNA DE HEPARINA.....	225
7.3. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y GENÓMICO DEL OVIDUCTO PORCINO Y BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA.....	230
7.3.1. PROTEÓMICA PORCINA.....	231
7.3.2. PROTEÓMICA BOVINA.....	235
7.3.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	240
7.3.3.1. Análisis de coincidencias en los estudios de proteómica y genómica en la especie porcina y bovina	244
7.3.3.2. Análisis de coincidencias de los resultados de proteómica y genómica del presente trabajo con los de genómica humana.....	245
8. CONCLUSIONES.....	249
9. CONCLUSIONS.....	252
10. ABREVIATURAS.....	255
11. ANEXOS.....	259
I. Proteínas identificadas en el fluido oviductal porcino en fase folicular tardía.....	260
II. Proteínas identificadas en el fluido oviductal bovino en fase folicular tardía.....	271
III. Proteínas del fluido oviductal porcino en fase folicular tardía analizadas y agrupadas mediante la plataforma Ingenuity.....	282
IV. Proteínas del fluido oviductal bovino en fase folicular tardía analizadas y agrupadas mediante la plataforma Ingenuity.....	286
V. Genes obtenidos mediante análisis de micromatrices del oviducto porcino analizadas y agrupadas mediante la plataforma Ingenuity.....	288
VI. Comparativa de los genes obtenidos mediante análisis de micromatrices del oviducto porcino con los resultados de otros autores	294
12. BIBLIOGRAFÍA.....	299



RESUMEN

La fecundación en mamíferos consiste básicamente en la fusión de los gametos masculino y femenino para formar un cigoto capaz de dar lugar a un nuevo individuo. Hasta ahora, la mayoría de las investigaciones encaminadas al esclarecimiento de este proceso se han centrado, bien en el estudio de la biología del espermatozoide y del ovocito como células aisladas, o bien en el estudio de los diversos mecanismos que tienen lugar durante la interacción de ambos. Sin embargo, se ha dejado un poco de lado a otro elemento fundamental y sin el cual el resto de estudios pueden resultar incompletos: el microambiente en el que tiene lugar el encuentro entre los gametos, es decir, el fluido y las células oviductales que secretan ciertos componentes de dicho fluido.

Los métodos usados para conocer el microambiente oviductal se han ido desarrollando poco a poco y han sido muy diversos. Entre ellos, podemos mencionar las técnicas de detección de moléculas específicas en gametos y en células del epitelio oviductal mediante anticuerpos, los estudios de proteómica de las secreciones oviductales o los de genómica de las células oviductales (revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010). Mediante este último tipo de estudios se han podido conocer los patrones de expresión génica parciales y totales del oviducto bovino (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004) y humano respectivamente (Tone, Begley *et al.*, 2008), implicando a genes concretos que indican con cierto grado de fiabilidad las diferentes proteínas que se pueden expresar en el oviducto. A diferencia de los otros dos métodos mencionados, la expresión génica aporta gran cantidad de información de un modo rápido gracias a tecnologías como la de las micromatrices (*microarrays*). Por su parte, las técnicas de inmunocitoquímica y las de proteómica tienen la ventaja de que permiten reconocer componentes de un modo más puntual, identificando proteínas concretas con alto grado de fiabilidad. Sin embargo, estas técnicas requieren de un procesado más lento para completar el abanico de posibles elementos que puedan tener algún papel relevante en el éxito de la fecundación. Estos estudios se han realizado previamente, dependiendo del interés científico en cada caso, en diferentes fases del ciclo estral, pero aún así la información que se posee actualmente resulta incompleta cuando nos centramos en alguna fase concreta del ciclo e intentamos asignar roles específicos a determinadas moléculas.

La **fase folicular tardía** o etapa inmediatamente preovulatoria, es el momento en el que el oviducto se encuentra preparado para el encuentro de los gametos y para que se produzca la fecundación. Debido a la importancia de los factores implicados en la unión de gametos que han de estar presentes en este momento preciso del ciclo estral y a la escasez de información acerca de los mismos, centramos nuestro estudio en esta fase.

Para ello, se abordó el análisis de los componentes oviductales y sus características fundamentalmente desde cuatro perspectivas: (1) efecto del fluido oviductal (FO) sobre la resistencia a la digestión enzimática (RDE) de la zona pelúcida (ZP), (2) fraccionamiento del FO bovino en base a su capacidad de unión a heparina, (3) análisis proteómico del FO y (4) análisis de la expresión génica del oviducto porcino.

1. Por un lado, el oviducto y sus secreciones han sido implicados en diferentes procesos entre los que encontramos el transporte del ovocito desde el ovario hasta el lugar de la fecundación. Existen evidencias de que durante ese traslado las secreciones oviductales participan en una maduración ovocitaria oviductal que implica un incremento pre-fecundación de la RDE de la ZP en algunas especies de mamíferos (porcina y bovina) y que ha sido considerado un nuevo mecanismo para el bloqueo de la polispermia *in vivo* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Además de la cerda, otras especies de animales con incidencia de polispermia después de la fecundación *in vitro* son la oveja y la cabra con una tasa próxima al 20% de los ovocitos fecundados (Fukui, Glew *et al.*, 1988; De Smedt, Crozet *et al.*, 1992). Estudios en conejos, ratones, ratas y hámsters también muestran polispermia durante la fecundación *in vitro* (Austin y Braden, 1953; Barros y Yanagimachi, 1972; Fraser y Maudlin, 1979), aunque no se conoce su causa.

Hasta ahora, el incremento pre-fecundación de la RDE de la ZP mediado por el FO sólo ha sido apreciado en la vaca y en la cerda, fenómeno que se produce de modo homólogo y heterólogo entre estas dos especies (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Para esclarecer si en otras especies de animales es necesario ese proceso de maduración oviductal y si ese fenómeno se produce de modo homólogo y/o heterólogo, se procedió a **la incubación de ovocitos de coneja, ratona, rata, hámster, cerda, vaca, oveja,**

cabra y de ZPs humanas, con FO en la fase folicular tardía. Además, para observar precisamente el posible efecto heterólogo, **el FO usado se obtuvo de cinco especies diferentes: cunícula, porcina, bovina, ovina y caprina.** En todos estos ensayos (tanto homólogos como heterólogos) se valoró el fenómeno del incremento en la RDE de la ZP con la enzima pronasa al 0'5 por ciento (%). Este método nos indica si aumenta o no la resistencia de la ZP tras el tratamiento con el FO y por lo tanto si ese proceso de “endurecimiento” pre-fecundación de la ZP mediado por el FO podría producirse *in vivo*, y si se produce de modo intra o inter-específico.

Los resultados obtenidos mostraron que el FO de las especies cunícula, porcina, bovina, ovina y caprina posee la capacidad de producir resistencia a la digestión enzimática de la ZP de los ovocitos de modo homólogo y de modo heterólogo en todas las especies estudiadas, con escasas excepciones. La ZP humana es una excepción generalizada, no adquiriendo RDE para ninguno de los FOs analizados. Algo similar ocurre con la ZP de los ovocitos de la ratona y la rata, las cuales no adquieren resistencia a la proteólisis de la ZP con prácticamente ninguno de los FOs analizados, salvo cuando se tratan con el FO de coneja. Por lo tanto, nuestros datos indican que el FO de coneja es el que produce RDE de modo más generalizado en las ZPs de las especies analizadas.

2. Por otro lado, es sabido que la secreción oviductal se compone fundamentalmente de proteínas glicosiladas. Éstas se pueden enriquecer, fraccionar o purificar en base a los azúcares que contienen mediante el uso de lectinas unidas a agarosa como WGA (lectina de *Triticum vulgare*), HPA (lectina de *Helix pomatia*) y PNA (lectina de *Arachis hypogaea*). Otros métodos empleados con la misma finalidad y basados en el conocimiento previo de las características del componente a separar han sido el uso de columnas de unión a heparina, columnas de exclusión molecular, cultivo de explantes o producción de proteínas recombinantes. Estas técnicas han sido usadas para la purificación parcial o total de proteínas que tienen un reconocido efecto favorable en la fecundación en diferentes especies, como es el caso de la oviductina u OVGPI en la coneja (Oliphant y Ross, 1982), ratona (Sendai, Komiya *et al.*, 1995), hámster (Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997), mujer (Arias, Verhage *et al.*, 1994; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1996; Ling, Lee *et al.*, 2005), babuina (Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997), cerda (Buhi, Alvarez *et al.*, 1996; Kouba, Abeydeera *et al.*,

2000), vaca (Sendai, Abe *et al.*, 1994; Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997) y cabra (Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011). Además de purificarla a partir de muestras de FO, OVGP1 también ha sido producida en algunas especies como proteína recombinante (Boice, Mavrogianis *et al.*, 1992; Sendai, Abe *et al.*, 1994; Suzuki, Sendai *et al.*, 1995; Buhi, Alvarez *et al.*, 1996; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1996; Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 2002; Ling, Lee *et al.*, 2005).

El interés de esta proteína, OVGP1, se debe, como hemos comentado, a su efecto beneficioso sobre la fecundación, por mecanismos que hasta ahora no habían sido del todo clarificados. Sin embargo, recientemente, OVGP1 ha sido implicada en el proceso de maduración oviductal de la ZP de las especies porcina y bovina a través de al menos dos de sus glicofomas de 75 y 95 kilo daltons (kDa), presentes en el FO bovino en fase folicular tardía (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). En este trabajo de Coy *et al.* se ha observado que ambas glicofomas de OVGP1 se unen a la ZP y se han considerado responsables de participar en el incremento de la RDE de ésta, el cual a su vez contribuye a la disminución de la polispermia *in vitro*. Sin embargo, la unión de ambas glicofomas a la ZP, así como el incremento de la RDE, desaparecen cuando estas ZPs se incuban en un medio carente de heparina. En consecuencia, tanto las glicofomas de OVGP1 mencionadas como cualquier otro factor implicado en el proceso de maduración zonal, deben de ser capaces de unirse a heparina de un modo más o menos estable. Por ello, en este trabajo **se realizó un fraccionamiento del FO bovino (de conocida capacidad para producir RDE de la ZP) en fase folicular tardía en base a su capacidad de unión a heparina** para separar y enriquecer el/los factores que participan en dicha maduración oviductal y que serán analizados en el futuro. De cada fraccionado se observó su patrón proteico mediante electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con plata y la capacidad de producir RDE en la ZP de ovocitos porcinos, mediante el ensayo de digestión con la enzima pronasa. Los resultados de este análisis mostraron la existencia de un fraccionado (el número 25) que se obtiene con una concentración de 0'4 Molar (M) de NaCl que posee un efecto de RDE similar al del FO bovino de partida, por lo que en esta fracción se encuentran posiblemente los factores implicados con dicha resistencia. Posteriores análisis de dicha fracción nos permitirán la identificación de sus componentes y averiguar los factores implicados en la RDE de la ZP.

3. En tercer lugar, se realizó el **análisis proteómico** del contenido oviductal en la fase folicular tardía de dos especies, la porcina y la bovina, por ser dos especies muy cercanas evolutivamente y que presentan diferencias importantes en el proceso de fecundación *in vitro*. Mientras que en la especie bovina la incidencia de polispermia *in vitro* no suele superar el 25%, en la especie porcina la tasa de polispermia *in vitro* es muy elevada, llegando incluso al 60% (revisado por Coy y Avilés, 2010).

En este apartado del trabajo experimental se identificaron diferentes proteínas presentes en el FO en la fase folicular tardía. Concretamente, se identificaron 291 proteínas en el FO porcino y 270 proteínas en el FO bovino, todas ellas con un nivel de validez significativo. Estas proteínas se clasificaron en base al criterio previamente establecido por Avilés *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) adaptado al presente estudio y para ello se consultaron diferentes bases de datos (PubMed y UniProtKB). Las proteínas también fueron analizadas mediante dos plataformas bioinformáticas disponibles, DAVID e Ingenuity.

Entre las proteínas detectadas se describen por primera vez en el presente trabajo 269 proteínas del oviducto porcino (22 de ellas secretadas) y 265 del oviducto bovino (35 de ellas secretadas).

4. Por último, el análisis proteómico porcino se completó con un **análisis de expresión génica** mediante el uso de la técnica de micromatrices. Los patrones de expresión génica oviductales son determinantes para conocer, en cada momento del ciclo, las condiciones en las que se encuentran los gametos, el recién formado cigoto o el embrión en sus estadios iniciales de desarrollo hasta que alcanza el útero. El análisis del patrón genómico de la etapa pre-ovulatoria se desarrolló solamente en la especie porcina debido a que en la especie bovina existen ya datos publicados al respecto que tuvimos en cuenta para el análisis y discusión de los resultados (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004).

En el análisis del **patrón de expresión génica oviductal del cerdo** en esta fase se observó la expresión de 2.943 genes, detectándose por primera vez en el oviducto de la especie porcina la expresión de 2889 genes. A partir de estos resultados se desglosó

la información y se redirigió hacia los aspectos concretos que nos interesan en la reproducción puesto que la información obtenida fue muy amplia y variada. Los genes fueron analizados usando las mismas plataformas bioinformáticas empleadas en proteómica.

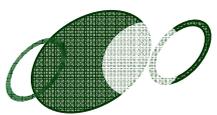
Comparando los resultados de proteómica porcina con los resultados de la expresión génica se observó la presencia de 35 proteínas coincidentes en los resultados de ambos análisis en el oviducto porcino. Posteriores estudios indicarán si existe algún patrón de expresión génica diferente en cada una de las fases del ciclo estral, esclareciendo qué factores podrían ser más relevantes en cada fase.

Los resultados proteómicos y de expresión génica del presente estudio mostraron similitudes con resultados obtenidos en otras especies, entre los que cabe mencionar el trabajo en trompa de Falopio (oviducto humano) de Tone *et al.* (Tone, Begley *et al.*, 2008). Estas coincidencias aumentan la certeza de nuestros datos sobre todo en la cerda ya que en esta especie no se ha descifrado por completo su genoma. A partir de la detección de componentes descritos en otras especies fue posible la identificación de algunas proteínas desconocidas para nuestras especies de interés.

Por lo tanto, aunque este bloque de resultados mostró numerosos componentes presentes en el oviducto en esta fase concreta del ciclo, sólo aquellos que son secretados y que se encuentran en condiciones fisiológicas en el lumen oviductal (es decir, 27 proteínas en la especie porcina y 38 en la especie bovina) se pueden considerar candidatos potenciales para desempeñar alguna función en los procesos reproductivos que acontecen durante la misma: maduración final de los gametos y fecundación. Es en el estudio de éstos en los que se deberían centrar los esfuerzos en el futuro para conseguir mejorar la eficacia de la fecundación *in vitro* y ampliar nuestro conocimiento sobre los factores implicados en este proceso *in vivo*.

En conclusión, el presente estudio nos ha permitido demostrar que el FO posee la capacidad de modificar la ZP de los ovocitos, incrementando su resistencia a la digestión enzimática, no sólo en la especie porcina y bovina sino también en la caprina, ovina y cunícola. Este efecto, además, no es específico de especie, ya que los diferentes ensayos demostraron la capacidad de los FOs empleados para producir un efecto

semejante de modo heterólogo. La única especie que resultó ajena a dicho efecto fue la mujer; por el contrario, la especie más “efectiva” en cuanto a la capacidad de su FO para inducir resistencia a la digestión enzimática de la ZP fue la coneja. Los factores oviductales implicados en la producción de este efecto tienen afinidad por heparina y se puede obtener una fracción de fluido enriquecida en dichos factores empleando una columna de heparina y una concentración 0'4M de NaCl para eluir la fracción enriquecida. Finalmente, se identificaron 27 proteínas en la especie porcina y 38 en la especie bovina como candidatos potenciales para desempeñar alguna función en los procesos reproductivos que acontecen durante la fase folicular tardía del ciclo estral, entre ellos la maduración final de los gametos y la fecundación.



SUMMARY

Fertilization in mammals is basically the merging of male and female gametes to form a zygote that can give rise to a new individual. So far, most research aimed at clarifying this process have focused either on the study of the biology of the spermatozoon and the oocyte as isolated cells or in the study of the various mechanisms that occur during the interaction of both. However, it has been partially left to one side to another key element without which the other studies may be incomplete: the microenvironment in which the meeting takes place between the gametes, ie the fluid and the oviductal cells that secrete some components of such a fluid.

The methods used to know the oviductal microenvironment have developed gradually and have been very different. Among them, we can mention the techniques for the detection of specific molecules on gametes and on oviductal epithelial cells by antibodies, proteomic studies of oviductal secretions and genomic studies of oviductal cells (reviewed in Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010). By the latter type of studies, it has been possible to learn the patterns of partial and total gene expression of bovine (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004) and human oviduct, respectively (Tone, Begley *et al.*, 2008), involving specific genes that indicate, with a certain degree of reliability, the different proteins that can be expressed in the oviduct. Unlike the other two methods mentioned above, gene expression provides a wealth of quick information thanks to technologies such as microarrays. For its part, the techniques of immunocytochemistry and proteomic have the advantage that components can be recognized in timelier, identifying specific proteins with a high degree of reliability. However, these techniques require a slower process to complete the range of possible elements that may have an important role in the success of fertilization. These studies have been performed previously, depending on the scientific interest in each case, at different stages of the estrous cycle. Yet the information is incomplete currently when we focus on a specific phase of the cycle and try to assign specific roles to specific molecules.

The **late follicular phase** or immediately pre-ovulatory phase is the time when the oviduct is prepared for the meeting of gametes and fertilization occurs. Due to the importance of the factors involved in the gametes interaction which must be present at this

precise moment of the estrous cycle and the scarcity of information about them, we focused our study on this phase.

To do so, it was addressed the analysis of oviductal components and features mainly from four perspectives: (1) effect of oviductal fluid (OF) on the resistance to enzymatic digestion (RED) of the zona pellucida (ZP), (2) fractionation of the bovine oviductal fluid based on their ability to bind to heparin, (3) proteomic analysis of oviductal fluid and (4) gene expression analysis of pig oviduct.

1. On the one hand, the oviduct and its secretions have been implicated in various process among which is the transport of the oocyte from the ovary to the site of fertilization. There is evidence that, during this transfer, oviductal secretions are involved in an oviductal oocyte maturation that implies a pre-fertilization increase of RED of ZP in some mammalian species (swine and cattle) and has been considered a new mechanism for blocking of polyspermy *in vivo* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Besides the pig, other animal species with incidence of polyspermy after *in vitro* fertilization are the sheep and goat with a rate close to 20 % of fertilized oocytes (Fukui, Glew *et al.*, 1988; De Smedt, Crozet *et al.*, 1992). Studies in rabbits, mice, rats and hamsters also show polyspermy during *in vitro* fertilization (Austin and Braden, 1953, Barros and Yanagimachi, 1972, Fraser and Maudlin, 1979), although its cause is unknown.

Until now, pre-fertilization increases of the RED of the ZP mediated by the OF has been appreciated only in the cow and the pig, a phenomenon that occurs by homologous and heterologous way in these two species (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). To clarify whether that oviductal maturation is necessary in other species of animals and whether this phenomenon is so homologous and/or heterologous, we proceeded to **the incubation of oocytes from rabbit, mouse, rat, hamster, pig, cow, sheep, goat, and of human ZPs, with OF in the late follicular phase**. In addition, to observe the possible heterologous effect precisely, the **OF used was obtained from five different species: cuniculi, porcine, bovine, ovine and caprine**. In all these trials (both homologous and heterologous) the

increase in RED of the ZP was assessed by the enzyme pronase at 0.5 %. This method tells us if the treatment with the OF increases or not the resistance of the ZP and so whether this process of pre-fertilization "hardening" of ZP mediated by OF could occur *in vivo*, and whether it occurs in an intra or interspecific way.

The results showed that the OF from cuniculi, porcine, bovine, ovine and caprine species, have the ability to produce RED of the ZP of homologous oocytes as heterologous in all species studied, with few exceptions. The human ZP is an exception, RED was not observed with any of the OFs analyzed. Something similar happens with the ZP of oocytes from mouse and rat, which do not develop resistance to proteolysis of the ZP in virtually none of the OFs analyzed, except when they are treated with the rabbit OF. Therefore, our data indicate that the rabbit OF is the one that produces more widespread RED in the ZPs of the species analyzed.

2. On the other hand, it is known that oviductal secretion consists mainly of glycosylated proteins. They can be enriched, splitted or purified using agarose-lectin bound lectin such as WGA (*Triticum vulgare* lectin), HPA (*Helix pomatia* lectin) and PNA (*Arachis hypogaea* lectin). Other methods used for the same purpose and based on prior knowledge of the characteristics of the component to be separated were the use of heparin-binding columns, molecular exclusion columns, culture of explants and production of recombinant proteins. These techniques have been used for partial or complete purification of proteins that have a recognized positive effect on fertilization in different species, as is the case of OVGP1 or oviductin in the rabbit (Oliphant and Ross, 1982), mice (Sendai, Komiya *et al.*, 1995), hamster (Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997), woman (Arias, Verhage *et al.*, 1994; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1996; Ling, Lee *et al.*, 2005), baboon (Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997), pig (Buhi, Alvarez *et al.*, 1996; Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000), cow (Sendai, Abe *et al.*, 1994; Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997) and goat (Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011). Besides purified from oviductal fluid samples, OVGP1 has also been produced in some species as recombinant protein (Boice, Mavrogianis *et al.*, 1992, Sendai, Abe *et al.*, 1994; Suzuki, Sendai *et al.*, 1995; Buhi, Alvarez *et al.*, 1996;

O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1996; Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 2002; Ling, Lee *et al.*, 2005).

The interest of this protein, OVGPI, is due, as mentioned, to its beneficial effect on fertilization, by mechanisms that until now had not been fully clarified. However, recently, OVGPI has been implicated in the oviductal maturation process of ZP in swine and cattle through at least two of its glycoforms, of 75 and 95 kDa, present in the bovine OF from the late follicular phase (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). In the study by Coy *et al.* it was observed that both OVGPI glycoforms bind to the ZP and are considered responsible for participating in the increase of its RED, which in turn contributes to the reduction of polyspermy *in vitro*. However, the binding of the two glycoforms to the ZP, as well as the increasing in the RED of ZPs, disappear when they are incubated in a medium devoid of heparin. Consequently, both OVGPI glycoforms mentioned, as any other factor involved in the zona maturation, must be capable of binding to heparin in a more or less stable way. Therefore, in this work, **fractionation of bovine OF in late follicular phase** (with known ability to produce RED of the ZP) **was performed based on their heparin-binding ability** to separate, enrich, and finally try to identify, factors involved in oviductal maturation. For each split, their protein pattern (by electrophoresis on polyacrylamide gels stained with silver), and their ability to produce RED in the ZP of pig oocytes (by testing the enzyme digestion with pronase), were observed. The results of this analysis showed the existence of a split (number 25), obtained with a concentration of NaCl 0.4 M, that has a similar effect on the RED than the whole bovine OF, so in this fraction factors possibly involved in this resistance should be found. Further analysis of this fraction will allow us to identify its components and determine the factors involved in the RED of the ZP.

3. Third, **proteomic analysis** of the OF content in the late follicular phase of two species, swine and cattle, was performed. These species are two evolutionarily closely related species that show significant differences in the process of *in vitro* fertilization. While the incidence of bovine polyspermy *in vitro* does not usually exceed 25 %, polyspermy rate in swine *in vitro* is very high, reaching even 60 % (reviewed by Coy and Avilés, 2010).

This section of the experimental work identified different proteins present in the OF in the late follicular phase. Specifically, we identified 291 proteins in the porcine OF and 270 proteins in the bovine OF, each with a significant level of validity. These proteins were classified based on criteria previously established by Aviles *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) adapted to this study and for that we consulted various databases (PubMed and UniProtKB). The proteins were also analyzed using available bioinformatics platforms, DAVID and Ingenuity.

Among the proteins identified in the present study, 269 pig oviductal proteins (22 of them secreted) and 265 bovine oviductal proteins (35 of them secreted) were described for the first time in these species.

4. Finally, porcine proteomic analysis was completed with **gene expression analysis** using microarray technology. The oviductal gene expression patterns are crucial to know, at every moment of the cycle, the conditions surrounding the gametes, the newly formed zygote or the embryo in its early stages of development until it reaches the uterus. The genomic pattern analysis of pre-ovulatory phase was developed only in pigs because partially results have been already published in bovine; however, these data were considered for the analysis and discussion of results (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004).

In the analysis of **gene expression pattern of the pig oviduct** at this stage we observed the expression of 2943 genes, 2889 of them were described for the first time in this study. From these results, the information was broken down and redirected towards specific aspects that we are interested in because the information obtained was very wide and varied. The expressed genes were analyzed using the same platforms as mentioned above.

Comparison between the results of proteomics with the results of gene expression in swine revealed the presence of 35 coincident proteins in pig oviduct. Further studies will

indicate whether there is a different gene expression pattern in each of the phases of the estrous cycle, clarifying what factors might be more relevant at every stage.

Proteomic and gene expression results obtained in the present study showed similarities with results obtained in other species, including works in the Fallopian tube (human oviduct) by Tone *et al.* (Tone, Begley *et al.*, 2008). These similarities increase the accuracy of our data especially in the pig because this species has not a completely deciphered genome. From the detection of components described in other species, it was possible to identify some proteins unknown to our species of interest.

Therefore, although this group of results showed numerous components present in the oviduct at this particular stage of the cycle, only those that are secreted and found in physiological conditions in the oviductal lumen (ie, 27 proteins in swine and 38 in bovine) can be considered potential candidates to play a role in reproductive processes that occur during this phase: final maturation of gametes and fertilization. Future efforts should be focused in the analysis of these proteins in order to improve the effectiveness of IVF and expand our knowledge about the factors involved in the *in vivo* fertilization.

In conclusion, this study has allowed us to demonstrate that the OF has the ability to modify the oocyte ZP, increasing its resistance to enzymatic digestion, not only in pigs and cattle but also in goats, sheep and rabbits. This effect is not species-specific, as different trials have demonstrated the ability of OFs used to produce a similar effect in a heterologous way. The only species that was alien to this effect was the human. On the contrary, the most "effective" species in terms of its ability to induce resistance to enzymatic digestion of the ZP was the rabbit. Oviductal factors involved in producing this effect have affinity for heparin and they can be obtained in an enriched fluid fraction using a heparin-affinity column followed by elution at 0.4 M NaCl. Finally, we identified 27 proteins in pigs and 38 in the bovine species as potential candidates to play a role in reproductive processes that occur during the late follicular phase of the estrous cycle, including the final maturation of gametes and fertilization.



INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La fecundación en mamíferos es un proceso interno en el que el oviducto es el responsable del mantenimiento de una serie de eventos dependientes del ciclo estral. Aunque el oviducto ha sido considerado durante mucho tiempo un mero conducto para los gametos y embriones hoy día se sabe que está implicado en numerosos e importantes procesos, siendo un tejido biológicamente activo que proporciona el microambiente adecuado para mantener, regular o mejorar eventos que ocurren antes y durante la fecundación y durante el desarrollo embrionario (Gandolfi, 1995; Buhi, Alvarez *et al.*, 1997). De modo general el oviducto está implicado en el transporte y maduración de los gametos, la preparación del microambiente idóneo para la fecundación, la producción de las moléculas necesarias para satisfacer las necesidades metabólicas tempranas del embrión y la regulación de la migración del embrión hacia el útero (Hunter, 1980; Buhi, Alvarez *et al.*, 2000).

El oviducto y sus secreciones se encuentran regulados por el ciclo estral, diferente entre especies. En el desarrollo de este trabajo nos vamos centrar en ciertos aspectos de la función y composición del fluido oviductal (FO) en varias especies de animales, en la fase folicular tardía del ciclo estral. Esta fase es la más cercana al momento de la ovulación, situación en la que el oviducto se encuentra preparado para la fecundación y no ha adquirido secreciones de otros tejidos fundamentalmente de procedencia ovárica como el fluido folicular y otros componentes que alcanzan el oviducto con el ovocito (Leese, 1988).

Esta etapa es importante porque en ella van a estar presentes aquellos componentes oviductales, fundamentalmente proteínas, que son importantes y posiblemente en algunos casos imprescindibles, junto con los gametos, para la fecundación (Roberts, Parker *et al.*, 1975; Leese, 1988; Malayer, Hansen *et al.*, 1988; Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010).

Los conocimientos derivados del estudio del oviducto en esta etapa se pueden poner a disposición de las técnicas de fecundación *in vitro* tanto en animales como en la especie humana para solucionar diferentes problemas o patologías existentes hoy día, y pueden ser útiles para el desarrollo de terapias para las mismas o para el desarrollo de nuevos medios de fecundación y cultivo embrionario.

Uno de los problemas con los que nos encontramos cuando se trabaja con la especie porcina es la elevada tasa de polispermia *in vitro*, efecto que también se produce en otras especies de ungulados como la oveja y la cabra (Fukui, Glew *et al.*, 1988; De Smedt, Crozet *et al.*, 1992). En la vaca y la cerda se ha demostrado un nuevo mecanismo de bloqueo de la polispermia *in vivo* en el que se encuentran implicadas las secreciones oviductales y que conlleva un incremento de la resistencia a la digestión enzimática (RDE) pre-fecundación de la zona pelúcida (ZP) (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Por lo tanto es de interés conocer en qué especies ocurre este fenómeno de maduración de la ZP para aplicarlo *in vitro*. También es de gran interés conocer qué especies son capaces de producir FO con efecto de incremento de la RDE pre-fecundación de la ZP y si ese efecto se produce de un modo específico o inter-específico. Además, si este efecto es inter-específico es importante conocer si existe algún tipo de FO con características de este tipo aplicables en medios *in vitro* para muchas especies o si por el contrario este efecto se restringe a especies determinadas. Por ello, la **primera hipótesis** del presente trabajo planteó la posibilidad de que muestras de fluido oviductal en fase folicular tardía procedentes de diferentes especies fueran capaces de inducir algún cambio en la resistencia de la digestión enzimática de la zona pelúcida de modo intra e inter-específico.

En el trabajo mencionado anteriormente (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), también se ha puesto en evidencia que el factor o factores responsables de este incremento de RDE pre-fecundación de la ZP posee/n la capacidad de unirse a la heparina por lo que **nos** planteamos como **segunda hipótesis** que fraccionando el FO en base a su unión a heparina y analizando las fracciones obtenidas podríamos purificar el/los componentes oviductales responsables del proceso.

Actualmente se conoce la existencia de un número limitado de proteínas presentes en el FO (revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010), algunas de ellas relacionadas con procesos recientemente evidenciados, como la proteína OVGPI1 implicada en la maduración oviductal del ovocito de la cerda y la vaca. Por lo tanto, es de evidente interés el conocimiento de los componentes proteicos del FO en esta fase del ciclo estral para conocer con más fiabilidad los procesos relacionados con los gametos en la fecundación. Por este motivo, **nos planteamos como tercera hipótesis** que empleando las técnicas actuales de identificación de proteínas en muestras de fluido

oviductal podríamos obtener un perfil proteico aproximado del fluido oviductal en esta etapa del ciclo y usando la técnica de las micromatrices (microarrays) podríamos conocer el patrón de expresión génica en la misma etapa del ciclo estral.

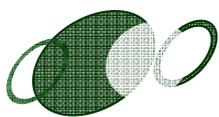
Por lo tanto, por todo lo mencionado anteriormente y con el propósito de ampliar los conocimientos actuales sobre la composición del FO y su posible función en el proceso de reproducción, los **objetivos** planteados para la realización de este trabajo fueron los siguientes:

1.- Conocer si el fluido oviductal de la coneja y de las especies porcina, bovina, caprina y ovina en la fase folicular del ciclo estral es capaz de producir resistencia a la digestión enzimática de modo específico y/o inter-específico en la ZP de ovocitos de coneja, ratona, rata, hámster, mujer, cerda, vaca, oveja y cabra.

2.- Determinar el patrón del fraccionamiento del fluido oviductal en base a su afinidad por la heparina y el efecto de cada fracción sobre la resistencia de la zona pelúcida a la digestión proteolítica.

3.- Identificar las proteínas presentes en el fluido oviductal de la vaca y la cerda en la fase folicular tardía.

4.- Conocer el patrón de expresión génica oviductal de la cerda y la vaca en la fase folicular tardía.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. FECUNDACIÓN

La fecundación en mamíferos es un complejo proceso en el que dos células germinales, ovocito y espermatozoide, se fusionan restaurando el número cromosómico propio de la especie y formando un cigoto totipotente de características únicas (Yanagimachi, 1984).

Es de gran interés conocer, con el mayor detalle posible, todos los fenómenos que se producen en la fecundación y factores implicados en cada uno de ellos para, por un lado, entender el proceso con sus diferencias entre especies, y por otro, desarrollar nuevas estrategias de reproducción *in vitro*, diagnóstico y tratamiento de los problemas de infertilidad tanto en mamíferos de interés zootécnico como en la especie humana.

Existen fundamentalmente dos estrategias de fecundación: la **fecundación externa** en animales acuáticos, en la que normalmente gran cantidad de gametos son vertidos al medio acuoso y la **fecundación interna** en la que el macho, gracias a un órgano específico deposita los gametos en el interior del aparato genital de la hembra durante el apareamiento (revisado por Dale y Defelice, 2010). Por su parte las hembras han desarrollado en su aparato genital diferentes órganos que se encargan de asegurar la fecundación y el desarrollo embrionario posterior. En los mamíferos, el semen se deposita en la vagina (conejo, rumiantes y primates) o en el útero (cerdo, caballo, perro y muchos roedores); (Hunter, 1991a; Hunter, Coy *et al.*, 2011). El lugar donde se produce la fecundación en mamíferos es la trompa de Falopio en primates u oviducto en no primates (Ménézo y Guérin, 1997). Una porción de este órgano denominada ampolla oviductal es la zona en la que el ovocito ovulado es reconocido por un espermatozoide capacitado produciéndose la fecundación (Hunter, 2005).

Esta interacción y fusión de dos células es aparentemente un proceso sencillo pero que resulta muy complejo pues consta de una secuencia de eventos seriados que han de producirse para que culmine con éxito. Procesos que se inician con la capacitación del espermatozoide en el istmo oviductal, lo que le permite realizar su viaje a la ampolla, donde se encontrará con el ovocito rodeado por el cúmulo ovígero (CO). Una vez aquí el espermatozoide ha de atravesar el CO también denominado *cumulus oophorus*, unirse a la zona pelúcida (ZP) y sufrir la reacción acrosómica (RA) para

poder atravesarla. Más tarde han de fusionarse las membranas de ambos gametos (espermatozoide-ovocito) y el ovocito responde activándose, de modo que se desencadenan la reacción cortical para evitar la entrada de espermatozoides adicionales por un lado y la formación del cigoto por otro (Yanagimachi, 1984).

Hay, además, un elemento que resulta importantísimo en este proceso y que es el oviducto y su contenido, el fluido oviductal (FO). El FO forma el microambiente que rodea a los gametos desde el primer momento que entran al oviducto, los acompaña hasta que se encuentran en la ampolla y comparte con el embrión el viaje hasta su salida al útero, por lo que sus componentes deben de estar implicados en múltiples e importantes funciones de todo este proceso. Al ser el oviducto y el fluido oviductal elementos de especial relevancia en esta tesis se van a desarrollar en un apartado específico.

Las células germinales o gametos son células que se forman y modifican por procesos específicos que las habilitan para la fecundación. Estos procesos específicos van a ser descritos por separado, para cada gameto.

En el ciclo reproductor de animales adultos la fase de predominio de estradiol se denomina fase folicular del ciclo y engloba al desarrollo de los folículos, el celo y la ovulación; la fase con predominio de progesterona se denomina fase luteal del ciclo y va desde la ovulación hasta la luteolisis.

En el desarrollo de esta tesis se hará mención a la fase folicular tardía que se caracteriza por el predominio de un folículo o varios (dependiendo de la especie) a punto de ovular (Carrasco, Coy *et al.*, 2008; Carrasco, Romar *et al.*, 2008).

4.1.1. OVOCITO

El ovocito es el gameto femenino maduro resultado de una serie de modificaciones en las que el crecimiento y maduración del mismo constituyen etapas fundamentales para una adecuada fecundación.

La formación del ovocito u ovogénesis comienza en la etapa embrionaria con la formación de las células germinales primordiales. Estas células germinales primordiales se originan fuera de la gónada y emigran a través del mesenterio del saco vitelino hasta las crestas genitales (Mcgee, Hsu *et al.*, 1998). Durante el desarrollo fetal, las células germinales femeninas inmaduras u ovogonias diploides se producen mediante una alta frecuencia de divisiones mitóticas dando lugar a unos dos millones de ovogonias en el desarrollo fetal. Posteriormente, tras la diferenciación sexual, tiene lugar la primera división meiótica y las ovogonias dan lugar a varios millones de ovocitos haploides (entre 1 y 3 millones en la cerda, revisado por Kaniz, 2001), aunque posteriores modificaciones fundamentalmente fenómenos de apoptosis, reducen el número de ovocitos a varios miles cuando se alcanza el momento del nacimiento y la mitosis de las ovogonias finaliza determinando el número de ovocitos de la vida reproductiva del individuo (De Pol, Marzona *et al.*, 1998).

Los ovocitos quedan detenidos en diplotene difusa de la profase de la primera división meiótica (dictiatio) denominándose ovocitos primarios o primordiales que se encuentran rodeados por células foliculares planas (Moor y Warnes, 1979). En el momento del nacimiento, la corteza ovárica está formada por ovocitos primordiales y en la pubertad la cantidad de folículos primordiales es aproximadamente de 210.000 en la vaca, 420.000 en la cerda y unos 400.000 en la mujer (De Pol, Marzona *et al.*, 1998).

4.1.1.1. Maduración ovárica

La maduración ovocitaria comprende de un periodo de **crecimiento** proseguido por la **maduración nuclear** y **maduración citoplasmática** como prerequisites para la fecundación y el desarrollo embrionario normales.

El folículo es la unidad funcional del ovario y se encarga de proporcionar el microambiente adecuado para el crecimiento y maduración del ovocito y sintetizar las hormonas esteroideas y proteicas necesarias.

El ovocito detenido en Profase I desde la vida fetal hasta la pubertad, completará en la etapa fértil la primera división meiótica como fase previa a la ovulación.

Durante el crecimiento folicular, el volumen del ovocito se incrementa de modo que los ovocitos bovinos incrementan su diámetro de 20 a 130 micrómetros (μm) y los porcinos de 40 a 120 μm . El período de crecimiento del folículo ovárico y del ovocito se caracterizan por ser una fase de síntesis proteica intensiva y de almacenamiento de macromoléculas por lo que los ovocitos adquieren una compleja organización citoplasmática dependiente de nuevos productos y organelas que se redistribuyen con los preexistentes (Miyano, 2003). Esta síntesis y captación de macromoléculas en el ovocito sirve para dos propósitos, por un lado para el crecimiento, desarrollo y maduración ovocitaria y por otro para almacenar ácido ribonucleico (ARN) y proteínas necesarias para el desarrollo post-fecundación (Picton, 2001).

Antes de cada ciclo reproductivo se recluta un número de folículos específico. Estos crecerán y alguno/s de ellos conseguirá/n ser el/los folículo/s dominante/s que finalmente será/n ovulado/s. Las características de estas oleadas de crecimiento folicular dependen de la especie de modo que en algunos animales (rata, primates hembra y cerda) los folículos dominantes se desarrollan sólo durante la fase folicular del ciclo estral y en otros (vaca, oveja y yegua) ocurren a intervalos regulares durante todo el ciclo. En todos los casos sólo el folículo o folículos dominante/s presente durante la fase folicular del ciclo será el que finalmente sea ovulado (Fortune, 1994).

El inicio de la meiosis coincide con el inicio de la foliculogénesis. El crecimiento folicular se debe a la actuación de dos hormonas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), (Filicori, 1999; Webb, Campbell *et al.*, 1999; Picton, 2001). La hormona FSH estimula a las células de la granulosa para la síntesis de factores de crecimiento, enzimas y proteínas implicadas en la formación de esteroides y en la producción de péptidos que se acumulan en el fluido folicular (Senbon, Hirao *et al.*, 2003). Al mismo tiempo, la hormona LH estimula la síntesis de andrógenos en las células de la teca. Las células de la granulosa los transforman en estradiol que contribuye a la maduración ovocitaria. Al final del crecimiento folicular las células de la granulosa responderán también a la LH y hormonas esteroideas (Foxcroft y Hunter, 1985; Tisdall, Watanabe *et al.*, 1995).

Los folículos primordiales sufrirán transformaciones (a nivel ovocitario, de las células foliculares y estroma) y se convertirán en folículos primarios que poseen el

ovocito en vesícula germinal y las células foliculares ahora cúbicas rodeadas por la lámina basal. Estos folículos primarios pueden componerse por tan solo una capa de células foliculares denominándose folículo primario unilaminar o por varias capas denominándose entonces folículo primario multilaminar. Estas capas de células foliculares se denominan células de la granulosa.

Al mismo tiempo que se transforman los folículos primordiales unilaminares en multilaminares, comienza a formarse la ZP entre el ovocito y las células de la granulosa adyacentes (Wassarman, 1988).

El origen de la ZP ha sido motivo de controversia debido a que sus componentes poseen diferente origen dependiendo de la especie que se trate. En el caso del ratón, la rata y el hámster su síntesis es exclusiva del citoplasma ovocitario (Epifano, Liang *et al.*, 1995; Scobie, Kerr *et al.*, 1999; El-Mestrah, Castle *et al.*, 2002; Izquierdo-Rico, Gimeno *et al.*, 2011) y en la gata esta síntesis se realiza en las células de la granulosa (Jewgenow y Fickel, 1999).

En otras especies como la coneja, la vaca, la cerda o la yegua la responsabilidad de la formación de la ZP es compartida entre el ovocito y las células de la granulosa (Dunbar, Avery *et al.*, 1994; Kölle, Sinowatz *et al.*, 1996; Kölle, Sinowatz *et al.*, 1998; Kölle, Dubois *et al.*, 2007).

El estroma ovárico se organiza alrededor de estos folículos formando la teca interna vascularizada y la teca externa compuesta fundamentalmente por tejido conjuntivo fibroso.

Algunos autores han propuesto que el folículo secundario multilaminar pasa a la fase folicular preantral cuando se forman las células de la teca (revisado por Orisaka, Tajima *et al.*, 2009).

Los folículos primarios multilaminares se transforman en folículos secundarios o antrales donde el ovocito aumenta de volumen y las células de la granulosa sufren hiperplasia e hipertrofia (Picton, 2001), las capas aumentan y dejan entre ellas espacios

intercelulares que son ocupados por el fluido folicular, (revisado por Senbon, Hirao *et al.*, 2003).

El fluido folicular es un exudado del plasma compuesto fundamentalmente por glucosaminoglicanos y hormonas esteroideas producidas por las células de la granulosa (Edwards, 1974). El tamaño del folículo aumenta linealmente con la síntesis del fluido folicular y éste se almacena en una sola cavidad denominada antro folicular (Schuetz y Anisowicz, 1974). En este punto las células de la granulosa se diferencian en dos subpoblaciones, aquellas que revisten la pared del folículo formando un epitelio estratificado en contacto con la lámina basal y aquellas que rodean al ovocito distribuyéndose desde el ovocito hasta el antro folicular que se denominan cúmulo ovífero (CO), siendo la capa de células inmediatamente en contacto con el ovocito denominada corona radiada (Canipari, 1994).

Las células del CO poseen prolongaciones citoplasmáticas que atraviesan la ZP del ovocito y contactan con el oolema mediante uniones estrechas o tipo Gap a través de las cuales se aporta al ovocito nutrientes para su viabilidad y crecimiento ovocitario (Anderson y Albertini, 1976; Buccione, Schroeder *et al.*, 1990; Eppig, 1991).

La mayor parte de los folículos que llegan hasta esta etapa de desarrollo experimentan atresia, la mínima parte aproximadamente el 0'05 %, siguen desarrollándose para convertirse en folículos maduros o de Graaf (Nuttinck, Mermillod *et al.*, 1993). Los ovocitos de estos folículos han desarrollado una adecuada ZP y tienen competencia para reanudar la meiosis (Mcgee y Hsueh, 2000).

Los ovocitos adquieren la madurez completa durante el desarrollo del folículo de Graaf, donde la acción de las gonadotropinas, fundamentalmente la hormona LH en los momentos previos a la ovulación desencadenan la maduración ovocitaria. Esta maduración ha de completarse tanto nuclear como citoplasmáticamente (Hyttel, Xu *et al.*, 1986).

La maduración nuclear o reanudación de la meiosis comienza cuando los ovocitos detenidos en profase I en el interior del folículo son estimulados durante la pubertad por el pico preovulatorio de la LH. La detención de la meiosis se ha relacionado con altos niveles intra-ovocitarios de adenosín monofosfato cíclico (AMPc)

(Cho, Stern *et al.*, 1974). Este AMPc es sintetizado por las células del CO y se transfiere al ovocito a través de las uniones citoplasmáticas tipo Gap (Dekel y Beers, 1978).

La LH también produce modificaciones a nivel de la esteroidogénesis folicular y en la relación del ovocito con el CO, ya que promueve la producción en las células foliculares de ácido hialurónico que se coloca en los espacios intercelulares de las células de la granulosa provocando su expansión. El ácido hialurónico se mucifica formando una matriz extracelular que suprime las uniones intercelulares entre las células de la granulosa y el ovocito, eliminando el transporte de nutrientes, productos del metabolismo e iones y por lo tanto bloquean el efecto inhibitor de la maduración del AMPc (Dekel y Kraicer, 1978; Thibault, Szöllösi *et al.*, 1987). La disminución de los niveles del AMPc lleva consigo el desbloqueo del factor promotor de la maduración que se activa y el ovocito reanuda la meiosis (Fissore, He *et al.*, 1996).

Estos cambios que conllevan a la maduración nuclear no se producen en todas las especies al mismo tiempo, por ejemplo en la especie bovina, la expansión del CO se inicia a las 10-12 horas del inicio de la maduración y alcanza su máximo a las 18 horas (Hyttel, Xu *et al.*, 1986) y en la especie porcina, la expansión se inicia a las 16 horas del pico preovulatorio de gonadotropinas (Eppig, 1979).

La meiosis se reanuda desde la profase I, denominada vesícula germinal (VG) y se detendrá de nuevo en el estadio de metafase de la segunda división meiótica, en lo que conocemos como “segunda detención de la meiosis”. Por tanto en la mayoría de las especies, incluida la bovina y la porcina, el ovocito es ovulado en metafase con el primer corpúsculo polar extruido.

La **maduración citoplasmática** es un proceso independiente de la maduración nuclear que prepara al ovocito para la fecundación, necesario para el bloqueo de la polispermia y fundamental para el desarrollo embrionario posterior. Estos cambios implican fundamentalmente a la reorganización de las organelas citoplasmáticas como las mitocondrias, retículo endoplasmático y los gránulos corticales (GC) (Gulyas, 1980; Thibault, Szöllösi *et al.*, 1987; Sathananthan, 1994).

Las mitocondrias se encuentran homogéneamente distribuidas por el citoplasma en el estadio de VG. Posteriormente en el momento de la rotura de la envoltura nuclear se disponen alrededor del núcleo para dispersarse posteriormente y rodear al retículo endoplasmático liso en unos agregados tubulares (Dvorák, 1989).

También se ha observado la presencia de vesículas electrodensas de retículo endoplasmático rugoso en ovocitos y embriones humanos procedentes de fecundación anómala (Mondéjar, Jiménez-Movilla *et al.*, 2007).

Los GC se forman en las vesículas del aparato de Golgi que se presenta bien organizado en la fase de VG y desaparece al final de la maduración ovocitaria mientras que los GC migran hacia la periferia colocándose inmediatamente bajo el oolema (Cran, 1985). En la maduración citoplasmática también se produce una reordenación de los microtúbulos debido a la intensa actividad cromosómica (Hyttel, Xu *et al.*, 1986; Moor, Mattioli *et al.*, 1990) y la acumulación de lípidos como fosfolípidos, triglicéridos y fracciones de otros lípidos importantes en el desarrollo ovocitario (McEvoy, Coull *et al.*, 2000).

También se produce la reprogramación de la síntesis proteica como el factor de crecimiento del pronúcleo masculino que será fundamental para la formación del pronúcleo tras la fecundación (Thibault, Gerard *et al.*, 1975).

Los cambios citoplásmicos en la especie bovina no se completan hasta las 30 horas del inicio de la maduración y en la especie porcina finaliza unas 36-40 horas después del pico de LH (Hyttel, Greve *et al.*, 1989).

Después de la maduración se desencadena la ovulación.

4.1.1.2. Ovulación

La disposición normal del ovario de mamíferos hace posible la ovulación en cualquier parte de su superficie excepto en el hilio. Una excepción se da en la yegua donde la ovulación se produce en la fosa de ovulación. En vacas y ovejas la ovulación

se produce al azar respecto al ovario que tiene el cuerpo amarillo previo y en algunos mamíferos la ovulación se alterna de forma precisa entre los ovarios (Hafez, 2000).

El incremento de la presión sobre la pared folicular debido a la continua producción de fluido, el incremento del aporte sanguíneo al folículo, los fenómenos de proteólisis en la pared junto con la contracción folicular culminan con la rotura de la pared del folículo y la ovulación (Tsafiri y Reich, 1999 ; Bridges, Cho *et al.*, 2011).

Cuando se incrementa la secreción de LH se incrementa también la activación de una cascada bioquímica de eventos que culminan con la ruptura del folículo/s preovulatorio/s, la expulsión del ovocito/s y la formación del cuerpo/s lúteo/s (Kanitz, 2001). La enzima colagenasa lisa la pared folicular aumentando la reacción inflamatoria en la zona (Murdoch, 1996). En la cascada bioquímica también se encuentran implicados los activadores del plasminógeno, la plasmina y metaloproteasas de la matriz que degradan la red de fibras de colágeno de la pared peri-folicular. También se ha observado un incremento de las prostaglandinas PGE₂, PGF_{2α} y angiotensina II (Kanitz, 2001; Murdoch y McDonnell, 2002). A la misma vez que se produce el aumento de la presión intrafolicular se produce la disminución del contenido en oxígeno que es condición para que se sintetice en el ovario la endotelina 2 (END2). Esta provocará la ovulación produciendo una contracción rápida del folículo a nivel de las células y se produce la rotura folicular y por lo tanto la ovulación. En lo que respecta al mecanismo que EDN2 utiliza en la inducción de la constricción folicular, es probable que EDN2 sea liberada de las células de la granulosa y viaje a través de la pared folicular para estimular la contracción de las células del músculo liso en la teca externa y en el intersticio del ovario (Bridges, Cho *et al.*, 2011).

4.1.1.3. El ovocito en el oviducto

El ovocito junto con el CO se encuentra flotando en el fluido folicular en el momento de la ovulación (Thibault, Szöllösi *et al.*, 1987), por lo que cuando se produce la rotura de la pared folicular este complejo es expelido a la cavidad abdominal. El complejo no se pierde en dicha cavidad ya que con la ovulación, las hormonas esteroideas del ovario estimulan a los cilios del infundíbulo que se mueven de manera sincronizada y dirigida hacia el orificio tubárico, de modo que el ovocito con sus

envolturas es recogido por las células ciliadas e introducido en la ampolla oviductal y se adhiere al epitelio oviductal (Croxatto y Ortiz, 1975; Norwood, Hein *et al.*, 1978; Kölle, Dubielzig *et al.*, 2009). Junto con el complejo cúmulo-ovocito llega al oviducto una pequeña parte de fluido folicular denso y viscoso (Leese, 1988).

Los cilios transportarán al ovocito al lugar de la fecundación donde esperarán a los espermatozoides. En el momento en el que se produzca la fecundación el recientemente formado cigoto seguirá su proceso de desarrollo mientras viaja por el istmo oviductal hasta llegar al útero (Kölle, Dubielzig *et al.*, 2009).

4.1.1.3.1. Maduración oviductal

Como ya hemos comentado el desarrollo de los ovocitos se realiza en el interior del ovario como resultado del crecimiento folicular o foliculogénesis, desarrollo que implica cambios en la ZP (Tesarík, Pilka *et al.*, 1988; Oehninger, Veeck *et al.*, 1991; Avilés, Castells *et al.*, 1999; Avilés, El-Mestrah *et al.*, 2000; Avilés, Okinaga *et al.*, 2000).

Posteriormente, durante el transporte oviductal, se produce una maduración final del ovocito que incluye modificaciones en el citoplasma, la ZP y el CO (Yang y Yanagimachi, 1989). Las modificaciones producidas en la ZP o maduración zonal, como consecuencia del paso del ovocito por el oviducto se han observado en diferentes especies. Tales cambios son fundamentales para la correcta unión con el espermatozoide y para el correcto bloqueo de la polispermia (Oikawa, Sendai *et al.*, 1988; Robitaille, St-Jacques *et al.*, 1988; Sakai, Araki *et al.*, 1988; Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997; Kolbe y Holtz, 2005; Lyng y Shur, 2007), ya que se ha propuesto que las proteínas oviductales regularían la exocitosis sincronizada de los gránulos corticales y/o incrementarían la sensibilidad de la ZP al contenido de los gránulos (Hunter, 1991b; Kim, Funahashi *et al.*, 1996).

Otra observación ha sido la adhesión a la ZP de proteínas secretadas de forma específica por el epitelio oviductal denominadas proteínas específicas del oviducto u oviductinas (Brown y Cheng, 1986; Hedrick, Wardrip *et al.*, 1987; Robitaille, St-Jacques *et al.*, 1988; Gandolfi, 1995). Estas proteínas adheridas a la ZP pueden mejorar

la fecundación debido a la selección espermática. Además de en la ZP, la oviductina (OVGP1) ha sido descrita entre las células del cúmulo, en el espacio perivitelino, en el oolema y entre las blastómeras, participando también en la mejora del desarrollo embrionario temprano (Brown y Cheng, 1986; Gandolfi, Brevini, *et al.*, 1989a; Gandolfi, Brevini *et al.*, 1989b; Gandolfi, Modina *et al.*, 1991; Buhi, O'Brien, *et al.*, 1993; Buhi, 2002; Wang, Day *et al.*, 2003; Lyng y Shur, 2009).

La secreción de las oviductinas depende de la fracción oviductal y de la fase del ciclo estral que se considere y varía entre especies (Buhi, Vallet *et al.*, 1989; Buhi, O'Brien *et al.*, 1993).

En un estudio reciente (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) se ha demostrado que la OVGP1 oviductal está implicada en la resistencia de la ZP de vacas y cerdas a la digestión proteolítica, con lo que ésta se endurece, aumentando la resistencia a la entrada de espermatozoides. Además se ha observado que esta proteína, junto con glicosaminoglicanos del tipo de la heparina, regulan la polispermia en la especie porcina. La regulación de la polispermia ha sido desde siempre un hecho característicamente ligado a la reacción cortical por lo que este efecto de endurecimiento prefecundación de la ZP es el primero atribuido al oviducto (Tienthai, Kjellén *et al.*, 2000; Coy, Cánovas *et al.*, 2008; Coy, Grullón *et al.*, 2008).

Otras observaciones en la ZP, como por ejemplo diferencias significativas entre tamaño y estructura de la ZP de los ovocitos madurados *in vivo* e *in vitro* (Funahashi, Ekwall *et al.*, 2000) nos indican que el oviducto ejerce un papel en la maduración zonal del ovocito.

4.1.1.3.2. Vida media y envejecimiento

La vida media del ovocito es el tiempo durante el cual mantiene la capacidad de ser fecundado por un espermatozoide y convertirse en un embrión viable.

De forma general, la fecundación se produce en el oviducto entre 8-12 horas tras la ovulación, siendo en la vaca de 10-12 horas y en la cerda de 6-8 horas; tras ese

periodo, los ovocitos que no han sido fecundados degeneran pudiendo sufrir procesos de partenogénesis espontánea (Hafez, 2000).

Además, también es importante la calidad del ovocito que se determina mediante el potencial de desarrollo del embrión después de la fecundación (Wang y Sun, 2006). Para que este potencial sea máximo, los ovocitos han de fecundarse tras la ovulación en un tiempo determinado que varía entre especies (Austin, 1974). Si el ovocito no es fecundado comienza el deterioro ovocitario alterándose morfológicamente sufriendo cambios que implican variaciones en la organización estructural del citoesqueleto, organelas citoplasmáticas y en la alineación cromosómica (Eichenlaub-Ritter, Chandley *et al.*, 1986; Díaz y Esponda, 2004; Schatten, 2008). La fecundación de estos ovocitos viejos disminuye la tasa de preñez, el tamaño de camada y el peso de las crías al nacer (Huhtinen, Koskinen *et al.*, 1996; Tarín, Pérez-Albalá *et al.*, 2000).

4.1.1.3.3. Transporte

Como hemos mencionado anteriormente el ovocito junto con el CO o complejos cúmulo-ovocito (CCO) son recogidos por los cilios del infundíbulo que los transportan al orificio u ostium tubárico y los introducen en la ampolla oviductal (Croxatto y Ortiz, 1975; Norwood, Hein *et al.*, 1978; Kölle, Dubielzig *et al.*, 2009). Estos complejos se transportan hasta el lugar de la fecundación en un tiempo que depende de la especie (en la porcina lo hacen en unos 30-45 minutos, Hunter, 1989).

Posteriormente, los ovocitos permanecen en el lugar de la fecundación durante 24-48 horas, los cigotos recientemente formados se dividirán y pasarán al útero y los no fecundados iniciarán el proceso de degeneración en el oviducto o en el viaje hacia el útero, dependiendo de la especie. En el hámster, la rata, la vaca y la yegua la mayoría de los cigotos se transportan hacia el útero mientras que los ovocitos no fecundados permanecen en el oviducto donde degeneran (Betteridge y Mitchell, 1974; Villalón, Ortiz *et al.*, 1982; Ortiz, Bedregal *et al.*, 1986; Holý, Vanatka *et al.*, 1992; Ménézo y Guérin, 1997). En la cerda no se han observado diferencias en el transporte de ambos entrando los dos tipos al mismo tiempo en el útero (Mwanza, Razdan *et al.*, 2002).

Parece ser que el destino de los ovocitos no fecundados y de los cigotos no depende de factores oviductales si no de la síntesis propia de moléculas derivadas de los ácidos grasos poliinsaturados (Kubagawa, Watts *et al.*, 2006).

4.1.2. CÉLULAS DEL CÚMULO

Las células de la granulosa acompañan al ovocito tras la ovulación formando el CO y su papel en el oviducto es importante por diversas razones.

Las células del cúmulo sintetizan fetuina en folículos en desarrollo y en grandes folículos (Høyer, Terkelsen *et al.*, 2001), lo cual puede estar implicado en la inhibición del endurecimiento de la ZP durante la maduración (Landim-Alvarenga, Boyazoglu *et al.*, 2002).

En la especie bovina, se ha demostrado que sólo los CCO no degenerados se unen fuertemente al epitelio ampular. Al parecer, esta unión, que está mediada por las células de la granulosa, está relacionada con la posterior viabilidad del CCO (Kölle, Dubielzig *et al.*, 2009).

Estas células del cúmulo que son desplazadas del folículo de Graaf al interior oviductal son de dos tipos: aquellas que se encuentran íntimamente unidas al ovocito formando el CCO y aquellas que se encuentran formando grupos de células en suspensión en la vecindad de las anteriores. Las células unidas al ovocito son poco a poco liberadas debido al batido ciliar, las contracciones en el interior de la ampolla oviductal y por la acción de componentes del fluido luminal, como el ión bicarbonato (Stambaugh, Noriega *et al.*, 1969) y enzimas de la cabeza del espermatozoide, especialmente la hialuronidasa acrosómica que influencia la separación de las células del cúmulo, por lo que los ovocitos de animales apareados se denudan más rápidamente que en los de los no apareados o inseminados (Hunter, 1974).

Una vez se han separado, estas células se mantienen en suspensión en las vecindades del ovocito o del nuevo embrión y muchas siguen siendo viables y activas desde un punto de vista secretor, ya que en condiciones *in vitro* se ha observado que las células del cúmulo equinas son capaces de sintetizar hormonas esteroideas como progesterona por lo que también deben de sintetizarlas *in vivo* (Hunter, 2002). Además de hormonas pueden sintetizar otras proteínas como factores de crecimiento que participan en los procesos de fecundación y desarrollo embrionario, citoquinas y proteoglicanos como condroitín sulfato, heparán sulfato, proteínas de unión a versican y a perlecan, péptido natriurético atrial, adrenalina, oxitocina, calcitonina y acetilcolina (revisado por Sun, Chung *et al.*, 2011).

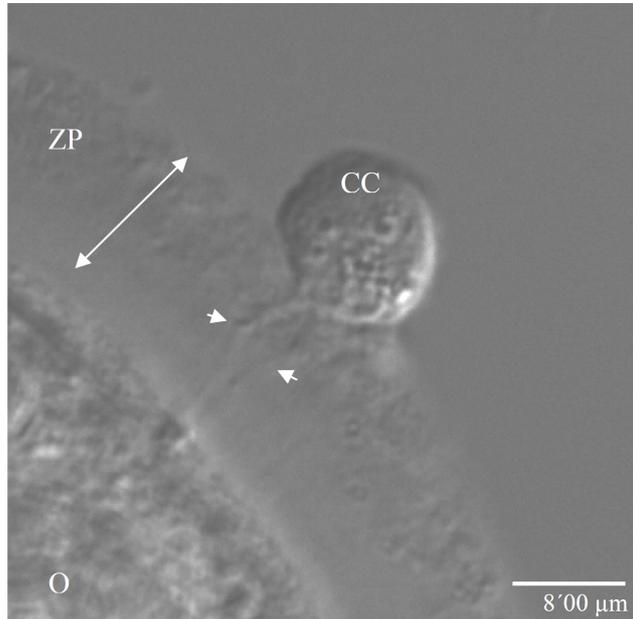


Figura 1. Ovocito bovino madurado *in vitro*. Imagen de luz transmitida en microscopio confocal. O: ooplasma; ZP: zona pelúcida; CC: célula del cúmulo; Flechas: zona de contacto entre el ovocito y la célula del cúmulo.

Estas células son capaces de producir piruvato en presencia de glucosa y lactato por lo que parecen estar implicados en la nutrición embrionaria (Donahue y Stern , 1968; Leese y Barton, 1985).

Como estas células acompañan al ovocito, sus secreciones pueden contribuir a la formación de un microambiente alrededor del ovocito o embrión e influir en la fecundación y en las primeras fases del desarrollo embrionario. Pueden también actuar como tejido paracrino desempeñando un papel vital en las primeras divisiones embrionarias. La progesterona que sintetizan podría incrementar el desarrollo del cuerpo lúteo en el ovario, lo que se amplifica con el gran número de células liberadas (Hunter, 2003). Además, existe una íntima conexión entre el ovocito y estas células por lo que pueden amplificar otras señales procedentes del propio ovocito o del embrión (Zhuo y Kimata, 2001; Hunter, 2002; Brankin, Mitchell *et al.*, 2003; Hunter, Einer-

Jensen *et al.*, 2005). En la figura 1 se puede observar la conexión existente entre un ovocito y una célula del cúmulo mediante prolongaciones citoplasmáticas.

En la ovulación, también se incorpora al oviducto junto con el CCO, la matriz extracelular despolimerizada de las células del cúmulo, aumentando la viscosidad de la ampolla (Hunter, Coy *et al.*, 2011) ya que el componente mayoritario de la matriz es el hialuronano que es una sustancia muy viscoelástica. La matriz extracelular del cúmulo también es determinante para la fecundación y se ha visto que ciertas alteraciones en su estructura y composición provocan infertilidad en ratones (Zhuo y Kimata, 2001).

4.1.3. ESPERMATOZOIDES

Debido a que el presente trabajo se centra fundamentalmente en el fluido oviductal y en el gameto femenino, comentaremos algunas generalidades importantes del gameto masculino y desarrollaremos más ampliamente aquellas que implican una relación de este gameto con el oviducto o con el FO.

4.1.3.1. Formación del espermatozoide maduro

Cuando el macho llega a su madurez sexual, las células de la serie germinal que revisten las paredes del tubo seminífero son capaces de producir los gametos masculinos haploides o espermatozoides mediante un proceso denominado **espermatogénesis**.

La espermatogénesis depende de procesos de regulación hormonal intra y extra testiculares, del sistema vascular, células de Leydig y otros componentes celulares del espacio intertubular. Gracias a este proceso la producción de espermatozoides es continua y se asegura un elevado número de gametos en el eyaculado (revisado por Holstein, Schulze *et al.*, 2003).

En el túbulo seminífero, sobre la lámina basal, se encuentran células de la serie germinal y células de Sertoli. Las células germinales forman varias capas de células, las cuales van a ir transformándose gradualmente desde la zona basal hasta la luz del túbulo, donde finalmente se producen los espermatozoides. Esta transformación puede

ser dividida en tres fases: espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis (Courot, Hochereau *et al.*, 1970).

La duración del proceso, desde espermatogonia a espermatozoide maduro, depende de la especie, siendo de 34 días en el ratón, 48 días en la rata, 75 días en el hombre, 41 días en las especies porcina y bovina y 32 días en la especie ovina, (Roosen-Runge, 1969; Parks, Lee *et al.*, 2003; Almeida, Leal *et al.*, 2006).

Los espermatozoides serán liberados a la luz del tubo seminífero en el proceso de espermiación regulado por las células de Sertoli.

Cuando los espermatozoides son liberados a la luz del tubo seminífero han alcanzado su madurez morfológica pero aún no tienen capacidad fecundante. Esta capacidad la adquieren durante el paso a través del epidídimo en un proceso denominado maduración epididimaria. Los espermatozoides atraviesan las tres regiones epididimarias: cabeza, cuerpo y cola siendo esta última la zona de almacenamiento de los espermatozoides madurados o remodelados, donde permanecen inmóviles hasta la eyaculación. La maduración epididimaria lleva consigo cambios en la motilidad, en la membrana plasmática, en el acrosoma y en el núcleo (Djakiew y Jones, 1983; Jones, Dacheux *et al.*, 2007).

Los cambios bioquímicos en la membrana de espermatozoides de mamíferos durante la maduración epididimaria son principalmente cambios en la composición proteica y lipídica que están regulados por la actividad secretora del epitelio epididimal. Estos cambios dotan a los espermatozoides de movilidad progresiva y de la capacidad para reconocer y fecundar al ovocito (Cooper, 1995).

En muchas especies de mamíferos la motilidad se adquiere cuando los espermatozoides interactúan con el plasma seminal, el cual es una compleja mezcla de componentes producidos por las glándulas accesorias masculinas (glándula vesicular, próstata y glándula bulbouretral).

En el plasma seminal se han encontrado factores que previenen la capacitación espermática como el colesterol (Cross, 1996) y proteínas como las espermadhesinas que

probablemente previenen la reacción acrosómica (RA) prematura (Drisdel, Mack *et al.*, 1995; Töpfer-Petersen, Romero *et al.*, 1998; Jonáková, Manásková *et al.*, 2007; Manásková y Jonáková, 2008).

Los espermatozoides maduros tienen una morfología única que les permite el transporte hacia el gameto femenino. Están formados por cabeza y cola y se encuentran envueltos en una membrana plasmática (figura 2, espermatozoide humano modificado de Holstein, Schulze *et al.*, 2003), caracterizada por su composición de glicoproteínas y lípidos que varía dependiendo de la región o función (Pesch y Bergmann, 2006).

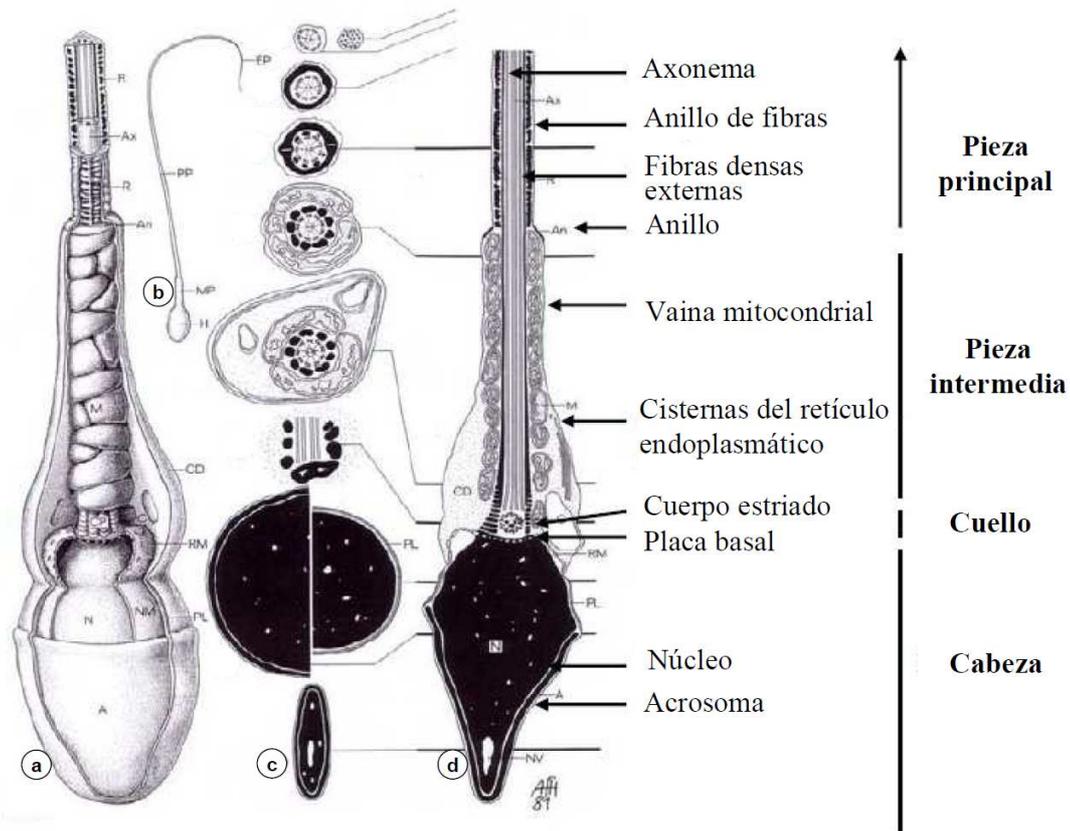


Figura 2. Espermatozoide humano. Tomado de Holstein, Schulze *et al.*, 2003. a) Preparación virtual del espermatozoide mostrando el acrosoma, el núcleo, las envolturas nucleares y las mitocondrias en la pieza media del flagelo. b) Aspecto a microscopio óptico. c) Sección transversal a los diferentes niveles indicados. d) Sección longitudinal del espermatozoide.

La cabeza está formada por núcleo y acrosoma, rodeados por una membrana plasmática. El tamaño y forma de la cabeza varía entre los distintos animales siendo estas características altamente especie-específicas (Downing Meisner, Klaus *et al.*, 2005).

La cabeza está cubierta en los dos primeros tercios de las partes anteriores del núcleo por el acrosoma, el cual se encuentra delimitado por una membrana acrosomal interna y otra externa que se divide en tres segmentos: apical, principal y ecuatorial (Downing Meisner, Klaus *et al.*, 2005). El contenido acrosomal es rico en enzimas hidrolíticas tipo acrosina (Barros, Capote *et al.*, 1992) hialuronidasa y otras hidrolasas y esterasas (Tulsiani, Abou-Haila *et al.*, 1998) que sirven al espermatozoide para atravesar las envolturas que rodean al ovocito durante los procesos de fecundación, gracias a la RA, en la cual la membrana acrosómica externa se fusiona en múltiples puntos con la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide y se libera el contenido acrosomal (Tulsiani y Abou-Haila, 2001), como se explicará posteriormente.

Estos enzimas liberados permiten al espermatozoide atravesar la ZP (De Los Reyes y Barros, 2000) lo cual, combinado con la movilidad vigorosa del mismo permite la llegada a las inmediaciones del oolema con el que se fusiona (Talbot, 1985).

La cola está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y terminal. A lo largo de toda esta porción discurre el flagelo que es el responsable del movimiento del espermatozoide.

4.1.3.2. Capacitación espermática

El espermatozoide eyaculado no posee la capacidad de fecundar; para ello, deberá sufrir una serie de modificaciones en el interior del tracto reproductor de la hembra, modificaciones que han recibido el nombre de capacitación espermática (Austin, 1951; Chang, 1951; Austin, 1952).

La capacitación espermática, que lleva consigo nuevas modificaciones bioquímicas y la adquisición de hiperactivación, se inicia después de la eliminación o modificación de factores adquiridos por los espermatozoides durante su contacto con el

plasma seminal, continúa durante su paso a través del tracto reproductor femenino y finaliza cuando los espermatozoides interactúan con la ZP del ovocito en la RA (De Jonge, 2005).

La capacitación puede producirse en el útero (Austin, 1951) aunque es más rápida en el oviducto (Bedford, 1969), siendo también más rápida en condiciones *in vivo* respecto a *in vitro* (Dobrinski, Smith *et al.*, 1997).

En la cópula el macho insemina varios miles o millones de espermatozoides, lo que no garantiza que la fecundación tenga éxito ya que van a ir siendo seleccionados en el tracto genital femenino. En la especie porcina, por ejemplo, de los miles de millones de espermatozoides eyaculados en la monta, sólo unos pocos alcanzan el istmo donde necesitan de 5 a 6 horas para su capacitación (Davis, 1981) y de ellos, solo unos cientos serán capaces de llegar al lugar de la fecundación (Murray y Smith, 1997) lo que favorece que la fecundación sea monospermica (Hunter, 1991b).

El inicio y la duración de la capacitación se encuentran condicionados por el lugar de la deposición del semen durante la cubrición. En especies de deposición uterina, como la murina y la porcina, la capacitación y el almacenamiento espermático se producen en el istmo oviductal (Dobrinski, Smith *et al.*, 1997), mientras que en las especies de deposición vaginal como la cunícula, la ovina y la caprina entre otras, comienza con el contacto de los espermatozoides con el moco cervical (Hunter, Nichol *et al.*, 1980; Hunter, 1982). De modo general, el periodo que los espermatozoides precisan mantenerse en el tracto genital femenino para sufrir la capacitación oscila de 2 a 4 horas, aunque este periodo es algo mayor para los espermatozoides de verraco (de 5 a 6 horas; Davis, 1981).

El paso del espermatozoide a través del moco cervical hace variar la cantidad de colesterol, lípidos y proteínas de su membrana, modificación que se puede deber a la acción de una o varias enzimas que se encuentran presentes en el moco cervical. La albúmina, un receptor de colesterol, provoca la reducción de este lípido en la membrana espermática lo que deriva en la fluidificación de la misma (Du Mesnil Du Boisson y Dautzier, 1955; Feki, Thérond *et al.*, 2004).

En los marsupiales e insectívoros los espermatozoides quedan retenidos en las criptas de la mucosa cervical mientras que en la mayoría de las especies de mamíferos los espermatozoides se unen al epitelio oviductal.

Los animales pueden regular la entrada de espermatozoides al oviducto fundamentalmente mediante dos métodos, unos son capaces de abrir y cerrar la unión útero-tubárica mediante la contracción del músculo liso, como ocurre en la vaca y en el ratón (Suarez, 1987; Wrobel, Kujat *et al.*, 1993; Yániz, Lopez-Gatius *et al.*, 2006) y otros producen moco, como ocurre en la mujer, la coneja y la cerda (Jansen, 1980; Jansen y Bajpai, 1982; Hunter, 2002); una vez en el oviducto quedan atrapados y mantenidos en el reservorio espermático.

Gracias a ensayos con animales knock-out se ha visto que algunas proteínas de la membrana del espermatozoide son necesarias para realizar el paso a través del moco de la unión útero-tubárica. Los espermatozoides de estos animales poseen morfología normal y son móviles pero no son capaces de unirse a la ZP. Entre las moléculas implicadas en el proceso destacan la proteína desintegrina (antes denominada fertilina β , formada por el dímero ADAM1b/ADAM2) (Cho, Bunch *et al.*, 1998), la calmegina (homólogo testicular de la chaperona calnexina) (Ikawa, Wada *et al.*, 1997; Yamagata, Nakanishi *et al.*, 2002) y la proteína testicular transformadora de la angiotensina (Hagaman, Moyer *et al.*, 1998; Ikawa, Inoue *et al.*, 2010). Diferentes líneas de ratones knockout (desintegrina y calmegina) muestran aberraciones en ADAM3 convirtiéndose en el factor más importante en la migración de los espermatozoides en el ratón aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual facilita el paso a través de la unión útero-tubárica (Yamaguchi, Yamagata *et al.*, 2006; Ikawa, Inoue *et al.*, 2010).

El reservorio espermático se ha observado en el oviducto de la ratona (Suarez, 1987), hámster (Smith y Yanagimachi, 1991), mujer (Pacey, Davies *et al.*, 1995; Baillie, Pacey *et al.*, 1997), cerda (Fléchon y Hunter, 1981; Hunter, 1981), vaca (Hunter y Wilmut, 1984; Hunter, 1991a) y oveja (Hunter y Nichol, 1983), (revisado por Suarez, 2008).

Una vez en el istmo caudal los espermatozoides unen íntimamente sus cabezas con el epitelio oviductal (Figura 3)

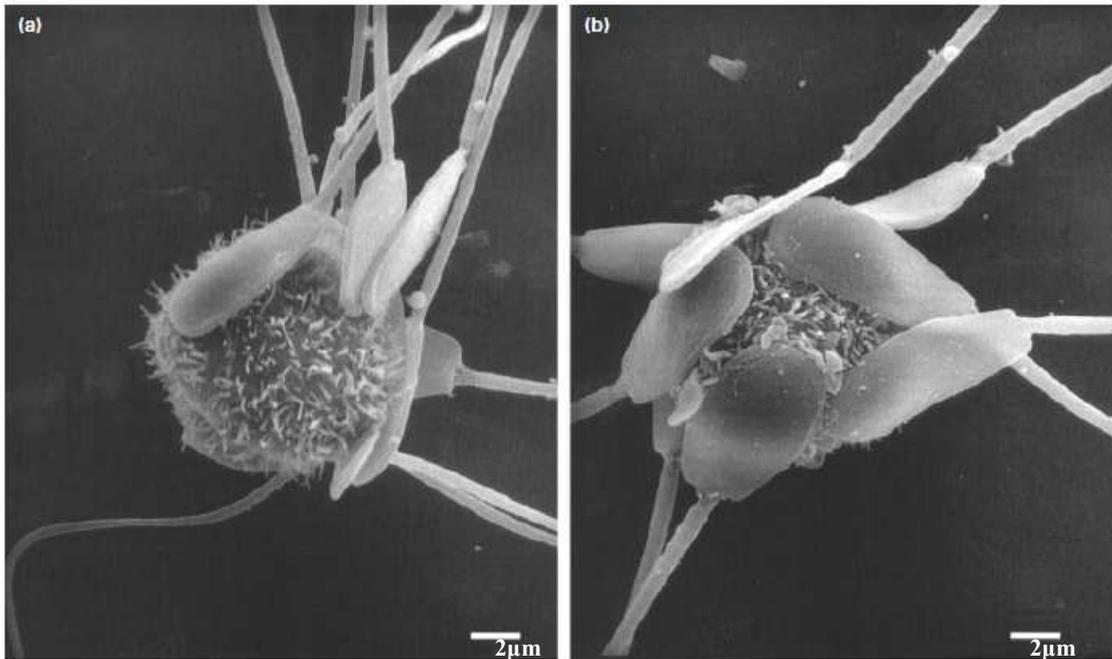


Figura 3. Tomado de Dobrinski, Ignatz *et al.* (Dobrinski, Ignatz *et al.*, 1996). Espermatozoides de cerdo unidos por sus cabezas a células epiteliales oviductales redondeadas cultivadas en suspensión.

Esta unión está mediada por carbohidratos y en la especie bovina los espermatozoides se unen al epitelio mediante la fucosa del trisacárido de Lewis-a (Suarez, Revah *et al.*, 1998). La unión no se realiza directamente si no que está implicada una proteína del plasma seminal bovino (BSP) que posee capacidad de unión a carbohidratos y heparina, siendo en este caso la proteína PDC109 (también BSPA1/A2) (Desnoyers y Manjunath, 1992; Ignatz, Lo *et al.*, 2001; Gwathmey, Ignatz *et al.*, 2003). Por lo tanto, esta unión está mediada por proteínas de unión a carbohidratos y a heparina como las espermadhesinas y las BSP mencionadas que incluyen a la BSPA3 y BSP30K (Töpfer-Petersen, Romero *et al.*, 1998; Liberda, Manásková *et al.*, 2006; Manásková, Peknicová *et al.*, 2007). Se han encontrado homólogos de las BSP en el ratón (mBSPH1 y mBSPH2) y en el hombre (hBSPH1) (Lefebvre, Fan *et al.*, 2007).

La espermadhesina AQN1 presente en el plasma seminal de cerdo, vaca y caballo, se une fuertemente a la superficie de la membrana espermática por un lado y por otro reconoce a diferentes carbohidratos como manosa y galactosa; se ha observado que la disminución de espermatozoides capacitados unidos a manosa está asociado con la pérdida de AQN1 (Ekhlasi-Hundrieser, Gohr *et al.*, 2005). Análisis mediante

inhibición competitiva por mono- y oligosacáridos evitan la unión espermática al oviducto en varias especies como en el hámster (Demott, Lefebvre *et al.*, 1995), el cerdo (Green, Bredl *et al.*, 2001; Wagner, Ekhlasi-Hundrieser *et al.*, 2002) y el caballo (Dobrinski, Ignatz *et al.*, 1996), (revisado por Suarez, 2008).

Los espermatozoides no capacitados se unen de modo selectivo al reservorio en la superficie apical de las células ciliadas oviductales donde se mantienen rodeados de secreciones de la mucosa ricas en mucopolisacáridos y proteínas específicas (Hunter y Wilmut, 1984; Fazeli, Duncan *et al.*, 1999).

El reservorio espermático es un reservorio funcional debido a que se disminuye el metabolismo de los espermatozoides y se suprime la motilidad flagelar a la vez que se preserva la capacidad fecundante de los mismos (Hunter, Nichol *et al.*, 1980).

El epitelio oviductal es el responsable del mantenimiento de la viabilidad espermática (Rodríguez-Martínez, Nicander *et al.*, 1990; Murray y Smith, 1997) y en su unión al epitelio los espermatozoides mantienen bajos los niveles de ión calcio (Ca^{2+}) citoplasmático, frente a los que nadan libremente (Dobrinski, Suarez *et al.*, 1996). Esto es importante debido a que la capacitación es un proceso dependiente de Ca^{2+} de modo que cuando los espermatozoides permanecen en el reservorio las concentraciones de este ión son bajas en un ambiente no favorable para la capacitación (Dobrinski, Smith *et al.*, 1997) y durante ella se produce un aumento intracelular de este ión (Parrish, Susko-Parrish *et al.*, 1989; Tardif, Dubé *et al.*, 2003).

El mecanismo por el que se previene una subida en los niveles del Ca^{2+} parece encontrarse mediado por la actuación de la enzima catalasa, detectada en el oviducto bovino. Esta enzima está implicada en la protección contra la peroxidación de las membranas espermáticas lo que impediría la entrada al citoplasma de iones calcio previniendo así una capacitación prematura (Lapointe, Sullivan *et al.*, 1998).

La entrada de los iones Ca^{2+} activa a la enzima adenilato ciclasa que aumenta los niveles de AMPc, lo que activa a su vez la cascada de señales de la proteína quinasa A (PKA).

Otro mecanismo por el que se activa la cascada de la PKA es dependiente de los niveles de bicarbonato, de modo que niveles bajos de carbonatos previenen la capacitación (Rodríguez-Martínez, Ekstedt *et al.*, 1990) mientras que niveles altos, similares a los oviductales, la estimulan (Vishwakarma, 1962).

La activación de la PKA, proteína reguladora del metabolismo lipídico (entre otras funciones) provoca cambios en la composición lipídica de la membrana espermática, de modo que se pierde gran cantidad de colesterol y otros fosfolípidos de membrana como fosfatidilcolina mediante la hidrólisis de los fosfoglicéridos (Flesch y Gadella, 2000; Zanetti, Monclus *et al.*, 2010). Esta reordenación junto con la captación de colesterol por la albúmina vista anteriormente hace que las pérdidas lipídicas en la membrana aumenten su fluidez permitiendo el flujo de iones a su través y modificando por lo tanto el potencial de la membrana espermática (Fraser y Dandekar, 1973; Flesch y Gadella, 2000; Fraser, Adeoya-Osiguwa *et al.*, 2005).

Otra consecuencia de la activación de la PKA es la fosforilación de tirosina en determinadas proteínas espermáticas proceso que ha sido claramente correlacionado con la capacitación (Leyton y Saling, 1989; Visconti, Bailey *et al.*, 1995; Visconti, Moore *et al.*, 1995).

La activación de diferentes rutas celulares a través del AMPc también va a modificar el metabolismo espermático aumentando la movilidad de los espermatozoides y desencadenando a hiperactivación espermática (revisado por Flesch y Gadella, 2000).

El epitelio oviductal es además capaz de secretar proteínas específicas que afectan a su función controlando el proceso de la capacitación (Holt y Fazeli, 2010), como la catalasa mencionada anteriormente, aunque también se expresan proteínas inductoras de la capacitación (King, Anderson *et al.*, 1994; Topper, Killian *et al.*, 1999) como la glicoproteína de alto peso molecular específica del oviducto, oviductina u OVGP1 (King, Anderson *et al.*, 1994; Mccauley, Buhi *et al.*, 2003); proteínas de bajo peso molecular tipo glicodelinas (Yeung, Lee *et al.*, 2006) o Heat Shock Proteins (HSP), como la HSPA8 (Lloyd, Elliott *et al.*, 2009). Además se ha observado que las fracciones de alto y bajo peso molecular pueden tener efectos complementarios sobre la capacitación (Coy, Lloyd *et al.*, 2010).

Los espermatozoides en contacto con el epitelio oviductal modulan además el proteoma de secreción oviductal por lo que dirigen en cierto modo las secreciones oviductales (Fazeli, Affara *et al.*, 2004; Georgiou, Sostaric *et al.*, 2005; Georgiou, Snijders *et al.*, 2007).

Conforme se acerca el momento de la ovulación, los espermatozoides en el epitelio se capacitan modificando los componentes de su membrana y adquieren una motilidad característica de hiperactivación, la cual permite su separación gradual del epitelio para evitar fenómenos de polispermia (Hunter y Wilmot, 1984).

En espermatozoides de verraco se ha observado que existen diferencias en la cantidad de espermatozoides capacitados cuando se comparan las etapas pre, peri y post ovulatoria. En la fase postovulatoria predominan los espermatozoides capacitados por lo que este evento depende de la etapa del ciclo estral de la hembra (Foresta, Rossato *et al.*, 1992; Suarez, 2002; Tienthai, Johannisson *et al.*, 2004; Sostaric, Dieleman *et al.*, 2008). De modo general la capacitación se ve favorecida por niveles altos de estrógenos e inhibida por niveles altos de progesterona por lo que ha de ser un proceso sincronizado con la ovulación (Foresta, Rossato *et al.*, 1992; Suarez, 2002; Tienthai, Johannisson *et al.*, 2004).

Varios parecen ser los factores que participan en la separación de los espermatozoides del reservorio, aunque no se conoce con exactitud el mecanismo controlador de la secuencialidad del proceso: factores hormonales mencionados previamente; los cambios acaecidos en la composición de la membrana del espermatozoide que debilitan la unión del espermatozoide con las células oviductales (Fazeli, Duncan *et al.*, 1999); el movimiento de hiperactivación adquirido tras la capacitación (Ho y Suarez, 2001); los movimientos de las capas musculares y la actuación de diferentes glico-conjugados sulfatados (heparina, fucoidano, dextrán sulfato y heparano) y compuestos reductores de grupos disulfuro que facilitan la rotura de las uniones con el epitelio (penicilamina) (Talevi y Gualtieri, 2001; Talevi, Zagami *et al.*, 2007; Brüssow, Rátky *et al.*, 2008; Gualtieri, Mollo *et al.*, 2009; Talevi y Gualtieri, 2010); las glicosidasas oviductales (Carrasco, Coy *et al.*, 2008; Carrasco,

Romar *et al.*, 2008) y el cambio en el proteoma oviductal inducido por la presencia de los gametos en el oviducto (Georgiou, Sostaric *et al.*, 2005).

Cuando los complejos cúmulo-ovocito se encuentran ya en la ampolla oviductal (Talbot, Geiske *et al.*, 1999), el espermatozoide inducido por señales procedentes del oviducto, células del cúmulo o los ovocitos se separa del epitelio y gracias al movimiento de hiperactivación viajará a lo largo del oviducto hacia las inmediaciones del ovocito donde deberá atravesar sus cubiertas y fecundar (Suarez y Dai, 1992; Kölle, Dubielzig *et al.*, 2009).

4.1.3.3. Reacción acrosómica (RA)

Como hemos mencionado previamente el acrosoma es una estructura vesicular que envuelve la mayor parte de la cabeza del espermatozoide en su región apical. Los primeros estudios afirmaron que el contenido acrosomal rico en enzimas hidrolíticas tipo acrosina, hialuronidasa, otras hidrolasas y esterases (Barros, Capote *et al.*, 1992; Tulsiani, Abou-Haila *et al.*, 1998), ayudan al espermatozoide para atravesar las envolturas que rodean al ovocito durante los procesos de fecundación. Posteriores estudios indicaron que sólo los espermatozoides parcialmente capacitados con acrosoma intacto son capaces de desplazarse libremente dentro del cúmulo debido a que el espermatozoide posee proteínas con actividad hialuronidasa (PH-20 e Hyal5) en su membrana plasmática, por lo que no es necesario sufrir la RA para atravesar las células del cúmulo (Meyers, Yudin *et al.*, 1997).

Como ya se ha mencionado anteriormente en la RA la membrana acrosómica externa se fusiona en múltiples puntos con la membrana plasmática del espermatozoide y se libera el contenido acrosomal (figura 4) y el espermatozoide expone ahora la envoltura nuclear rodeada por la membrana acrosomal interna (Yanagimachi, 1994a; Ikawa, Inoue *et al.*, 2010; Tulsiani y Abou-Haila, 2001).

Los estímulos a los que el espermatozoide responde con la RA se encuentran bajo debate. La glicoproteína ZP3 es la principal responsable de la RA en el ratón y en los humanos se ha observado que son necesarias además la ZP1 y la ZP4 (Cross, Morales *et al.*, 1988; Gupta, Bansal *et al.*, 2009; Gupta y Bhandari, 2011). Este modelo

asume que sólo los espermatozoides con acrosoma intacto pueden unirse a la ZP, llevar a cabo la RA y penetrar las envolturas para la fusión con el ovocito (Miller, Macek *et al.*, 1992). Sin embargo, este modelo se ha puesto en duda ya que transgénicos de ratón (ZP2Mut, ZP3Mut) no son capaces de inducir la RA; sin embargo, los ovocitos siguen siendo fecundados en estas cepas, lo que sugiere que los espermatozoides sufren la RA, ya sea antes de su contacto con la zona o durante su paso a través de ella (Gahlay, Gauthier *et al.*, 2010).

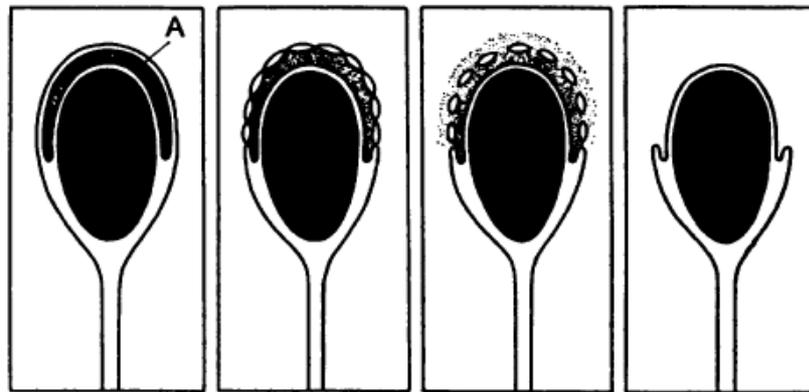


Figura 4. Tomado de Austin, 1974. Estados de la reacción acrosómica con la vesiculación de las membranas y liberación de los enzimas acrosómicos.

En otros modelos se ha observado que existen espermatozoides que sufren la RA en las células del cúmulo ovífero antes de llegar a la ZP (Bedford, 1972). Actuales observaciones referentes al factor NYD-SP8 indican que dicho factor inicia la RA en la interacción del espermatozoide con las células del cúmulo (revisado por Sun, Chung *et al.*, 2011). Sun *et al.* proponen en su revisión un modelo bastante integrador con los datos existentes hasta el momento en el que la RA se produce en las células de la granulosa, en el cúmulo y en la ZP, siendo éstos últimos, los que sufren la RA en la ZP, los únicos capaces de penetrar y fecundar al ovocito.

No hay duda de que la ZP tiene la capacidad de inducir la RA aunque no debe ser considerada la única sustancia que la induzca (Yanagimachi, 2011).

4.1.4. INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO Y FECUNDACIÓN

Los espermatozoides capacitados en el istmo consiguen llegar a través del fluido oviductal al lugar de la fecundación gracias a su movimiento de hiperactivación y se

encuentran al ovocito recientemente ovulado rodeado por el CO. Para poder interactuar con el ovocito el espermatozoide ha de atravesar el cúmulo, la ZP y finalmente el oolema. Una vez allí se producirá la fusión de gametos.

Como hemos mencionado anteriormente, las células del cúmulo se encuentran unidas entre sí mediante una matriz de sustancia extracelular formada fundamentalmente por ácido hialurónico que ha de ser degradada por enzimas con actividad hialuronidasa (Salustri, Yanagishita *et al.*, 1992).

Para poder atravesar esta capa de células el espermatozoide posee una serie de proteínas entre las cuales se encuentran la proteína PH-20 o SPAM1 y la Hyal5 ya mencionadas en la superficie del espermatozoide que poseen actividad hialuronidasa de modo que hidrolizan el ácido hialurónico que une a las células del cúmulo permitiendo al espermatozoide avanzar entre ellas (Meyers, Yudin *et al.*, 1997; Myles y Primakoff, 1997; Kim, Baba *et al.*, 2005) ayudados por el movimiento de hiperactivación (Meyers, Yudin *et al.*, 1997; Myles y Primakoff, 1997; Kim, Baba *et al.*, 2005). Por la posición que ocupan dichas proteínas en el espermatozoide reaccionado de macaco y cobayo (Overstreet, Lin *et al.*, 1995) fueron propuestas para estar implicadas en la unión primaria y/o secundaria de los gametos pero posteriores revelaciones indicaron que apenas poseen dicha actividad (Baba, Kashiwabara *et al.*, 2002; Kim, Yamashita *et al.*, 2008).

Una vez atravesado el cúmulo, el espermatozoide interactúa con el ovocito a varios niveles, en primer lugar, con la ZP; posteriormente, con la membrana plasmática del ovocito denominada oolema, con la que se fusiona, y finalmente con el citoplasma llamado ooplasma/ovoplasma donde se produce la descondensación del núcleo espermático.

4.1.4.1. Zona Pelúcida (ZP)

La ZP es una matriz extracelular de glicoproteínas que rodea a los ovocitos de animales mamíferos la cual permite la comunicación entre ovocitos y células foliculares durante la ovogénesis. Está involucrada en el reconocimiento y unión al espermatozoide, en la RA, en el bloqueo de la polispermia y en la protección del

embrión antes de la implantación (Yanagimachi, 1994b; Dean, J, 2004; Kaneko, Moisyadi *et al.*, 2005; Wassarman y Litscher, 2008).

La ZP de ratón fue la primeramente descrita, está compuesta por tres glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3 (Bleil y Wassarman, 1980), composición propuesta como modelo para los mamíferos aunque posteriormente se ha demostrado que su composición varía de una especie a otra (Topper, Kruijt *et al.*, 1997) pudiendo estar compuesta por cuatro glicoproteínas (Bleil y Wassarman, 1980; Izquierdo-Rico, Jiménez-Movilla *et al.*, 2009; Mugnier, Dell'Aquila *et al.*, 2009; Moros *et al.*, 2010), (Tabla 1).

Tabla 1. Glicoproteínas de la ZP de las especies utilizadas en el presente estudio. Modificado de Izquierdo-Rico, Jiménez-Movilla *et al.*, 2009.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	ACCESO EN BASE DE DATOS			
		ZP1	ZP2/ZPA	ZP3/ZPC	ZP4/ZPB
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Coneja	XM_002709016	L12167 P48829	U05782 P48833	M58160 Q00193
<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	NM_053509.1 O54766	NM_031150 O54767	NM_053762 P97708	NM_172330 Q8CH34
<i>Mus musculus</i>	Ratona	NM_009580 O62005	NM_011775 P20239	NM_011776 P10761	NR_027813 Pseudogen
<i>Mesocricetus auratus</i>	Hámster	EU003563 A7U762	AY876920 Q5FY68	M63629 P23491	DQ838550 Q0P6F1
<i>Homo sapiens</i>	Mujer	NM_207341 P60852	NM_003460 Q05996	NM_007155 P21754	NM_021186 Q12836
<i>Sus scrofa</i>	Cerda	--	NM_213848 P42099	NM_213893 P42098	NM_214045 Q07287
<i>Bos taurus</i>	Vaca	--	NM_173973 Q9BH10	NM_173974 P48830	NM_173975 Q9BH11
<i>Ovis aries</i>	Oveja	--	ADQ47435 E5FYD9	ADQ47460 E5FYG4	--
<i>Capra hircus</i>	Cabra	--	ADQ47436 E5FYE0	ADQ47461 E5FYG5	--
<i>Equus caballus</i>	Yegua	XM_001493722.2	XM_001494769.1	XM_001493044.2	XM_001490753

Estas glicoproteínas están altamente glicosiladas, lo que es muy importante para conferir a la ZP sus funciones biológicas específicas (Noguchi y Nakano, 1993; Bauskin, Franken *et al.*, 1999).

4.1.4.2. Interacción espermatozoide-ovocito

Como hemos mencionado anteriormente la ZP está implicada en el reconocimiento y unión con el espermatozoide, función que se ha asignado a glicoproteínas concretas. Previamente, hemos comentado que se considera a la glicoproteína ZP3 como la principal responsable de la RA en el ratón y en el hámster; en humanos son necesarias además la ZP1 y la ZP4 (Wassarman, Bleil *et al.*, 1986; Cross, Morales *et al.*, 1988; Gupta, Bansal *et al.*, 2009; Gupta y Bhandari, 2011) y en el cerdo y la vaca se asigna este papel conjuntamente a ZP3 y ZP4 (Wassarman, 1990; Topper, Kruijt *et al.*, 1997), por lo que se ha considerado a estas glicoproteínas y fundamentalmente a la ZP3 como los encargados de la unión primaria. En el cerdo y en la vaca (Yurewicz, Sacco *et al.*, 1998; Yonezawa, Fukui *et al.*, 2001) existen evidencias de que la ZP4 se une al espermatozoide. Esta unión desencadena la RA y prosigue la unión secundaria en la que el espermatozoide se mantendrá unido al ovocito gracias a la ZP2 mediante a enzima acrosina de la membrana acrosomal interna espermática.

Este modelo de unión de espermatozoides capacitados mediada por las glicoproteínas de la ZP es comúnmente aceptado (Topfer-Petersen, Petrounkina *et al.*, 2000), aunque se ha observado que no es estrictamente necesaria la capacitación para unirse al ovocito (Wassarman, 2009).

Además ratones mutantes con ZP2Mut, ZP3Mut no desencadenan la RA pero sí logran fecundar, por lo que se cuestiona el papel de la unión primaria de la ZP3 y la secundaria de la ZP2 (Gahlay, Gauthier *et al.*, 2010; Yanagimachi, 2011).

Los N-oligosacáridos también han sido implicados en la unión a la ZP en el espermatozoide de toro y verraco; en ambos se ha implicado al ácido siálico (Amari, Yonezawa *et al.*, 2001; Nakano y Yonezawa, 2001; Yonezawa, Fukui *et al.*, 2001; Velasquez, Cánovas *et al.*, 2007). Además los oligosacáridos podrían estar también

implicados en el establecimiento de la especificidad de especie (Shalgi y Raz, 1997; Clark y Dell, 2006).

Otro enfoque para el abordaje de la unión espermatozoide-ovocito podría ser la estructura supramolecular de la ZP. Las proteínas poseen una conformación tridimensional que les confiere ciertas propiedades (Monné y Jovine, 2011). En el caso de la ZP, dependiendo de la especie, está formada por tres o cuatro glicoproteínas que no se encuentran distribuidas de modo homogéneo en ella y se sintetizan por capas lo que le confiere cierta asimetría entre las capas externa e interna (Phillips y Shalgi, 1980; Ahuja y Bolwell, 1983; Keefe, Tran *et al.*, 1997). Por lo tanto la estructura supramolecular podría ser la causa de las interacciones específicas entre espermatozoide-ZP (Rankin, Tong *et al.*, 1998; Rankin, Coleman *et al.*, 2003; Dean, J., 2004). De este modo la conformación tridimensional aportada por las ZP2 y ZP3 sería la responsable de la unión con el espermatozoide de forma específica; tras la liberación del contenido de los gránulos corticales ZP2 sufriría proteólisis y modificaría esta estructura supramolecular provocando la compactación de la misma evitando la entrada de más espermatozoides (Barros y Yanagimachi, 1971; Wolf y Hamada, 1977; Hoodbhoy y Dean, 2004; Monné y Jovine, 2011). Este modelo supramolecular explicaría los resultados de fertilidad obtenidos con ratones *knockout* para ZP1 (Rankin, Talbot *et al.*, 1999).

Una vez que el espermatozoide ha atravesado la ZP gracias a la acción coordinada de las enzimas del acrosoma y el movimiento del espermatozoide (O'rand, Welch *et al.*, 1986), alcanza el espacio perivitelino (EPV), gracias a la motilidad residual del flagelo, y cesa su actividad flagelar bruscamente. La cabeza del espermatozoide se coloca contactando la membrana a nivel del segmento ecuatorial con las microvellosidades del oolema y se incorpora al citoplasma ovocitario u ovoplasma por fusión de las membranas plasmáticas. En mamíferos el flagelo espermático penetra en el interior del ooplasma y junto con las mitocondrias de la porción intermedia degeneran por lo que no contribuyen a la formación del embrión (Gaddum-Rosse, 1985).

El proceso de fusión puede ser dividido en tres eventos fundamentales: un primer contacto inicial de las dos membranas y reconocimiento mediado por uniones

proteína-proteína o carbohidrato-proteína; el segundo evento consiste en la fusión física de las membranas mediante interacciones lípido-proteína o proteína-proteína desembocando en un cambio conformacional irreversible; finalmente se reorganizan los lípidos aportados por las dos membranas formando una sola bicapa que engloba a las dos células (Jahn y Grubmuller, 2002).

La fusión de las membranas está regulada por proteínas presentes en las membranas de ambos gametos que en el caso del espermatozoide se encuentran distribuidas en el segmento ecuatorial. Entre las proteínas implicadas se encuentran las proteínas unidas a fosfatidil inositol (Coonrod, Naaby-Hansen *et al.*, 1999), fertilina espermática (Myles y Primakoff, 1997), integrinas de membrana de ambos gametos (Evans, 2009), tetraspaninas (Oren, Takahashi *et al.*, 1990; Seigneuret, Delaguillaumie *et al.*, 2001), proteínas de secreción ricas en cisteína (CRISP) (Vadnais, Foster *et al.*, 2008), proteína Izumo (Inoue, Ikawa *et al.*, 2005), enzima mSLLP1 (Herrero, Mandal *et al.*, 2005) y proteínas chaperonas (Ellerman, Myles *et al.*, 2006).

Cuando se produce la unión de las membranas el ovocito se activa (White, Pate *et al.*, 2010) liberándose Ca^{2+} de los depósitos citoplasmáticos a modo de ondas y se reanuda la meiosis hasta la metafase con la extrusión del segundo corpúsculo polar, se activa la reacción cortical en un intento de bloqueo de la polispermia (Tsaadon, Eliyahu *et al.*, 2006) y entran en singamia los pronúcleos masculino y femenino.

Posteriormente, los embriones libres de las células del cúmulo y rodeados aún por la ZP permanecen en el istmo durante varios días (3-4 días en la mayoría de las especies de mamíferos) y entran en el útero en forma de mórula o blastocisto. En las vacas y ovejas lo hacen 3 días después de la ovulación en estado de 8-16 células mientras que en la cerda lo hace a los 2 días contando sólo con 4 células (Hunter, 1980).

4.1.4.3. Bloqueo de la polispermia

Aún no se conocen los mecanismos exactos por los que se produce el bloqueo de la polispermia en mamíferos. La polispermia es el fenómeno por el cual varios espermatozoides llegan a penetrar a un mismo ovocito y el cigoto descendiente de carga genética anormal no es viable por lo que detendrá su desarrollo embrionario. La

polispermia no es frecuente en la fecundación *in vivo* pero sí es un problema que se presenta en la fecundación *in vitro* de algunas especies como por ejemplo la porcina (Hunter, 1991b; Coy y Romar, 2002; Hao, Mathialagan *et al.*, 2006).

Diferentes variables pueden provocar la polispermia entre las que nos encontramos el grado de madurez de los ovocitos, siendo de mayor incidencia en los ovocitos inmaduros y en los envejecidos. En ambos casos se ha relacionado con el momento de exocitosis de los gránulos corticales siendo insuficiente en los primeros y prematura en los segundos (Hunter, 1976; Hunter, 1991b; Ducibella y Buetow, 1994) aunque también se puede deber a características anormales de la ZP (Familiari, Nottola *et al.*, 1992; Keefe, Tran *et al.*, 1997).

A lo largo del transcurso de esta revisión bibliográfica hemos ido mencionando mecanismos mediante los cuales a partir de una cantidad enorme de espermatozoides depositados durante la cubrición de la hembra disminuye el número de los mismos de modo que cuando se inicia la fecundación nos encontramos que la proporción espermatozoide: ovocito puede encontrarse próxima a 1:1 (Hunter, 1993).

Estos mecanismos podrían considerarse como un modo de bloqueo de la polispermia dependiente del oviducto.

Otro mecanismo oviductal de bloqueo de la polispermia recientemente observado y previamente mencionado para la vaca y la cerda consiste en la modificación de la ZP del ovocito en el contacto con las secreciones oviductales. Este bloqueo se ve reflejado como una resistencia a la digestión proteolítica e implica a la OVGP1 y glicosaminoglicanos sulfatados del tipo de la heparina (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

En el bloqueo de la polispermia también se implican otras estructuras, el oolema y la zona pelúcida (dependiendo de la especie), que se modificarán como consecuencia de la interacción de gametos y la extrusión de los gránulos corticales.

El bloqueo de la polispermia a nivel de la membrana u oolema es muy diferente si el ovocito es o no de mamífero. En los animales no mamíferos el bloqueo implica una

despolarización rápida y transitoria de la membrana plasmática que ocurre en apenas unos segundos y que se ha denominado “bloqueo rápido” y que oscila desde segundos en el erizo de mar a varios minutos en los anuros (Jaffe y Cross, 1986). Esta despolarización rápida del oolema no se observa en ovocitos de mamíferos como coneja, ratona y hámster y el bloqueo de la membrana se establece en el mismo tiempo que el de la ZP siendo algo más lento, de 30-60 minutos (Miyazaki y Igusa, 1981; Igusa, Miyazaki *et al.*, 1983; Mcculloh, Rexroad *et al.*, 1983).

El bloqueo de la polispermia a nivel del oolema es muy controvertido (Wolf y Hamada, 1979; Horvath, Kellom *et al.*, 1993; Sengoku, Tamate *et al.*, 1995). El fenómeno por el cual el oolema participa en el bloqueo de la polispermia junto con la ZP en especies como la porcina no está claro aunque diferentes ensayos en algunas especies lo han evidenciado ya que se han incubado ovocitos carentes de ZP en un medio con el contenido de los GC y se observa un aumento en la tasa de monospermia (Hunter y Nichol, 1988; Hunter, 1990; Zuccotti, Yanagimachi *et al.*, 1991; Gardner y Evans, 2006). Por lo tanto el oolema de los embriones pierde capacidad para fusionar espermatozoides (Binor, Sokoloski *et al.*, 1982; McAvey, Wortzman *et al.*, 2002). Este bloqueo se ha asociado con la pérdida o enmascaramiento en el oolema del ovocito de factores de capacidad fusogénica con el espermatozoide (Zuccotti, Yanagimachi *et al.*, 1991; Blobel, Wolfsberg *et al.*, 1992; Horvath, Kellom *et al.*, 1993; Sengoku, Tamate *et al.*, 1995) o a variaciones en la composición lipídica de la membrana y por lo tanto de su fluidez (Wolf, 1978).

Otro modelo propone que los cambios producidos en el oolema están regulados por flujos intracelulares del ión Ca^{2+} (Gardner, Williams *et al.*, 2007).

En algunas especies estos dos mecanismos de bloqueo (oolema-ZP) parecen estar perfectamente acoplados de modo que en especies donde el bloqueo a nivel de la ZP no es muy efectivo aparece un fuerte bloqueo a nivel del oolema y viceversa. El primer caso se ha observado por ejemplo en ovocitos de conejo donde aparecen gran cantidad de espermatozoides en el espacio perivitelino (EPV) sin opción a fecundar al ovocito y por el contrario en ratona y oveja no aparecen espermatozoides en el EPV (Odor y Blandau, 1949; Austin, 1961; Hunter, Vajta *et al.*, 1998).

En la mujer existen datos contradictorios que por un lado afirman la inexistencia del bloqueo a nivel del oolema (Wolf, Ducot *et al.*, 1997) y por otro apuntan a la coexistencia de ambos mecanismos (Sengoku, Tamate *et al.*, 1995).

El bloqueo a nivel de la ZP se denomina también “bloqueo lento” y está relacionado con la exocitosis del contenido de los gránulos corticales (GC) al EPV tras la reacción cortical (Barros y Yanagimachi, 1971). Este bloqueo ha sido denominado “Reacción Zonal o de Zona” debido a que el contenido de los GC modifica las características fisicoquímicas de la ZP haciéndola refractaria a la entrada de espermatozoides adicionales (Braden, Austin *et al.*, 1954).

Los GC son gránulos de secreción rodeados de membrana con un diámetro de 0'2-0'6 μm sintetizados por el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático de modo continuo hasta la ovulación (Anderson, 1968). Durante el crecimiento y maduración ovocitaria estas vesículas migran desde el ooplasma hasta la región cortical aunque con diferencias entre especies y alguna excepción citoplasmática (Cran, 1985; Ducibella, Duffy *et al.*, 1994). Cuando el primer espermatozoide contacta con el oolema se libera Ca^{2+} de los depósitos citoplasmáticos a modo de ondas de Ca^{2+} que provocan entre otras la reacción cortical (White, Pate *et al.*, 2010). El contenido de las vesículas se vierte al EPV y ya no se resintetizan más (Wessel, Brooks *et al.*, 2001). La exocitosis de estas organelas es más o menos rápida dependiendo de la especie; en el erizo de mar se produce en segundos (Abbott y Ducibella, 2001), en el hámster en un minuto (Stewart-Savage y Bavister, 1991) y en el ratón hasta 1 hora (Tahara, Tasaka *et al.*, 1996).

El contenido de los gránulos corticales modifica la ZP pero se conoce muy poco acerca de los componentes y los mecanismos implicados. Los GCs de mamíferos poseen distintas enzimas como ovoperoxidasa (Gulyas y Schmell, 1980), enzimas tipo tripsina y proteinasas (Moller y Wassarman, 1989), N-acetilglucosaminidasa (Miller, Gong *et al.*, 1993), calreticulina (Muñoz-Gotera, Hernández-González *et al.*, 2001; Saavedra Leos, 2009), tPA (Rekkas, Besenfelder *et al.*, 2002) y varias proteínas de distinto peso molecular conocidas como p75, p62, p56 (Hoodbhoy, Dandekar *et al.*, 2001) y p32 (Gross, Wessel *et al.*, 2000).

En ovocitos de ratona activados con iónoforo de Ca^{2+} se libera en la reacción cortical una proteinasa que hidroliza la ZP2 a la forma ZP2f, evitando que espermatozoides reaccionados penetren el ovocito y provocando por lo tanto la reacción zonal (Moller y Wassarman, 1989). Actuales evidencias corroboran que esta hidrólisis es la responsable del bloqueo a la unión de espermatozoides adicionales (Gahlay, Gauthier *et al.*, 2010; Monné y Jovine, 2011). La mencionada fragmentación de ZP2 mediante una proteasa es la responsable del endurecimiento de la ZP en la envoltura vitelina en *Xenopus laevis* (Lindsay y Hedrick, 2004).

4.2. OVIDUCTO

Los oviductos, llamados también trompas de Falopio en la mujer, son un par de conductos más o menos enrollados según la especie que se extienden desde los ovarios hasta la porción más distal de los cuernos uterinos con los que se continúan. Son los encargados de transportar los ovocitos y los espermatozoides en direcciones opuestas (Bearden y Fuquay, 1997) y los embriones hacia el útero. Este fue en un principio el significado funcional que se les adjudicó, posteriormente se ha demostrado que la secreción de los mismos junto con otras características son fundamentales para la consecución de la interacción entre los gametos y el desarrollo embrionario temprano.

4.2.1. ANATOMÍA

Existe una íntima relación anatómica entre el ovario y el oviducto. En los mamíferos domésticos, el ovario se encuentra en una bolsa ovárica abierta, a diferencia de lo que ocurre en otras especies como rata y ratón, en las que se haya en un saco cerrado. En los mamíferos domésticos dicha bolsa consiste en un delgado pliegue peritoneal del mesosálpinx, que está unido a un asa suspendida en la porción superior del oviducto. En vaca y oveja, la bolsa ovárica es ancha y abierta, en cerdas está bien desarrollada y aunque está abierta encierra la mayor parte del ovario (Hafez, 2000).

El oviducto o trompa uterina es un conducto músculo-membranoso de gran movilidad de longitud variable dependiendo de la especie que se trate (16-18cm en la mujer, 28-30 cm en la cerda) que proporciona en los mamíferos el microambiente

adecuado para importantes procesos reproductivos como el transporte de los gametos, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Croxatto y Ortiz, 1975).

El oviducto está formado por cuatro porciones funcionales (Leese, 1988; Ménéz y Guérin, 1997), que desde el ovario hasta el útero son infundíbulo, ampolla, istmo y unión útero-tubárica.

El **infundíbulo** tiene forma de embudo y se encuentra abierto al peritoneo por el ostium tubárico. Se localiza cerca del ovario mostrando en su extremo prolongaciones llamadas fimbrias las cuales se encuentran libres excepto en un punto en el extremo superior del ovario lo que asegura una estrecha aproximación entre ellas y la superficie ovárica.

La **ampolla** es considerada la verdadera porción secretora, ocupa casi la mitad de la longitud del oviducto y se distingue del istmo por ser una zona más dilatada y menos muscular.

El **istmo** ocupa el tercio del oviducto próximo al útero y al final del mismo se encuentra la unión **útero-tubárica** o **porción intramural** en la mujer. La unión útero-tubárica presenta características morfológicas diferentes entre especies, por ejemplo en la cerda esta unión está bordeada por largas prolongaciones mucosas digitiformes y en la vaca y oveja se caracteriza por la formación de un pliegue, en especial durante el estro (Wrobel, Kujat *et al.*, 1993; Hafez., 2000).

4.2.1.1. Vascularización

La **vascularización** procede de ramas de las arterias ovárica y uterina y varía entre especies, individuos y situaciones hormonales. En la cerda una rama de la arteria ovárica irriga el infundíbulo, la ampolla y la porción más distal del istmo, mientras que la porción más proximal del istmo y la unión útero-tubárica está irrigada por una rama de la arteria uterina. En el caso de ratas, hámsters, cobayas y monos la arteria uterina irriga la mayor parte del oviducto (Ginther, 1974).

En la cerda el drenaje venoso va paralelo al arterial, lo que produce una transferencia a contra corriente de energía (calor) y hormonas (Hunter, Cook *et al.*, 1983), lo que puede explicar que existan concentraciones de hormonas más elevadas en el FO que en el plasma (Leese, 1988). Esto se ha visto también en la coneja, la ratona, en mujeres, la vaca y la oveja (Ginther, 1974; Bendz, 1977; Bendz, Hansson *et al.*, 1982). Este transporte contra-corriente es pasivo y la transferencia es del 100 % de calor, el 10 % de gases, el 1 % de sustancias grandes y un 12 % de hormonas en condiciones *in vivo* (Einer-Jensen y Hunter, 2005).

De este modo los lechos vasculares de ovario, oviducto y útero están controlados hormonalmente, no solo por los esteroides ováricos si no también por las prostaglandinas, redistribuyendo el flujo sanguíneo entre estos tres órganos en base a sus necesidades funcionales. Esta transferencia de información puede explicar la tendencia a la ovulación alternativa entre los dos ovarios en algunas especies y por lo tanto la selección contralateral (Hunter, Cook *et al.*, 1983; García-Pascual, Labadía *et al.*, 1996; Einer-Jensen y Hunter, 2005). Además las paredes de los vasos pueden presentar adaptaciones como un adelgazamiento selectivo de la arteria uterina humana en las zonas estrechamente relacionadas con la vena (Bendz, 1977).

El aporte sanguíneo al oviducto es importante por varios motivos. Por un lado, porque el FO está formado por algunos componentes procedentes del plasma y por otro, porque existen variaciones cíclicas paralelas entre aporte sanguíneo y secreción de fluido oviductal. La tasa de proliferación y actividad secretora de las células epiteliales oviductales es máxima bajo control estrogénico en la fase preovulatoria, fase en la que se incrementa el flujo de sangre hacia el oviducto (Perkins, 1974; Janson *et al.*, 1983; Abe y Oikawa, 1992; Kamwanja y Hansen, 1993).

El oviducto posee un intenso drenaje linfático cuyos vasos se expanden durante el estro coincidiendo con el incremento de volumen del FO (Leese, 1988), el cual también puede estar implicado en la transferencia local de hormonas esteroides. Además, algunos autores han señalado que los cambios cíclicos en el flujo sanguíneo pueden estar implicados también en el transporte de gametos y embriones. En líneas generales, la vasodilatación inducida por los estrógenos en la microvasculatura y

sistema linfático del oviducto permiten el transporte de los gametos, mientras que la vasoconstricción lo impide (García-Pascual, Labadía *et al.*, 1996).

En la coneja se ha observado que la vascularización distendida en el músculo liso del istmo y en su serosa adyacente provoca la constricción del lumen ístmico retardando el paso del gameto o embrión por la unión ampular ístmica. Del mismo modo, las venas centrales de las fimbrias en el momento de la ovulación pueden ayudar a la captura de los ovocitos y a transportarlos a la ampolla (Verco, Gannon *et al.*, 1984).

Por otra parte, se ha sugerido en el oviducto humano que la presencia de cojines arteriales dentro de los pliegues de la mucosa de la ampolla puede actuar como una bomba pulsátil arterial para el transporte de los ovocitos (García-Pascual, Labadía *et al.*, 1996).

Elevadas concentraciones de esteroides y prostaglandinas en la fase folicular pueden permitir cambios en la permeabilidad y actividad contráctil del istmo facilitando la fase periovulatoria de transporte de espermatozoides desde la porción caudal del oviducto a la zona de la fecundación (Hunter, Cook *et al.*, 1983).

En el oviducto existen dos isoformas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R), la forma completa funcional y la truncada inactiva. La presencia limitada de los receptores funcionales de tamaño completo en la capa epitelial oviductal (metaestro o luteal) indica una función específica durante el desarrollo embrionario temprano, mientras que las formas truncadas EGF-R (predominantes en diestro y proestro (folicular temprana y luteal temprana) pueden regular potencialmente las contracciones y el flujo sanguíneo en el oviducto (Steffl, Schweiger *et al.*, 2005).

4.2.1.2. Inervación

Los estudios del **sistema nervioso** en el oviducto se han centrado en la contractilidad de las capas musculares y su función ya que ayudan a denudar el ovocito, regulan su transporte, facilitan la fecundación incrementando el contacto entre gametos y también sirven para mezclar los diferentes componentes luminales y para la

regulación de la producción de FO (Rodríguez-Martínez, Einarsson *et al.*, 1982; Leese, 1988).

Las contracciones oviductales son complejas y de varios tipos: contracciones de tipo peristáltico que se originan en segmentos aislados y que recorren poca distancia; contracciones segmentarias y movimientos lumbricoides de todo el oviducto.

Las contracciones en sentido abovárico son más comunes que las adováricas y en general la ampolla es menos activa que el istmo. Las contracciones musculares del oviducto son estimuladas por contracciones de dos membranas importantes que contienen musculatura lisa y están unidas a fimbrias, ampolla y ovario: el mesosálpinx y la membrana mesotubárica superior y por terminaciones nerviosas del sistema nervioso simpático y parasimpático que están presentes en la pared oviductal (Hafez, 2000).

La adrenalina y la noradrenalina, neurotransmisores del sistema nervioso simpático, producen vasoconstricción por lo que disminuye el aporte sanguíneo al oviducto inhibiendo la formación de fluido oviductal (Jankovic, Protic *et al.*, 2004). Los neurotransmisores también pueden actuar directamente en el oviducto produciendo absorción (noradrenalina) y secreción (acetilcolina). La mayor concentración de los terminales adrenérgicos se encuentra en la unión ampular-ístmica, su número desciende hacia el útero, son pocos en la ampolla y la mayoría de ellos son vasomotores (Leese, 1988; García-Pascual, Labadía *et al.*, 1996).

La frecuencia y amplitud de las contracciones varían con la fase del ciclo estral de modo que en el periodo pre-ovulatorio el número de contracciones peristálticas y antiperistálticas son similares y suaves, durante la ovulación adquieren su máxima intensidad ejerciendo una especie de masaje a la superficie ovárica y posteriormente disminuyen e incluso desaparecen en el oviducto porcino para detener el transporte del ovocito en las inmediaciones de la unión ampular-ístmica. Los patrones de contracción son más regulares en las fases perio-ovulatorias que en la luteal (Wijayagunawardane, Miyamoto *et al.*, 2001).

4.2.2. HISTOLOGÍA

El tejido oviductal se encuentra formado por diferentes capas que desde el exterior hacia la luz del tubo son: serosa, muscular y mucosa.

La capa **serosa** es la más externa de todas ellas y está representada por el peritoneo que se continúa con el ligamento ancho.

La capa **muscular** está formada en la mayor parte de su longitud por dos capas, una capa circular interna y una capa longitudinal externa. El espesor de la musculatura aumenta desde el extremo ovárico del oviducto hacia el extremo uterino.

La **mucosa** se encuentra formada por un epitelio que forma pliegues ramificados, largos y numerosos en la ampolla que van disminuyendo progresivamente hacia el istmo. Esto determina que la luz ampular sea mínima y junto con el escaso contenido en fluidos permita al ovocito ovulado con su cúmulo ovífero estar en íntimo contacto con la mucosa ciliada. La luz del istmo es estrecha con pequeñas elevaciones no ramificadas (Yániz, Lopez-Gatius *et al.*, 2006; Desantis, Zizza *et al.*, 2011).

El revestimiento de la mucosa está formado por un epitelio cilíndrico simple formado fundamentalmente por dos tipos celulares: células ciliadas y células no ciliadas secretoras con alguna célula linfoide dispersa (Umezu y Tomooka, 2004; Yamanouchi, Umezu *et al.*, 2010), cuya distribución y características dependen de la sección oviductal en la que se encuentren.

Las células ciliadas tienen delgados cilios móviles denominados cinocilios que se extienden hacia la luz. Estas células pueden jugar un papel importante en el transporte de los ovocitos y embriones y posiblemente en la regulación de la progresión espermiática (Hunter, 1994; Abe y Hoshi, 2008). La rapidez con la que estos cilios se mueven depende de la concentración de hormonas ováricas siendo su actividad máxima durante la ovulación o justo después, de modo que los cilios de la zona de las fimbrias se mueven de modo sincronizado hacia el infundíbulo desplazando al ovocito recién ovulado hacia la región inicial del oviducto (Nutu, Weijdegård *et al.*, 2009). Este movimiento de los cilios, junto con las contracciones del oviducto, permiten el

desplazamiento de los ovocitos hasta la zona de la fecundación y el de los cigotos hasta el útero (Shi, Komatsu *et al.*, 2011). En la vaca se ha observado que la velocidad media de transporte de partículas en el oviducto bovino es de 133 $\mu\text{m}/\text{segundo}$ (Kölle, Dubielzig *et al.*, 2009).

Las contracciones musculares parecen no ser limitantes para el transporte del ovocito al lugar de la fecundación ya que por ejemplo en ratas, que carecen de capa muscular lisa en el infundíbulo, se demuestra que el transporte del ovocito ovulado se puede producir solamente con el batido ciliar (Halbert, Tam *et al.*, 1976; Halbert, Becker *et al.*, 1989) y en conejos con la musculatura lisa oviductal suprimida el transporte de los ovocitos al lugar de la fecundación se hace en su tiempo normal (Halbert, Tam *et al.*, 1976). En la mujer se ha observado que la frecuencia del movimiento ciliar es mayor en el infundíbulo y disminuye conforme nos desplazamos por el oviducto hasta el istmo (Yamaoka, 1987), siendo este batido mayor en la fase ovulatoria que en la luteal (Bylander, Nutu *et al.*, 2010).

A lo largo del oviducto varía la distribución de los dos tipos celulares siendo las células ciliadas las más abundantes en la zona de las fimbrias e infundíbulo. Su proporción disminuye en dirección hacia el istmo, aumentando las células secretoras donde estas últimas son las más abundantes. Esta distribución gradual tiene un papel funcional importante: las células ciliadas abundan en el lugar donde el ovocito es captado por la superficie oviductal mientras que las células secretoras abundan donde se requieren secreciones como medio para la interacción de ovocito y espermatozoide (Abe y Hoshi, 2008; Yamanouchi, Umezu *et al.*, 2010).

Las células no ciliadas secretoras presentan su superficie apical cubierta de numerosas microvellosidades. Son células que sintetizan proteínas de modo activo caracterizadas por contener gránulos de secreción de diferente naturaleza, tamaño y número dependiendo de la especie, segmento del oviducto, zona basal o apical de los pliegues y la fase del ciclo estral en la que nos encontremos (Abe, 1996; Yániz, Lopez-Gatius *et al.*, 2000; Yániz, Lopez-Gatius *et al.*, 2006; Abe y Hoshi, 2007; Desantis, Zizza *et al.*, 2011).

En general el ciclo estral produce cambios muy marcados en el epitelio de la fimbria y ampolla, siendo estos cambios escasos e incluso nulos en el istmo y la unión útero-tubárica (Abe, Onodera *et al.*, 1999; Tienthai, Sajjarengpong *et al.*, 2009).

Durante la fase luteal tardía se produce deciliación y atrofia disminuyendo el porcentaje de células ciliadas en la porción del infundíbulo y ampolla (Odor, Gaddum-Rosse *et al.*, 1980); mientras que en la fase folicular temprana se produce ciliogénesis y aumento de la altura celular ciliar que se hace más marcada en la fase folicular tardía y post ovulatoria temprana (Abe y Hoshi, 2008; Tienthai, Sajjarengpong *et al.*, 2009).

Las células secretoras que se localizan en el infundíbulo y ampolla sufren también transformaciones de modo que en la fase luteal las células del infundíbulo no poseen gránulos de secreción y en las de la ampolla disminuye su contenido (Odor, Gaddum-Rosse *et al.*, 1983); en la fase peri-ovulatoria aumentan la cantidad de gránulos de secreción produciendo un máximo de secreción en esta fase (Shirley y Reeder 1996; Abe y Hoshi, 2007).

La producción de las secreciones por el oviducto se encuentra regulada por hormonas ováricas que poseen un papel importante en la preparación de los gametos para la fecundación y en la nutrición y protección del embrión (Hunter, 1994; Abe, Sendai *et al.*, 1995a; Gandolfi, 1995).

Por lo tanto, la composición de la mucosa oviductal es un factor fundamental que se ve reflejado en la composición del microambiente oviductal, importante entre otros para la migración de los gametos, desplazamiento y desarrollo embrionario (Szulańczyk, 2009; Katarzyna, Wiesław *et al.*, 2010), siendo decisivo para la fertilidad.

Las diferencias no son solamente regionales, sino que también se pueden encontrar diferentes tipos de células ciliadas o secretoras (con características diferenciales entre ellas) dependiendo del segmento oviductal en el que se encuentren lo que sugiere que el epitelio de cada segmento está implicado en la producción de un microambiente distinto con una integridad bioquímica única relacionada con su funcionalidad, en cada etapa del ciclo estral (Abe, 1996; Desantis, Zizza *et al.*, 2011). Así por ejemplo se ha observado que el fluido oviductal bovino obtenido de diferentes

porciones oviductales y diferente fase del ciclo estral afecta de diferente modo a las tasas de unión y fecundación (Way, Schuler *et al.*, 1997). Además hay que tener muy en cuenta que la composición del FO puede ser modificada por la presencia de los gametos (Georgiou, Snijders *et al.*, 2007).

Toda esta variedad de situaciones y composición del epitelio oviductal nos infiere a reconocer que nos faltan muchos elementos en el cultivo *in vitro* de gametos y embriones para reproducir las condiciones que se producen *in vivo* y que son determinantes para el éxito de una buena maduración y fecundación *in vitro*, sobre todo en especies que presentan aún problemas en su fecundación en laboratorio, como es el caso de la especie porcina debido a la alta incidencia de polispermia. También sería útil conocer con más precisión la composición del FO para diagnosticar y tratar problemas de infertilidad (de causa desconocida) de diferentes orígenes en especies como la humana.

4.2.5. FISIOLÓGÍA

La mayoría de las funciones del oviducto han sido mencionadas en los apartados anteriores. En general, consisten en facilitar los procesos de transporte y maduración de los gametos, aportar el ambiente idóneo para la fecundación, encargarse de los aspectos metabólicos al principio del desarrollo embrionario y regular la migración del embrión hacia el útero (Hunter, 1980). Estas funciones se podrían resumir en:

- Transporte del ovocito desde el ovario hasta el punto de la fecundación
- Fase final del transporte de espermatozoides
- Fase final de maduración zonal
- Participación en la capacitación y RA
- Lugar donde ocurre la fecundación
- Regulación de la vida media y envejecimiento de los gametos
- Formación y secreción del FO.

Dada su importancia para el presente estudio, se desarrollará a continuación un apartado específico sobre el FO, incluyendo su formación, obtención, propiedades y funciones.

4.3. FLUIDO OVIDUCTAL

La luz del oviducto se encuentra ocupada por el fluido oviductal el cual es una mezcla compleja de diferentes componentes.

Fundamentalmente está compuesto por un trasudado selectivo del suero sanguíneo y secreciones específicas de las células oviductales. Además, existen otros aportes aumentando la complejidad de su composición: el contenido folicular que se libera en la ovulación y que va a parar al oviducto, el fluido del peritoneo en aquellas especies carentes de bolsa ovárica y el fluido uterino cuando existe reflujo a través de la unión útero-tubárica (Roberts, Parker *et al.*, 1975; Leese, 1988; Malayer, Hansen *et al.*, 1988; Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010). La proporción de cada uno de estos componentes depende del estadio del ciclo en el que se encuentre el animal (Leese, Hugentobler *et al.*, 2008).

La composición de la dieta materna puede influir en la composición del fluido oviductal y uterino, de modo que alguna carencia nutricional en estas etapas puede “programar” una enfermedad en el individuo adulto (Harding, 2001; Leese, Hugentobler *et al.*, 2008).

4.3.1. FORMACIÓN

La formación del FO se encuentra bajo control hormonal (Bishop, 1956; Mastroianni, Beer *et al.*, 1961). Las células ciliadas y no ciliadas secretoras del epitelio oviductal son muy sensibles a las variaciones de concentración de los esteroides en sangre (Murray, 1995). Los estrógenos producen hipertrofia, maduración e incremento de la altura de las células epiteliales no ciliadas secretoras y restablecen el fenotipo de las células ciliadas *in vitro* mientras que la progesterona causa atrofia y disminuye la actividad secretora (Comer, Leese *et al.*, 1998). Estos cambios en la morfología celular indican cambios en la actividad secretora y por lo tanto en la producción de FO.

Las hormonas esteroideas pueden modificar la tasa de secreción de fluido cambiando el movimiento de los iones a través del epitelio oviductal. En mujeres se ha observado que la principal fuerza motriz para la formación del FO es la secreción transepitelial de iones cloro (Cl^-) al oviducto y que el adenosín trifosfato (ATP) extracelular regula la formación (Dickens, Maguiness *et al.*, 1995; Dickens, Comer *et al.*, 1996).

Durante la secreción de FO el transporte selectivo de iones Cl^- hacia el lumen está influenciado por factores adrenérgicos como la adrenalina, la noradrenalina, isoproterenol y la fenilefrina (Leese, 1988; Leese, Tay *et al.*, 2001) y se inhibe con el AMPc y altas concentraciones de iones Ca^{2+} (Leese y Gray, 1985; Gott, Gray *et al.*, 1988) o con bloqueadores selectivos de los receptores β -adrenérgicos como el propanolol. En cultivos celulares monocapa se ha visto que la adrenalina favorece el transporte de iones Cl^- desde la zona basal a la apical y que el AMPc lo favorece en el sentido contrario favoreciendo la tasa de absorción (Dickens, Southgate *et al.*, 1993). En la vaca y en la oveja también se ha determinado que los receptores β -adrenérgicos se encuentran implicados en la producción del FO ya que estos receptores responden a la progesterona sintetizando AMPc el cual aumenta en la fase luteal e inhibe por tanto la producción de FO (Einspanier, Gabler *et al.*, 1999).

4.3.1. OBTENCIÓN

El análisis del fluido de los diferentes microambientes oviductales es importante para el desarrollo de nuevos medios de maduración de gametos, cultivo y transferencia embrionaria, por lo que los métodos usados para la recogida y mantenimiento del FO previo a los análisis son determinantes (Velazquez, Parrilla *et al.*, 2010). Por un lado, las muestras lógicamente no deben de ser contaminadas con agentes extraños, patógenos o no, y tampoco se deben de alterar las propiedades intrínsecas del fluido a analizar tales como el pH, temperatura, cantidad de oxígeno, anhídrido carbónico (CO_2), etc.

Los métodos de recogida de muestras se han desarrollado tanto *in vivo*, en animales anestesiados (mona, coneja, cerda, vaca, yegua), como tras el sacrificio de los animales en matadero (cerda, vaca, oveja, cabra).

Entre los métodos de recogida de muestras *in vivo* encontramos la canulación y la perfusión vascular y en cuanto a la recogida de fluido de animales sacrificados o animales vivos pero manipulados con técnicas quirúrgicas tenemos el cultivo de células epiteliales oviductales (CEO), lavado, capilaridad y la aspiración.

La **canulación** consiste fundamentalmente en ligar una porción del oviducto cercana al útero y colocar y mantener una cánula normalmente en el extremo ovárico del oviducto de modo permanente en el animal para la recolección del FO durante días e incluso durante varios ciclos estrales (Mastroianni, Beer *et al.*, 1961; Carlson, Black *et al.*, 1970). El método ha variado dependiendo de los requerimientos de los investigadores y se han usado por ejemplo: la canulación dual (ampolla e istmo) del oviducto (Yoshinaga, Mahoney *et al.*, 1971), exteriorización de la cánula a través del útero y la vagina, ligadura de la unión ampular-ístmica (Bergqvist, Killian *et al.*, 2005) o de la unión útero-tubárica (Bergqvist y Rodríguez-Martínez, 2006). Algunos autores afirman que mediante este método el FO recogido puede estar alterado debido a posibles reacciones inflamatorias producidas como reacción del animal a la canulación pudiendo producirse contaminaciones del fluido producido. También se pueden producir obstrucciones en la cánula en el interior de la cavidad peritoneal que pueden dar falsos datos de volumen y concentración y al faltarle refrigeración pueden perderse algunos de sus componentes que ya no podrán ser cuantificados o serán cuantificados de forma errónea (Leese, Hugentobler *et al.*, 2008). Por ello se aconseja la canulación acotada o en un intervalo de tiempo (Hugentobler, Diskin *et al.*, 2007; Gonçalves, Staros *et al.*, 2008; Hugentobler, Humpherson *et al.*, 2008).

Mediante la canulación se ha obtenido FO de diferentes especies, entre las cuales encontramos a la **coneja** (Bishop, 1956), la **mujer** (Lippes, Enders *et al.*, 1972), la **mona** (Yoshinaga, Mahoney *et al.*, 1971), la **cerda** (Iritani, Sato *et al.*, 1974), la **vaca** (Carlson, Black *et al.*, 1970; Stanke, Deyoung *et al.*, 1973; Kavanaugh y Killian, 1988; Killian, Chapman *et al.*, 1989; Gerena y Killian, 1990; Bergqvist, Yokoo *et al.*, 2005; Bergqvist y Rodríguez-Martínez, 2006; Gonçalves, Staros *et al.*, 2008; Leese, Hugentobler *et al.*, 2008; Souza, Moura *et al.*, 2008; Velazquez, Parrilla *et al.*, 2010; McNutt y Killian 1991), la **oveja** (Black, Duby *et al.*, 1963; Perkins, Goode *et al.*, 1965; Belve y McDonald, 1968; Iritani, Gomes *et al.*, 1969) y la **yegua** (Engle, Witherspoon *et al.*, 1970; Willis, Sekhar *et al.*, 1994).

Esta técnica precisa de un laboratorio preparado para anestesia e intervenciones quirúrgicas y/o laparotomías.

La **perfusión vascular** fue ideada por Leese y Gray (Leese y Gray, 1985) y consiste en la incorporación de sustancias en la arteria ovárica y después de un tiempo se drena el contenido de la arteria uterina y se recoge el FO mediante una cánula colocada en el lumen oviductal. En ensayos en los que se ha usado este método se observa la respuesta del oviducto a la aplicación de diferentes sustancias (aminoácidos (AA), sustratos energéticos, etc.) a través de la vascularización oviductal, que como ya hemos mencionado influye en la secreción y composición del FO. Esta técnica se ha usado en **conejas** (Leese, 1983; Leese y Gray, 1985; Gott, Gray *et al.*, 1988; Dickens, Maguiness *et al.*, 1995) y **en humanos** (Dickens, Maguiness *et al.*, 1995; Tay, Rutherford *et al.*, 1997). Esta técnica es considerada como la más ética y menos molesta para la obtención de FO *in vivo* de humanos (Leese, Hugentobler *et al.*, 2008).

Un método muy usado para la obtención de secreciones oviductales y para posibilitar el estudio de la composición de las mismas ha sido el **cultivo de células epiteliales oviductales (CEO) *in vitro*** a partir de fracciones de oviducto procedentes fundamentalmente de animales sacrificados en matadero. Este método se ha usado con diferentes especies como **coneja** (Hyde y Black, 1986; Erickson-Lawrence, Turner *et al.*, 1989), **babuina** (Fazleabas y Verhage, 1986; Verhage y Fazleabas, 1988; Verhage, Fazleabas *et al.*, 1997a), **mujer** (Verhage, Fazleabas *et al.*, 1988), **cerda** (Buhi, Vallet *et al.*, 1989; Buhi, Alvarez *et al.*, 1990), **vaca** (Wegner y Killian, 1992; Anderson y Killian, 1994; Ijaz, Lambert *et al.*, 1994; Van Langendonck, Vansteenbrugge *et al.*, 1995) y **oveja** (Gandolfi y Moor, 1987; Gandolfi, Brevini *et al.*, 1989b).

Los cultivos de CEO se han usado para analizar las proteínas encontradas en el FO en las diferentes fases del ciclo estral, la movilidad del espermatozoide y capacitación en diferentes porciones oviductales y diferentes fases del ciclo, efecto en el desarrollo embrionario y efecto de la progesterona y estrógenos en la síntesis del FO.

Otros estudios con cultivo de CEO se han basado en observar las relaciones con los gametos o embriones (Carney, Tobback *et al.*, 1990; Ellington, 1993; Gabler, Oda

et al., 2008), como por ejemplo el estudio de las interacciones espermatozoide-oviducto (Ellington, Evenson *et al.*, 1999; Ellington, Samper *et al.*, 1999; Rottmayer, Ulbrich *et al.*, 2006; Mugnier, Kervella *et al.*, 2009) y la recreación de condiciones *in vitro* más aproximadas al proceso de fecundación *in vivo* (Romar, Coy *et al.*, 2001; Romar, Coy *et al.*, 2005).

Una técnica compleja basada en el cultivo de CEO es el cultivo primario de células oviductales como una monocapa polarizada permitiendo el estudio del movimiento de electrolitos y componentes energéticos a través del epitelio oviductal y la respuesta del mismo a determinadas hormonas (Dickens, Southgate *et al.*, 1993; revisado por Leese, Tay *et al.*, 2001). La ventaja fundamental de esta técnica es su bajo coste, ya que no necesita de la manipulación ni mantenimiento de modelos animales y el medio de cultivo es un medio definido por lo que se pueden analizar los componentes sintetizados y secretados por las células oviductales bajo las condiciones deseadas (Killian, 2011).

Los cultivos de células epiteliales oviductales no son una fuente permanente de células oviductales y de FO debido a que después de varios pasajes (el número de ellos depende de la especie) se altera la morfología, actividad y crecimiento de estas células (Ouhibi, Ménézo *et al.*, 1989).

Mediante el **lavado** se consigue una muestra diluida del FO. Consiste en colocar un catéter en la unión útero-tubárica e introducir presionando con la ayuda de una jeringa en la zona del infundíbulo una solución de modo que salga progresivamente todo el contenido por el catéter donde se recoge la mezcla (Buhi, Alvarez *et al.*, 1990; Abe, Numazawa *et al.*, 1993; Kumaresan, Ansari *et al.*, 2006). Estudios de microscopía electrónica demuestran que la presión ejercida por la solución de lavado daña el epitelio oviductal y provoca la aparición de restos celulares y sanguíneos en la mezcla obtenida, los cuales se pueden eliminar con un leve centrifugado (Einspanier, Gabler *et al.*, 1999).

En cuanto a la **capilaridad**, durante el desarrollo de esta tesis y como resultado de las visitas del doctor RHF Hunter, nuestro departamento ha sido partícipe de este método de obtención de FO en cerdas anestesiadas mediante pipeta de vidrio con punta roma. La pipeta se introduce en la porción deseada del oviducto tras una pequeña

incisión lo más limpia posible (excepto la muestra recogida de la ampolla que se recoge por la introducción de la pipeta por el ostium tubárico) y al introducir la pipeta el FO entra en ella por capilaridad. La mayor ventaja de este método es que el FO se recoge directamente de su microambiente sin usar medios de dilución y evitando que la muestra posea restos celulares ya que mediante este método se rechazan las muestras contaminadas con restos sanguíneos (Nichol, Hunter *et al.*, 1992).

La **aspiración** requiere la disección previa del oviducto eliminando restos de otros tejidos y sangre. Se basa en la succión del contenido oviductal mediante diferentes métodos. Es de mencionar el laborioso trabajo realizado en la obtención de fluido mediante este método en ratonas (Roblero, Biggers *et al.*, 1976; Borland, Hazra *et al.*, 1977; Gardner y Leese, 1990). Estos últimos, Gardner y Leese, (1990) aspiraron FO de la ampolla del oviducto de ratonas usando un capilar unido a una jeringa y obtuvieron cantidades de fluido de unos 20 nl por ampolla.

Otros métodos basados en el mismo fundamento han sido desarrollados para animales de mayor talla sacrificados en matadero, en los cuales el FO se recoge mediante aspiración con pipeteadores directamente del lumen oviductal. Esta técnica debe tener en cuenta que el tiempo transcurrido y el mantenimiento del material desde el sacrificio hasta la obtención del FO es importantísimo para evitar fenómenos de degeneración y proteolisis. Al igual que la capilaridad posee la ventaja de que el FO se recoge directamente de su microambiente sin usar medios de dilución añadiendo la ausencia de malestar animal. El mayor volumen recogido mediante este método en cerdas y vacas se obtiene en la fase folicular tardía ($50.7 \pm 1.3 \mu\text{l}/\text{oviducto}$) (Carrasco, Romar *et al.*, 2008). Tras la recolección del FO mediante este método también se precisa de una centrifugación leve para la eliminación de los restos celulares y sanguíneos (Roblero, Biggers *et al.*, 1976; Borland y Biggers *et al.*, 1980; Elhassan, Wu *et al.*, 2001; Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Algunos autores han usado varios de los métodos mencionados anteriormente como por ejemplo Roberts, *et al.* 1975 (Roberts, *et al.*, 1975) que han usado las técnicas de canulación y lavado.

Los métodos de recogida de FO que implican el uso de animales post-mortem (lavado y aspiración) pueden presentar variaciones en sus constituyentes debido a la hipoxia que conduce a la muerte celular y a la lisis o rotura. Estas muestras tienen el riesgo de generar artefactos en los resultados debido a la salida al medio extracelular del contenido celular. En nuestro caso, las células que sintetizan proteínas liberan los AA que contienen. Estas técnicas se han usado para la recogida de fluido destinado a cuantificar entre otras cosas, cantidad de AA y se ha observado que sus resultados han sido bastante elevados comparados con los obtenidos mediante otros métodos como la canulación (Leese, Hugentobler *et al.*, 2008).

4.3.3. PROPIEDADES FÍSICAS

El fluido oviductal se encuentra en un continuo cambio de volumen, temperatura, viscosidad y concentración de sus componentes. Estas variaciones incluyen o implican a electrolitos, carbohidratos, AA, mucosustancias, proteínas, ácidos nucleicos, esteroides y hormonas (Beier, 1974; Gerena y Killian, 1990).

4.3.3.1. Tasa de secreción y volumen

Ambos parámetros, tasa de secreción y volumen son dependientes de estrógenos secretándose activamente en la fase estral del ciclo con un máximo en la ovulación y disminuyendo con el predominio de la progesterona en la fase luteal (Perkins, Goode *et al.*, 1965; Carrasco, Romar *et al.*, 2008).

La tasa de secreción o velocidad de formación del FO ha sido analizada mediante diferente metodología en varios modelos animales y los resultados varían entre especies y dentro de una misma especie, lo que posiblemente se encuentre relacionado con el método de obtención y las diferencias inter-individuales.

En la **coneja** canulada en estro se forman 0'79 ml/24horas (Bishop, 1956). En coneja canulada en las inmediaciones de la ampolla oviductal, se observó que el FO aparece en el lumen a un ritmo constante de $16'8 \pm 0'64 \mu\text{l/h}$ (Leese y Gray, 1985). En conejas pseudo-preñadas bajo el predominio de estrógenos se obtuvieron entre 2'6-0'9 ml y en el predominio de progesterona entre 0'2-1'0 ml.

En **mujeres** en fase folicular la tasa media de aparición fue de 48 μ l/h (Dickens, Maguiness *et al.*, 1995).

En la **cerda** se ha observado un máximo de secreción en la fase folicular tardía (50'7 μ l de FO/ oviducto), siendo esta etapa del ciclo estral la que menor concentración de proteínas presenta por volumen de FO analizado (39'5 μ g/ μ l de FO) (Carrasco, Romar *et al.*, 2008).

En **vacas** el máximo de secreción fue de 1'9 ml/24horas (Roberts, Parker *et al.*, 1975).

En la **oveja** el máximo de producción en el momento de la ovulación fue de 1'3 ml/ 24 horas (Perkins, Goode *et al.*, 1965). La tasa de secreción obtenida al comienzo del estro fue de 0'8 ml/24 horas y en la fase luteal de 0'3 ml/ 24 horas (Iritani, Gomes *et al.*, 1969).

En general se puede afirmar que los volúmenes del FO en la **cerda** (Iritani, Sato *et al.*, 1974), en la **vaca** (Carlson, Black *et al.*, 1970), en la **oveja** (Black, Duby *et al.*, 1963) y en la **yegua** (Engle y Foley, 1975) oscilan de 0'5 a 7'0 ml. Además el volumen de FO obtenido varia dependiendo de la porción oviductal en la misma fase del ciclo estral, obteniéndose mayores cantidades de la ampolla que del istmo (Belve y Mcdonald, 1968; Kavanaugh y Killian, 1988; Killian, 2011).

4.3.3.2. Temperatura

En cerdas en celo antes de la ovulación el istmo distal se encuentra una media de 0'7 °C mas frío que la ampolla proximal en animales que se han apareado. En animales no apareados la diferencia de temperatura es de 0'43 °C, mientras que en animales ovulados el gradiente se reduce a solo 0'1 °C (Hunter y Nichol, 1986). Estas diferencias de temperatura en la fase preovulatoria pueden estar relacionadas con la actividad vascular y linfática del oviducto y con los microambientes químicos específicos, pudiendo permitir periodos relativamente largos de almacenamiento espermático en el reservorio oviductal. Puede ser significativo que tanto los gametos masculinos como los

femeninos estén expuestos a temperatura reducida en las horas previas a la fase final del transporte de gametos (Hunter y Nichol, 1986; Hunter, 2002; Hunter, 2005).

En la bibliografía se ha descrito también un gradiente de temperatura en el oviducto de conejo (Hunter, 2002).

4.3.3.3. Viscosidad

La porción viscosa del FO se puede observar fácilmente tras el almacenaje de las muestras debido a la precipitación de la porción mucosa (Roberts, Parker *et al.*, 1975).

Mediciones de este parámetro han ofrecido resultados similares en el FO y en el suero de 1'8 mPa/sec. (Ménézo y Guérin, 1997).

En la etapa preovulatoria se secretan y acumulan glicoproteínas viscosas en el istmo caudal oviductal y forman una especie de tapón mucoso (Hunter, 1998). Es importante que esta secreción se forme en el reservorio espermático preovulatorio aunque con una primera función física de evitar el paso de la mayoría del plasma seminal tras la cópula, evitar el paso del fluido uterino al reservorio espermático, evitar la entrada de partículas extrañas o antígenos al lugar de la fecundación, disminuir el movimiento flagelar o aislar físicamente a los espermatozoides con la movilidad suprimida antes de la ovulación (Hunter, 2002). La viscosidad del contenido oviductal no se restringe al istmo si no que existe en todo él como consecuencia de la secreción glicoproteica del epitelio oviductal. Esta secreción es distinta dependiendo de la porción oviductal formando diferentes microambientes y está bajo el control hormonal disminuyendo marcadamente en cantidad y viscosidad en el intervalo post-ovulatorio en respuesta a los niveles de progesterona. Hunter (Hunter, 1972) disminuyó el contenido y viscosidad del FO del istmo de cerdas mediante una aplicación local de progesterona lo que provocó la una alta incidencia de fecundaciones polispérmicas. Esto indica que existe disminución en el contenido y una posible selección espermática gracias a la viscosidad del medio aunque conocemos que están implicados otros factores.

La viscosidad de los fluidos oviductales responde a variaciones cíclicas de temperatura, que como hemos mencionado anteriormente existen en el oviducto cerca

del momento de la ovulación. El gradiente de temperatura preovulatorio provoca un gradiente de viscosidad lo que influye en el patrón y resistencia de la actividad flagelar y en la tasa de movimiento rectilíneo progresivo del espermatozoide (Hunter, 2002; Hunter, 2005; Hunter, Coy *et al.*, 2011). En la zona de la ampolla oviductal, el contenido se hace más complejo tras la ovulación incorporándose al mismo fluidos foliculares y peritoneales. Acompañando a estos fluidos nos encontraremos con la matriz despolimerizada de las células del cúmulo que es muy viscosa (Hunter, Coy *et al.*, 2011).

4.3.4. PROPIEDADES QUÍMICAS.

4.3.4.1. pH

El valor de este parámetro depende de las fluctuaciones oviductales de bicarbonato que están influenciadas a su vez por las hormonas esteroides. De modo general, el pH del moco cervical es básico, con un valor de 8´4 y el del fluido oviductal es de 7´1 a 7´3 en la fase folicular y de 7´5 a 7´8 en la fase luteal (Hafez, 2000).

El pH del FO ha sido medido en diferentes especies y suele ser similar entre ellas ya que existe un fuerte sistema bicarbonato/CO₂/anhidrasa carbónica que desemboca en un pH ligeramente alcalino (Ménézo y Guérin, 1997).

En general el pH es prácticamente neutro en la fase folicular y se alcaliniza en la ovulación y fase luteal.

En **coneja** en estro el pH es de 7´5 (Hunter, 1988), en **cerdo** en la misma fase es de 7´9 y justo antes de la ovulación se eleva a 8´1 unidades (datos no publicados, Hunter). En la **mona rhesus** el pH en la fase folicular varía entre 7´1-7´3 y sube súbitamente a 7´5-8´0 en la ovulación y fase luteal y en **ovejas** se ha observado que el pH no varía a lo largo del ciclo estral manteniéndose en un valor de 7´4 ± 0´4 (Iritani, Gomes *et al.*, 1969).

4.3.4.2. Osmolaridad

Ménézo y Guérin, (1997) han afirmado que la osmolaridad en el FO es aproximadamente de 290 mOsm/Kg independientemente de la especie, siendo similar al suero y que dicho valor no se ve modificado por variaciones hormonales.

Otros estudios reflejan diferentes rangos para este parámetro. Por ejemplo, en la **coneja** en estro oscila entre 302-310 mOsm/litro (Stambaugh *et al.*, 1969) y en estado de pseudopreñez entre 270-320 mOsm (Oliphant, Bowling *et al.*, 1978). En la **cerda** se ha visto que durante el estro la osmolaridad es menor que en la fase luteal (Killian, Chapman *et al.*, 1989), siendo en los días 3 y 5 tras el estro de 318 y 321 mOsm respectivamente (Li, Whitworth *et al.*, 2007). Mediciones indirectas en el FO de **ratón** le otorgan valores más altos, 310mOs/Kg cuando el oviducto tiene cigotos y 360mOs/Kg cuando posee embriones de 2 células (Collins y Baltz 1999); estos autores afirman que los valores de osmolaridad en la **mujer** son similares a los analizados en ratón, teniendo en cuenta los datos de concentración de iones descritos anteriormente por Borland, Biggers *et al.* 1980 (Borland, Biggers *et al.*, 1980).

4.3.4.3. Tensión de oxígeno

Ménézo y Guérin, (1997) han afirmado que en el FO la tensión de O₂ es de 60 mmHg (menos de la mitad del O₂ atmosférico), independientemente de la especie. Sin embargo, otros autores en diferentes especies (mono, hámster y coneja) indican que la concentración de O₂ en el FO es aproximadamente el 5 % (35 mmHg) (Fischer y Bavister, 1993).

4.3.5. COMPOSICIÓN

Un importante dato con respecto al fluido oviductal son los componentes que lo forman lo que nos permite acercarnos de un modo cada vez más preciso a los factores implicados en el proceso de la fecundación. Es importante conocer el contenido oviductal y es importante dotar de función cada uno de sus componentes, colocando en el lugar que corresponda a cada pieza del puzzle. De este modo podremos reproducir los

eventos más fundamentales en el laboratorio para mejorar las técnicas de reproducción asistida en la especie que se necesite en cada caso.

4.3.5.1. Agua y electrolitos

El componente mayoritario del FO es el agua y se considera que el epitelio oviductal no la transporta activamente sino que fluye en función de los gradientes osmóticos. Los electrolitos oviductales proceden de la sangre, son los responsables primarios del pH y de la osmolaridad del FO aunque algunos iones pueden tener además funciones específicas siendo muy importantes en la capacitación espermática, movilidad espermática, RA y fecundación (Leese y Gray, 1985; Leese, 1988; Grippo, Henault *et al.*, 1992).

Aunque pueden existir diferencias entre especies en algún ión de forma concreta, de modo general se puede afirmar que los niveles de potasio (K^+) son significativamente mayores que en plasma, el sodio (Na^+), magnesio (Mg^{2+}) y cloro (Cl^-) son similares en ambos compartimentos y el calcio (Ca^{2+}) puede encontrarse en similares o menores concentraciones que los presentados en plasma (Borland y Biggers *et al.*, 1980; Ménéz y Guérin, 1997).

En la cerda los iones Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} se encuentran en mayor concentración que el Mg^{2+} y fósforo (P) (Iritani, Sato *et al.*, 1974).

El fluido de la trompa de Falopio de mujer (en menometrorragia) se caracteriza por niveles de K^+ y Cl^- mayores, niveles de Na^+ y Mg^{2+} similares y niveles de Ca^{2+} menores a los del plasma. Los niveles encontrados de azufre (S) fueron 12'3 mM y de P 8'69 mM (Borland, Biggers *et al.*, 1980). Los niveles observados para estos iones en la mujer son similares a los obtenidos en FO (con embriones) de ratona de la ampolla e istmo (Roblero, Biggers *et al.*, 1976) y en diferentes fases (Borland, Hazra *et al.*, 1977).

Algunas funciones de los iones se indican a continuación:

Como hemos mencionado existe una elevada concentración del ión K^+ respecto al plasma, lo que puede estar implicado en la inhibición del movimiento de los

espermatozoides en el reservorio espermático del istmo de coneja, la cual es revertida con piruvato (Burkman, Overstreet *et al.*, 1984). En el semen de carnero se ha observado que altas concentraciones de K^+ paralizan el consumo de oxígeno y la glicolisis (Murdoch y White, 1971). Por otro lado la concentración elevada de K^+ (aproximadamente 50 mM) mejora la división embrionaria y la implantación del cigoto en ratón (Quinn, Kerin *et al.*, 1985; Roblero y Riffo, 1986) y en humanos (Quinn, Kerin *et al.*, 1985; Roblero y Riffo, 1986).

Otro ión que encontramos es el Na^+ , cuyos niveles son importantes para la nutrición del embrión ya que una pequeña variación en el contenido de este ión de la ampolla al istmo oviductal de ratona es suficiente para influir sobre los embriones tempranos que realicen la captación de AA (Van Winkle, Campione *et al.*, 1985).

En estudios realizados en los FOs de conejas, animales de granja y primates se ha observado que el catión mayoritario es el Na^+ y el principal anión el Cl^- . El transporte de Na^+ entre la mucosa y serosa del oviducto es bidireccional y en las mismas proporciones, mientras que para el Cl^- se produce un transporte unidireccional de iones hacia la mucosa oviductal. Esa secreción transepitelial de iones Cl^- en dirección al oviducto es la principal fuerza motriz para la formación del FO en humanos (Dickens, Comer *et al.*, 1996). Además, este ión ha sido descrito como esencial para el proceso de capacitación espermática y el proceso de fosforilación de tirosina asociado (Wertheimer, Salicioni *et al.*, 2008).

Por otro lado aunque la cantidad del ión Mg^{2+} de modo general es similar al del plasma, la cantidad de este ión en el FO bovino es menor que en plasma y varía durante el ciclo estral aunque sin mostrar variaciones entre regiones oviductales. Una diferencia importante en referencia a este ión lo marca la yegua que posee una concentración hasta 5 veces mayor en el FO que en el plasma (Campbell, Douglas *et al.*, 1979).

Otro ión que se encuentra en el FO de modo general en cantidades similares o en menores que en el plasma es el Ca^{2+} , aunque el contenido de este ión aumenta después de la ovulación en el FO de oveja, mona rhesus y mujer (Gott, Gray *et al.*, 1988). En la vaca, durante el estro y la ovulación, su concentración es significativamente mayor en el istmo que en la ampolla. Este ión también ha sido implicado en la unión de proteínas

oviductales a la superficie espermática y en la movilidad del espermatozoide (Grippe, Henault *et al.*, 1992; Lapointe y Sirard, 1996); además se ha visto que es necesario para la unión del espermatozoide de ratón a la zona pelúcida (Saling, Storey *et al.*, 1978).

Finalmente, los Iones bicarbonato (HCO_3^-), en las concentraciones encontradas en el FO estimulan la respiración (Hamner y Williams, 1964), el movimiento de hiperactivación y la RA en espermatozoides (Boatman y Robbins, 1991), además de promover la dispersión de las células de la corona radiada y proporcionar un entorno favorable para el desarrollo embrionario (Stambaugh, Noriega *et al.*, 1969; Maas, Storey *et al.*, 1977). En la mona rhesus las concentraciones de iones bicarbonato fueron 35 mM y 90 mM en las fases folicular y luteal respectivamente, siendo en ambos casos, superiores a los del plasma.

Las diferencias observadas en la concentración de electrolitos entre especies se han podido deber al diferente método de recolección del fluido (Hunter, 1988).

4.3.5.2. Componentes energéticos

El FO contiene entre otros glucosa, lactato, piruvato, glutamato, glucógeno y AA, posiblemente involucrados en el soporte metabólico de los gametos y/o embriones (Leese y Gray, 1985). Los principales sustratos energéticos han sido considerados la glucosa y el piruvato (Brewis, Winston *et al.*, 1992).

En el FO se ha observado que el contenido en glucosa oscila entre 1-3 mM siendo menor que su contenido en suero, de 5 a 6 mM (Ménézo y Guérin, 1997), siendo en la fase post-ovulatoria en la región ampular y ampular-ístmica de 0'5 y 1'3 mM respectivamente (Leese, Hugentobler *et al.*, 2008).

Por el contrario, el contenido en lactato es mayor que en el suero debido al metabolismo de la glucosa del propio oviducto. Se ha estimado que el 75 % del lactato presente en el oviducto es producido por las células epiteliales a partir de la glucosa vascular y el 25 % procede del lactato vascular (Leese, 1988; Ménézo y Guérin, 1997; Nichol, Hunter *et al.*, 1998).

Observando diferentes especies de un modo más detallado se pueden encontrar pequeñas variaciones. En la **coneja** se ha visto que la glucosa, lactato y piruvato oviductales proceden de la sangre y se encuentran por debajo de los niveles plasmáticos por lo que el transporte hacia el oviducto se realiza mediante difusión facilitada. La concentración de estos tres nutrientes es mayor en la ampolla que en el istmo (Leese, 1983) y disminuye tras la ovulación aunque los niveles de piruvato son mayores en las cercanías de los CCOs debido a que este es sintetizado por las células del cúmulo (Gardner y Leese, 1990).

En la **ratona** en estro los datos de glucosa, piruvato y lactato se han medido en FO procedente de la ampolla que se ha recogido junto con ovocitos con y sin células del cúmulo y aunque los datos concretos entre autores no son coincidentes para todos los parámetros, se observa en todos ellos que la concentración de glucosa es mayor en el FO con ovocitos sin células del cúmulo y el piruvato es mayor cuando están presentes las células del cúmulo. El lactato se muestra similar en ambos casos. También aparecen otros componentes metabólicos como glutamina y glutamato (Gardner y Leese, 1990; Harris, Gopichandran *et al.*, 2005).

En el caso del fluido de las trompas de Falopio de la **mujer** obtenido mediante inyección vascular contiene glucosa, lactato y piruvato cuyas concentraciones son en la fase folicular 3'11, 4'87 y 0'25 mM respectivamente, mientras que en la ovulación fueron 0'5, 10'5 y 0'32 mM respectivamente (Dickens, Maguiness *et al.*, 1995; Gardner, Lane *et al.*, 1996; Leese, 1998). Estos datos coinciden además con datos en coneja y en cerda en los que se produce una bajada de glucosa tras la ovulación cuando el embrión debe entrar al útero por lo que la glucosa ya no es necesaria en el oviducto (Nichol, Hunter *et al.*, 1992; Edwards y Leese 1993; Leese, Hugentobler *et al.*, 2008).

En la **cerda** también nos encontramos con valores de glucosa menores y de lactato mayores que en plasma. La concentración de glucosa no varía significativamente entre las regiones ampollar-ístmica aunque la concentración sí es significativamente mayor en la fase preovulatoria que tras el apareamiento o en la fase luteal. El contenido de lactato en la región de la ampolla en la fase preovulatoria no mostró diferencias con respecto a la fase post-ovulatoria. Los valores de piruvato en esta especie fueron

similares a los del plasma, siendo además similar en todas las porciones oviductales y fases del ciclo estral (Nichol, Hunter *et al.*, 1992).

Las concentraciones de estos componentes son independientes de la presencia o no de embriones, de la realización de ovariectomías tanto en el ovario contralateral como en el ipsilateral por lo que aparentemente la concentración de los mismos está regulada por mecanismos sistémicos (Nichol, Hunter *et al.*, 1998).

En la **vaca** también nos encontramos con que el contenido en glucosa y piruvato del FO son menores que en el plasma y que el contenido de lactato es mayor (incluso hasta ocho veces más que en plasma), valores que se mantienen estables a lo largo del ciclo (Hugentobler, Humpherson *et al.*, 2008). Sin embargo, en la **oveja** el contenido de glucosa es mayor en la fase estral del ciclo y el de lactato mayor en la fase luteal (Iritani, Gomes *et al.*, 1969).

4.3.5.3. Lípidos

En el oviducto el contenido en lípidos es bajo pero se encuentran presentes todos los tipos: **fosfolípidos**, **triglicéridos**, **colesterol libre** y **esterificado**.

Los transportadores de lípidos en el FO son mayoritariamente **lipoproteínas de alta densidad** (LDH), que en la fase folicular podrían participar en la capacitación espermática en el istmo (Ehrenwald, Foote *et al.*, 1990) y **albúmina**, la cual podría contener también esteroides (Ménézo y Guérin, 1997).

4.3.5.4. Aminoácidos (AA)

Los AA son esenciales para el crecimiento y desarrollo del embrión temprano estando implicados como precursores de proteínas, ácidos nucleicos y síntesis de ARN. Actúan también como sustratos energéticos, electrolitos, reguladores del pH, señalización de moléculas y quelantes de metales pesados (Gardner, 2008).

Si se compara con el suero, la composición en AA del FO es completamente original (Perkins y Goode, 1967) y sus concentraciones se encuentran por debajo, lo que

indica que su transporte al oviducto es por difusión facilitada con la excepción del ratón y la yegua donde la concentración de ellos es mayor que en plasma (Leese y Gray, 1985; Harris, Gopichandran *et al.*, 2005).

Los AA mayoritarios presentes en el FO de modo general son: **alanina, aspartato, glicina, glutamato, serina y taurina** (Gardner, 2008).

De todos los AA mencionados que se encuentran presentes en el FO existe un claro predominio de la glicina en todas las especies observadas: **coneja** (Perkins y Goode, 1967; Miller y Schultz, 1987; Leese y Gray, 1985; **ratona** (Gardner y Leese, 1990; Harris, Gopichandran *et al.*, 2005); **mujer** (Tay, Rutherford *et al.*, 1997); **cerda** (Iritani, Sato *et al.*, 1974; Li, Whitworth *et al.*, 2007); **vaca** (Elhassan, Wu *et al.*, 2001; Hugentobler, Diskin *et al.*, 2007; Hill, Wade *et al.*, 1997) y **oveja** (Perkins y Goode, 1967).

En cuanto a los AA mayoritarios existen pequeñas variaciones entre especies por lo que las mencionaremos de un modo más detallado. Por ejemplo, en la **coneja**, entre los AA mayoritarios se encontraron a la glicina seguida de alanina, treonina y ácido glutámico, pero no se encontraron prolina y treonina entre una quincena de AA detectados (Perkins y Goode, 1967; Leese y Gray 1985; Miller y Schultz, 1987).

En la **ratona** en estro predominan alanina, glicina, glutamato, glutamina y taurina (Gardner y Leese, 1990; Harris, Gopichandran *et al.*, 2005), mientras que en el fluido de las trompas de Falopio de la **mujer**, de una veintena de AA que detectaron se observa un predominio de arginina, alanina y glutamato (Tay, Rutherford *et al.*, 1997).

En la **cerda** en estro de la veintena de AA encontrados predomina la glicina seguida de otros AA mayoritarios como alanina, leucina, lisina y valina, además se ha observado que a los 5 días del estro sigue existiendo un claro predominio del AA glicina (Iritani, Sato *et al.*, 1974; Li, Whitworth *et al.*, 2007).

En la **vaca**, también existe un claro predominio de la glicina, siendo junto con la alanina y el glutamato los AA más abundantes entre la veintena de AA observados. Además, la concentración de los AA no se vio afectada por la fase del ciclo estral

analizada (Hill, Wade *et al.*, 1997; Hugentobler, Diskin *et al.*, 2007). En la fase luteal del ciclo existe también un claro predominio de estos tres AA cuando lo comparamos con los AA uterinos, lo que sugiere que estos pueden tener un papel importante en el desarrollo embrionario (Elhassan, Wu *et al.*, 2001). En esta especie se pudo observar además que los AA no esenciales son más abundantes que los esenciales (Elhassan, Wu *et al.*, 2001).

Finalmente, en el FO de **oveja**, la glicina se encuentra seguida por valina, lisina, alanina y leucina de la quincena de AA observados (Perkins y Goode, 1967).

Los AA **glicina** y **alanina** están implicados en la regulación del pH intracelular y en la protección del embrión frente al estrés osmótico (Fischer y Bavister, 1993). La **taurina** y la **hipotaurina** se encuentran en elevados niveles en el FO y son secretados por el epitelio oviductal mediante una enzima específica denominada cisteína sulfonato descarboxilasa y han logrado ser sintetizados mediante cultivos celulares *in vitro* de diferentes mamíferos (Guérin, Guillaud *et al.*, 1995; Guérin y Ménézo 1995; Guérin, Tappaz *et al.*, 1995; Ménézo y Guérin, 1997).

Taurina e hipotaurina son importantes para la viabilidad de los gametos, capacitación, fecundación y el desarrollo e implantación embrionario (Leese, Tay *et al.*, 2001). La hipotaurina se encarga de captar radicales sintetizando taurina la cual tiene efecto antioxidante y de protección de las membranas. Se consideran junto con la glicina y la alanina como AA de efecto beneficioso en el desarrollo *in vitro* de embriones de diferentes especies (Ménézo y Guérin, 1997).

4.3.5.5. Proteínas

Como ya hemos mencionado previamente, el FO se compone de un trasudado selectivo del suero sanguíneo y secreciones específicas de las células oviductales junto con fluido folicular y fluido del peritoneo en proporciones variables dependiendo de la etapa del ciclo (Roberts, Parker *et al.*, 1975; Leese, 1988; Malayer, Hansen *et al.*, 1988; Leese, Hugentobler *et al.*, 2008; Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010).

En el próximo apartado se va a desarrollar con detalle la composición protéica de los dos primeros orígenes por ser exclusivos del oviducto.

En el oviducto existen **proteínas procedentes del plasma** aunque la concentración de ellas es sólo del 5 -10 % de la encontrada en el suero (Roberts, Parker *et al.*, 1975; Leese, 1988).

Las proteínas de este tipo más abundantes en el FO son la albúmina y la inmunoglobulina G, representando prácticamente el 95 % del total de las proteínas séricas (Lippes, Enders *et al.*, 1972; Oliphant, Bowling *et al.*, 1978). De ellas, la albúmina es la proteína más abundante representando del 60-80 % del total y es de gran importancia si se considera su capacidad para unirse a lípidos, péptidos o catecolaminas (Ménézo y Guérin, 1997). Además se ha observado en el ratón que la albúmina de la sangre se transfiere a través de las células oviductales en lugar de entre ellas (Glass, 1969), por lo que las células oviductales secuestran las proteínas de la sangre y las transportan a la luz oviductal en forma de vesículas aunque no se sabe si las diferentes proteínas viajan separadas en vesículas diferentes (Parr y Parr, 1986). De este modo, la capacidad de las proteínas de entrar en el oviducto es inversamente proporcional a su tamaño y sólo las inmunoglobulinas de alto peso molecular no pueden atravesar el epitelio oviductal (Ménézo y Guérin, 1997).

La concentración de proteínas séricas en el oviducto se mantiene constante en **conejas** pseudopreñadas aunque haya cambios de volumen oviductal (Oliphant, Bowling *et al.*, 1978). En **ratona** en estro el FO de la ampolla con CCOs posee una concentración de proteínas de $10'90 \pm 1'90$ mg/ml (Gardner y Leese, 1990). En **vacas**, la concentración total de proteínas es mayoritaria en el estro (Roberts, Parker *et al.*, 1975).

El resto **de proteínas de origen oviductal** son sintetizadas por la porción de células secretoras no ciliadas del epitelio oviductal. Las cantidades de estas glicoproteínas oviductales son mayores durante el periodo preovulatorio y posteriormente disminuyen, por lo que su síntesis y secreción ocurre como respuesta a la estimulación de los estrógenos mientras que la progesterona parece tener poca influencia (Abe, Satoh *et al.*, 1998).

Los componentes proteicos oviductales son de distinta naturaleza y podemos agruparlos en: factores de crecimiento, citoquinas y sus receptores, hormonas y sus receptores, proteasas y sus inhibidores, agentes de protección antioxidantes, agentes de protección o defensa, glicosidasas y glicosil-transferasas, otros enzimas, chaperonas y heat shock proteins, otras proteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos y otros componentes (revisado en Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010). De esta clasificación haremos mención solamente a algunos componentes de interés para el presente estudio.

Algunas de estas proteínas presentes en el FO como **oviductina**, **osteopontina** y **lipocalin-tipo Prostaglandina D sintasa** son capaces de unirse a la ZP de ovocitos y mediante el uso de anticuerpos específicos se ha determinado que están implicadas en la unión con el espermatozoide, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* (Gonçalves, Wolinetz *et al.*, 2007). Por esta razón se revisan de forma exhaustiva a continuación.

La **oviductina** u **OVGP1** (Oviductal Specific Glycoprotein 1) (Merchán, Rendón *et al.*, 2006), ha sido nombrada de varios modos a lo largo de los años conforme se han ido observando sus características: oestrus-associated glycoprotein (Sutton, Nancarrow *et al.*, 1984), glycoprotein GP 215 (Kapur y Johnson, 1985), oviductin (Robitaille, St-Jacques *et al.*, 1988), oviductal secretory proteins (OSP) (Buhi, Vallet *et al.*, 1989), sheep oviduct glycoprotein (SOP) (Gandolfi, Brevini *et al.*, 1989b), glycoprotein " o hamster oviductin 1" (Kan, Roux *et al.*, 1990), estrogen dependent oviductal secretory glycoproteins (OSP) (Buhi, O'Brien *et al.*, 1993), oviduct-specific glycoprotein (OGP) (Sendai, Abe *et al.*, 1994), Mucin-9 (MUC-9) (Lagow, DeSouza *et al.*, 1999) y oviduct-specific oestrogen-dependent glycoproteins (Buhi, 2002).

Esta proteína pertenece a una familia de 18 proteínas glicosil-hidrolasas que incluye proteínas con actividad quitin-hidrolasa aunque no se le ha descrito actividad enzimática (DeSouza y Murray, 1995a; DeSouza y Murray, 1995b).

Se encuentra presente en oviducto de diferentes especies como la **coneja** (Oliphant y Ross, 1982; Merchán, Peiró *et al.*, 2009; García, Peiró *et al.*, 2010), **ratona** (Kapur y Johnson, 1985; Sendai, Komiya *et al.*, 1995; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 2002; Araki, Nohara *et al.*, 2003), **hámster** (Léveillé, Roberts *et al.*, 1987; Oikawa,

Sendai *et al.*, 1988; Robitaille, St-Jacques *et al.*, 1988; Kan, Roux *et al.*, 1990; Suzuki, Sendai *et al.*, 1995; Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997b; Abe, Satoh *et al.*, 1998; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 2002; McBride, Boisvert *et al.*, 2004a), **mujer** (Verhage, Fazleabas *et al.*, 1988; Donnelly, Fazleabas *et al.*, 1991; Rapisarda, Mavrogianis *et al.*, 1993; Arias, Verhage *et al.*, 1994; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1995; Briton-Jones, Lok *et al.*, 2001; Briton-Jones, Lok *et al.*, 2004), **babuina** (Fazleabas y Verhage, 1986; Donnelly, Fazleabas *et al.*, 1991; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1996; Verhage, Fazleabas *et al.*, 1997a), **macaca** (Verhage, Mavrogianis *et al.*, 1997), **chimpancé** (XP_001159836; pubmed), **titi común** (XP_002751293; pubmed), **gibón de mejillas blancas** (XP_003268014; pubmed) **cerda** (Buhi, Vallet *et al.*, 1989; Buhi, Alvarez *et al.*, 1990; Buhi, Alvarez *et al.*, 1996; Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000; Merchán, Rendón *et al.*, 2006), **vaca** (Malayer, Hansen *et al.*, 1988; Boice, Geisert *et al.*, 1990; King y Killian, 1994; Abe, Sendai *et al.*, 1995a; Martus, Verhage *et al.*, 1998), **oveja** (Sutton, Nancarrow *et al.*, 1984; Gandolfi, Brevini *et al.*, 1989b; Gandolfi, Modina *et al.*, 1991; DeSouza y Murray, 1995; Hill, Wade *et al.*, 1997) y **cabra** (Abe, Onodera *et al.*, 1995; Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011).

Animales como la rata y la yegua poseen el pseudogen de la OVGPI, lo que se corresponde con una secuencia en el ADN con alteraciones que provocan que no se exprese como proteína, por lo que ésta no aparecerá en el FO de estas especies (Mugnier, Kervella *et al.*, 2009; Tian, Pascal *et al.*, 2009).

La OVGPI es una glicoproteína por lo que se encuentra glicosilada y en base a dicha glicosilación pueden aparecer diferentes glicofomas dentro de una misma especie como por ejemplo en el cerdo (Buhi, O'Brien *et al.*, 1993) y además suele variar su longitud en AA y por lo tanto el peso molecular entre especies.

En la mayoría de las especies, la síntesis y la secreción máxima de OVGPI se produce durante el celo/estro, entre mediados y finales de la fase folicular, la fecundación y el desarrollo embrionario inicial siendo su secreción en el oviducto dependiente del nivel de estrógenos en sangre en la **mujer**, **babuina**, **cerda**, **vaca** y **oveja** (Gandolfi, Brevini *et al.*, 1989b; Arias, Verhage *et al.*, 1994; DeSouza y Murray, 1995a; Nancarrow y Hill, 1995; Buhi, Alvarez *et al.*, 1996; Verhage, Fazleabas *et al.*, 1997b; Buhi, Alvarez *et al.*, 2000; Lok, Briton-Jones *et al.*, 2002). En el **hámster** y la

coneja no se observan diferencias en la expresión del ARNm durante el ciclo estral (Paquette, Merlen *et al.*, 1995; Merchán, Peiró *et al.*, 2007).

Esta proteína ha sido identificada en los gránulos de secreción de las células secretoras epiteliales encontrándose presente a lo largo de todo el oviducto, en el infundíbulo, ampolla e istmo con la excepción del ratón y la oveja en los que dicha proteína no se encuentra presente en el istmo (Kapur y Johnson, 1988; Gandolfi, Modina *et al.*, 1991; Sendai, Komiya *et al.*, 1995).

Además, se han descrito polimorfismos de la OVGPI en conejo y en hámster (Paquette, Merlen *et al.*, 1995; Merchán, Peiró *et al.*, 2007) y diferentes glicofomas (McBride, Boisvert *et al.*, 2004b; McBride, Brockhausen *et al.*, 2005; Merchán, Peiró *et al.*, 2007).

Un estudio comparativo de la secuencia completa de los AA de esta proteína se muestra en la tabla 2. Otras comparaciones realizadas también en diferentes especies indican que existe un elevado grado de conservación en la región N-terminal de la proteína, lugar donde se encuentra el dominio quitinasa, (Verhage, Fazleabas *et al.*, 1997a), mientras que la porción C-terminal es más variable y en ella existen N y O-glicosilaciones. Se ha observado que esta porción C-terminal es la responsable del efecto de la OVGPI en el desarrollo embrionario temprano (Yong, Gu *et al.*, 2002).

Un ensayo sugiere que la porción responsable de la unión a los gametos es la región conservada no glicosilada N-terminal y el puente entre ambos podría ser la proteína MYH9 (Kadam, D'Souza *et al.*, 2006).

Tabla 2. Porcentaje de identidades comunes existente entre la proteína OVGPI de diferentes especies de animales. Secuencias comparadas en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

OVGPI	Sus scrofa Q28990 527 AA	Bos taurus Q28042 537 AA	Ovis aries Q28542 539 AA	Cabra hircus ABF20534 539AA	Homo sapiens Q12889 678 AA	Oryctolagus cuniculus NP_001075574 475 AA	Mesocricetus auratus Q60557 671 AA	Mus musculus Q62010 721 AA	Canis familiaris XP_852238 553 AA	Pan troglodytes XP_001159107 Isoforma 1 625AA	Pan troglodytes XP_001159308 Isoforma 2 603AA	Macaca radiata AAQ17078 593AA
Sus scrofa Q28990	x	78	78	78	73	74	66	70	67	66	68	70
Bos taurus Q28042		x	94	94	73	73	64	70	66	63	66	69
Ovis aries Q28542			x	97	66	73	64	69	65	62	65	68
Cabra hircus ABF20534				x	71	73	64	70	66	63	66	68
Homo sapiens Q12889					x	80	65	75	60	92	96	92
Oryctolagus cuniculus NP_001075574						x	74	75	66	75	79	80
Mesocricetus auratus Q60557							x	83	59	59	61	66
Mus musculus Q62010								x	64	68	71	75
Canis familiaris XP_852238									x	58	60	62
Pan troglodytes XP_001159107										x	96	89
Pan troglodytes XP_001159308											x	93
Macaca radiata AAQ17078												x

Esta proteína interacciona con espermatozoides, ovocitos y embriones, por lo que participa en múltiples y variados procesos (figura 5. Tomado de Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.* 2010)

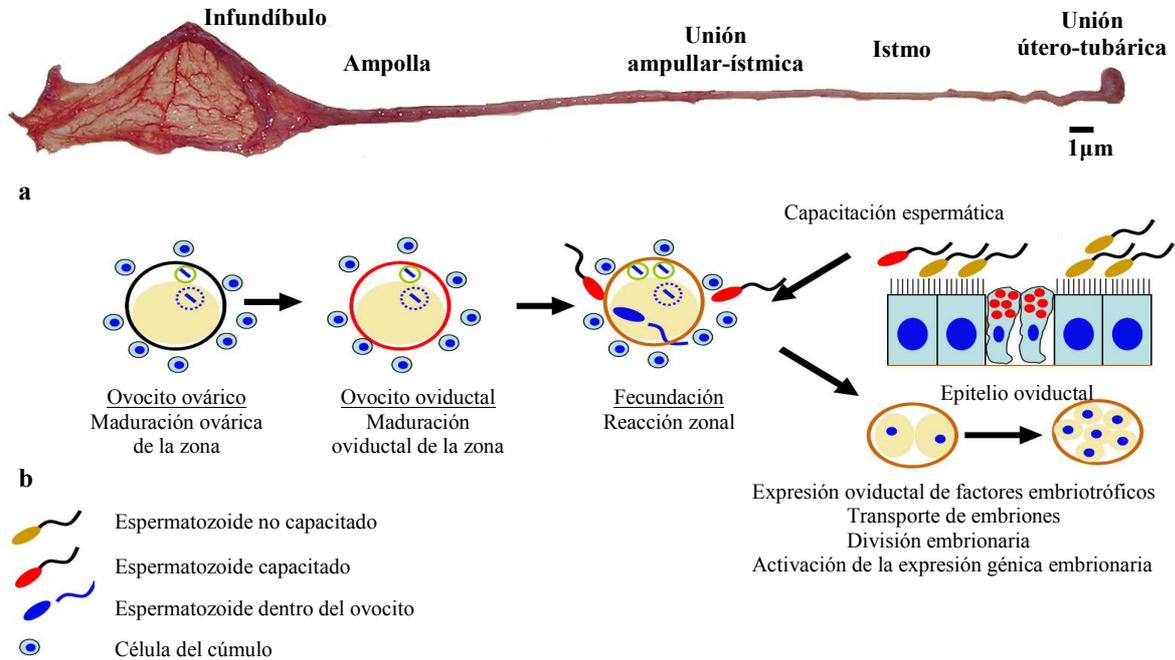


Figura 5. Modificado de Avilés *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010). Esquema de los diferentes eventos que se producen en las diferentes regiones oviductales durante la fecundación. a) Oviducto porcino disecado con sus diferentes regiones. b) Esquema de los eventos en los que participa la proteína oviductina (capacitación, maduración zonal, fecundación y desarrollo embrionario).

Con respecto al gameto masculino está implicada en la movilidad, viabilidad, capacitación, RA y unión a la ZP. La OVGPI se une a la membrana de los espermatozoides (McNutt, Rogowski *et al.*, 1992; King, Anderson *et al.*, 1994; Lyng y Shur, 2009), mejora la movilidad y viabilidad espermática (Abe, Sendai *et al.*, 1995b; Satoh, Abe *et al.*, 1995) y estimula la capacitación (King, Anderson *et al.*, 1994; McCauley, Buhi *et al.*, 2003; Killian, 2004).

El tratamiento previo de los gametos con la OVGPI también incrementa las tasas de fecundación *in vitro*, el desarrollo embrionario y reduce las tasas de polispermia (King, Anderson *et al.*, 1994; Boatman y Magnoni, 1995; Hill, Wade *et al.*, 1997; Martus, Verhage *et al.*, 1998; Buhi, Alvarez *et al.*, 2000; Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000; McCauley, Buhi *et al.*, 2003).

También se le ha observado actividad embriotrófica en algunas especies (McCauley, Buhi *et al.*, 2003; Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010).

En algunas especies como la ovina incrementa las tasas de división embrionaria (cleavage) y el número de blastocistos (Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000; revisado por Buhi, 2002).

Con respecto a su asociación con el gameto femenino, la OVGP1 modifica la ZP de hámster (Robitaille, St-Jacques *et al.*, 1988). Esta asociación se ha observado de modo homólogo en hámster (ZP de hámster relacionada con OVGP1 de hámster), mujer, babuina, vaca y oveja (Boice, McCarthy *et al.*, 1990; Gandolfi, Modina *et al.*, 1991; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1996; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 2002; Coy, Cánovas *et al.*, 2008; Gonçalves, Staros *et al.*, 2008) y de modo heterólogo (ZP del ovocito de una especie relacionada con la OVGP1 de otra especie diferente), entre ZP de cerda y OVGP1 bovina (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), ZP de hámster y OVGP1 humana (Reuter, O'Day-Bowman *et al.*, 1994) y ZP humana con OVGP1 de babuina (O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1996). La unión de esta proteína con el gameto femenino y/o embrión suele darse a nivel de la ZP, espacio perivitelino y entre blastómeras embrionarias en la ratona (ZP y espacio perivitelino) (Kapur y Johnson, 1986; Lyng y Shur, 2009), en el hámster (Léveillé, Roberts *et al.*, 1987), babuina (Boice, McCarthy *et al.*, 1990), cerda (Buhi, O'Brien *et al.*, 1993), vaca (Boice, McCarthy *et al.*, 1990) y oveja (Gandolfi, Modina *et al.*, 1991).

Por todo ello, la OVGP1 parece tener un papel como regulador de la fecundación y del desarrollo embrionario (revisado por Buhi, 2002).

Además, la OVGP1 junto con otros componentes del fluido oviductal como glicosaminoglicanos sulfatados del tipo de la heparina han sido implicados en la maduración oviductal de la zona pelúcida lo que permite la regulación de la polispermia *in vitro* como ya hemos comentado anteriormente (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Resumiendo, la OVGP1 está implicada en el aumento de la penetración espermática, incremento de las tasas de fecundación, disminución de las tasas de

polispermia, aumento de la tasa de división embrionaria y el número de embriones que se desarrollan hasta el estadio de blastocisto.

En cultivo de CEO porcinas se liberan al medio al menos 15 proteínas mayoritarias de las cuales sólo se han identificado, caracterizado y localizado a: las OVGP1s, el inhibidor de metaloproteinasas tisular (pTIMP-1) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (Buhi y Alvarez, 2003). Estos dos últimos (inhibidores de metaloproteasas y del activador del plasminógeno tipo tisular respectivamente) podrían proteger a la ZP y al embrión frente a la degradación, manteniendo la integridad del embrión, regulando la síntesis de la matriz extracelular y remodelándola en el oviducto y promoviendo el desarrollo embrionario (Kouba, Burkhardt *et al.*, 2000).

Entre otras proteínas oviductales que se han descrito capaces de unirse a los espermatozoides o a los ovocitos modificando la fisiología de los gametos para la fecundación nos encontramos a la **osteopontina (OPN)**.

La OPN es una glicoproteína ubicua que se encuentra presente en muchos tejidos y secreciones, está implicada en la señalización y adhesión celular al unirse a integrinas a través de la secuencia de AA arginina-glicina-aspartico (RGD) por lo que puede estar implicada en procesos de adhesión celular (Denhardt y Guo, 1993). Posee un sitio de unión a iones Ca^{2+} y dos dominios de unión a heparina (Elisa, 2007). La OPN es sintetizada y secretada por las células oviductales y está presente en el FO en el que se han detectado tres formas glicoproteicas (25, 48 y 55 kDa) (Gabler, Chapman *et al.*, 2003; Killian, 2004; Killian, 2011), también se ha demostrado que existe una presencia diferencial de estas tres glicofomas de OPN y de diferentes integrinas a lo largo del ciclo estral, por lo que las posibles interacciones (OPN-integrina) podrían formar parte de la funcionalidad normal del oviducto influenciando interacciones entre gametos, embrión y epitelio.

La OPN ha sido encontrada en el plasma seminal de toros en cantidades que se correlacionan con la fertilidad de este animal (Killian, Chapman *et al.*, 1993). Se ha detectado en la membrana plasmática del espermatozoide eyaculado de toro (Erikson, Way *et al.*, 2007) y su distribución en la membrana cambia tras la incubación con FO

(Souza, Moura *et al.*, 2008), pero este cambio no parece ser producido por un aumento de la asociación de OPN a la membrana de los espermatozoides incubados en FO.

La incubación de los ovocitos de vaca con OPN mejora la tasa de unión de los espermatozoides a la ZP, la fecundación y el desarrollo embrionario *in vitro*. La OPN facilita la viabilidad y la capacitación espermática. Los espermatozoides incubados con OPN poseen mejores tasas de fecundación *in vitro*, división, y formación de blastocistos (Erikson, Way *et al.*, 2007; Gonçalves, Chapman *et al.*, 2008; Gonçalves, Staros *et al.*, 2008; Monaco, Gasparrini *et al.*, 2009).

En cerdos, la exposición de los espermatozoides y ovocitos a ciertas dosis de OPN mejora la tasa de fecundación *in vitro* y reduce la tasa de polispermia de modo dosis-dependiente (Hao, Mathialagan *et al.*, 2006).

Diferentes estudios han evidenciado que el mecanismo por el cual OPN influencia la unión espermatozoide-ovocito y la fecundación depende de la unión a integrinas mediante la secuencia RGD de la OPN. Aunque parece estar implicada en procesos muy importantes, en la fecundación no parece ser esencial por lo menos en el modelo murino ya que modelos de ratón knock-out para la OPN (Rittling, Matsumoto *et al.*, 1998) son fértiles.

La proteína **prostaglandina D sintasa tipo lipocalina (L-PGDS)** y la **albúmina** se encuentran presentes en el FO bovino y son capaces de unirse a la ZP de los ovocitos estando implicadas en la unión espermática, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* pero no en la división. No se conoce si la proteína **L-PGDS** es sintetizada y secretada por el epitelio oviductal o si procede del plasma (Gonçalves, Staros *et al.*, 2008). Aunque fue identificada como una proteína asociada a la fertilidad en el plasma seminal de toro, su función es actualmente desconocida (Gerena, Irikura *et al.*, 1998).

La **albúmina** que se une a la ZP de ovocitos bovinos es de peso molecular 74 kDa (62-74 kDa), lo que hace pensar que la ZP se une a moléculas grandes. La albúmina es una proteína capaz de transportar vitaminas, lípidos y hormonas (Gonçalves, Staros *et al.*, 2008).

En el FO nos encontramos **hormonas** que han alcanzado el oviducto gracias al sistema contracorriente, por lo que pueden presentarse en el oviducto en mayor concentración que en la sangre periférica. En la etapa folicular se ha visto que en el oviducto hay la misma cantidad de cortisol y prostaglandina E2 que en el plasma periférico. En el caso de las hormonas progesterona, androstenediona, estradiol y prostaglandina F2 α su concentración es mayor en el oviducto (Hunter, Cook *et al.*, 1983).

Las **glicosidasas** y **glicosil-transferasas** son proteínas encargadas de modificar los azúcares de las glicoproteínas, por lo que pueden modificar glicoproteínas de la superficie del espermatozoide, de la ZP y de las células epiteliales. Estas glicosidasas pueden variar a lo largo del ciclo estral, como se ha descrito en la cerda y la vaca (Carrasco, Coy *et al.*, 2008; Carrasco, Romar *et al.*, 2008).

Los **Glicosaminoglicanos (GAG)** se encuentran presentes en el fluido folicular, en el FO y en el útero y están implicados en la capacitación espermática *in vivo*. La capacitación *in vitro* de los espermatozoides de toro se puede activar mediante el uso de la heparina, la cual es un glicosaminoglicano altamente sulfatado (GAG-S). Se ha analizado la concentración de los GAG-S en el oviducto de vaca y se ha observado que su concentración es mayor en el oviducto ipsilateral siendo mayoritario en la fracción de la ampolla (73.5 ± 10.49 mg/l) frente al istmo (43.2 ± 10.74 mg/l) durante toda la fase folicular hasta después de la ovulación (de proestro a metaestro). Además el heparán sulfato (sindecano1 y sindecano 2) se encuentra presente en las células epiteliales a lo largo de todas las porciones oviductales durante todo el ciclo. Por ello los GAG y sindecanos pueden influir en la estancia de los gametos en el oviducto. La cantidad de estos GAGs sulfatados puede ser suficiente para la capacitación espermática *in vivo* (Bergqvist, Yokoo *et al.*, 2005; Bergqvist y Rodríguez-Martínez, 2006).

El ácido hialurónico o **hialuronano (HA)** es un mucopolisacárido de alta viscosidad y es el principal GAG presente en los fluidos mencionados anteriormente (del 16 al 39 % de todos los glicosaminoglicanos). Su concentración fisiológica en el cerdo en la fase folicular oscila entre 0.04-1.83 mg/ml (Kano, Miyano *et al.*, 1998). En la vaca se ha observado que las células epiteliales secretan el HA y sus proteínas de unión, siendo la cantidad del mismo similar entre las diferentes regiones oviductales

aunque con cierta mayoría en el reservorio espermático y con un pico de secreción en la ovulación (Bergqvist, Yokoo *et al.*, 2005; Bergqvist y Rodríguez-Martínez, 2006).

También se ha detectado la presencia de GAGs a lo largo de todo el epitelio de la cerda mientras que la distribución del HA, el único GAG no sulfatado, se restringe a la lámina propia excepto en la zona de la mucosa de la unión útero-tubárica y sobre todo en la etapa peri-ovulatoria (Tienthai, Kjellén *et al.*, 2000).

Las principales funciones del HA incluyen la adhesión celular y la migración (procesos dinámicos en los que se relaciona con los componentes de la matriz extracelular incluyendo laminina, elastina, condroitín sulfato y heparán sulfato), regulación de la expresión génica, proliferación celular y diferenciación celular.

Como resultado de sus características físico-químicas el HA aumenta la viscosidad de las soluciones, regula la distribución de las proteínas y el agua, es capaz de retener de agua y adquirir propiedades hidratantes, de producir efectos de filtrado y de lubricación (Scott, 1992; Stojkovic, Kolle *et al.*, 2002), además de tener efectos bacteriostáticos (Pirnazar, Wolinsky *et al.*, 1999). Por lo tanto el HA puede estar implicado en la hidratación y defensa del oviducto.

La incorporación de hialuronano a medios de cultivo de embriones (con BSA o albúmina recombinante) incrementa la capacidad de los blastocistos de sobrevivir tras la criopreservación, por este motivo se emplea habitualmente en los medios de fecundación *in vitro* humana (Stojkovic, Kolle *et al.*, 2002; Lane, Maybach *et al.*, 2003).

En la revisión realizada por Avilés *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010), se aportó una tabla con las proteínas descritas hasta ese momento como componentes oviductales. A ella se le pueden añadir otras proteínas localizadas en la bibliografía como expresadas y/o secretadas por el oviducto de diferentes especies de mamíferos (Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas expresadas y/o secretadas por el oviducto de diferentes especies de mamíferos, ampliación de Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010.

PROTEÍNAS Y/O COMPONENTES	ESPECIES	REFERENCIA
Factores de crecimiento, citoquinas y receptores		
FasL (TNF ligand superfamily member 6)	vaca	Bergqvist, Killian <i>et al.</i> , 2005
Proteasas e inhibidores		
Oviductal fluid tripsina inhibitor (OFTI)	conejo	McLaughlin y Hamner, 1975
Glicosidasas y glicosiltransferasas		
Glicerol fosforilcolina diesterasa	cerda	Iritani, Sato <i>et al.</i> , 1974
Otras enzimas		
Lactato deshidrogenasa	ratón	Gibson y Masters, 1970
Prostaglandina D-sintasa tipo lipocalin (L-PGDS)	vaca	Gonçalves, Staros <i>et al.</i> , 2008

4.3.6. FUNCIONES

En un principio se trataron dos teorías acerca de la función oviductal; la teoría **pasiva** que indica que el oviducto proporciona un óptimo ambiente en términos de temperatura, pH, presión osmótica, nutrientes, tensión de oxígeno y otros factores, mientras que la teoría **activa** indicaba que el oviducto es un tejido biológicamente activo proporcionando variedad de proteínas secretoras las cuales sostienen y regulan o mejoran eventos que ocurren antes y durante la fecundación y durante el desarrollo embrionario (Gandolfi, 1995; Buhi, Alvarez *et al.*, 1997).

La fecundación sólo se va a producir cuando la introducción del semen en el tracto genital femenino y la ovulación ocurran en el momento adecuado y después de que en los gametos tengan lugar ciertos cambios de maduración en el lumen oviductal.

Los embriones se mantienen en éste de dos a tres días después de la fecundación por lo que es importante para el correcto desarrollo embrionario y la protección del embrión.

De modo general, la función del FO deriva en gran medida de los componentes que lo forman, de modo que se ha visto que existen proteínas que se asocian a los gametos y por lo tanto están implicadas en la maduración, interacción de gametos y/o desarrollo embrionario. La mayoría de estas funciones ya han sido descritas a lo largo de esta revisión por lo que en este apartado se indicarán solo algunas observaciones fisiológicas hasta ahora no comentadas.

Por otro lado, se ha sugerido que el contenido oviductal y el tránsito de los gametos a través de él puede no ser decisivo para que se produzca la fecundación, ya que en las clínicas de infertilidad humana depositan habitualmente los gametos directamente en el útero y se generan embarazos a término, aunque no se puede descartar que exista aporte del contenido oviductal al microambiente uterino (Hunter, 1998).

El oviducto parece ser un órgano **inmunológicamente** privilegiado en el que existen diferentes componentes implicados por un lado en la defensa ante proteínas extrañas y patógenas y por otro en permitir la supervivencia de los espermatozoides y embriones tempranos (Bergqvist, Killian *et al.*, 2005).

En el oviducto bovino se ha detectado la presencia del sistema Fas-FasL, implicados en la respuesta inmune. Su actividad no parece estar ligada a la apoptosis de las células epiteliales por lo que podría actuar eliminando a linfocitos T citotóxicos y células NK previniendo así el ataque de éstas a los espermatozoides y los embriones tempranos mediando en su supervivencia (Bergqvist, Killian *et al.*, 2005). Otras proteínas detectadas en el oviducto e implicadas en esta respuesta son las heat shock proteins (HSP) (Neuer, Spandorfer *et al.*, 2000; Boilard, Reyes-Moreno *et al.*, 2004), entre las que nos encontramos la HSP8 que es fundamental para la supervivencia de los espermatozoides en el oviducto (Elliott, Lloyd *et al.*, 2009). A estos agentes de defensa se añadiría el efecto bacteriostático del HA (Pirnazar, Wolinsky *et al.*, 1999).

En el oviducto se expresan además varias proteínas de la familia de las mucinas, la MUC-9 u OVGP1 que es soluble y a la que hemos descrito previamente y también presenta la MUC-1, la cual no es secretada de modo que permanece en la superficie apical del epitelio oviductal revistiéndolo y formando una barrera de moléculas mucosas. Entre las funciones posibles de las mucinas se encuentran la lubricación de estas células epiteliales para evitar la deshidratación, protección de las células para evitar la proteólisis, protección contra el ataque microbiano, modulación de la unión celular e inhibición de la respuesta inmune de las células (revisado por Lagow, DeSouza *et al.*, Lagow, DeSouza *et al.*, 1999). La MUC-9 ha sido implicada también en la prevención de la implantación ectópica embrionaria, recubriendo las células epiteliales, función que podría ser compartida por la MUC-1 sugiriendo por lo tanto un efecto anti-adhesivo y que se sustenta con los datos que indican que la MUC-1 se encuentra regulada a la baja en el útero en el momento de la implantación, (Surveyor, Gendler *et al.*, 1995; Lapensée, Paquette *et al.*, 1997; Hoffman, Olson *et al.*, 1998).

En la **fecundación** se ha visto que la secreción oviductal modifica a los gametos de modo que favorece la fecundación especie-específica (Slavik y Fulka, 1999).

Modificaciones en el **ovocito** ya han sido comentadas pero también existen evidencias que indican que las proteínas específicas del oviducto como glicosaminoglicanos, carbohidratos, norepinefrina, catecolaminas, heat shock proteins y osteopontina, componentes del FO, tienen la capacidad de modular/modificar la función **espermática** (Killian, 2011).

En técnicas *in vitro* se ha observado que la adición de proteínas procedentes del FO previamente a la congelación espermática aporta efectos beneficiosos en términos de movilidad espermática, viabilidad e integridad acrosomal (Kumaresan, Ansari *et al.*, 2006). Además la procedencia del fluido en cuanto a porción oviductal y fase del ciclo estral influyen de modo diferente en la viabilidad, movilidad, RA y capacidad de fecundar al ovocito (McNutt y Killian, 1991; Pollard, Plante *et al.*, 1991; Grippo, Way *et al.*, 1995).

También se ha observado que los fluidos viscosos, como el FO, mejoran la capacidad del movimiento espermático, unión y penetración en el ovocito *in vitro* (Coy, Gadea *et al.*, 2009).

El oviducto proporciona el mejor microambiente para el **desarrollo embrionario temprano** (Freeman, Woods *et al.*, 1992). Además las necesidades metabólicas del embrión preimplantacional cambian durante el desarrollo (Leese, 1995), por lo que el oviducto modifica continuamente su actividad con el fin de proporcionar el ambiente óptimo para el desarrollo del embrión (revisado por McGee, Hsu *et al.*, 1998; Buhi, 2002; Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010). Ortiz, Bedregal *et al.*, (Ortiz, Bedregal *et al.*, 1986) sugirieron que los embriones regulaban su propio tránsito a lo largo del oviducto y más tarde se ha comprobado que esa regulación se realiza mediante sustancias (canabinoides) que pueden coordinar la contracción y relajación del músculo liso oviductal (Wang, Guo *et al.*, 2004).

El oviducto también secreta una serie de factores cuyos receptores se encuentran presentes en el embrión (Kane, Morgan *et al.*, 1997; Lee y Yeung, 2006) y también se han descrito factores embriotróficos (Liu, Chan *et al.*, 1998; McCauley, Buhi *et al.*, 2003; Lee, Yanagimoto Ueta *et al.*, 2006) que pueden actuar durante diferentes etapas del desarrollo embrionario aumentando el desarrollo de blastocistos, la tasa de blastocistos, la tasa de eclosión y el número de células de la masa celular interna del blastocisto, actuando también incluso en la protección embrionaria contra efectos adversos de la transcripción/replicación del ADN mitocondrial y fenómenos de apoptosis (Lee y Yeung, 2006; Lloyd, Romar *et al.*, 2009). Estos factores embriotróficos no deben de ser específicos de especie debido a que han sido muchos los autores que usan el ambiente oviductal para el cultivo de embriones de alta calidad de modo homólogo o heterólogo (Trounson, Willadsen *et al.*, 1977; Rao, Sarmah *et al.*, 1984; Rizos, Lonergan *et al.*, 2002; Rizos, Ward *et al.*, 2002; Gutiérrez-Adán, Rizos *et al.*, 2004; Lazzari, Colleoni *et al.*, 2010; Rizos, Ramirez *et al.*, 2010).

El embrión además es capaz de alterar con su presencia la fisiología y la expresión génica del oviducto (Lee y Yeung, 2006). Algunos de estos factores son el receptor para el factor activador de plaquetas derivado del embrión, presente en las células oviductales humanas y bovinas (Tiemann, Viergutz *et al.*, 2001; Velasquez,

Maisey *et al.*, 2001), el factor embriotrófico 3 (Lee, Lee *et al.*, 2003), el derivado iC3b del factor del complemento 3 (Lee, Lee *et al.*, 2004), entre otros. Además el oviducto también puede afectar a la expresión génica de los embriones preimplantacionales (Lee, Chow *et al.*, 2001).

4.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN OVIDUCTAL

4.4.1. PROTEÓMICA, GENÓMICA Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

A partir de material oviductal (independientemente del modo de su recolección) han sido frecuentes los estudios electroforéticos, en los que se separan proteínas en base a su peso molecular. Gracias a estas determinaciones se ha podido conocer, entre otros, que el patrón proteico del FO de diferentes especies como coneja, mujer y mona es muy similar al patrón que se obtiene del suero (Roberts, Parker *et al.*, 1975).

A partir de estas técnicas electroforéticas se han desarrollado técnicas de proteómica mediante las cuales se identifican proteínas. Mediante estas se han descrito algunos componentes del FO en diferentes especies como en cerda y vaca (Buhi, Alvarez *et al.*, 2000; Georgiou, Sostaric *et al.*, 2005; Georgiou, Snijders *et al.*, 2007; Coy, Cánovas *et al.*, 2008; Seytanoglu, Georgiou *et al.*, 2008).

Otras estrategias para conocer las relaciones entre la secreción oviductal y los gametos o embriones ha sido la **yodación** (McNutt, Rogowski *et al.*, 1992) o la **biotinilación** (Staros y Killian, 1998) de las secreciones oviductales.

Por otro lado, también se ha usado la técnica de los **anticuerpos** para evidenciar la presencia y localización concreta de las proteínas de interés (tomadas como antígeno) e incluso para esclarecer las funciones de las mismas (Gandolfi, Modina *et al.*, 1991; Chegini, Zhao *et al.*, 1994; King y Killian, 1994; McBride, Boisvert *et al.*, 2004a).

Debido a que la secreción oviductal se compone fundamentalmente de proteínas glicosiladas éstas se pueden enriquecer, fraccionar o purificar en base a ello, mediante el uso de lectinas unidas a agarosa como la aglutinina de germen de trigo (wheat germ agglutinin, WGA-agarosa), helix pomatia agglutinin (HPA-agarosa), mediante la unión

a Heparina y mediante columnas de exclusión de tamaño molecular. La glicoproteína a la que mayor interés se le ha prestado y que más ha sido pretendida por estas técnicas ha sido fundamentalmente la proteína OVGP1. Ésta ha sido purificada en base a alguna de las técnicas mencionadas en algunas especies y también ha sido clonada (Boice, Mavrogianis *et al.*, 1992; Sendai, Abe *et al.*, 1994; Suzuki, Sendai *et al.*, 1995; Buhi, Alvarez *et al.*, 1996; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1996; Schmidt, Mavrogianis *et al.*, 1997; O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 2002; Ling, Lee *et al.*, 2005).

El conocimiento que se tiene hasta hoy día del contenido proteico oviductal procede, como hemos visto, del uso de multitud de técnicas aunque es bastante limitado debido a la complejidad del fluido, la lentitud en el procesado de las muestras y la dificultad de la obtención de las mismas, sobre todo en aquellas especies como la humana en la que existe una importante limitación a la hora de poder disponer de ellas.

Datos más recientes y que salvan en parte esa dificultad, son los aportados con la técnica de micromatrices (microarrays), gracias a la cual se está aumentando rápidamente la información sobre la expresión de genes en la mucosa oviductal en diferentes especies, como es el caso de la especie bovina (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004) en la que se ha demostrado que existe expresión diferencial de genes, estando regulados 37 en estro y 40 en diestro. Datos posteriores obtenidos mediante esta misma técnica nos han aportado información sobre la expresión génica en la mucosa oviductal en la especie humana (Tone, Begley *et al.*, 2008). La mayoría de los estudios de este tipo se han centrado en el endometrio e implantación embrionaria siendo escasos los análisis en el oviducto.

Gracias a la técnica de micromatrices se puede determinar el perfil transcripcional de los genes expresados en un tejido determinado, pero esta técnica requiere de un diseño experimental cuidado para que los resultados puedan ser analizados de modo estadístico (Churchill, 2002). Esta técnica no es determinante ya que los genomas expresados han de confirmarse mediante otras técnicas como la técnica de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Chegini, Zhao *et al.*, 1994; Zhao, Chegini *et al.*, 1994).

4.4.2. RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA (RDE) E INTERACCIONES HOMÓLOGAS Y HETERÓLOGAS

Los primeros usos que se realizaron con las enzimas proteolíticas se destinaban a eliminar la ZP de los embriones recolectados de oviducto o útero para la producción de quimeras en ratón y el desarrollo de embriones sin la ZP (Mintz, 1962) y en algunos casos algunos autores llegaron a afirmar que en un porcentaje de sus resultados la ZP no se digiere (Moor y Cragle, 1971; Trounson y Moore, 1974) o incluso se mantiene totalmente intacta (Menino y Wright, 1982) en las condiciones y metodología empleadas. Algunos autores relacionaron este hecho al estado celular y día de recolección de los embriones (Menino y Wright, 1982).

Para la eliminación de la ZP de ovocitos de diferentes especies se han utilizado diferentes productos como: enzimas proteolíticas entre las cuales se encuentran: bromelina, papaína, pronasa, alfa-quimotripsina, quimotripsina, tripsina (Moor y Cragle, 1971; Coy y Avilés, 2010); el anión caotrópico tiocianato (SCN⁻) (Domon, Pinsker *et al.*, 1973); mercaptoetanol (Domon, Pinsker *et al.*, 1973); urea (Iwamoto, Ikeda *et al.*, 1999); calor o incluso estrés mecánico (Papi, Brunelli *et al.*, 2010).

Cuando se han analizado las diferencias en la actividad de diferentes enzimas (Moor y Cragle, 1971), prácticamente todas ellas son capaces de eliminar en pocos minutos la ZP de ovocitos no fecundados, mientras que sólo la pronasa lo hace con cierto porcentaje de ZPs de embriones, siendo el resto de enzimas incapaz de disolver la ZP de embriones de oveja obtenidos del animal *in vivo*. Por lo tanto, se puede decir que la enzima pronasa es capaz de detectar pequeñas variaciones en los cambios físico-químicos de la ZP que son reflejados en los diferentes tiempos necesarios para la disolución de la ZP.

A partir de los estudios de roedores, el término “endurecimiento de la ZP” se usó para indicar el aumento de la resistencia a la digestión por enzimas proteolíticos de la ZP que se produce como consecuencia de la liberación del contenido de los GC (Austin y Braden, 1956; Gwatkin, 1964; Barros y Yanagimachi, 1971; Inoue y Wolf, 1974; Gulyas y Yuan, 1985). Posiblemente este aumento de RDE de la ZP se deba a que los GC liberan una proteasa que corta a la glicoproteína ZP2 de la cubierta extracelular

del ovocito, lo que puede causar un cambio conformacional de la ZP2 que permita la interacción entre filamentos adyacentes de la ZP provocando la compactación de la estructura (Monné y Jovine, 2011). Este aumento va acompañado de una mayor dificultad de los espermatozoides para atravesar la ZP modificada por ese mecanismo.

Sin embargo, el periodo de tiempo en el que comienza a observarse esa resistencia a la proteólisis de la ZP tras la fecundación varía entre especies (Coy y Avilés, 2010). Mientras que en ratones y ratas la resistencia de la ZP es significativamente más alta después de la fecundación o tras la activación artificial (Gulyas y Yuan, 1985; Zhang, Rutledge *et al.*, 1992; DeMeestere, Barlow *et al.*, 1997), en humanos no está tan claro (Schiewe, Araujo *et al.*, 1995; Manna, Rienzi *et al.*, 2001; Coy y Avilés, 2010) y en la vaca (Iwamoto, Ikeda *et al.*, 1999; Coy, Romar *et al.*, 2005) y la cerda (Coy y Romar, 2002; Kolbe y Holtz, 2005) no se produce.

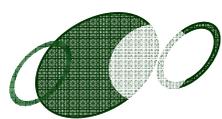
Se ha observado que el tiempo para la digestión de la ZP mediante enzimas proteolíticos aumenta en los ovocitos que son recuperados directamente del oviducto (Katska, Kauffold *et al.*, 1989; Kolbe y Holtz, 2005; Coy, Grullón *et al.*, 2008). Este mismo fenómeno se ha observado cuando se tratan los ovocitos con FO antes del tratamiento proteolítico con las enzimas, (revisado por Coy y Avilés, 2010) y también cuando se colocan ovocitos en el interior de oviductos *in vivo* o en secciones de los mismos mantenidos en condiciones *in vitro*, de modo homólogo o heterólogo, como por ejemplo, cuando se colocan ovocitos de vaca en el interior de oviductos de vaca (Smorag y Katska, 1988; Katska, Kania *et al.*, 1999) o en el oviducto de otras especies como oveja y conejo (Katska, Smorag *et al.*, 1988; Katska, Kauffold *et al.*, 1989), por lo que este proceso no se produce de modo especie-específico.

Este mecanismo de endurecimiento de la ZP que se produce pre-fecundación ha denominado **maduración oviductal** de la zona, y se ha demostrado que ocurre por la asociación de la glicoproteína oviductal OVGP1 a la ZP, junto a GAG tipo heparina (Coy, Cánovas *et al.*, 2008; Coy y Avilés, 2010).

Datos experimentales han evidenciado que los espermatozoides pueden penetrar los ovocitos con la ZP “endurecida” y que esta maduración oviductal de la ZP

contribuye a una reducción de la polispermia al menos en ovocitos de cerda y de vaca (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Para diferenciar entre los diferentes tipos de análisis de resistencia de la ZP a la digestión proteolítica por enzimas se han acuñado dos términos (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), de modo que se entiende como “**endurecimiento de la ZP**” a aquella resistencia de la ZP a las enzimas que está asociada con la disminución en la penetración de los espermatozoides, mientras que se entiende como “**resistencia a la proteolisis**” a aquella resistencia de la ZP a las enzimas en la que no se analiza la relación de la misma con la penetración de los espermatozoides.



MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

Todos los componentes necesarios para la fabricación de los diferentes medios de lavado y de cultivo que se nombran en esta tesis han sido adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España), salvo que se indique otra especificación.

Los medios de cultivo se prepararon con agua ultrapura producida mediante un des-ionizador MiliQ plus (Milli-Q, Millipore, EEUU) tras alcanzar éste una resistencia de 18'2 MΩ/cm. A su vez todos los medios fueron filtrados bajo cabina de flujo laminar (Telstar BH-100, Terrasa; Barcelona) con filtros de 0'2 μm de diámetro (Millipore corporation, Bedford, Massachussets, EEUU).

5.1.1. OVARIOS

5.1.1.1. Obtención.

Los ovarios del lagomorfo usado, conejo (*Oryctolagus cuniculus*), y de los roedores usados, ratones (*Mus musculus* de la cepa C57), ratas (*Rattus norvegicus* de la línea Wistar) y hámster (*Mesocricetus auratus*), se obtuvieron tras el sacrificio de los animales en el laboratorio como se relata posteriormente.

Los ovarios de las especies porcina, bovina, ovina y caprina se obtuvieron de diferentes mataderos de la Comunidad Valenciana y de la Región de Murcia.

Los ovarios de la especie porcina (*Sus scrofa domestica*) se obtuvieron de hembras prepúberes, híbridas Landrance X Large White de unos 90-100 Kg de peso, sacrificadas en el matadero de “El Pozo Alimentación” de Alhama de Murcia (Murcia).

Los ovarios bovinos (*Bos taurus*) usados en estos estudios procedieron de hembras de razas Asturiana, Charolés, Limussine y Simental de entre 14 y 20 meses de edad, sacrificadas en el matadero “Orihuela S.A” (Alicante, Comunidad Valenciana).

Los ovarios de la especie ovina (*Ovis aries*) se obtuvieron a partir de hembras de razas Marina, Segureña y Cruces de Assaf de entre 18 meses y 5 años de edad y de unos 30 Kg de peso del matadero “Murgaca S.A.” de Cartagena (Murcia).

Los ovarios de la especie caprina (*Capra hircus*) se obtuvieron a partir de hembras de raza Murciano-Granadina de entre 18 meses y 5 años de edad y de entre unos 40-50 Kg de peso del mismo matadero de Cartagena.

5.1.1.2. Transporte

En el caso de roedores y lagomorfos, los animales se sacrificaron en los propios laboratorios de Fisiología de la Universidad de Murcia.

Tras el sacrificio de los animales en matadero (hembras de ungulados) se recogieron los ovarios y se trasladaron al laboratorio de Fisiología Veterinaria de la Universidad de Murcia en el menor tiempo posible, que supuso menos de 3 horas desde el inicio del sacrificio.

El material biológico se transportó en el interior de un termo en solución salina fisiológica (SSF) al 0'9 % de cloruro sódico (p/v) (NaCl; S-9888) suplementada con 100 mg/ml de sulfato de kanamicina (K-1377) a 38-38'5°C.

5.1.1.3. Lavado

Los ovarios procedentes de animales sacrificados en el laboratorio (lagomorfos y roedores) se lavaron con SSF al 0'9 % de NaCl (p/v) con 100 unidades internacionales (UI) de penicilina (P-3032) y 100 µg/ml de estreptomomicina (S-9137).

Una vez en el laboratorio, los ovarios procedentes de matadero se lavaron una vez con una solución al 0'04 % (p/v) de cetrimida (CETAB, H-5882) y dos veces en el mismo tipo de SSF usado para los roedores y lagomorfo.

Los medios de transporte y lavado usados para el material procedente de matadero se atemperaron a 38'5°C antes de su uso en una estufa P. Selecta.

5.1.2. OVOCITOS

Los medios utilizados para la selección y recogida de los ovocitos fueron diferentes según la especie empleada.

Previamente al uso de los tampones de selección y manipulación de ovocitos, éstos se atemperaron a 38'5 °C en una estufa (Edelstahl rost Frei; Alemania).

5.1.2.1. Coneja (*Oryctolagus cuniculus*)

Cinco hembras adultas de conejo de unos 18 meses de edad, donadas por el departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de esta misma Universidad, fueron sometidas a estimulación folicular para la obtención de ovocitos.

Las conejas se encontraban alojadas en jaulas individuales bajo ciclos naturales de luz-oscuridad a temperatura ambiente.

Estos animales recibieron una primera inyección intramuscular de 40 UI de gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG, SincopartTM, Ceva Salud Animal S.A. Barcelona), para estimular el desarrollo folicular. 48 horas más tarde se les suministró una segunda inyección de 40 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Laboratorios Intervet S.A.) para la inducción de la ovulación.

Las hembras fueron sacrificadas mediante inyección intra vascular de pentotal sódico (Pentotal sódico polvo vial 1G, Braun medical S.A.) 14 horas después de la estimulación con la hCG, de modo que evitamos que los animales ovulasen, proceso que se suele producir a las 17-19 horas de la administración de hCG.

El contenido de los folículos estimulados se extrajo mediante la disección superficial de los ovarios (figura 6) con hojas de bisturí lavándose repetidamente con varios mililitros (ml) de tampón Dubecco's Phosphate Buffered Saline, (DPBS, D8662)

suplementado a 1 mg/ml con alcohol polivinilo (PVA, P8136) y 0'005 mg/ml de rojo fenol (RF, Panreac, 171615; DPBS-PVA-RF). Toda esta actuación se realizó sobre placas de Petri colocadas sobre placa calefactora a 38°C.

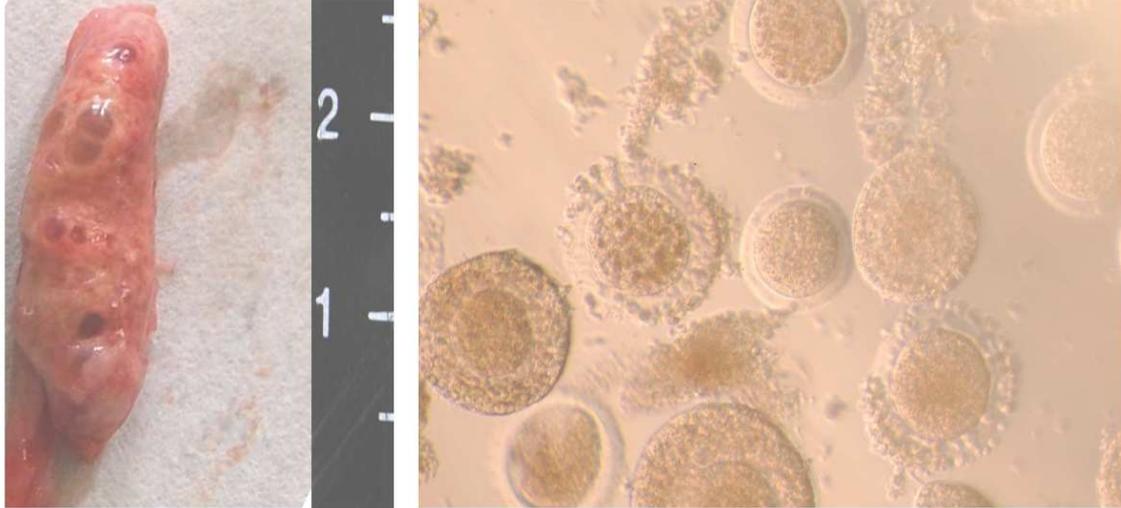


Figura 6. a) Ovario de coneja. b) Ovocitos en diferentes estadios procedentes de ovario de coneja.

5.1.2.2. Ratona (*Mus musculus*)

Ocho hembras adultas de ratón de la cepa C57 de entre 12-16 semanas de edad procedentes del animalario de la Universidad de Murcia se usaron para esta experiencia.

Las ratonas se encontraban alojadas en una jaula compartida y mantenidas en una sala con el ciclo de luz-oscuridad controlado con periodos de luz constantes de doce horas (desde las 08:00 hasta las 20:00 horas) y a temperatura ambiente.

Estas hembras fueron sometidas a estimulación folicular para la obtención de ovocitos mediante una primera inyección subcutánea de 5 UI de PMSG y 48 horas más tarde se les suministró una segunda inyección, en este caso de 5UI de hCG para la inducción de la ovulación.

Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de CO₂ 20 horas después de la inyección de hCG. Con esto evitamos que los animales ovulasen, proceso que se suele producir a las 24 horas de la administración de hCG.

Los ovocitos se extrajeron de los ovarios (figuras 7a y 7b) siguiendo el procedimiento usado en coneja.

5.1.2.3. Rata (*Rattus norvegicus*)

Ocho hembras adultas de rata de la línea Wistar de entre 12-16 semanas de edad procedentes del animalario de la Universidad de Murcia fueron sometidas a estimulación folicular.

Las ratas se encontraban alojadas en una jaula compartida y mantenidas en una sala con el ciclo de luz-oscuridad y temperatura igual al descrito para las ratonas.

Estas hembras fueron sometidas a estimulación folicular para la obtención de ovocitos mediante una primera inyección subcutánea de 15 UI de PMSG y 48 horas más tarde se les suministró una segunda inyección, en este caso de 15 UI de hCG para la inducción de la ovulación.

Las ratas fueron sacrificadas mediante sobredosis de CO₂ 17 horas después de la inyección de hCG y los ovocitos (figuras 7c y 7d), en este caso ovulados (ya que ovulan unas 13-14 horas tras la inyección de hCG), se extrajeron del oviducto.

Las ratas poseen un pseudogen de la proteína oviductina (OVGP1) lo que significa que esta proteína no puede ser sintetizada por el epitelio oviductal. Esto nos permite recoger los ovocitos ovulados de la ampolla oviductal puesto que no van a entrar en contacto en ningún momento con la proteína OVGP1, no interfiriendo así en nuestros análisis.

5.1.2.4. Hámster (*Mesocricetus auratus*)

Para nuestra experiencia ocho hembras adultas de hámster de entre 12-16 semanas de edad, procedentes del animalario de la Universidad de Murcia, fueron sometidas a estimulación folicular para la obtención de ovocitos.

Los animales se encontraban alojados en una jaula compartida y mantenidos en una sala con el ciclo de luz-oscuridad y temperatura igual al descrito para las ratonas y ratas.

Estas hembras recibieron una primera inyección subcutánea de 25 UI de PMSG para la estimulación del crecimiento folicular y 48 horas más tarde se les suministró una segunda inyección, en este caso de 25 UI de hCG para la inducción de la ovulación.

Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de CO₂ 14 horas después de la estimulación con la hCG. Con esto evitamos que los animales ovulasen, proceso que se suele producir a las 17 horas de la administración de hCG.

Los ovocitos se extrajeron de los ovarios (figuras 7e y 7f) siguiendo el procedimiento usado en conejo y ratona.

Los complejos cúmulo ovocito (CCO) de los lagomorfos y roedores estimulados se seleccionaron sobre placas de Petri con DPBS-PVA-RF colocadas sobre placa calefactora.

Todos los animales tuvieron libre acceso a comida y agua y se mantuvieron y manipularon según el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 252, de 21 de octubre de 2005, página 34367) y según la Ley 8/2003, de 24 de Abril de sanidad animal.

5.1.2.5. Cerda (*Sus scrofa*)

Los CCOs se extrajeron de folículos antrales de tamaño comprendido entre 3 y 6 milímetros (mm) de diámetro, mediante aspiración con jeringa y aguja de 18 G. Cada 5 minutos el contenido de la jeringa se depositó en el interior de tubos colocados en gradillas que permitían el contacto de los tubos con la placa calefactora, donde se dejaron sedimentar para la formación de un precipitado de CCOs.

Una vez formado ese precipitado se retiró con una pipeta Pasteur el fluido folicular sobrenadante y se adicionaron varios mililitros (ml) de DPBS-PVA-RF. Tras su homogeneización el contenido se depositó en el interior de placas de Petri colocadas

sobre platinas calefactoras. Los CCOs de la especie porcina se seleccionaron en DPBS-PVA-RF.

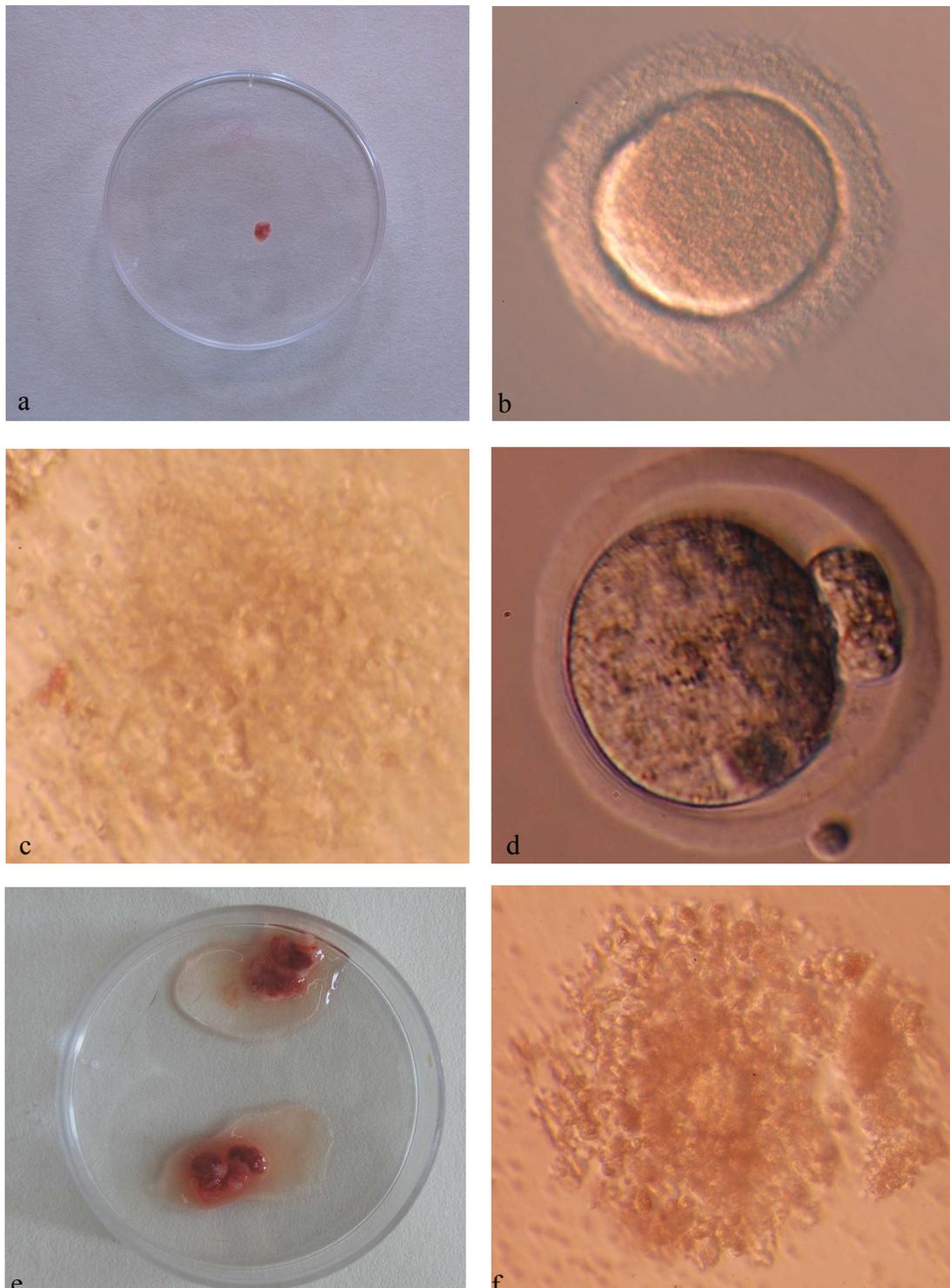


Figura 7. a) Ovario de ratona. b) Ovocito ovárico de ratona sin células de la granulosa. c) Ovocito tubárico de rata con células de la granulosa. d) Ovocito tubárico de rata sin células de la granulosa. e) Ovarios de hámster. f) Ovocito ovárico de hámster con células de la granulosa.

De los CCOs que se obtuvieron sólo se usaron para los experimentos aquellos que poseían un ovocito con citoplasma homogéneo y 3 o más capas completas de células del cúmulo alrededor.

5.1.2.6. Vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*) y cabra (*Capra hircus*).

Una vez lavados los ovarios, se procedió a la extracción de los CCOs de los folículos antrales de tamaños comprendidos entre 3 y 6 mm de diámetro, mediante aspiración con jeringa y aguja de 18 G. Los CCOs de las especies bovina, caprina y ovina se seleccionaron en un medio de colección de ovocitos (MCO) que consistió en medio TCM-199 con sales de Hanks y L Glutamina a pH 7.4 suplementado según se especifica en la tabla 4.

TABLA 4.	
MEDIO DE COLECCIÓN DE OVOCITOS (MCO).	
Componente	Concentración
Medio TCM-199 con sales de Hanks y L Glutamina (M0393)	
Bicarbonato sódico (S-5761)	4.20 mM
Hepes (H-4034)	10.00 mM
Suero fetal bovino (Novalteck; 14-501)	2.00 % (v/v)
Glutamina (G-8540)	200.00 mM
Penicilina (P-3032)	10.000 UI/ml
Estreptomicina (S-9137)	10.000 UI/ml
Polivinilalcohol (PVA ,P-8136)	0.005 g/l
Heparina (Analema, Vigo, España)	6µl/ml

Previamente a la recogida de los CCOs, las jeringas se rellenaron parcialmente de este medio de colección para evitar la agregación de los mismos. Al medio de colección se le adicionó anticoagulante heparina para evitar la formación de agregados del material.

El contenido de esas jeringas se vació a intervalos de tiempo de 5 minutos (para que los ovocitos no se enfriaran) y se depositó sobre placas de Petri colocadas sobre platina calefactora. De los CCOs que se obtuvieron sólo se usaron para los experimentos aquellos que poseían las mismas características mencionadas para la especie porcina.

5.1.3. ZONAS PELÚCIDAS

Los ovocitos humanos fueron obtenidos de la clínica de reproducción humana asistida “Tahe fertilidad” de Murcia. Estos ovocitos proceden de fallos de fecundación y de ovocitos inmaduros. Estos ovocitos fueron obtenidos tras el correspondiente consentimiento informado de las pacientes. Los ovocitos fueron recogidos en agua y almacenados congelados a -80°C . Posteriormente y previo a su uso para la obtención de las zonas pelúcidas (ZPs, figura 8), los ovocitos se lavaron en



Figura 8. ZPs de ovocitos porcinos madurados *in vitro*.

DPBS y se aspiraron y expulsaron de modo continuado en el mismo tampón usando una pipeta de vidrio de diámetro adelgazado mediante calor. El diámetro de la pipeta fue menor que el de los ovocitos por lo que éstos se rompían permitiendo separar las ZPs del resto de los ovocitos.

Las ZPs obtenidas se lavaron varias veces en el mismo tipo de tampón para más tarde usarlas en el tratamiento correspondiente.

5.1.4. OVIDUCTOS Y FLUIDO OVIDUCTAL

Los oviductos de las especies bovina, porcina, ovina y caprina se obtuvieron de los mismos mataderos mencionados anteriormente para la obtención de los ovarios.

Tras el sacrificio de los animales, los oviductos se trasladaron al laboratorio mantenidos en frío. Una vez en el laboratorio se clasificaron según la morfología ovárica (figura 9) en fase folicular temprana y tardía para las hembras prepúberes y en

fase folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía para las hembras adultas.

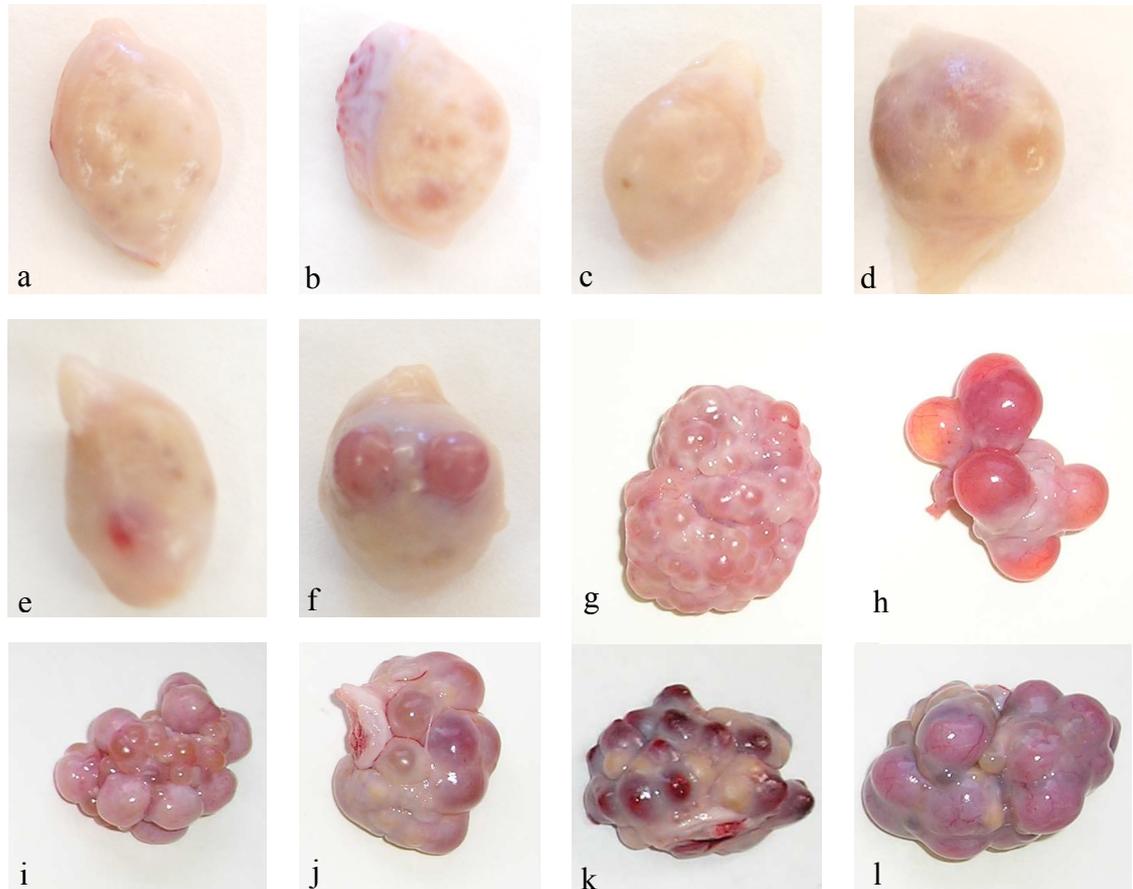


Figura 9. Ovarios ovinos clasificados según Carrasco, Coy *et al.*, 2008. Ovocitos porcinos clasificados y obtenidos de Carrasco, Romar *et al.*, 2008). Ovarios ovinos de a hasta f y ovarios porcinos de g hasta l. a y g) Ovarios de hembras prepúberes en fase folicular temprana. b y h). Ovarios de hembras prepúberes en fase folicular tardía. c e i) Ovarios de hembras adultas en fase folicular temprana. d y j) Ovarios de hembras adultas en fase folicular tardía. e y k) Ovarios de hembras adulta en fase luteal temprana. f y l) Ovarios de hembras adultas en fase luteal tardía.

Los fluidos oviductales que se utilizaron en los test homólogos o heterólogos pertenecían a hembras adultas en la fase folicular tardía. Esta fase se caracteriza por un predominio de un folículo o varios bien desarrollados a punto de ovular, según la especie. Si la especie es monotoca como la vaca o la yegua, se desarrolla solo un folículo en cada ciclo estral, mientras que si la especie es politoca como la coneja, la ratona, la rata, el hámster o la cerda, desarrollará varios folículos (10-15 en el caso de la

cerda) dando lugar a varios descendientes si son fecundados los ovocitos correspondientes. La oveja y la cabra son especies clasificadas como monotocas pero con frecuentes partos gemelares, por lo que se ovulan 2 ovocitos con frecuencia.

Los oviductos procedentes de conejo se recogieron tras el sacrificio de los animales en el laboratorio y previa estimulación del desarrollo folicular y ovulación tal y como se detalla anteriormente.

Una vez clasificados los oviductos se lavaron dos veces en solución salina con cuidado de que no entrase en ningún momento esta solución por la ampolla oviductal y en frío, sobre una placa de Petri, se fue separando el oviducto del mesosalpinx.

Posteriormente, el oviducto se dispuso de modo que con la yema de los dedos se pudiera presionar y deslizar el contenido desde la zona del istmo hacia la ampolla, con el fin de arrastrar el fluido oviductal y almacenarlo en la luz de la ampolla oviductal donde todo el fluido del oviducto fue recogido por aspiración con una pipeta automática y depositado en un tubo tipo Eppendorf con inhibidor de proteasas (complete Mini, EDTA-free, referencia 11 836 170 001, Roche) en cantidad que dependió del volumen obtenido (1µl de solución 10X por cada 10µl de fluido oviductal).

La recogida de fluido oviductal procedente de varias hembras (8-10) sacrificadas el mismo día nos permitió obtener muestras representativas de la especie.

Posteriormente esta mezcla se centrifugó a 7.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante libre de restos celulares que se distribuyó en cantidades alícuotas y congeló a -80°C hasta el día de uso.

5.2. MADURACIÓN *IN VITRO*.

Previamente a su uso, todos los medios de cultivo se equilibraron durante varias horas en un incubador (Heraeus instrument, Function line, BB16; Alemania) a 38'5°C y 5'5 % de CO₂.

Los medios de maduración de todas las especies fueron esterilizados mediante filtración haciéndolos pasar a través de una membrana de 0'22 µm de diámetro de poro (Millipore corporation, Bedford, Massachussets, EEUU).

Los CCOs se pusieron a madurar en grupos de 50 en 500 µl del medio de maduración a 38'5°C bajo 5% CO₂ y al 100% de humedad.

5.2.1. ESPECIE PORCINA

Los CCOs se lavaron una vez en DPBS-PVA-RF y dos veces más en el medio de maduración de ovocitos porcinos o NCSU-37.

Los ovocitos se pusieron a madurar en el de medio de maduración NCSU-37 suplementado (Tabla 5), con 1mM de dibutiril AMP cíclico (dbAMPc , Fluka, 34988), 10UI/ml de PMSG y 10 UI/ml de hCG durante 22 horas. Pasado ese tiempo los ovocitos se lavaron y se depositaron finalmente en medio de maduración carente de dbAMPc, PMSG y hCG, donde permanecieron durante 20 horas más en las mismas condiciones (Funahashi y Day, 1993).

TABLA 5.	
MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS PORCINOS (NCSU 37).	
Componente	Concentración (mM)
Cloruro de sodio (S-9888)	108'73
Bicarbonato sódico (S-5761)	25'07
Cloruro potásico (P-5405)	4'78
Dihidrogeno fosfato de potasio (P-5655)	1'19
Sulfato de magnesio heptahidratado (M-1880)	1'19
Cloruro calcico dihidratado (C-7902)	1'70
Glucosa (G-7021)	5'55
Glutamina (G-8540)	1'00
D- Sorbitol (S-3889)	12'00
Penicilina G (P-3032)	0'18
Estreptomina (S-9137)	39'00 UI/ml

Suplementos	Concentración
Cisteína (C-7352)	0'57 mM
β-mercaptoetanol (M-7154)	50'00 μM
Insulina (I-6634)	5'00 mg/l
Fluido folicular Porcino (PFF)	10'00 % (v/v)
dbAMPc (Fluka, 34988)	1'00 mM
PMSG (Sincopart TM , Ceva Salud Animal S.A. Barcelona)	10'00 UI/ml
hCG (Laboratorios Intervet S.A.)	10'00 UI/ml

5.2.2. ESPECIE BOVINA, CAPRINA Y OVINA

En este caso, el medio de maduración usado fue el Medio TCM-199 modificado con sales de Earle y suplementado según se especifica en la tabla 6, donde los COCs permanecieron durante 22 horas.

TABLA 6. MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS, CAPRINOS Y OVINOS.	
Componente	Concentración
Medio TCM-199 con sales de Earle y Glutamina (M-0393)	
L Glutamina (G-8540)	2'00 mM
Piruvato de sodio (P-2256)	0'20 mM
Suero fetal bovino (Novalteck, 14-501)	10'00 % v/v
Gentamicina (G-1272)	50'00 μg/ml
PMSG (Sincopart TM , Ceva Salud Animal S.A. Barcelona)	1.000UI/ml
hCG (Laboratorios Intervet S.A.)	1.000UI/ml

5.3. INCUBACIÓN EN FLUIDO OVIDUCTAL

5.3.1. OVOCITOS

Los CCOs tubáricos de ratas y los ováricos de conejo, hámster y ratón fueron decumulados usando hialuronidasa (1 mg/ml, S-3506) y lavados posteriormente varias veces en DPBS-PVA-RF.

Los ovocitos madurados *in vitro* de las especies bovina, caprina, ovina y porcina fueron decumulados mecánicamente con una pipeta automática y lavados varias veces en DPBS- PVA-RF.

Posteriormente, los ovocitos se incubaron en gotas de fluido oviductal (FO) a razón de 1 ovocito por cada microlitro (μ l) de FO (figuras 10 y 11), en placas cubiertas con aceite mineral que se mantuvieron a 38'5°C bajo 5 % de CO₂ y al 100 % de humedad durante 30 minutos.

En cada experiencia se usó también un grupo control en el que los ovocitos no se trataron con ningún FO. En este caso se mantuvieron en gotas de DPBS-PVA-RF a razón de 1 ovocito por cada μ l de tampón, colocadas en placas cubiertas con aceite mineral sobre placa calefactora a 38° C durante 30 minutos.

5.3.2. ZONAS PELÚCIDAS

Las ZPs que se incubaron en gotas de FO y las ZPs usadas como control se trataron del mismo modo indicado en el apartado anterior para los ovocitos.

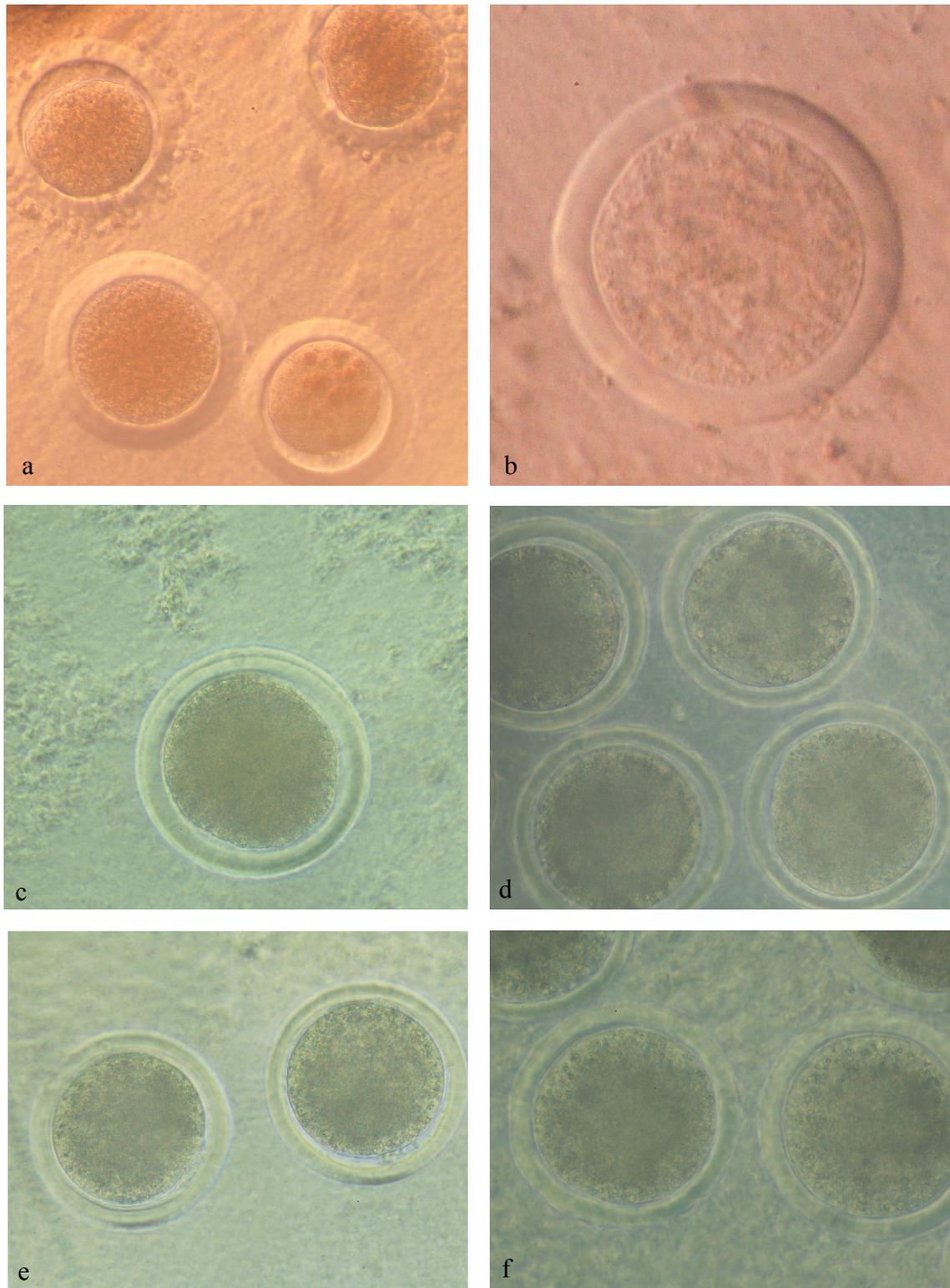


Figura 10. a y b) Ovocitos en FO de coneja. a) Ovocitos ováricos de coneja. b) Ovocito ovárico de hámster. De c hasta f, ovocitos ovinos en diferentes FOs de la fase folicular tardía. c) Ovocito en FO bovino. d) Ovocitos en FO caprino. e) Ovocitos en FO ovino. f) Ovocitos en FO porcino.

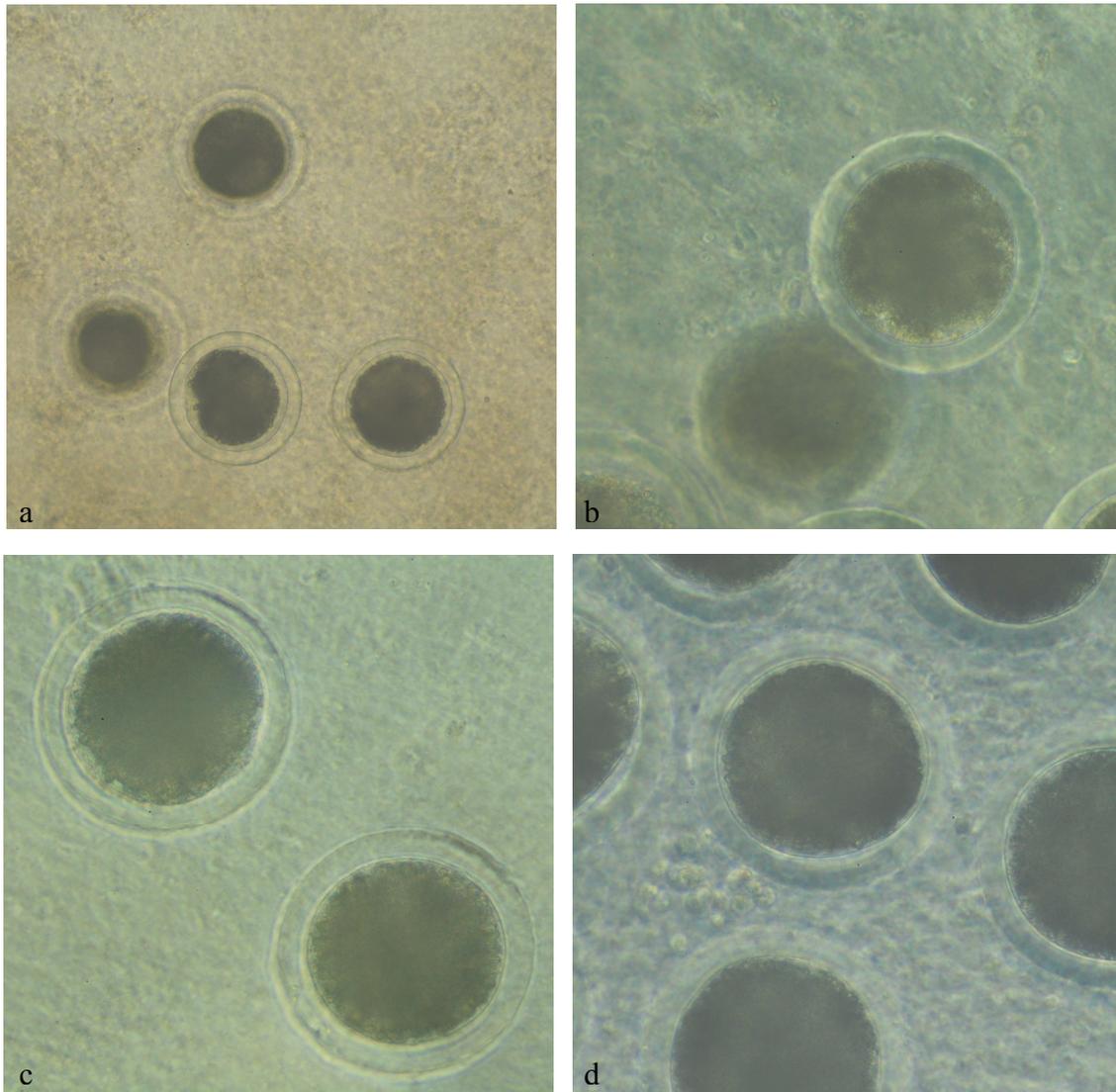


Figura 11. Ovocitos porcinos en diferentes FOs de la fase folicular tardía. a) Ovocitos en FO bovino. b) Ovocitos en FO caprino. c) Ovocitos en FO ovino. d) Ovocitos en FO porcino.

5.4. DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA

El estudio de la resistencia proteolítica de la ZP consistió en analizar el tiempo que tarda la ZP de los ovocitos en digerirse en una solución de pronasa al 0'5 % (p/v) (Protease from *Streptomyces griseus*, P8811) en PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Coy, *et al.*, 2002) a 38°C.

Para conocer el tiempo de digestión de la ZP de los ovocitos no tratados y los tratados con FO, los ovocitos se sacaron del correspondiente tratamiento, se lavaron

rápidamente en DPBS-PVA-RF y se introdujeron en gotas de 50 μ l de la solución de pronasa al 0'5 % (p/v).

El proceso de disolución de las ZPs fue continuamente revisado bajo un estereomicroscopio con una platina calefactora a 38 °C y se fue anotando el tiempo de disolución de cada ZP (tiempo en el que deja de verse por completo la ZP, figura 12) al cual nos referiremos como tiempo de digestión de la ZP.

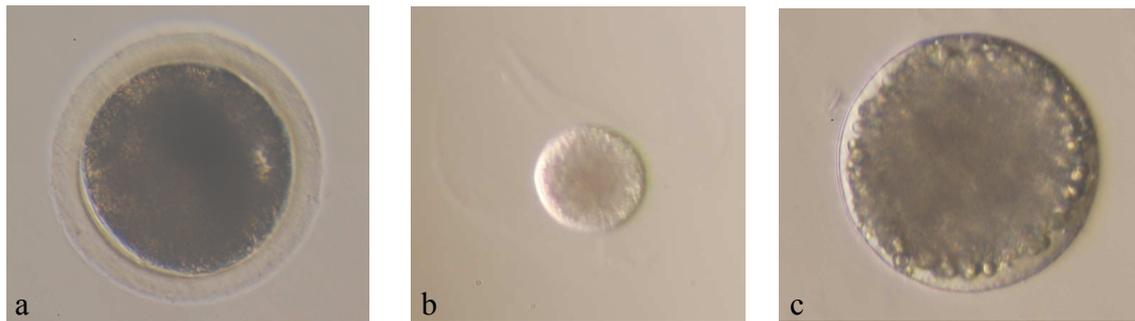


Figura 12. Evolución de la digestión en pronasa al 0'5 %, de la ZP de un ovocito porcino madurado *in vitro*. a) Ovocito denudado en el que se observa la ZP. b) ovocito a menor aumento para mostrar detalle de digestión de la ZP en la pronasa al 0'5 %. c) Ovocito carente de ZP tras el tratamiento con la pronasa.

5.5. OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA MEDIANTE COLUMNA DE HEPARINA

La obtención de diferentes fracciones de una muestra de fluido oviductal bovino (FOB) en fase folicular tardía en base a la capacidad de unión a la heparina se realizó mediante cromatografía líquida en un sistema FPLC modelo Biorad Biologic P. (Biorad, figura 13), equipado con un muestreador automático, bomba capilar, mezclador, dosificador, espectrofotómetro (que mide absorbancia a 280nm), monitor y un carrusel automático de recogida de las fracciones.



Figura 13. Imagen de un sistema de FPLC (Biorad).

Para el fraccionamiento de la muestra de fluido oviductal bovino se usó una columna de 1ml de heparina (Hi Trap™ Heparin HP, 17-0406-01), de la casa comercial GE Healthcare (Amersham Biosciencias, Alemania) que se mantuvo a 4°C en su almacenaje previo y posterior al uso en una solución de etanol al 20 % .

Se usó este tipo de columna para el fraccionamiento del FO bovino debido a que se conoce que los factores responsables del endurecimiento de la ZP son capaces de unirse a heparina (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Además conocemos que la proteína OVGP1 posee grupos arginina y lisina descritos como lugares de unión a heparina y ha sido verificada por otros autores para la obtención de la misma en otras especies (Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000).

La muestra de FO bovino adulto de la fase folicular tardía de un volumen de 2 ml con inhibidor de proteasas se homogeneizó y se centrifugó a 6.000 rpm durante 9 minutos a 4°C; posteriormente, se recogió el sobrenadante que se diluyó en 5 ml de tampón de equilibrado o tampón A. Este tampón A estaba compuesto por Tris-HCl 100 mM y Ácido cítrico 10 mM y tiene un pH de 7´4.

El aparato tiene un volumen muerto de 7 ml por lo que en un principio se introdujo el tampón de equilibrado puro y una vez que éste ha llegado a la columna a velocidad de 1 ml/min para limpiar de solución de almacenaje, se hizo pasar la muestra a esa misma velocidad de 1ml/min. La fracción libre, que fue la fracción de muestra que en este paso no se une a la heparina de la columna, es visible en un monitor en forma de picos de elución gracias al espectrofotómetro integrado del aparato.

Posteriormente, una vez introducida totalmente la muestra en la columna, se siguió pasando a través de ella tampón A hasta que la absorbancia bajó a los niveles iniciales mostrados por este tampón. De este modo nos aseguramos que se lavara la columna y se eluyera todo aquello que no tenía afinidad por la heparina.

Tras lavar bien la columna se hizo pasar el tampón de elución o tampón B en un gradiente de 0-100 %. El Tampón de elución estaba compuesto por Tris-HCl 100 mM, NaCl 2 M, Ácido Cítrico 10 mM y posee un pH de 7´4. Esta fase tuvo una duración de 60 minutos.

Esto se realizó para separar las diferentes proteínas del fluido oviductal en función de su afinidad por la heparina, que vino determinada por la concentración de NaCl necesaria para separarlas de la heparina de la columna, siendo el gradiente de 0 a 2 M de NaCl.

Las fracciones de muestra con proteínas que poseen afinidad por la heparina se recogieron en fracciones de 1ml a partir de una concentración determinada de NaCl.

Esto también fué visible en el momento de la elución gracias al espectrofotómetro del aparato cuyo resultado se visualizó en el monitor en forma de picos de elución.

Una vez seleccionadas las fracciones con proteínas con afinidad por la heparina se filtró cada fracción de muestra en filtros de 10 kDa (Amicon Ultra-4, PLGC Ultracel-PL Membrane, 10 kDa de Millipore) para eliminar las sales procedentes del tampón de elución.

Para la filtración de las muestras se procedió de modo que a cada ml de fracción de muestra se le realizaron 4 lavados con 3 ml de agua bidestilada en cada lavado, mediante ciclos de centrifugación de 20 minutos a 4.000 rpm. Posteriormente, las muestras filtradas fueron liofilizadas en un liofilizador ALPHA 1-2 LDplus de la marca Christ.

A continuación las muestras se resuspendieron con 20 μ l de agua bidestilada y se cuantificó la cantidad de proteínas que contenían.

La cuantificación de la cantidad de proteínas existente en cualquiera de las muestras analizadas se realizó por duplicado. A cada replicado se le añadió una mezcla colorimétrica del kit comercial BCATM Protein assay Kit Prod (Pierce, 23225) que junto con la muestra se mantuvo 30 minutos a 37°C. Posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Boeco, Germany; S-20 Spectrophotometer) a 562 nm de longitud de onda.

La concentración de las muestras se calculó mediante el programa GraphPad PRISM 4 usando como referencia una recta patrón realizada con los datos de absorbancia obtenidos de valores conocidos de concentración de BSA a esa misma longitud de onda y en las mismas condiciones ambientales, también por duplicado.

5.6. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA DEL FLUIDO OVIDUCTAL (BOVINO Y PORCINO)

5.6.1. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Para el estudio de las proteínas de interés presentes en las muestras se procedió a la separación de las mismas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes o SDS-PAGE.

Las muestras se resuspendieron en tampón de carga Laemmli al 1:1 (v/v) (Laemmli, 1970), tabla 7. Este tampón posee β -mercapto-etanol, componente que permite la rotura de los puentes disulfuro de las proteínas.

TABLA 7.	
TAMPÓN DE CARGA.	
Componente	Concentración
Azul de bromofenol (B-0770)	0'01%
Dodecil sulfato sódico (SDS, L-3771)	2'00 %
Tris/HCl pH:6'8 (154563/ Panreac, 181021)	62'50 mM
Glicerol (G-8773)	10'00 %
β -mercapto-etanol (M-7154)	2'50 %

Las muestras mezcladas con Laemmli se calentaron a 95°C durante 5 minutos, en un calefactor para tubos tipo Eppendorf (Biosan, CH-10), para que se produjera la desnaturalización de las proteínas. De este modo, las proteínas se comportan como polianiones que migran en el gel en función de su peso molecular.

Posteriormente las proteínas de las muestras se separaron en geles discontinuos de poliacrilamida (A-3449) basados en un gel concentrador o de carga al 4 % de poliacrilamida y a pH 6'8 (tabla 8) y en un gel separador al 12 % de poliacrilamida y pH 8'8 (tabla 9).

Ambos geles polimerizaron gracias al persulfato amónico y el N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) que contenían.

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente durante un periodo de al menos una hora, periodo que vino determinado por la salida del frente de electroforesis fuera del gel a un voltaje constante de 150 V en tampón de recorrido a pH 8'3 (tabla 10).

En cada gel se colocó al menos un marcador molecular (LC-5925, Invitrogen-Live Technologies, Santa Clara, California, EEUU) compuesto por varias proteínas preteñidas de peso molecular conocido que se corrió en paralelo con las muestras para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas de interés.

Las electroforesis se realizaron usando varios tipos de cubetas de electroforesis Miniprotean®3cell y Miniorotean® tetracell de Biorad, las cuales se usaron unidas mediante electrodos a la fuente de alimentación PowerPac™Basic también de Biorad.

TABLA 8.	
GEL CONCENTRADOR O DE CARGA (5ml).	
Componente	Volumen
Agua Destilada	3'05 ml
Tris HCl 1'5 M (pH 6'5) (154563/ Panreac, 181021)	1'25 ml
SDS 10% (L-4522)	50'00 µl
Acilamida/Bisacilamida al 30% (A-3449)	0'65 ml
Persulfato Amonico 10% (Laboratorios Biorad, 161-0700)	25'00 µl
TEMED (T-9281)	5'00 µl

TABLA 9.	
GEL SEPARADOR (10ml)	
Componente	Volumen
Agua Destilada	3'34 ml
Tris/HCl 1.5M (pH 8.8) (154563/ Panreac, 181021)	2'50 ml
SDS 10% (L-4522)	100'00 µl
Acrilamida-Bisacrilamida al 30% (A-3449)	3'96 ml
Persulfato Amonico 10% (Laboratorios Biorad, 161-0700)	50'00 µl
TEMED (T-9281)	10'00 µl

TABLA 10.	
TAMPÓN DE RECORRIDO (1l)	
Componente	Volumen
Agua ultrapura	1'00 l (volumen final)
Tris (154563)	0'025 M
Glicina (G-8898)	0'192 M
SDS (L-3771)	0'10 % (p/v)

5.6.2. TINCIÓN DE PLATA

El método de tinción de plata muestra en el gel todas las proteínas que se encuentran en la muestra.

Para realizar esta tinción, el gel obtenido tras la electroforesis como se describió anteriormente, se fijó durante 30 minutos en una solución de ácido acético (Guinama, 40917) y metanol (Panreac, 141091) en relación 1:10 (v/v). Posteriormente se realizaron dos lavados de 15 minutos cada uno, siendo el primer lavado en metanol al 50 % y el segundo en agua ultrapura.

Posteriormente el gel se sensibilizó en una solución de tiosulfato sódico al 0'01 % (Fluka, 96692), durante un minuto y posteriormente se eliminaron los restos del mismo mediante dos lavados de un minuto cada uno con agua ultrapura. Tras ello el gel se colocó en una solución de nitrato de plata al 0'1 % (Fluka, 85228) a 4°C durante 20

minutos. Tras dos lavados de un minuto cada uno con agua ultrapura se reveló el gel sumergiéndolo en una solución de carbonato sódico al 2% (Fluka, 71345) y formol al 35% (Fluka, 47630). En esta fase el gel fue continuamente observado hasta la aparición de las diferentes bandas de proteínas. Una vez éstas bandas aparecieron, el gel se fijó en una solución de ácido acético al 5% durante 5 minutos y se mantuvo posteriormente en una solución de ácido acético al 1 % a 4°C.

Todas las fases de esta tinción se realizaron en agitación constante y a temperatura ambiente excepto en la tinción con nitrato de plata.

5.6.3. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS BANDAS.

El análisis por espectrometría de masas se realizó en el Laboratorio de Proteómica de la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

Tras teñir los geles de poliacrilamida con la solución de plata según el protocolo anteriormente descrito, las bandas de interés se recortaron, se lavaron varias veces en agua ultrapura y se congelaron en 1 ó 2 gotas de agua ultrapura.

Posteriormente, en el Laboratorio de Proteómica las muestras se procesaron mediante el siguiente procedimiento estándar:

Las bandas se sometieron a un proceso de desteñido mediante el uso de los componentes incluidos en el Kit ProteoSilver Plus® (PROT-SIL2, Sigma-Aldrich). Posteriormente, se lavaron dos veces con tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8´5 durante 30 minutos a 37°C y otras dos veces con tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8´5 en 50 % de acetonitrilo.

Las bandas se secaron usando un concentrador-evaporador por vacío modelo Eppendorf 5301 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 15-30 minutos y tras ello se incubaron con 50 µl de tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8´5 con tributilfosfina 10 mM (TBP) (T7567, Sigma-Aldrich), a 60°C durante 15 minutos.

Después se eliminó el sobrenadante y se añadieron radicales alquilo a las muestras reducidas para bloquear los grupos -SH libres de las cisteínas mediante la adición de 50 µl de tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8'5 con iodoacetamida 100 mM (IAA) (A3221, Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad.

Posteriormente se eliminó el sobrenadante y las bandas se lavaron primero con tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8'5 y a continuación con tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8'5 en 50% de acetonitrilo, durante 15 minutos a 37°C cada vez.

Después de estos lavados, las bandas se secaron usando un concentrador-evaporador por vacío modelo Eppendorf 5301 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) durante 15-30 minutos. A continuación, las bandas se rehidrataron en tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8'5 que contiene aproximadamente 0'3 µg de Tripsina Grado de Proteómica (T6567, Sigma-Aldrich) durante 45 minutos a 4°C para finalmente ser sometidas a digestión durante 16-18 horas a 37°C en agitación constante.

Pasado este tiempo, la reacción de digestión se detuvo con 0'5% de ácido trifluoroacético (TFA), el sobrenadante se recogió en un tubo nuevo y las bandas se lavaron con 50 µl de una solución al 50 % de acetonitrilo y 0'5 % de TFA durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizó otro lavado con 50 µl de acetonitrilo y 0'5 % de TFA durante 30 minutos a 37°C. Estos lavados permitieron mejorar la extracción de los fragmentos digeridos de las bandas del gel. Después de cada lavado, todos los sobrenadantes procedentes de una misma banda se recogieron en el mismo tubo y se secaron usando concentrador-evaporador por vacío.

La separación y análisis de las digestiones tripticas de las muestras se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC/MS-MS) mediante un sistema que consistió en un HPLC modelo Serie 1.100 de Agilent (Technologies, Santa Clara, California, EEUU), termostatzado y equipado con un muestreador automático y una bomba capilar. Este HPLC se conectó a un espectrómetro de masas tipo trampa de iones modelo Agilent Ion Trap XCT Plus

(Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU) usando una interfase tipo electrospray (ESI).

Las muestras que previamente habían sido secadas mediante el concentrador-evaporador por vacío se resuspendieron en 10 µl de tampón A, el cual consiste en una mezcla de agua ultrapura: acetonitrilo: ácido fórmico (94'9:5:0'1), (v/v) y se inyectaron mediante un flujo de 10 µl/minuto en una columna de HPLC tipo Zorbax SB-C18 (5 µm, 150 × 0'5 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU), la cual se encontraba a 40°C en un compartimiento termostatzado. Después de la inyección de la muestra, la columna se lavó con tampón A durante 10 minutos. Posteriormente los péptidos digeridos se eluyeron de la columna usando un gradiente lineal de 0 a 80 % de un tampón B compuesto por una mezcla de agua ultrapura: acetonitrilo: ácido fórmico (10: 89'9: 0'1; v/v) durante 120 minutos. Los componentes eluidos de la columna se acoplaron en línea al espectrómetro de masas utilizando una fuente electrospray (ESI).

El espectrómetro de masas analizó los iones en modo positivo, con un voltaje en el capilar de 3.500 V y una velocidad de barrido de 8.100 (m/z)/segundo, en el rango de medida desde 300-2.200 m/z. La presión del gas de nebulización (Nitrógeno) se mantuvo en 15 psi, mientras que el gas secante se mantuvo a un flujo de 5 litros/minuto y a una temperatura de 350°C. Los datos de MS/MS se recogieron de forma automatizada, de manera que en cada barrido los cinco iones más intensos se fragmentaron secuencialmente mediante una disociación inducida por colisión (CID) usando helio, con una ventana de aislamiento de 2 m/z de anchura y una energía relativa de fragmentación por colisión del 35 %.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa de análisis LC/MSD Trap Data Analysis Versión 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania) y la búsqueda de coincidencias se llevó a cabo con el motor Spectrum Mill (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU) frente a la versión más actualizada en ese momento de la base de datos NCBIInr.

5.6.5. ANÁLISIS DE DATOS

Para la confirmación de la existencia en el fluido oviductal correspondiente de las proteínas que nos indicó el servicio de proteómica se comprobó que la proteína indicada poseía un peso molecular que coincidía con la banda recortada o con una proteína de mayor peso molecular ya que pudieron haberse producido fenómenos de proteólisis, que el dato de validez de los datos o “score” fuera superior al mínimo indicado por el mencionado servicio y que el péptido indicado coincidía correctamente en la secuencia de la proteína indicada. Posteriormente se identificó la función y localización de cada proteína mediante el uso de varias bases de datos como pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y/o UniprotKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=>).

5.7. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA OVIDUCTAL PORCINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA

5.7.1. RECOGIDA DE MUESTRAS

Para esta experiencia se usaron 4 cerdas híbridas de entre 150 y 200 Kg de peso sacrificadas en el matadero de “El Pozo Alimentación” de Alhama de Murcia.

Todas las muestras usadas procedieron de hembras adultas que se encontraban en la fase folicular tardía mostrando de 6 a 12 folículos de 8 a 12 mm de diámetro. Las muestras se recogieron justo tras el sacrificio, en el momento en el que cada canal fue desprovista del aparato genital, entonces se disecó el oviducto sobre una placa estéril colocada sobre hielo. Una vez identificada la región correspondiente a la unión ampular istmica (figura 14) se seccionó con una hoja de bisturí. La región seleccionada tiene una longitud de 1 cm aproximadamente. Cada muestra oviductal se seccionó longitudinalmente obteniéndose dos porciones equivalentes que se introdujeron en criotubos e inmediatamente se sumergieron en nitrógeno líquido durante unos 3 minutos. Posteriormente las muestras se trasladaron al laboratorio de análisis (iGenomix, Valencia, España) en hielo seco y se mantuvieron hasta su análisis a -80°C.

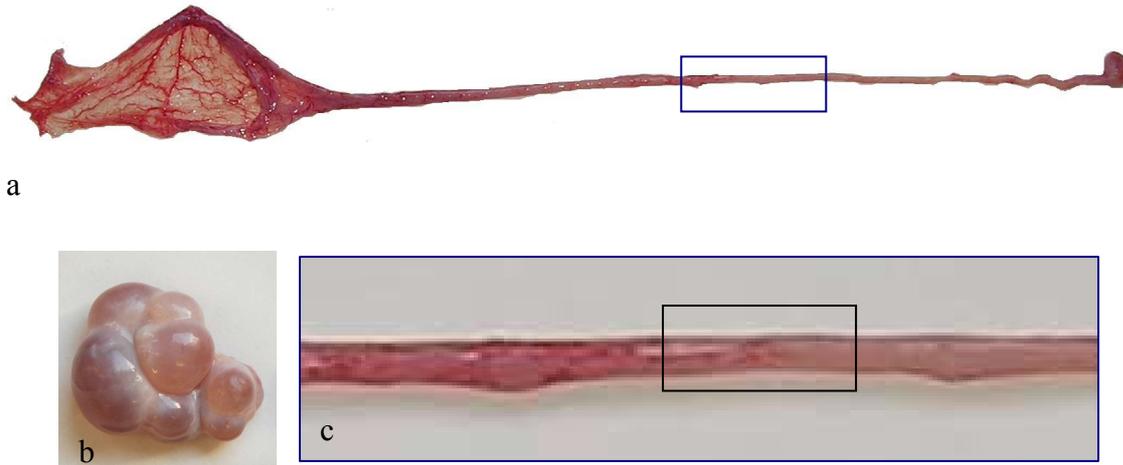


Figura 14. Porciones de genital de hembra porcina adulta en fase folicular tardía. a) Oviducto obtenido de Carrasco *et al.* (Carrasco, Romar *et al.*, 2008). b) Ovario con varios folículos de entre 8-12 mm de diámetro. c) Detalle de la zona unión ampular-istmica.

5.7.2. PROCESAMIENTO Y OBTENCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

5.7.2.1. Extracción del Ácido Ribonucleico (ARN) total.

Para el análisis se procedió a la extracción del ARN total de las muestras mediante el “método TRIzol” (TRIzol®, Invitrogen, Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante y como se indica a continuación.

Tras la adición del TRIzol se añadieron 0’2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de TRIzol, para separar el ARN total del ADN y de las proteínas; esa mezcla fue agitada vigorosamente durante 15 segundos. Tras centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C se transfirió el sobrenadante a otro tubo tipo eppendorf donde se le añadieron 0’5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de TRIzol utilizado en el paso previo y se dejó precipitar la muestra durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 12 minutos a 4°C y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70 % (v/v) en agua con dietilpircarbonato (DEPC-Treated Water, AM9922, Invitrogen, Barcelona, España). Posteriormente el precipitado se resuspendió en 30 µl de agua DEPC.

5.7.2.2. Análisis de la cantidad e integridad del ARN

Una vez extraído el ARN total, éste fue cuantificado y validado para la experiencia.

La calidad e integridad del ARN aislado fue evaluada mediante la utilización del kit comercial ARN 6.000 Nano LabChip®, usando posteriormente el software Agilent 2.100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) para su cuantificación. El parámetro RIN (RNA Integrity Number) (Schroeder, *et al.*, 2.006) fue introducido por Agilent Technologies. Este parámetro permite clasificar el ARN en un sistema numérico del 1 al 10, siendo el 1 el más degradado y el 10 el más íntegro. Sólo las muestras con un RIN superior a 7'0 fueron utilizadas.

5.7.2.3. Hibridación con micromatrices

La hibridación se realizó usando una micromatriz (*microarray*) de expresión génica porcina (Agilent Technologies, Madrid, España), la cual abarca 43.803 sondas de Ácido desoxiribonucleico (ADN) (Porcine (V2) 4x44K).

A partir del ARN obtenido se obtuvo ADNc (ADN complementario) que fue marcado con Cy-3 (kit de marcaje Quick-AMP de Agilent Technologies, Madrid, España). El ADNc fue transcrito a ARNc (ARN complementario) y éste se fragmentó en trozos con un rango de 35 a 200 bases. Las muestras de ARNc fragmentado se hibridaron con la micromatriz mediante incubación con rotación constante durante 17 horas a 65°C.

Posteriormente la micromatriz se lavó dos veces durante 1 minuto con tampones de lavado, para eliminar uniones inespecíficas. Las micromatrices hibridadas con los ARNc marcados fueron escaneados en el escáner óptico Axon 4.100A (Molecular Devices, Sunnyvale CA, EE.UU.) y los datos fueron extraídos con el software GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices, Sunnyvale CA, EE.UU.).

5.7.2.4. Análisis de los datos

Para el análisis de la imagen de la micromatriz y el cálculo de las medidas de intensidad de los spots (cada uno de los puntos que contiene una sonda o conjunto de sondas iguales) se utilizó el software GenePix Pro 6.0.

Los resultados procedentes de los spots de la micromatriz fueron analizados mediante métodos estadísticos bioinformáticos como Análisis de Componentes Principales (PCA). Para el PCA se normalizaron los datos de expresión de los spots y se agruparon jerárquicamente mediante el software MeV 4.2.02 (<http://www.tm4.org>) usando el coeficiente de correlación de Pearson como la medida de similitud y para el estudio de los genes se utilizaron las bases de datos DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) e Ingenuity (www.ingenuity.com/).

5.8. DISEÑO EXPERIMENTAL

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en 3 fases experimentales. En estos experimentos se estudió la capacidad que posee el FO en fase folicular tardía de diferentes especies para producir un incremento de la resistencia a la digestión enzimática (RDE) de la ZP de modo homólogo (analizando cómo afecta sobre la ZP del ovocito el FO procedente de la misma especie) y heterólogo (analizando cómo afecta sobre la ZP de un ovocito el FO procedente de otra especie). Las moléculas implicadas en esta RDE se deben unir a heparina o a otros glicosaminoglicanos como ha sido descrito previamente (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) por lo que también se estudió el comportamiento del FO bovino en fase folicular tardía cuando se fracciona mediante columna de heparina en base a su interacción con la misma. Por otro lado, para conocer con mayor detalle el microambiente oviductal se realizó un estudio de la composición proteica de los fluidos oviductales porcinos y bovinos en la fase folicular tardía y de la genómica oviductal en la unión ampular-ístmica en esa misma fase del ciclo.

5.8.1. FASE EXPERIMENTAL 1. ANÁLISIS DEL EFECTO QUE PRODUCE EL FLUIDO OVIDUCTAL DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN USANDO LA ENZIMA PRONASA

Para esta primera fase experimental se usaron una serie de controles del procedimiento.

Todos los análisis con pronasa se realizaron en gotas de 50µl de enzima al 0'5% en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺.

5.8.1.1. Análisis de la cinética enzimática de la enzima pronasa

El grado y tipo de actividad de la enzima pronasa se analizó mediante dos diseños experimentales.

Estos estudios surgieron para poner solución a un problema planteado en algunos análisis de RDE en los que ZPs de ovocitos que habían sido tratados 30 minutos con una muestra de fluido oviductal se podían encontrar en pronasa durante periodos de tiempo de más de un mes sin llegar a digerirse. Por lo tanto, existía la posibilidad de que la enzima pronasa pasado un tiempo ya no fuera activa y se debiera de tener en cuenta un periodo concreto de recogida de muestras, en lugar de hacerlo de modo indefinido como se estaba realizando hasta el momento.

5.8.1.1.1. Efecto del tiempo de permanencia de la enzima en incubación sobre su actividad en la digestión de la zona pelúcida

Para conocer si el tiempo tenía algún efecto sobre la actividad de la enzima y cesaba por ello la proteólisis sobre nuestras muestras (ZP) se colocaron 13 gotas de 50µl de pronasa en placas cubiertas con aceite mineral que se mantuvieron en el incubador a 38'5°C bajo 5% CO₂ y al 100% de humedad durante todos los días que duró la experiencia. La actividad de la pronasa fue analizada en un periodo total de 17 días. Para ello se analizó su capacidad proteolítica para 10 ZP porcinas cada 24 ó 72 horas, usando una gota intacta en cada ocasión.

5.8.1.1.2. Efecto de la dilución de la solución enzimática y/o del gasto enzimático sobre la capacidad de digestión de la zona pelúcida

Para analizar el posible efecto de disminución en la capacidad proteolítica por la dilución de la enzima en la incorporación de las muestras y si la enzima “se agotaba”, se colocó una gota de 50 µl de pronasa en una placa cubierta con aceite mineral que se mantuvo en el incubador a 38´5°C bajo 5 % CO₂ y al 100 % de humedad, durante todos los días que duró la experiencia. En este caso se analizó la actividad de la pronasa de esta gota durante un periodo total de 17 días introduciendo en la misma 10 ZP cada 24 ó 72 horas.

5.8.1.2. Análisis de la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de cerda en diferentes diluciones del fluido oviductal bovino en fase folicular tardía

Para conocer cómo el análisis de RDE de la ZP producido por un FO se veía afectado por la dilución de dicha muestra, lo cual se puede producir cuando se usa el FO como suplemento en diferentes medios, se realizaron diferentes diluciones (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 y 1:60) de dos muestras iniciales de FO bovino en fase folicular tardía en DPBS.

Se usaron dos grupos controles uno sin tratar con ninguna dilución y otro control de la actividad del FO bovino usando una muestra de cada uno de los FO bovinos estudiados sin diluir.

Se analizaron un total de 200 ovocitos porcinos divididos en dos grupos de 100 por cada fluido y en subgrupos de incubación de 10 ovocitos. Posteriormente se observó el tiempo de digestión de la ZP de los ovocitos mediante análisis de digestión con la enzima pronasa.

El programa usado para el análisis de los todos los resultados estadísticos de esta tesis fue el SPSS versión 15 para Windows. Los resultados se mostrarán en minutos u horas dependiendo de los resultados obtenidos para simplificar la comprensión de los

datos. Los resultados de la variable estudiada (tiempo de digestión de la ZP con pronasa) de este primer diseño experimental se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza ANOVA y cuando este test reveló efectos significativos, se compararon mediante la prueba post hoc DHS de Tukey, considerando como diferencias significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad $P < 0.05$.

5.8.1.3. Efecto relativo de la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de nueve especies diferentes (coneja, ratona, rata, hámster, mujer, cerda, vaca, oveja y cabra) mediada por el fluido oviductal de cinco especies diferentes (cunícola, porcina, bovina, ovina y caprina) en la fase folicular tardía

Este experimento se diseñó tras realizar un análisis preliminar de la capacidad de RDE prefecundación, mediante análisis de digestión con la enzima pronasa, de los FO procedentes de diferentes especies de animales, de diferente edad y en diferente fase del ciclo estral. La mayoría de los FO analizados (porcino, bovino, ovino y caprino) que producían RDE prefecundación, lo hacían en mayor o menor grado en todas sus edades (prepúber y adultas) y en todas las etapas del ciclo estral en adultas con la excepción de la especie porcina que sólo lo produce en muestras de hembras adultas en la fase folicular tardía y en algunas en la fase luteal temprana. En la fase luteal temprana el contenido oviductal se puede ver modificado por fluidos de otras porciones, por ello para este análisis se usó en todos los casos FO en fase folicular tardía de hembras adultas.

En este estudio se analizó también la capacidad relativa que tiene un FO de una especie determinada de producir RDE en la ZP de otras especies debido a que en todos los estudios se ha usado el mismo FO de partida (figura 15).

Para este estudio se usaron lotes de FO en fase folicular tardía de las especies lagomorfa, porcina, bovina, ovina y caprina.

La capacidad de producir RDE prefecundación de la ZP para cada uno de estos lotes fue analizada mediante la enzima pronasa.

Se analizaron en esta experiencia un total de 559 ovocitos de diferentes especies y 50 ZPs humanas, por lo que se analizaron un total de 609 ZPs.

Para cada una de las incubaciones con los diferentes FO se usaron grupos mínimos de 10 ovocitos con algunas excepciones. Los grupos en los que la cantidad de ovocitos obtenidos llevó a la ligera reducción de la muestras fueron el de ratón (para los que se usaron grupos de 7 y 10 ovocitos) y el humano (para los que se usaron grupos de 7 y 9 ovocitos).

En este caso, los resultados de la variable estudiada, tiempo de digestión de la ZP producida por la enzima pronasa, se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). En primer lugar se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías analizando por un lado el tipo de ovocito y por otro el tipo de FO y cuando este test reveló efectos significativos, se compararon mediante la prueba post hoc DHS de Tukey, considerando como diferencias significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad $P < 0'001$.

Para simplificar la comprensión de los resultados se realizó posteriormente un análisis de la varianza de una vía y el post hoc DHS de Tukey, considerando como diferencias significativas aquellas que alcanzaron niveles de probabilidad de $P < 0'05$.

Los test analíticos del ANOVA de una vía se orientaron a analizar los efectos en dos sentidos, el análisis de los efectos producidos tomando como factor de variación el tipo de FO y el análisis de los efectos tomando como factor principal el tipo de ovocito/ZP.

5.8.1.3.1 Análisis del efecto producido por cinco tipos de fluido oviductal en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de diferentes especies

Este análisis se orientó a determinar los efectos producidos por cada uno de los tratamientos realizados a los ovocitos de las diferentes especies. Es decir, si un mismo FO producía el mismo efecto o no a todos los ovocitos de las especies estudiadas. Este análisis se realizó comparando los resultados obtenidos en la enzima pronasa tras las

incubaciones de los ovocitos en los diferentes FOs con el resultado en la pronasa ofrecido por el grupo control. El grupo control es el grupo de ovocitos que no habían sido tratados con ningún FO y representó la RDE normal de este ovocito obtenido *in vitro* o *in vivo* (dependiendo de la especie que estemos tratando en cada caso), para una $P < 0.05$.

5.8.1.3.2 Análisis del efecto producido en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de nueve especies diferentes por el fluido oviductal de cinco especies diferentes

Este análisis estadístico está orientado a determinar los efectos que producen los diferentes FOs estudiados en los ovocitos de cada una de las especies usadas, es decir, si una especie responde igual o no a los diferentes FOs analizados.

5.8.1.4. Análisis de la resistencia a la digestión por pronasa de la zona pelúcida de ovocitos porcinos incubados con fluido oviductal carente de oviductina

En trabajos previos de nuestro laboratorio (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), hemos demostrado que en la RDE prefecundación se encuentra implicada la proteína oviductina (OVGP1). Todos los FOs analizados previamente poseen dicha proteína. La yegua y la rata son animales que poseen un pseudogen para la OVGP1 por lo que no la producen en su oviducto (Mugnier, Kervella *et al.*, 2009) y por lo tanto no aparece en su FO. El uso de este FO sin OVGP1 nos indicará si esta es una proteína o no imprescindible para la producción de la RDE.

En este estudio se incubaron ovocitos madurados *in vitro* de cerda en FO de yegua (FOY) procedente de dos hembras adultas, en la fase folicular tardía, en una relación 1 ovocito/1 μ l de FO. Para esta experiencia también se usó un grupo control en la que los ovocitos de cerda no se incubaron en ningún fluido oviductal.

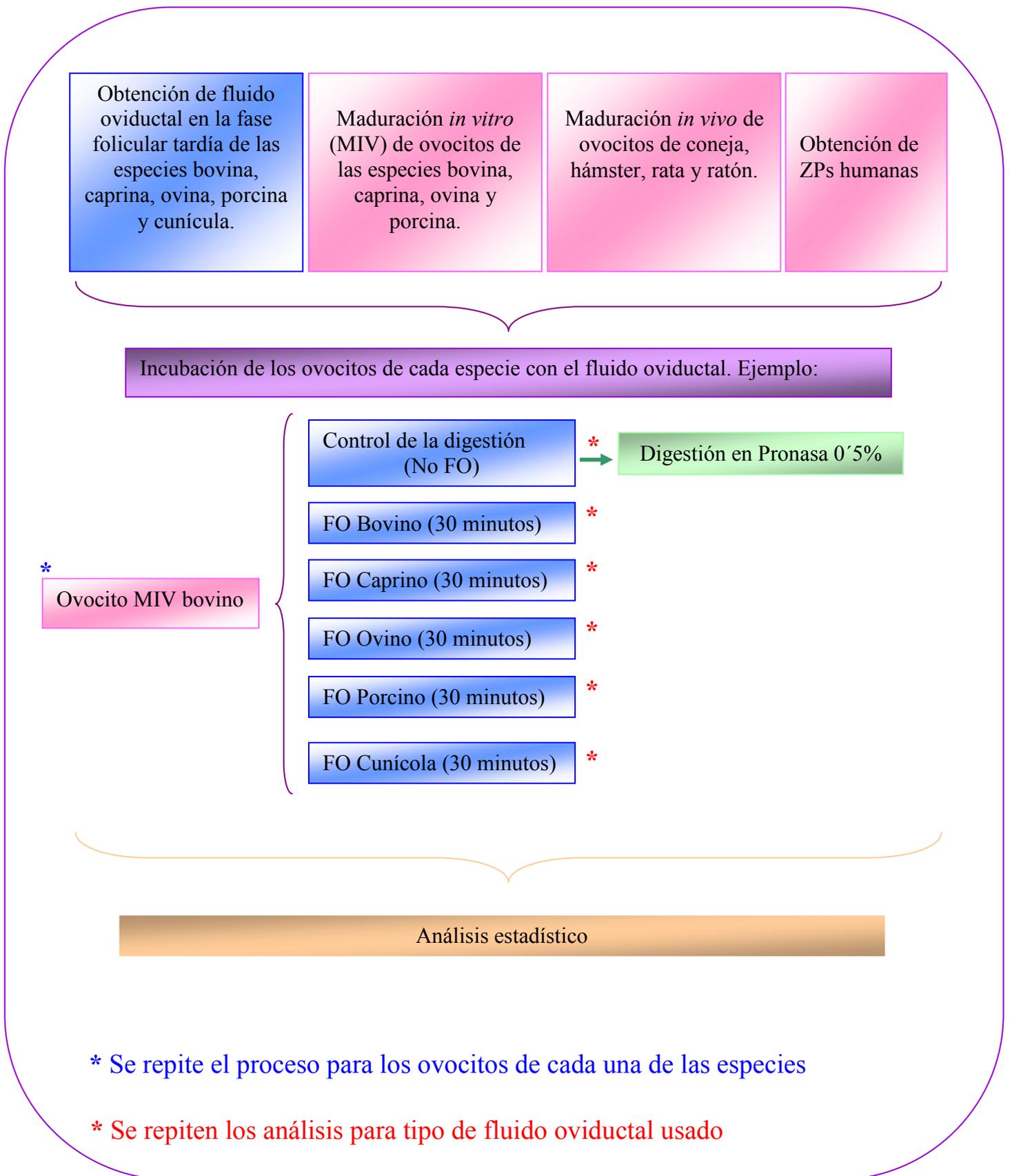


Figura 15. Esquema de la fase experimental 1.

5.8.2. FASE EXPERIMENTAL 2. OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HEPARINA Y ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS MISMOS SOBRE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LA ZONA PELÚCIDA

Para este estudio se realizaron 3 replicados en los que se usaron 2 ml de FO bovino en fase folicular tardía en cada uno de ellos. En cada experiencia se usó una columna de heparina de 1 ml. En esta fase experimental se pueden diferenciar varios apartados (figura 16).

5.8.2.1. Cromatografía de afinidad

En esta fase se obtuvieron diferentes fracciones de un fluido oviductal bovino inicial en función de la capacidad que presenten las proteínas que lo componen de unirse a la heparina de la columna. Las proteínas que se unen a la heparina se separan de ella mediante una solución creciente (0-2M) de NaCl.

5.8.2.2. Análisis del efecto sobre la resistencia a la digestión enzimática (RDE) de la zona pelúcida provocada por las diferentes fracciones obtenidas.

Se analizó la relación existente entre la afinidad por heparina (dada como la cantidad necesaria de NaCl usada para separar las fracciones de la columna) y la capacidad de producir RDE de cada fracción en ZPs porcinas.

Para determinar la RDE de las diferentes muestras se usaron ovocitos porcinos madurados *in vitro*, que se incubaron durante 30 minutos en cada una de las muestras a analizar. Posteriormente se determinó la RDE introduciendo los ovocitos en gotas de 50 µl de pronasa al 0'5% sobre platina calefactora a 37°C. Para poder comparar las fracciones se midió el contenido proteico de cada una de ellas y los ovocitos se incubaron a razón de 10 µg de proteína por ovocito. El incremento en la RDE producido por el FO bovino de partida se determinó usando 1 µl de FO por ovocito y la fracción de muestra sin afinidad por la heparina (o fracción no retenida) se determinó usando 10 µg

de proteína por ovocito (al igual que las fracciones). Las fracciones de muestra que no se unen a heparina mostraron concentraciones entre 34-37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

El resultado de RDE se expresó en minutos \pm SEM y se realizó un análisis de homogeneidad de varianza ANOVA seguido de un test post hoc de Tukey para $P < 0.05$.

5.8.2.3. Electroforesis y tinción de plata

Para conocer el patrón proteico de cada una de las fracciones retenidas y la del FO bovino de partida se realizaron diferentes electroforesis que se tiñeron con plata.

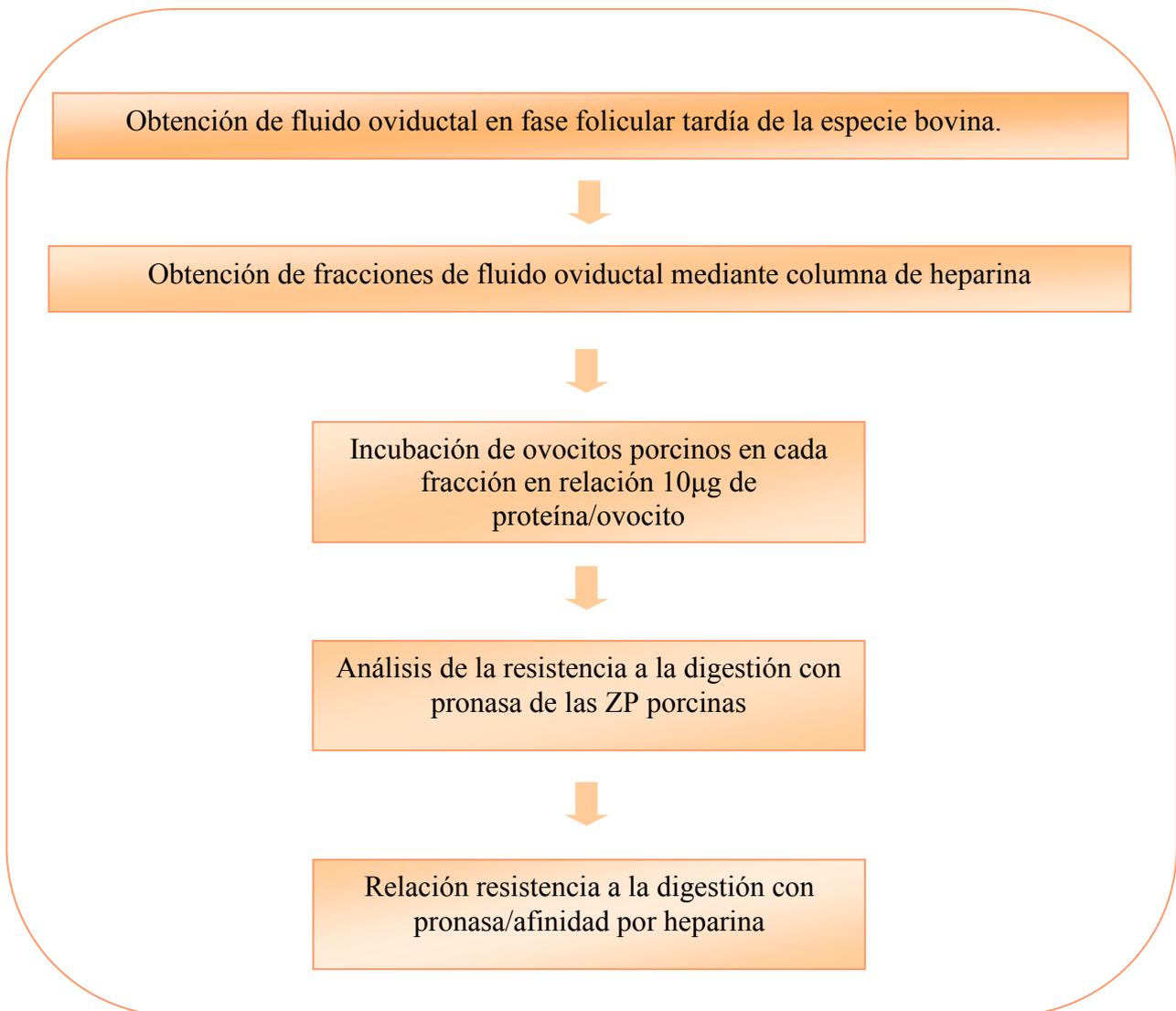


Figura 16. Fase experimental 2.

5.8.3. FASE EXPERIMENTAL 3. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y GENÓMICO DEL OVIDUCTO PORCINO Y BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA.

El estudio de la composición del FO porcino y bovino en la fase folicular tardía se abordó mediante dos tipos de metodología. Por un lado se ha realizado un análisis proteómico del contenido oviductal (porcino y bovino) y por otro se ha realizado un análisis genómico, análisis que nos muestra los genes que se están expresando en el momento de la obtención de las muestras en el oviducto porcino.

5.8.3.1. Análisis proteómico

Mediante este análisis se analizaron varios lotes de FO formados por el contenido oviductal de unas 15 hembras en fase folicular tardía, de las especies porcina y bovina. El contenido proteómico de dichos fluidos se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en una dimensión en condiciones desnaturalizantes, de modo que las diferentes proteínas se separan en base a su peso molecular. Para la localización de las bandas se realizó tras la electroforesis una coloración mediante la tinción de plata, descrita en el apartado de materiales y métodos. De este modo se pudo observar el patrón de bandas de esta fase folicular tardía del ciclo.

Las bandas de los geles obtenidos mediante electroforesis fueron recortadas con hojas de bisturí estériles con la mayor asepsia posible y se enviaron al Laboratorio de Proteómica de la Sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa de análisis LC/MSD Trap Data Analysis Versión 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania) y la búsqueda de coincidencias se llevó a cabo con el motor Spectrum Mill (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EEUU) frente a la versión más actualizada en ese momento de la base de datos NCBIInr. Posteriormente se localizaron los péptidos proporcionados por el servicio de proteómica en las secuencias proteicas correspondientes, validando así los resultados obtenidos (Figura 17a).

Los resultados del análisis proteómico han sido clasificados teniendo en cuenta la clasificación realizada previamente por Avilés *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*,

2010) con ciertas adaptaciones al presente estudio y mediante las bases bioinformáticas mencionadas DAVID e Ingenuity.

5.8.3.2. Análisis genómico

Para este análisis se usaron 4 hembras porcinas adultas en estado pre-ovulatorio sacrificadas en matadero. No se realizó esta experiencia para la especie bovina debido a que existe para esta especie un estudio previo del mismo tipo (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004).

Las muestras usadas para analizar la expresión de los genes se obtuvieron en el matadero, en las mejores condiciones de asepsia posibles e inmediatamente tras el sacrificio de los animales para evitar la degradación del ARN. Las muestras se obtuvieron de la porción ampular-istmica, porción donde se produce la fecundación en la especie porcina y por lo tanto de especial interés en nuestro estudio. Las muestras se recolectaron tras el sacrificio del animal y se congelaron en nitrógeno líquido durante unos 3 minutos. Posteriormente estas muestras se enviaron al laboratorio de análisis iGenomix de Valencia (España), en hielo seco y se mantuvieron hasta su análisis a - 80 °C.

La expresión de los genes oviductales se analizó mediante una [micromatriz](#) de expresión génica porcina (Agilent Technologies, Madrid, España), la cual abarca 43.803 sondas de ADN. Los resultados fueron analizados mediante el método estadístico bioinformático de Análisis de Componentes Principales (PCA) y para la clasificación de los genes se utilizaron las bases de datos mencionadas DAVID e Ingenuity (Figura 17b).

Para los diferentes análisis realizados en el presente trabajo se han usado diferentes herramientas de diferentes bases de datos como PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) y UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Los resultados obtenidos de ambos análisis (proteómico y genómico) fueron comparados para la identificación de coincidencias. En la especie porcina esta comparación se realizó con los datos de proteómica y genómica propios, mientras que

las coincidencias en la especie bovina se realizaron por comparación de nuestros resultados de proteómica con los datos previamente publicados de Bauersachs *et al.* (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004). Ambos datos también fueron comparados con la publicación de Tone *et al.* de las trompas de Falopio (Tone, Begley *et al.*, 2008).

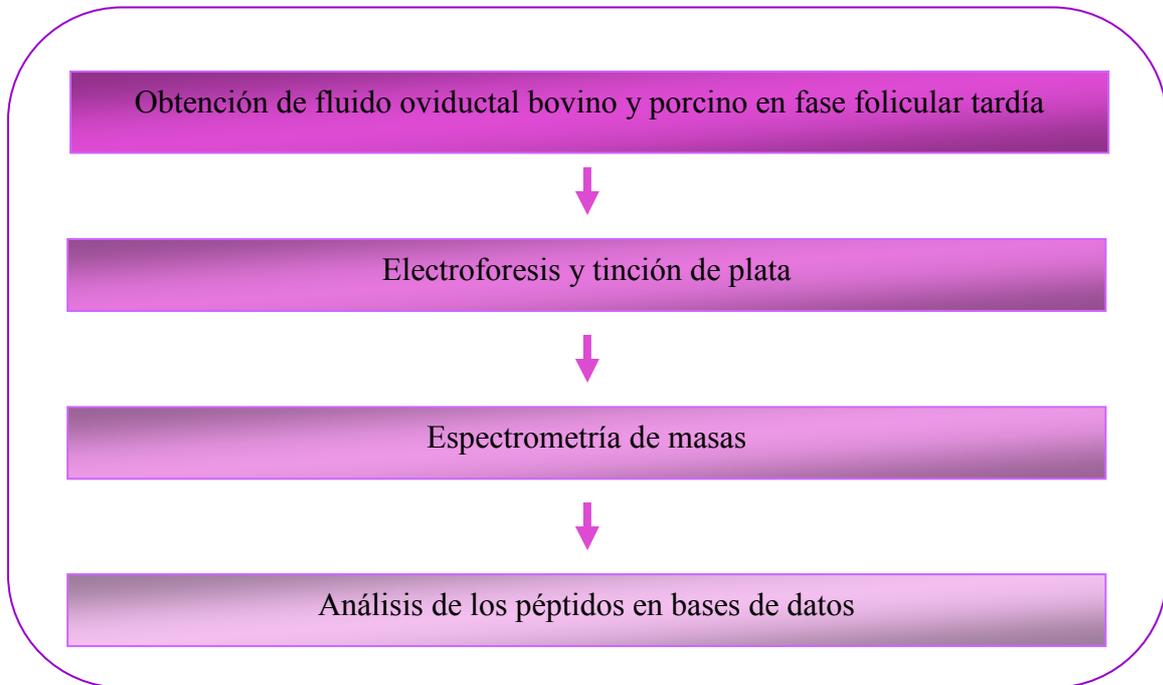


Figura 17a. Esquema de la fase experimental del análisis proteómico.

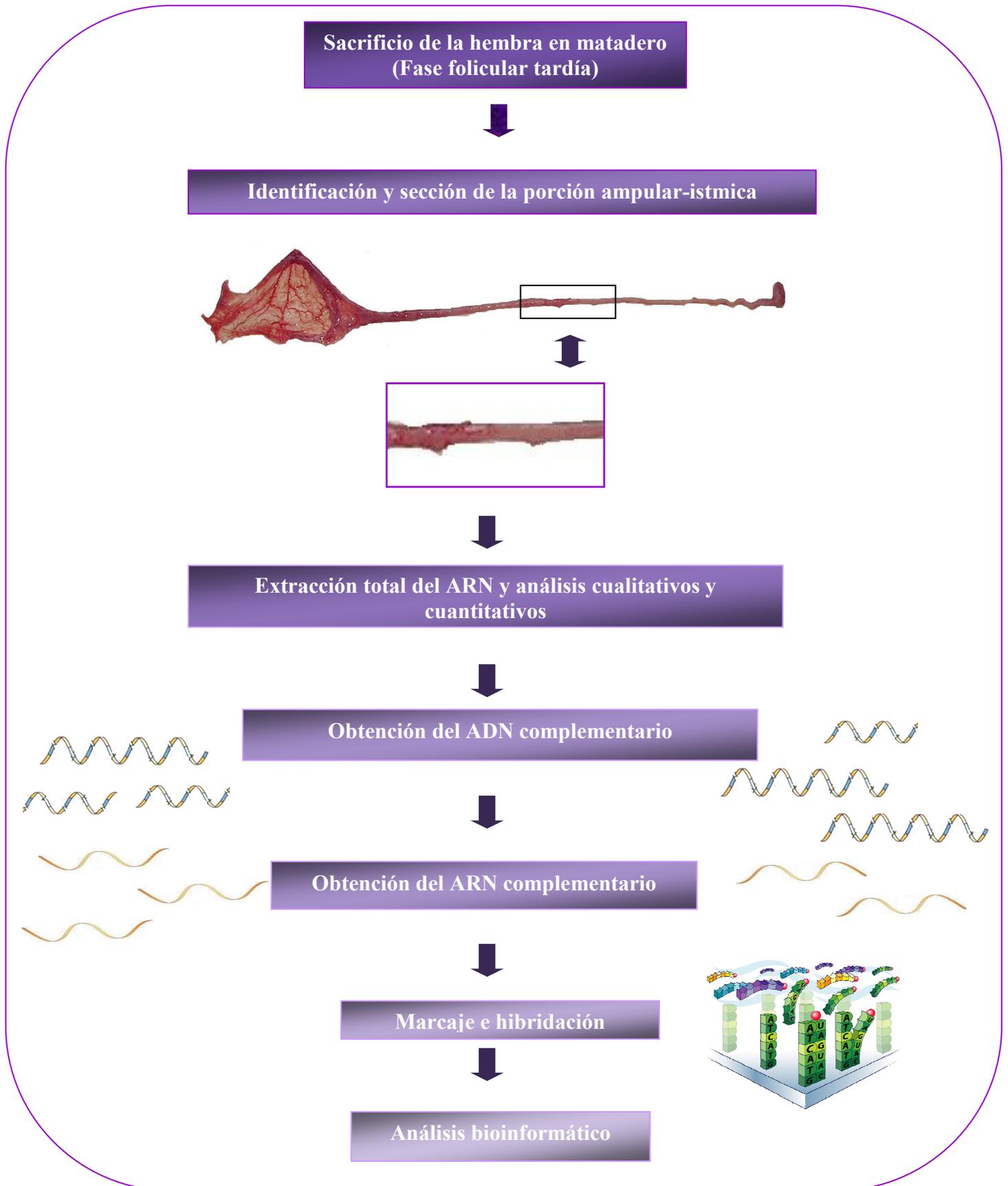
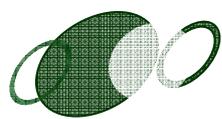


Figura 17b. Esquema de la fase experimental del análisis genómico del oviducto porcino.



RESULTADOS

6. RESULTADOS

En este apartado se detallan los resultados obtenidos siguiendo la metodología descrita anteriormente.

6.1. EFECTO DEL FLUIDO OVIDUCTAL DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN EN PRONASA

6.1.1. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA PRONASA

6.1.1.1. Efecto del tiempo de permanencia de la enzima en incubación sobre su actividad en la digestión de la zona pelúcida

El análisis de la digestión de ZPs porcinas en gotas de pronasa muestra que se produce un aumento gradual del tiempo necesario para digerir la misma cantidad de ZPs N=10 (tabla 11), en función de la permanencia de la enzima en el incubador. Así, el primer día se necesitó una media de tiempo de unos dos minutos y en cambio el día 12 el tiempo se incrementó a 18 minutos aproximadamente. A partir del día 16 se observó que el tiempo requerido fue mayor de 40 minutos, lo que podría interpretarse como una ausencia de actividad enzimática de la pronasa o pérdida de la misma. Los datos en detalle se pueden ver en la figura 18.

Tabla 11. Actividad de la enzima pronasa sobre las ZPs porcinas respecto al tiempo.

Momento del análisis	N	Digestión de la ZP de ovocitos porcinos Media \pm SEM (expresada en minutos)
0 horas (día 1)	10	2'04 \pm 0'18 ^a
24 horas (día 2)	10	3'40 \pm 0'36 ^a
48 horas (día 3)	10	3'31 \pm 0'30 ^a
72 horas (día 4)	10	5'30 \pm 0'25 ^{abc}
96 horas (día 5)	10	8'00 \pm 0'42 ^{bc}
168 horas (día 8)	10	7'60 \pm 0'65 ^{abc}
192 horas (día 9)	10	11'20 \pm 0'64 ^{cd}

216 horas (día 10)	10	8'93±1'84 ^{bc}
240 horas (día 11)	10	9'90±0'31 ^{cd}
264 horas (día 12)	10	18'30±1'16 ^e
336 horas (día 15)	10	15'00±1'12 ^{de}
360 horas (día 16)	10	40'80±3'93 ^f
384 horas (día 17)	10	45'00±0'30 ^f
Total	130	P < 0'05

a, b, c, d, e, f Diferentes letras en la columna indican diferencias entre grupos.

ZP Porcina

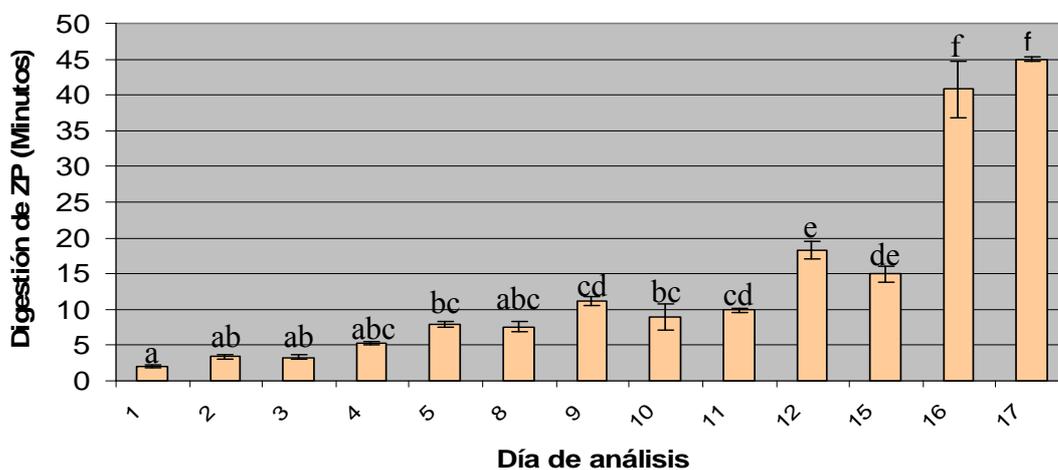


Figura 18. Actividad de la enzima pronasa sobre las ZPs respecto al tiempo.

1.1.2. Efecto de la dilución de la solución enzimática y/o del gasto enzimático sobre la capacidad de digestión de la zona pelúcida

Al igual que en el estudio anterior, se observa un aumento gradual en el tiempo que necesita la enzima para digerir el mismo número de ZPs (tabla 12), con el mismo patrón que muestra en el ensayo anterior (Fig. 19). Es decir, a partir del día 11-12, la solución enzimática presentaba ya un grado de dilución que podríamos considerar le hacia perder la actividad de modo significativo.

Tabla 12. Actividad de la enzima pronasa respecto al tiempo.

Momento del análisis	N	Digestión de la ZP de ovocitos porcinos (Minutos) \pm SEM
0 horas (día 1)	10	2'72 \pm 0'61 ^a
24 horas (día 2)	10	3'12 \pm 0'33 ^{ab}
48 horas (día 3)	10	5'50 \pm 0'66 ^{ab}
72 horas (día 4)	10	7'20 \pm 1'10 ^{abc}
96 horas (día 5)	10	6'80 \pm 1'12 ^{ab}
168 horas (día 8)	10	7'80 \pm 0'92 ^{abc}
192 horas (día 9)	10	12'90 \pm 1'20 ^{bcd}
216 horas (día 10)	10	10'00 \pm 0'20 ^{abcd}
240 horas (día 11)	10	16'80 \pm 1'69 ^{cde}
264 horas (día 12)	10	23'00 \pm 2'49 ^e
336 horas (día 15)	10	17'80 \pm 1'14 ^{de}
360 horas (día 16)	10	18'40 \pm 1'34 ^{de}
384 horas (día 17)	10	40'60 \pm 6'07 ^f
Total	130	P < 0'05

a, b, c, d, e, f Diferentes letras en la columna indican diferencias entre grupos.

ZP Porcina

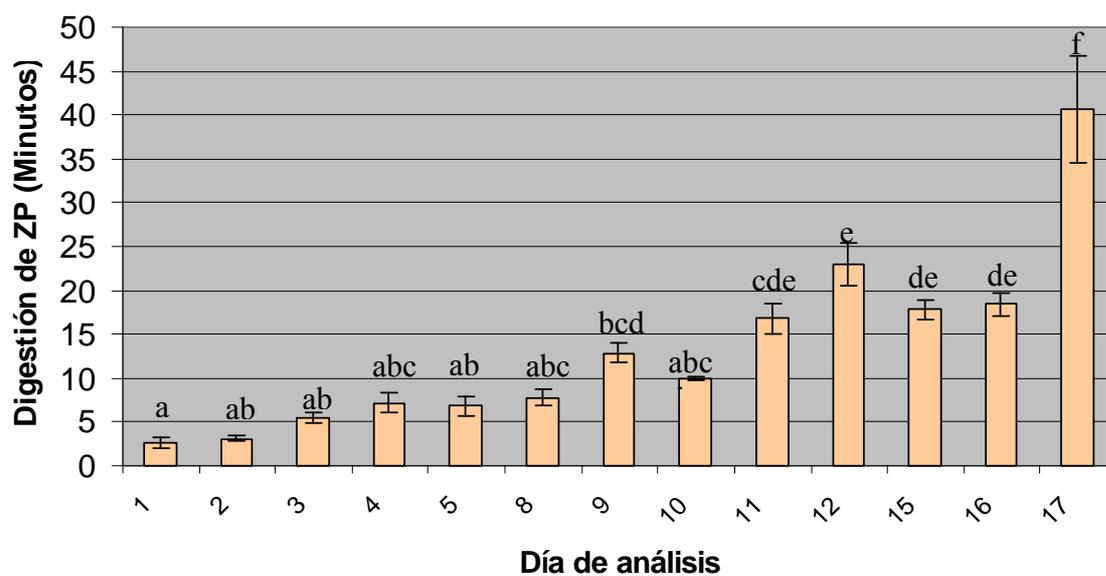


Figura 19. Actividad de la enzima pronasa respecto al tiempo, (experimento 2).

Con estos resultados, se puede poner una fecha límite para el análisis de los posibles efectos sobre la RDE de las muestras de FO. Teniendo en cuenta el análisis estadístico post hoc Test de Tukey de los dos ensayos anteriores, se llegó a la determinación de que a partir del día 12 no se tendría en cuenta el dato de RDE. Se tomó en cuenta este máximo debido a que el test de Tukey en esta fecha nos muestra un grupo (e) con diferencias significativas respecto a los anteriores, siendo además la velocidad de acción de la enzima diez veces menor de lo normal.

6.1.2. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LA ZONA PELÚCIDA DE LA CERDA EN DIFERENTES DILUCIONES DEL FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA

El análisis de digestión con pronasa de ZPs de ovocitos que han sido tratados durante 30 minutos en muestras de FO bovino de la fase folicular tardía o en diluciones del mismo, muestra que conforme se diluye el fluido, se produce también una disminución en el efecto sobre la RDE de la ZP (tabla 13). La muestra de FO bovino utilizada provocó que las ZPs fueran resistentes a la digestión en pronasa durante aproximadamente 4 horas ($239'13 \pm 9'63$ minutos), mientras que las sucesivas diluciones provocaron una menor resistencia a la digestión. El efecto de RDE deja de observarse en la dilución 1:10, cuando el tiempo necesario para la digestión de las ZP fue similar (ver prueba post hoc de Test de Tukey) al requerido para digerir las ZP de ovocitos que no habían sido tratados con ninguna muestra que contuviera FO o muestra control (ver Fig. 20).

Los diferentes lotes de FO bovino no siempre muestran el mismo efecto sobre la RDE variando de horas a días. Por ello, este dato de RDE debe de ser tomado, en cualquier caso, como un dato orientativo para el FO bovino. Por lo tanto, se puede considerar que el dato de RDE es específico de cada lote de FO y este factor debería de testarse previo al uso de un lote nuevo como aditivo.

Tabla 13. Efecto de la dilución del FOB sobre su capacidad de producir endurecimiento de la ZP de ovocitos porcinos.

Grupo	N	Digestión de la ZP de ovocitos porcinos (Minutos) ± SEM
Control	20	1'8±0'17 ^a
FOB puro	20	239'13±9'63 ^b
FOB (1: 2)	20	197'79±18'13 ^b
FOB (1: 5)	20	59'09±9'23 ^c
FOB (1: 10)	20	39'42±3'02 ^{ac}
FOB (1: 20)	20	4'39±0'76 ^a
FOB (1: 30)	20	3'2±0'28 ^a
FOB (1: 40)	20	2'23±0'40 ^a
FOB (1: 50)	20	2'66±0'41 ^a
FOB (1: 60)	20	1'75±0'13 ^a
Total	200	P<0'05

a, b, c Diferentes letras en la columna indican diferencias entre grupos.

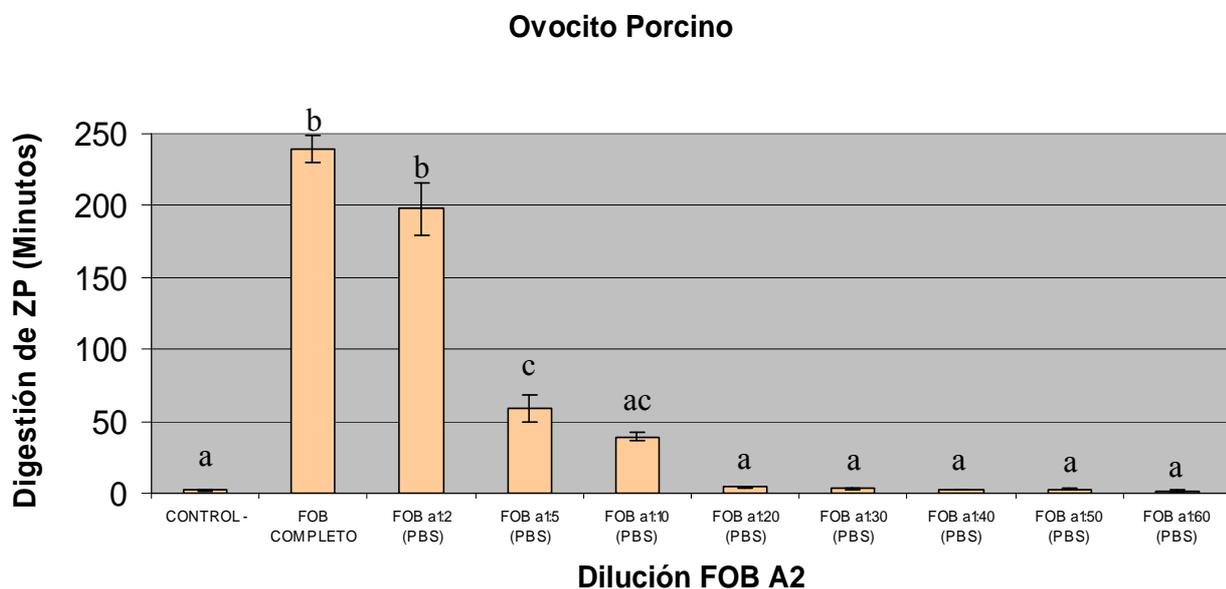


Figura 20. Efecto de la dilución del FOB sobre su capacidad de producir RDE de la ZP de ovocitos porcinos.

6.1.3. EFECTO RELATIVO DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LA ZONA PELÚCIDA DE NUEVE ESPECIES DIFERENTES TRAS LA INCUBACIÓN EN EL FLUIDO OVIDUCTAL EN LA FASE FOLICULAR TARDÍA DE CINCO ESPECIES

El análisis estadístico de los resultados obtenidos (tiempo de digestión de ZPs) mediante el análisis de la varianza de dos vías (tomando como factores fijos los ovocitos de una misma especie o el FO de una especie concreta), nos indica que existen diferencias significativas entre los ovocitos de las diferentes especies analizadas (cuando se usa un FO procedente de una especie concreta), entre los diferentes fluidos oviductales empleados (sobre ovocitos de una misma especie), y que también se observan diferencias significativas en la interacción de ambos parámetros (tipo de ovocito/tipo de FO) para una $P < 0'001$. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 14 (datos expresados en horas).

Los datos obtenidos indican que cuando se analizan los ovocitos control (ovocitos no tratados con ningún FO), la ZP de todos ellos se digiere en pocos minutos excepto la de hámster que tarda en hacerlo horas. Aún así, todos los ovocitos tratados aumentan su resistencia a la digestión de la ZP con pronasa en mayor o menor grado según se haya usado un FO u otro, con la excepción de la rata, la ratona y la mujer. En estas especies, la ZP presenta un tiempo de digestión similar a los controles excepto en la rata con el FO de coneja y en la ratona con los FOs de cabra y de coneja, en los que sí se produce un aumento en el tiempo de digestión de la ZP.

Tabla 14 Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies tratados con diferentes fluidos oviductales. La escala de colores indica intervalos de tiempo: rojo: de 0 a 10 minutos; Naranja: de 10 minutos a 1 hora; verde: de 1 hora a 24 horas; azul: mayor de 24 horas

OVOCITO	FO CONTROL	FO CUNÍCOLA	FO PORCINO	FO BOVINO	FO OVINO	FO CAPRINO	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN
Coneja	0'04 ± 0'01 ^a N=10	120'00 ± 0'00 ^b N=9	6'48 ± 1'01 ^a N=10	13'95 ± 1'29 ^a N=10	120'00 ± 0'00 ^b N=10	110'40 ± 6'40 ^b N=10	<0'001
Ratona	0'04 ± 0'01 ^a N=10	96'00 ± 8'00 ^b N=10	0'04 ± 0'01 ^a N=7	0'07 ± 0'01 ^a N=7	0'06 ± 0'01 ^a N=7	14'86 ± 1'64 ^a N=10	<0'001
Rata	0'07 ± 0'01 ^a N=21	207'43 ± 24'47 ^b N=14	0'06 ± 0'01 ^a N=10	0'04 ± 0'01 ^a N=10	0'06 ± 0'01 ^a N=10	0'05 ± 0'01 ^a N=10	<0'001
Hámster	24'42 ± 4'79 ^a N=22	288'00 ± 0'00 ^b N=17	63'30 ± 12'99 ^a N=10	26'85 ± 10'35 ^a N=10	240'00 ± 3'58 ^b N=10	47'55 ± 15'81 ^a N=10	<0'001
Mujer	0'03 ± 0'01 ^a N=11	0'05 ± 0'01 ^b N=9	0'02 ± 0'01 ^a N=7	0'03 ± 0'01 ^{ab} N=9	0'03 ± 0'01 ^{ab} N=7	0'03 ± 0'01 ^{ab} N=7	<0'001
Cerda	0'05 ± 0'01 ^a N=30	288'00 ± 0'00 ^c N=10	9'20 ± 2'24 ^a N=10	98'30 ± 38'57 ^b N=10	4'51 ± 0'28 ^a N=10	5'15 ± 1'24 ^a N=10	<0'001
Vaca	0'05 ± 0'01 ^a N=28	288'00 ± 0'00 ^c N=10	1'78 ± 0'03 ^a N=10	196'50 ± 28'56 ^{bc} N=10	105'90 ± 25'37 ^b N=10	172'10 ± 34'59 ^b N=10	<0'001
Oveja	0'09 ± 0'01 ^a N=20	168'00 ± 0'00 ^c N=10	0'48 ± 0'13 ^a N=10	76'86 ± 32'55 ^{ab} N=10	88'27 ± 32'54 ^{ab} N=10	0'60 ± 0'14 ^a N=10	<0'001
Cabra	0'06 ± 0'01 ^a N=17	240'00 ± 0'00 ^c N=10	0'72 ± 0'24 ^a N=10	42'15 ± 22'13 ^{ab} N=10	120'10 ± 32'76 ^b N=10	13'45 ± 3'70 ^a N=10	<0'001

a, b, c Diferentes letras en la misma línea indican diferencias entre grupos para P<0'001

Para simplificar el análisis y comprensión de los resultados, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test pos hoc de Tukey para una $P < 0.05$, estudiando el tiempo de digestión de la ZP en dos sentidos, por un lado, analizando el efecto del factor FO y por otro analizando el efecto del factor ovocito.

6.1.3.1. Análisis del efecto producido por cinco tipos de fluido oviductal SOBRE la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de especies diferentes

6.1.3.1.1. Control

Cuando se analiza el grado de endurecimiento que tienen las ZPs de ovocitos madurados *in vitro* o *in vivo*, ovocitos usados de partida en nuestras experiencias, se observa que prácticamente la totalidad de ellos no presenta RDE, digiriéndose las ZPs en unos pocos minutos (entre 2 y 5 minutos, tabla 15). El hámster es la única especie que bajo nuestras condiciones experimentales presenta RDE y además posee un valor bastante elevado con una media de digestión de aproximadamente 24 horas (figura 22). Véase la diferencia con el resto de las muestras en la tabla 15 y en las figuras 21 (tiempo de digestión expresado en minutos) y 22 (tiempo de digestión expresado en horas).

Tabla 15. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando no son incubados con ninguna muestra de FO, resultados indicados en horas y minutos.

OVOCITO	N	DIGESTIÓN DE LA ZP DE OVOCITOS NO INCUBADOS CON FO (CONTROL)	
		(Minutos) ± SEM. (Valor máximo y mínimo)	(Horas) ± SEM. (Valor máximo y mínimo)
Coneja	10	2'64±0'38 ^a (1'20-4'00)	0'04±0'01 ^a (0'02-0'06)
Ratona	10	2'59±0'43 ^a (1'62-5'28)	0'04±0'01 ^a (0'03-0'08)
Rata	21	3'9±0'55 ^a (0'72-9'00)	0'07±0'01 ^a (0'01-0'15)
Hámster	22	1465'36±287'42 ^b (1'98-288'00)	24'42±4'79 ^b (0'03-48'00)
Mujer	11	1'83±0'9 ^a (1'17-2'08)	0'03±0'01 ^a (0'02-0'03)
Cerda	30	3'29±0'43 ^a (1'37-10'00)	0'05±0'01 ^a (0'02-0'17)
Vaca	28	2'74±0'1 ^a (1'56-3'48)	0'05±0'00 ^a (0'03-0'06)

Oveja	20	5'48±0'60 ^a (2'00-13'80)	0'09±0'01 ^a (0'03-0'23)
Cabra	17	3'77±0'32 ^a (2'67-13'80)	0'06±0'01 ^a (0'04-0'10)
Total	169	P<0'05	P<0'05

a, b, Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa entre grupos.

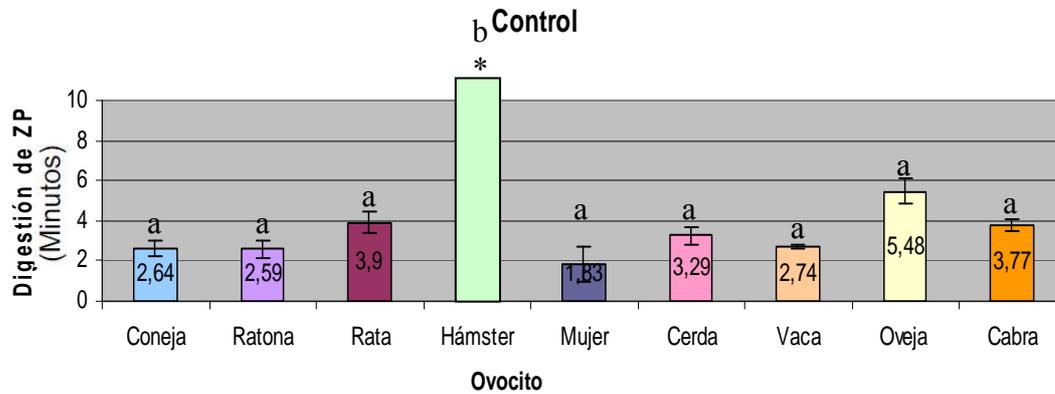


Figura 21. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando no son incubados con ninguna muestra de FO (minutos). *La ZP de los ovocitos de hámster tiene un tiempo medio de digestión de 1465'36±287'42 minutos, el cual se sale del rango indicado en la figura.

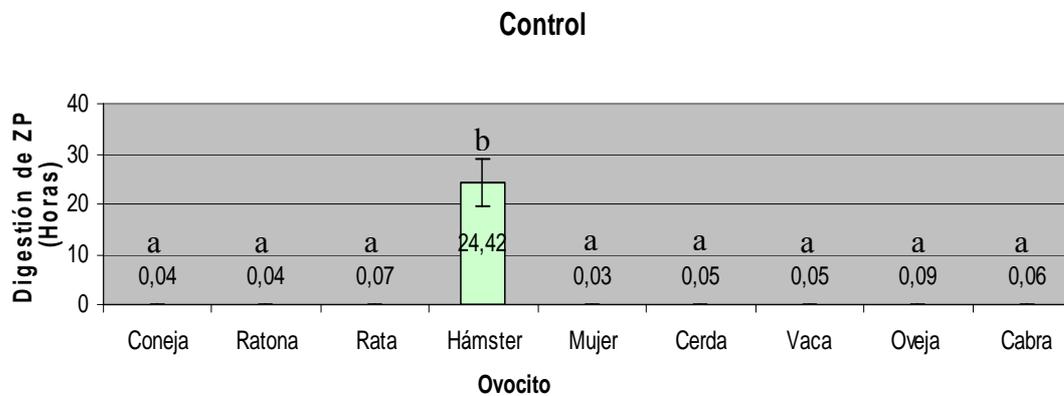


Figura 22. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando no son incubados con ninguna muestra de FO (Horas).

6.1.3.1.2. Fluido oviductal de coneja

Las ZPs de casi la totalidad de las especies estudiadas responden al FO de coneja aumentando el tiempo de digestión en pronasa. La única excepción encontrada para este FO ha sido la especie humana. Según el análisis estadístico podemos afirmar

que el FO de coneja produce un efecto significativamente diferente entre las ZPs humanas y las de los ovocitos del resto de las diferentes especies analizadas. Los ovocitos de hámster, cerda, vaca y cabra adquieren la RDE en mayor grado que los ovocitos de oveja, coneja, ratona y rata.

El FO cunícola es el que en líneas generales más efecto ejerce (véase comparación general en la figura resumen (Fig. 30), aumentando el tiempo de digestión en pronasa a todas las muestras (no humanas), siendo un fluido que provoca que las ZPs permanezcan en la solución de pronasa incluso periodos de tiempo de más de un mes. Debido a que la mayoría de las ZP incubadas con FO de coneja han permanecido visibles durante periodos elevadísimos de tiempo y de modo prácticamente inalterable e idénticas a como se encontraban a las 24 horas (Figs. 24 y 25), ciertos grupos en los que estaban presentes todas las ZP fueron desechados en el mismo día, por lo que el dato medio de endurecimiento es el mismo, el valor mínimo y máximo coinciden y no se observa error estadístico en los datos numéricos (tabla 16) ni barras de error en las figuras en las que se analiza dicho FO (Fig. 23), con las excepciones de la rata y ratona que sí sufrieron digestión progresiva y se pudo tomar un dato de digestión similar al resto. El que no aparezca dicho error indica que esas ZPs tienen un periodo de digestión en pronasa mayor del dato de tiempo indicado en las tablas y figuras.

Tabla 16. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando son incubados con FO de coneja.

OVOCITO	N	DIGESTIÓN DE LA ZP DE OVOCITOS INCUBADOS 30 MINUTOS CON FO DE CONEJA. (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Coneja	9	120'00±0'00 ^{ab} (120'00-120'00)
Ratona	10	96'00±8'00 ^a (72'00-120'00)
Rata	14	207'43±24'47 ^{cd} (72'00-288'00)
Hámster	17	288'00±0'00 ^e (288'00-288'00)
Mujer	9	0'05±0'01 ^f (0'03-0'05)
Cerda	10	288'00±0'00 ^e (288'00-288'00)
Vaca	10	288'00±0'00 ^e (288'00-288'00)

Oveja	10	168'00±0'00 ^{bc} (168'00-168'00)
Cabra	10	240'00±0'00 ^{de} (240'00-240'00)
Total	99	P<0'05

a, b, c, d, e, f, Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa entre grupos.

Fluido oviductal cunícula

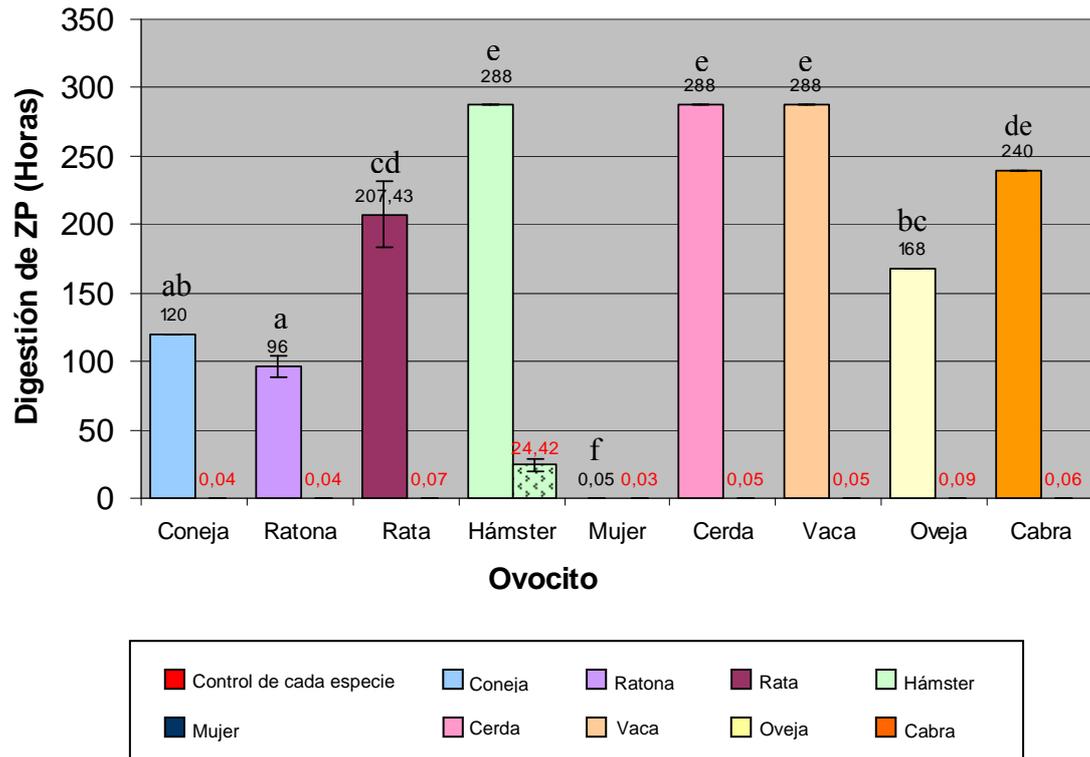


Figura 23. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando son incubados con FO de coneja y su correspondiente dato control (rojo).

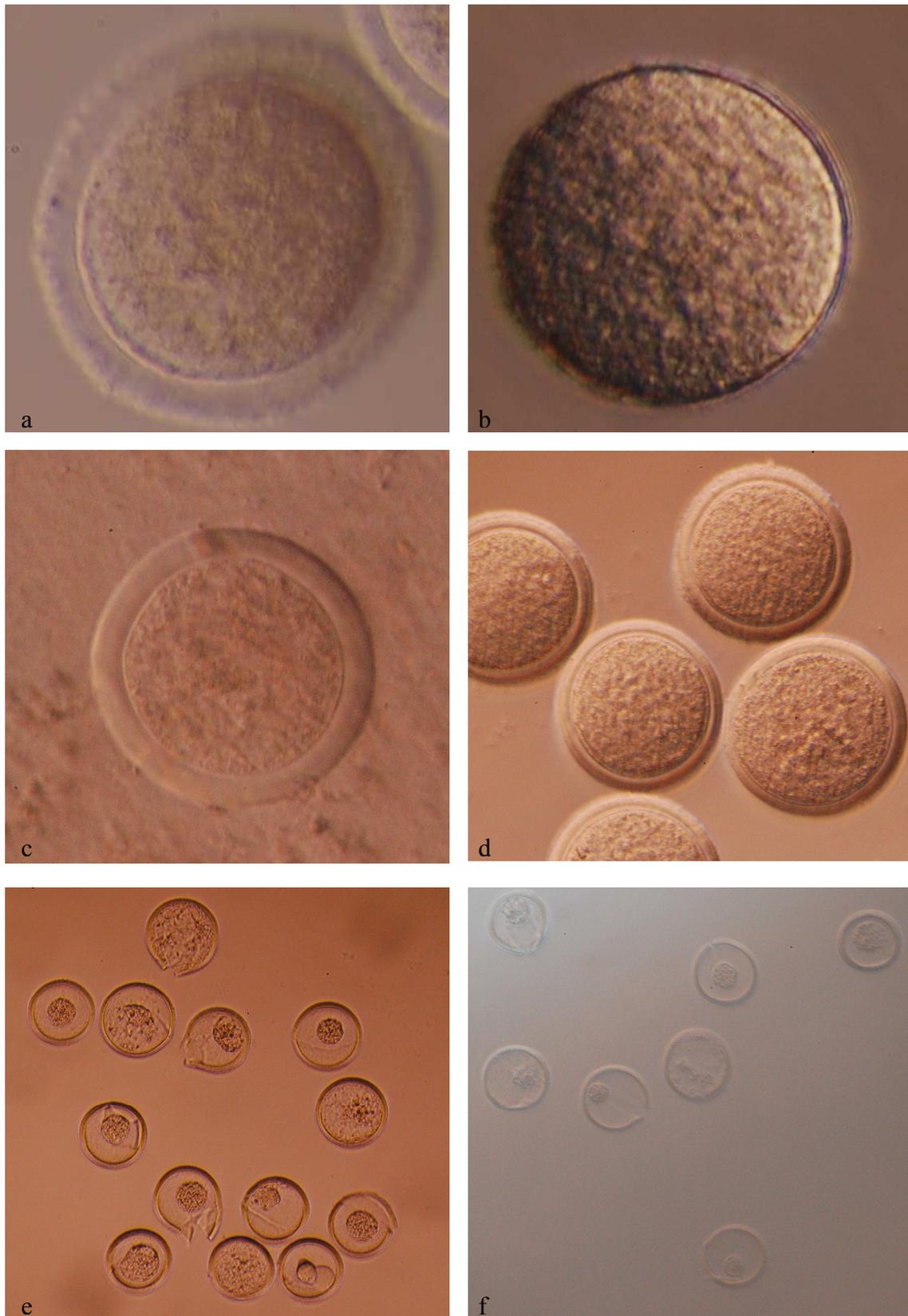


Figura 24. Ovocitos de hámster control o tratados con FO de coneja. a) Ovocito ovárico de hámster sin células de la granulosa. b) ovocito control de hámster en pronasa tras 1:30 horas. c) Ovocito de hámster siendo tratado 30 minutos en FO de coneja. d) Ovocitos de hámster pretratados con FO de coneja a los 15 minutos en la solución de pronasa. e) Ovocitos de hámster pretratados con FO de coneja tras 24 horas en la solución de pronasa. f) Ovocitos de hámster pretratados con FO de coneja tras 30 días en la solución de pronasa.

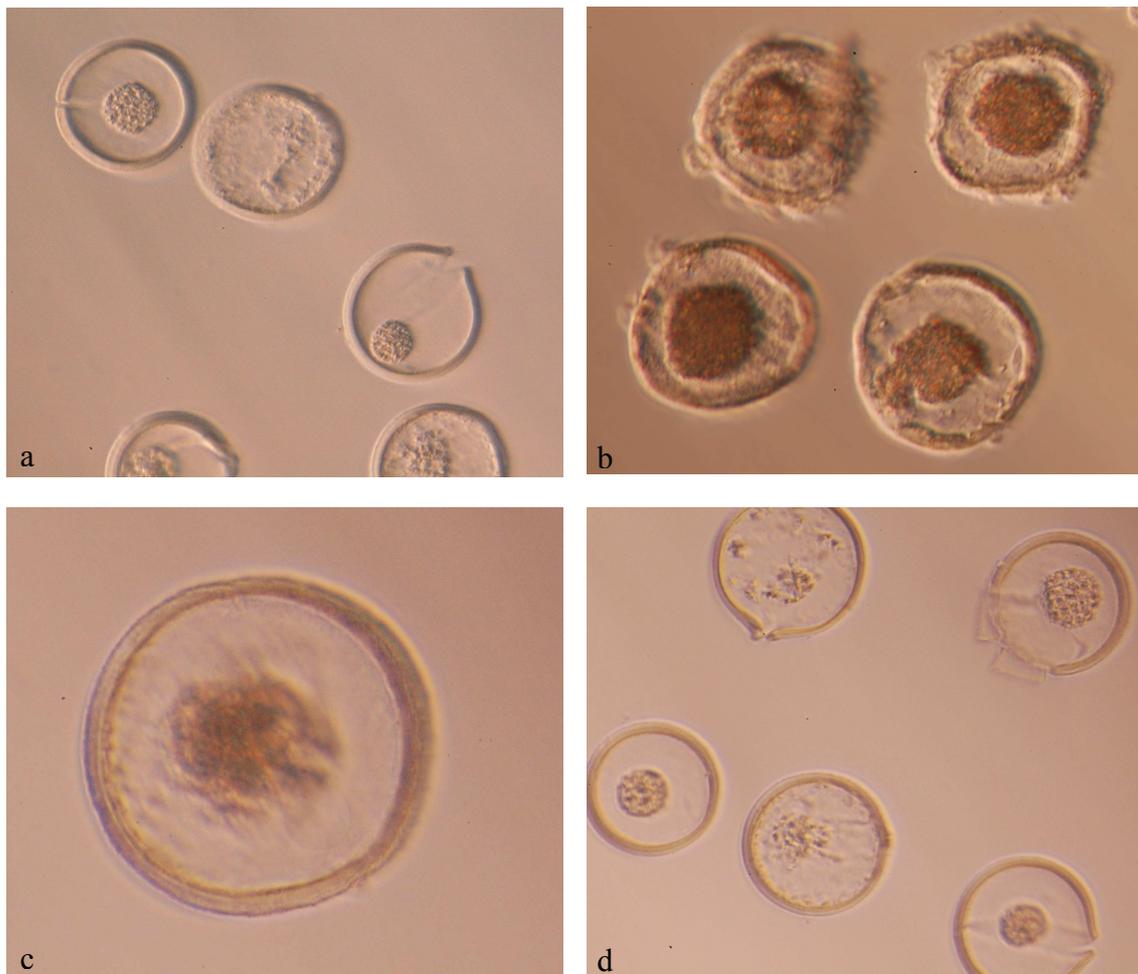


Figura 25. Ovocitos de diferentes especies pretratados 30 minutos en FO de coneja tras introducirlos en la solución de pronasa. a) Ovocitos bovinos 30 días en la solución de pronasa. b) Ovocitos de coneja 5 días en la solución de pronasa. c) Detalle de ovocito de hámster, 30 días en la solución de pronasa. d) Ovocitos de cerda 30 días en la solución de pronasa.

6.1.3.1.3. Fluido oviductal porcino

Las ZPs responden al FO porcino de diferentes modos dependiendo de la especie a la que pertenezcan. En líneas generales pueden adquirir RDE o no (tabla 17). El FO porcino aún produciendo RDE en la mayoría de las especies estudiadas es el que lo produce de un modo más leve. Véase comparación general en figura resumen (Fig. 30). El FO porcino produce RDE sobre las ZPs de los ovocitos de hámster de modo significativamente diferente respecto al resto de las especies analizadas (Fig. 26).

Tabla 17. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando son incubados con FO porcino.

ESPECIE DE OVOCITO	N	DIGESTIÓN DE LA ZP DE OVOCITOS INCUBADOS 30 MINUTOS CON FO PORCINO (HORAS) ± SEM (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Coneja	10	6'48±1'01 ^a (0'40-8'00)
Ratona	7	0'04±0'01 ^a (0'03-0'05)
Rata	10	0'06±0'01 ^a (0'03-0'07)
Hámster	10	63'30±12'99 ^b (16'50-120'00)
Mujer	7	0'02±0'01 ^a (0'01-0'03)
Cerda	10	9'20±2'24 ^a (1'42-16'00)
Vaca	10	1'78±0'03 ^a (0'17-2'77)
Oveja	10	0'48±0'13 ^a (0'08-0'95)
Cabra	10	0'72±0'24 ^a (0'08-2'50)
Total	84	P<0'05

a, b, Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa entre grupos.

Fluido oviductal porcino

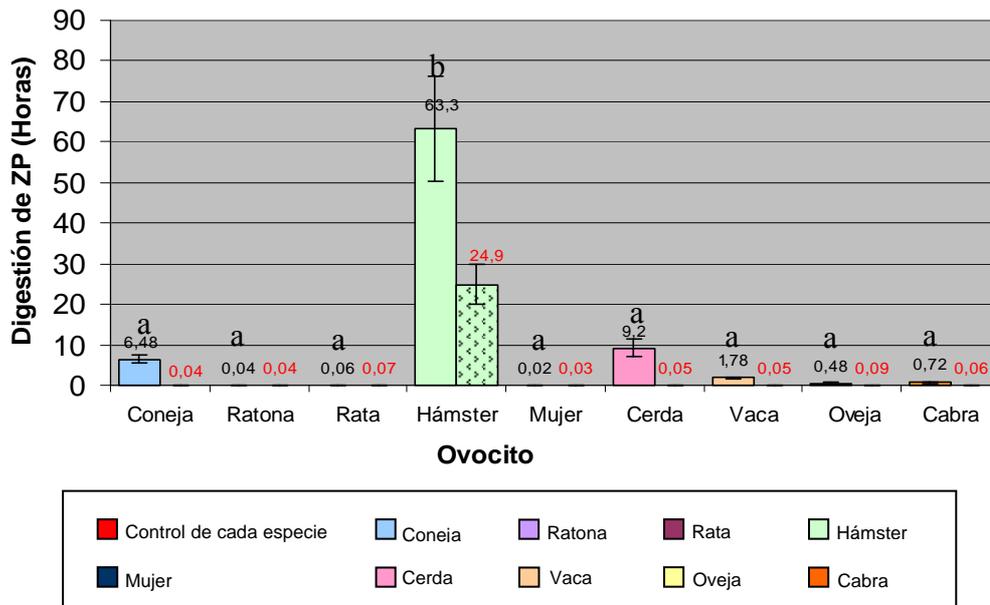


Figura 26. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando son incubados con FO porcino y su correspondiente dato control (rojo).

6.1.3.1.4. Fluido oviductal bovino

Las ZPs responden al FO bovino, al igual que con el FO anterior, de diferentes modos dependiendo de la especie a la que pertenezcan. En líneas generales pueden adquirir RDE por pronasa o no (tabla 18). El FO bovino provoca una mayor RDE en las ZPs homólogas y en las de cerda que en las del resto de especies estudiadas coneja, ratona, rata, mujer, oveja y cabra. Estas especies no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellas pero si con respecto a los anteriores (Fig. 27).

Tabla 18. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando son incubados con FO bovino.

OVOCITO	N	DIGESTIÓN DE LA ZP DE OVOCITOS INCUBADOS 30 MINUTOS CON FO BOVINO (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Coneja	10	13'95±1'29 ^a (8'00-16'50)
Ratona	7	0'07±0'01 ^a (0'06-0'10)
Rata	10	0'04±0'01 ^a (0'03-0'06)
Hámster	10	26'85±10'35 ^a (16'50-120'00)
Mujer	9	0'03±0'01 ^a (0'03-0'04)
Cerda	10	98'30±38'57 ^{ab} (3'17-240'00)
Vaca	10	196'50 ± 28'56 ^b (21'00-288'00)
Oveja	10	76'86±32'55 ^a (0'58-240'00)
Cabra	10	42'15±22'13 ^a (5'00-240'00)
Total	86	P<0'05

a, b, Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa entre grupos.

Fluido oviductal bovino

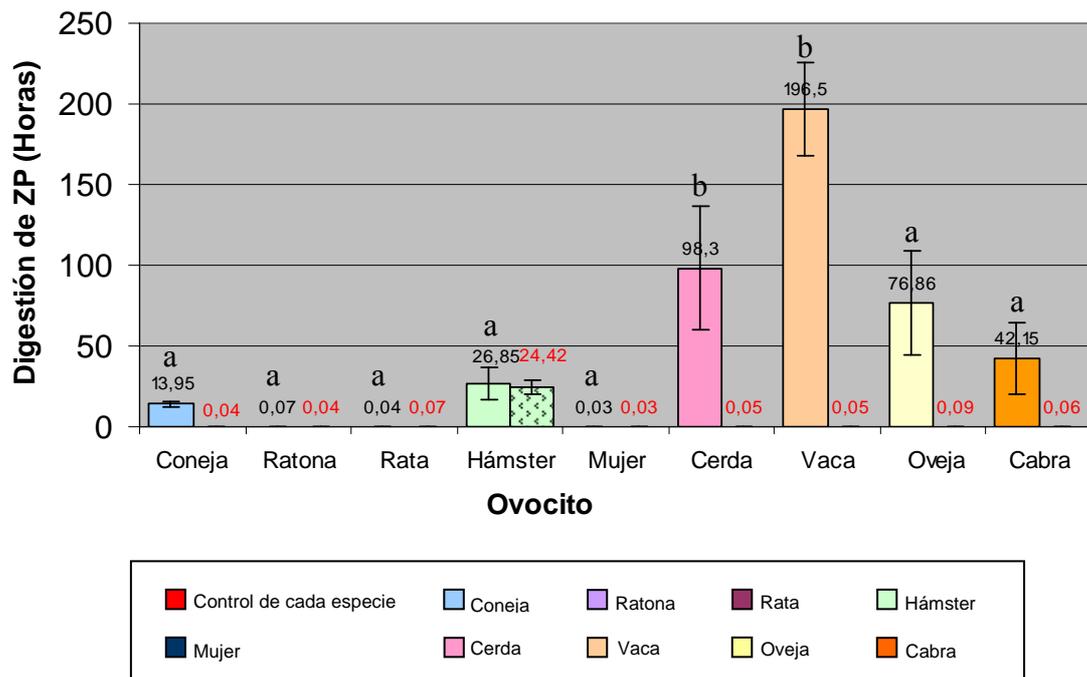


Figura 27. Tiempo de digestión de la ZP de ovucitos de diferentes especies cuando son incubados con FO bovino y el correspondiente dato control (rojo).

6.1.3.1.5. Fluido oviductal ovino

Las ZPs responden al FO ovino fundamentalmente de dos modos dependiendo de la especie a la que pertenezcan. En líneas generales pueden adquirir resistencia a la digestión por pronasa o no (tabla 19). El FO ovino ejerce mayor resistencia a la digestión por pronasa en los ovucitos de hámster seguidos por los de cabra, coneja, vaca y oveja. El estadístico muestra que las ZPs de ratona, rata, mujer y cerda son diferentes respecto a las mencionadas anteriormente no adquiriendo RDE (Fig. 28).

Tabla 19. Tiempo de digestión de la ZP de ovucitos de diferentes especies cuando son incubados con FO ovino.

OVUCITO	N	DIGESTIÓN DE LA ZP DE OVUCITOS INCUBADOS 30 MINUTOS CON FO OVINO (HORAS) ± SEM (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO).
Coneja	10	120'00±0'00 ^a (120'00-120'00)
Ratona	7	0'06±0'01 ^b (0'04-0'08)

Rata	10	0'06±0'01 ^b (0'05-0'10)
Hámster	10	240'00±3'58 ^c (216'00-264'00)
Mujer	7	0'03±0'01 ^b (0'03-0'04)
Cerda	10	4'51±0'28 ^{bd} (3'12-5'50)
Vaca	10	105'90±25'37 ^a (10'00-168'00)
Oveja	10	88'27±32'54 ^{ad} (0'50-240'00)
Cabra	10	120'10±32'76 ^a (24'50-240'00)
Total	84	P<0'05

a, b, c, d, Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa entre grupos.

Fluido oviductal ovino

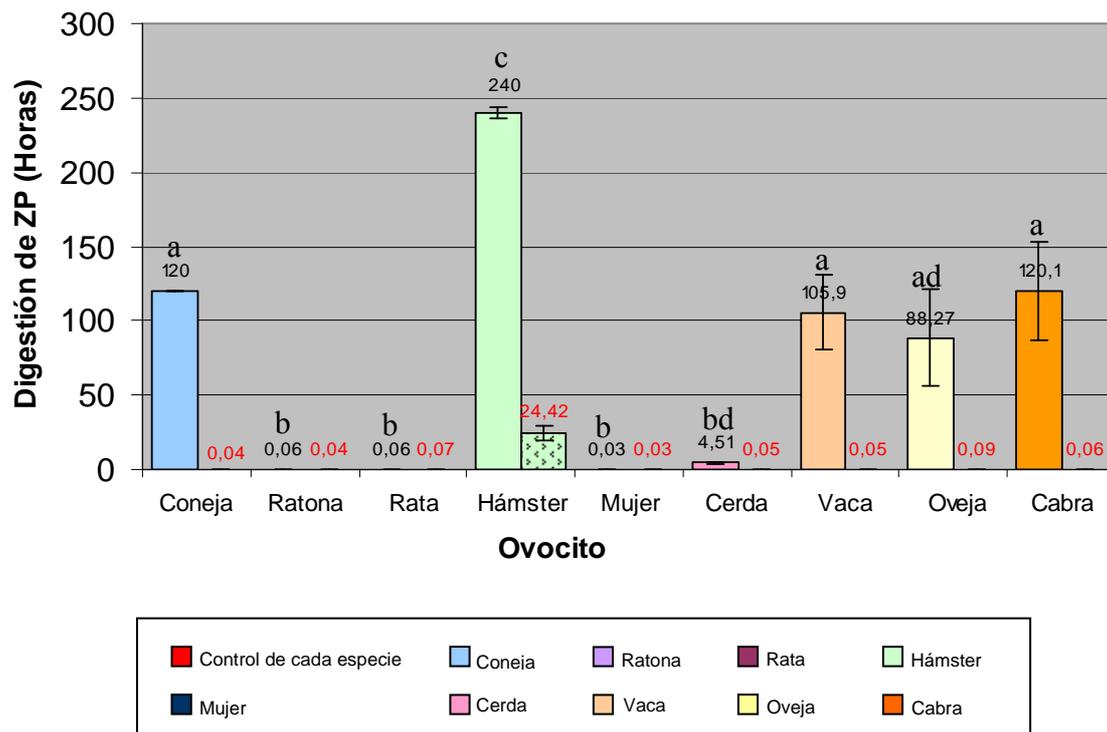


Figura 28. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando son incubados con FO ovino y su correspondiente control (rojo).

6.1.3.1.6. Fluido oviductal caprino

Las ZPs responden al FO caprino fundamentalmente de dos modos dependiendo de la especie a la que pertenezcan. En líneas generales pueden adquirir resistencia a la digestión por pronasa o no (tabla 20). El FO caprino ejerce mayor efecto sobre la RDE en los ovocitos de vaca, seguido de los ovocitos de coneja. La ZP de los ovocitos de hámster, ratona, rata, mujer, los homólogos de cabra, los de cerda y finalmente los de oveja son estadísticamente diferentes respecto a las dos especies anteriormente mencionadas (Fig. 29).

Tabla 20. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando son incubados con FO caprino.

OVOCITO	N	DIGESTIÓN DE LA ZP DE OVOCITOS INCUBADOS 30 MINUTOS CON FO CAPRINO (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Coneja	10	110'40±6'40 ^a (72'00-120'00)
Ratona	10	14'86±1'64 ^b (0'07-16'50)
Rata	10	0'05±0'01 ^b (0'03-0'08)
Hámster	10	47'55±15'81 ^b (16'50-120'00)
Mujer	7	0'03±0'01 ^b (0'02-0'04)
Cerda	10	5'15±1'24 ^b (2'17-15'50)
Vaca	10	172'10±34'59 ^c (10'00-240'00)
Oveja	10	0'60±0'14 ^b (0'22-1'22)
Cabra	10	13'45±3'70 ^b (0'87-24'50)
Total	87	P<0'05

a, b, c Diferentes letras en la misma línea indican diferencia significativa entre grupos.

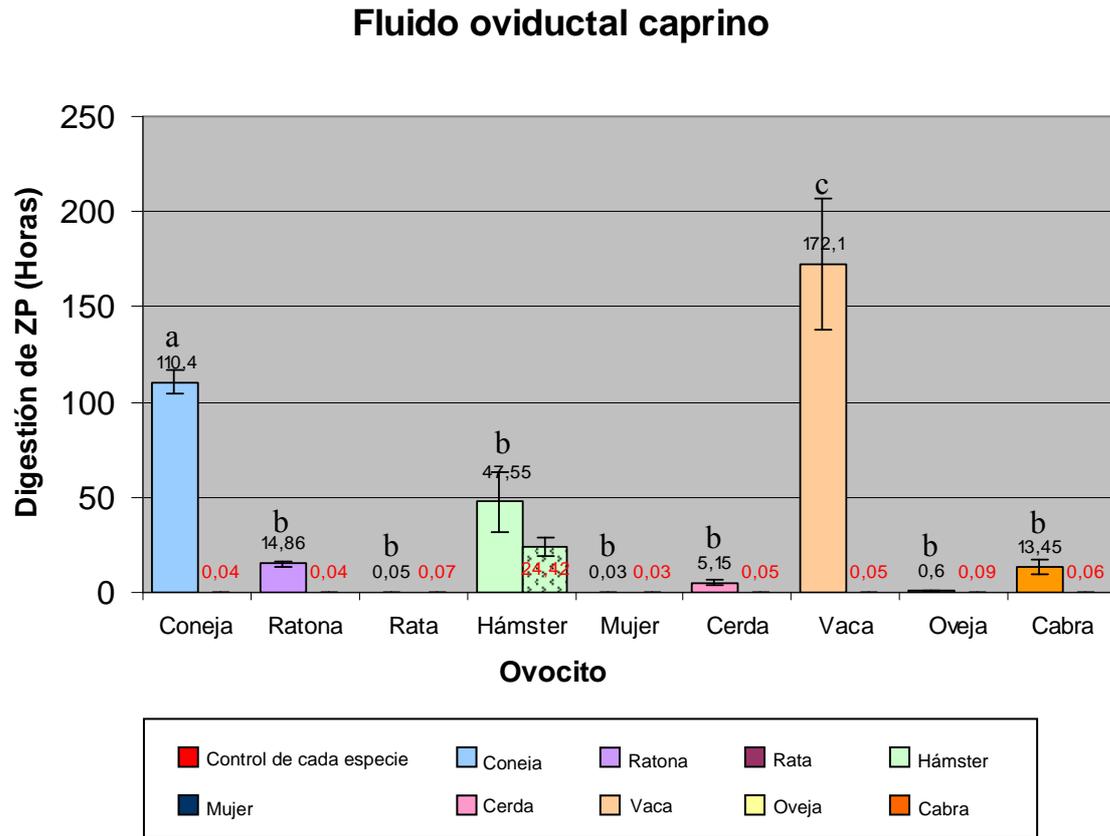


Figura 29. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de diferentes especies cuando son incubados con FO caprino y el correspondiente dato control (rojo).

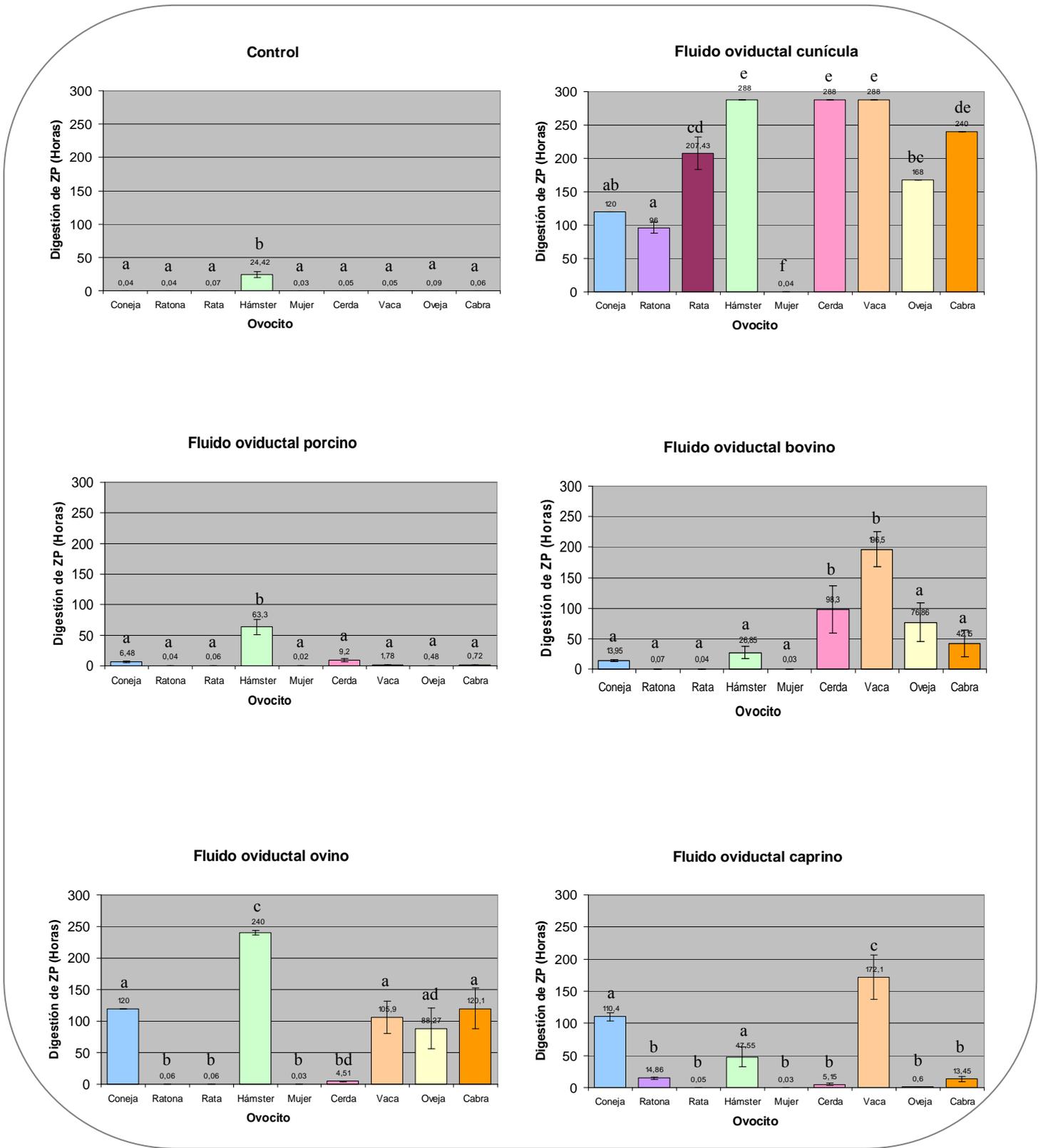


Figura 30. Resumen del efecto de diferentes fluidos oviductales sobre la resistencia a la digestión enzimática de ovocitos de diferentes especies.

6.1.3.2. Análisis del efecto producido en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de nueve especies diferentes por el fluido oviductal de cinco especies diferentes

6.1.3.2.1. Ovocito de coneja

Las ZPs de ovocitos de coneja madurados *in vivo* muestran un tiempo de digestión en pronasa de 0'04 horas ($2'64 \pm 0'38$ minutos). Cuando los ovocitos son tratados con FO (figura 23) aumenta el tiempo de digestión respecto al control anterior, excepto en el caso del FO porcino (tabla 21 y Fig. 31). En el caso del ovocito de coneja podemos afirmar que el FO homólogo y el FO ovino producen un elevado aumento de la RDE, seguidos del FO caprino y el FO bovino. En las figuras 32 y 33 se muestran ovocitos de coneja en diferentes situaciones como resumen de los análisis realizados.

Tabla 21. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de coneja cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Control	10	0'04±0'01 ^a (0'02-0'06)
FO Cunícola	9	120'00±0'00 ^b (120'00-120'00)
FO Porcino	10	6'48±1'01 ^{ac} (0'40-8'00)
FO Bovino	10	13'95±1'29 ^d (8'00-16'50)
FO Ovino	10	120'00±0'00 ^b (120'00-120'00)
FO Caprino	10	110'40±6'40 ^b (72'00-120'00)
Total	59	P<0'05

a, b, c, d, Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre grupos.

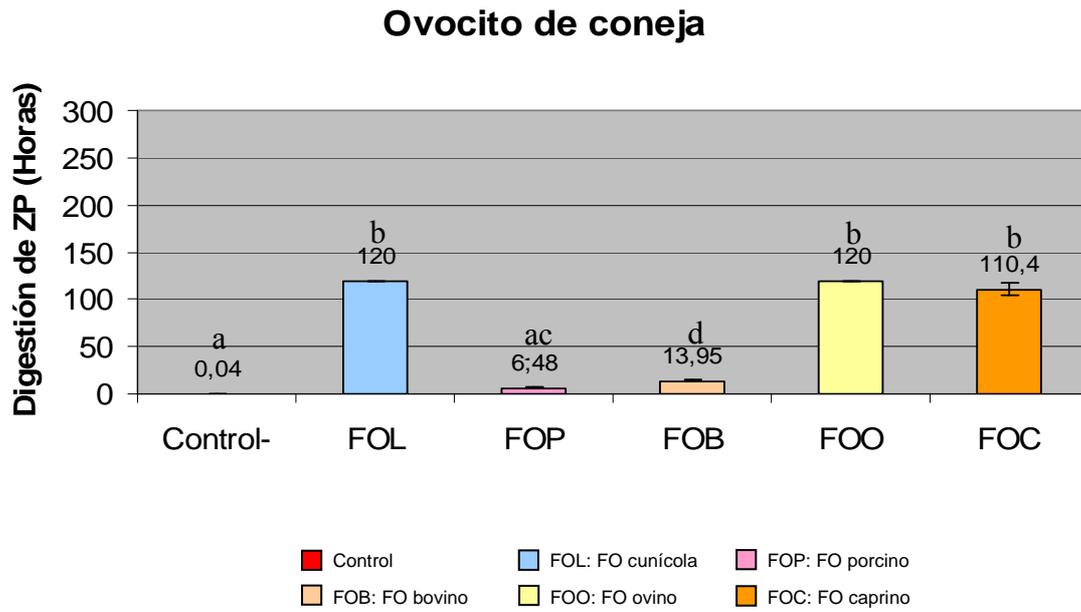


Figura 31. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de coneja cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

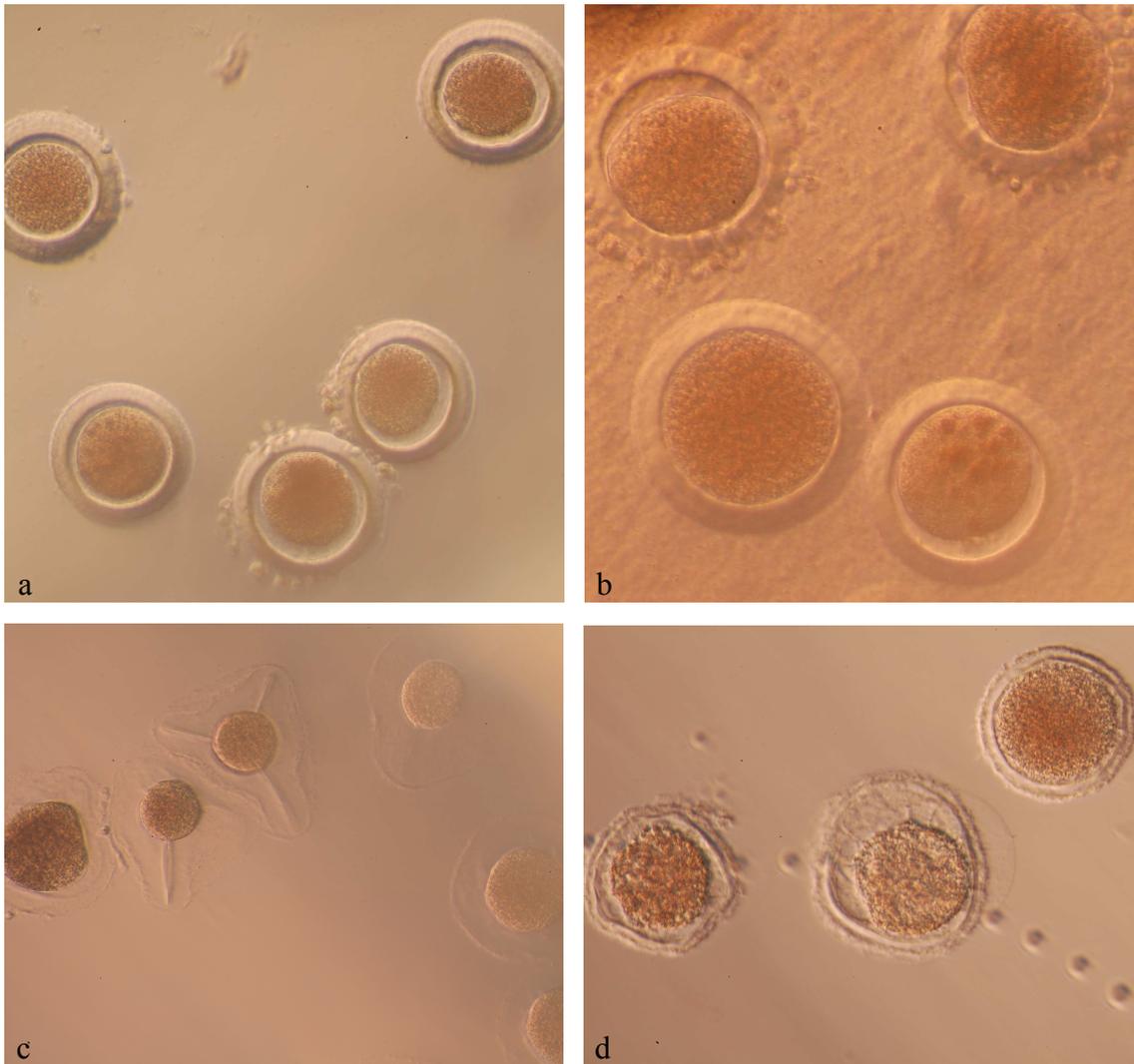


Figura 32. Ovocitos de coneja en diferentes situaciones. a) Ovocitos de coneja madurados in vivo sin células de la granulosa. b) Ovocitos de coneja siendo incubados en FO de coneja durante 30 minutos. c) Ovocitos de coneja control a los 2 minutos en solución de pronasa. d) Ovocitos de coneja preincubados en FO bovino 30 minutos tras permanecer en solución de pronasa 1:30 horas.

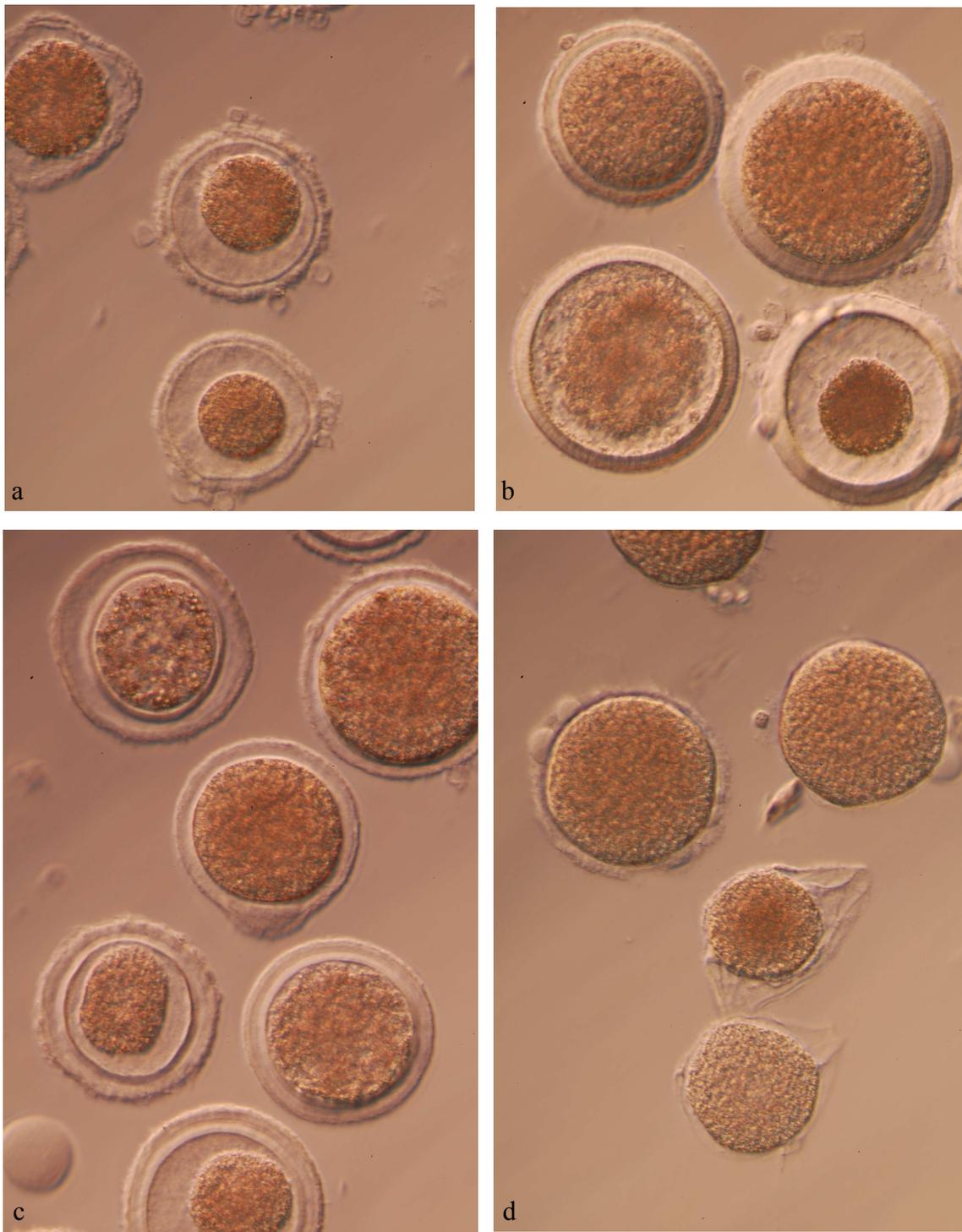


Figura 33. Ovocitos de coneja madurados in vivo, preincubados 30 minutos en diferentes FOs a las 1:30 horas de incubación en solución de pronasa. a) Ovocitos de coneja preincubados en FO caprino en solución de pronasa. b) Ovocitos de coneja preincubados en FO homólogo en solución de pronasa. c) Ovocitos de coneja preincubados en FO ovino en solución de pronasa. d) Ovocitos de coneja preincubados en FO porcino en solución de pronasa.

6.1.3.2.2. Ovocito de ratona

Las ZPs de ovocitos de ratona madurados *in vivo* no tratados u ovocitos control muestran un tiempo medio de digestión en pronasa de unas 0'04 horas ($2'60 \pm 0'40$ minutos). Cuando los ovocitos son tratados con algún FO no se produce ningún cambio en el tiempo de digestión respecto al control exceptuando el FO cunícola (tabla 22 y Fig. 34).

Tabla 22. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de ratona cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Control	10	0'04±0'01 ^a (0'03-0'08)
FO Cunícola	10	96'00±8'00 ^b (72'00-120'00)
FO Porcino	7	0'04±0'01 ^a (0'03-0'05)
FO Bovino	7	0'07±0'01 ^a (0'06-0'10)
FO Ovino	7	0'06±0'01 ^a (0'04-0'08)
FO Caprino	10	14'86±1'64 ^a (0'07-16'50)
Total	70	P<0'05

a, b, Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre grupos.

Ovocito de ratona

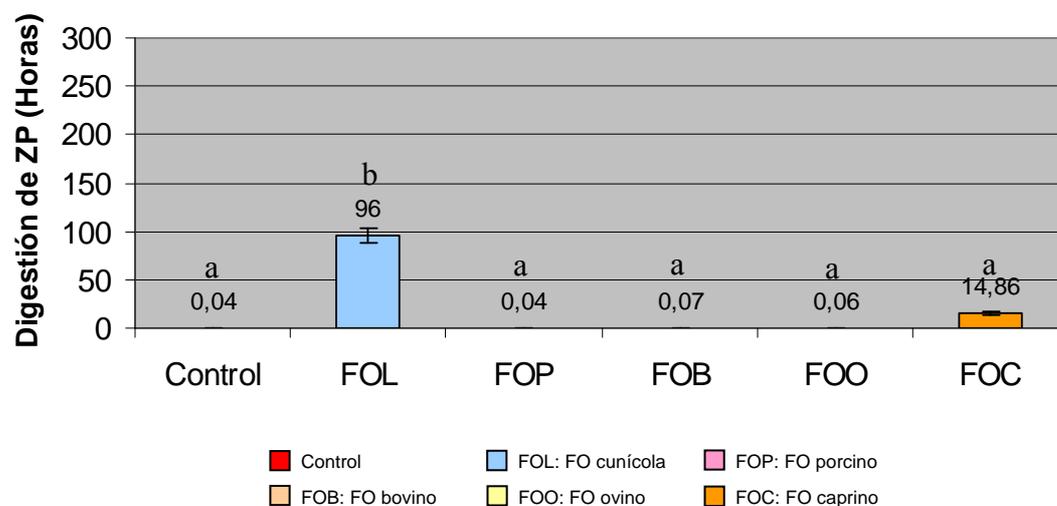


Figura 34. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de ratona cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

6.1.3.2.3. Ovocito de rata

Las ZPs de ovocitos de rata madurados *in vivo* y obtenidos de la ampolla oviductal no tratados u ovocitos control muestran un tiempo medio de digestión en pronasa de unas 0'07 horas ($3'09 \pm 0'55$ minutos). Cuando los ovocitos son tratados con algún FO no se produce ningún efecto en el tiempo de digestión respecto al control exceptuando el FO cunícola (tabla 23), que en esta especie es el único que aumenta la RDE, siendo este efecto además muy elevado (Fig. 35).

Tabla 23. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de rata cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Control	21	0'07±0'01 ^a (0'01-0'15)
FO Cunícola	14	207'43±24'47 ^b (72'00-288'00)
FO Porcino	10	0'06±0'01 ^a (0'03-0'07)
FO Bovino	10	0'04±0'01 ^a (0'03-0'06)
FO Ovino	10	0'06±0'01 ^a (0'05-0'10)
FO Caprino	10	0'05±0'01 ^a (0'03-0'08)
Total	75	P<0'05

a, b, Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre grupos.

Ovocito de rata

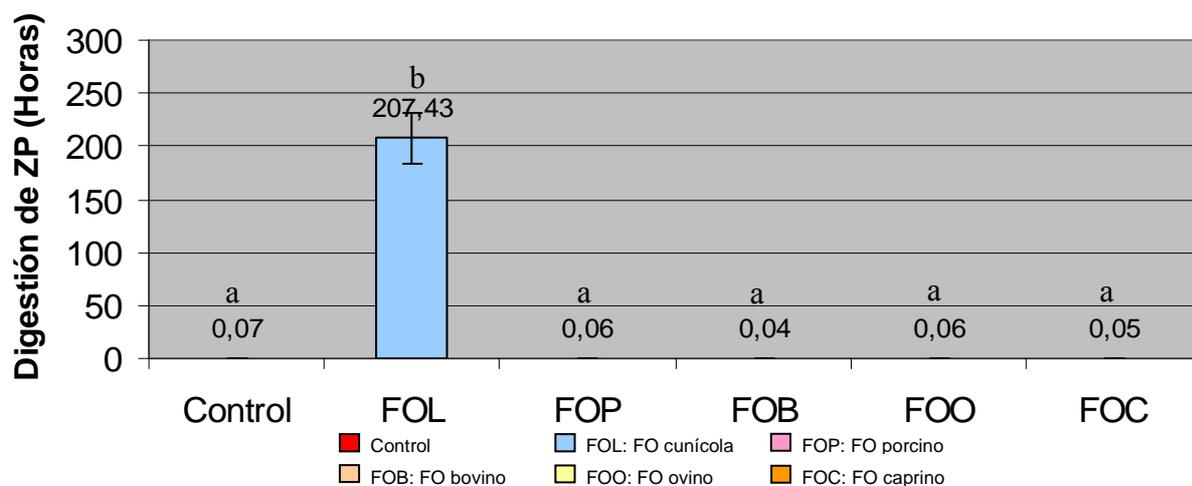


Figura 35. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de rata cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

6.1.3.2.4. Ovocito de hámster

Las ZPs de ovocitos de hámster madurados *in vivo* o foliculares no tratados con ningún FO u ovocitos control muestran un tiempo medio de digestión en pronasa de unas 24 horas, por lo que estos ovocitos presentan RDE de su ZP (tabla 24), a diferencia del resto de especies estudiadas (figuras 4 y 5). Cuando los ovocitos son tratados con FO cúnicola, porcino u ovino aumenta el tiempo de digestión respecto al control. El FO cúnicola es el que mayor efecto produce en la ZP de ovocitos de hámster mientras que el FO de vaca y cabra no producen efecto de RDE (Fig. 36).

Tabla 24. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de hámster cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Control	22	24'42±4'79 ^a (0'03-48'00)
FO Cúnicola	17	288'00±0'00 ^b (288'00-288'00)
FO Porcino	10	63'30±12'99 ^c (16'50-120'00)
FO Bovino	10	26'85±10'35 ^a (16'50-120'00)
FO Ovino	10	240'00±3'58 ^d (216'00-264'00)
FO Caprino	10	47'55±15'8 ^{ac} (16'50-120'00)
Total	79	P<0'05

a, b, c Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre grupos.

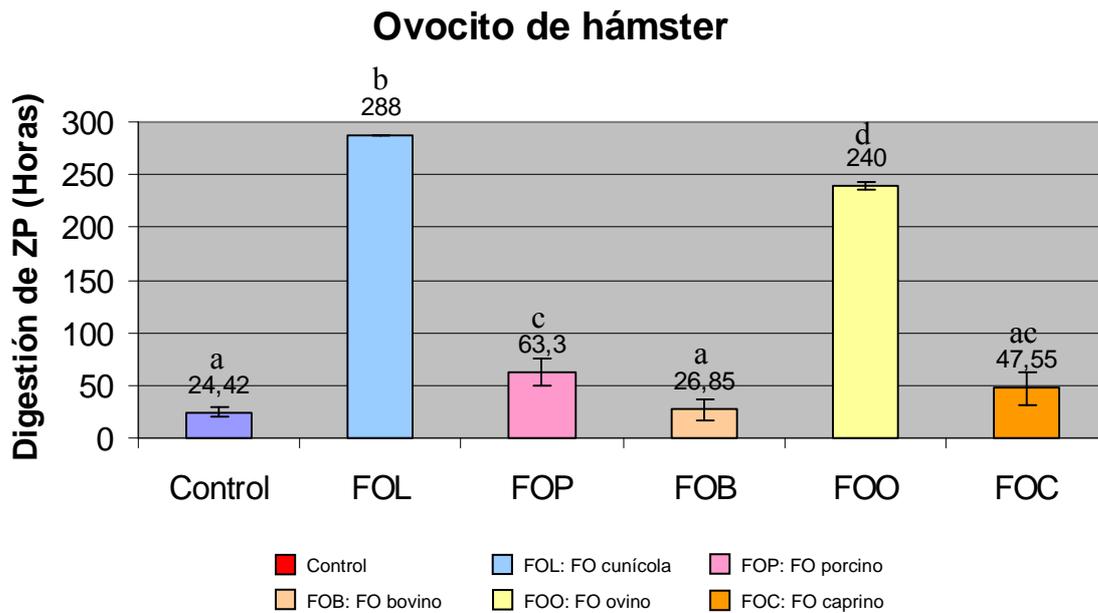


Figura 36. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de hámster cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

6.1.3.2.5. Ovocito de mujer

Las ZPs de ovocitos de mujer no tratados con ningún FO u ovocitos control muestran un tiempo medio de digestión en pronasa de unas 0'03 horas ($2'03 \pm 0'01$ minutos). Solamente cuando los ovocitos son tratados con FO cunícola ($2'83 \pm 0'12$ minutos), el estadístico pos hoc Test de Tukey muestra que existen diferencias significativas con respecto al control (tabla 25 y Fig. 37).

Tabla 25. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de mujer cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (MINUTOS) \pm SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (HORAS) \pm SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Control	11	$1'83 \pm 0'9^a$ (1'17-2'08)	$0'03 \pm 0'01^a$ (0'02-0'03)
FO Cunícola	9	$2'83 \pm 0'12^b$ (2'00-3'00)	$0'04 \pm 0'01^b$ (0'03-0'05)
FO Porcino	7	$1'45 \pm 0'18^a$ (0'88-2'02)	$0'02 \pm 0'01^a$ (0'01-0'03)
FO Bovino	9	$2'04 \pm 0'7^a$ (1'50-2'17)	$0'03 \pm 0'01^a$ (0'03-0'04)

FO Ovino	7	1'89±0'23 ^a (1'07-2'52)	0'03±0'01 ^a (0'02-0'04)
FO Caprino	7	2'01±0'24 ^a (1'23-2'87)	0'03±0'01 ^a (0'02-0'04)
Total	50	P<0'05	P<0'05

a, b, Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre grupos.

Ovocito de mujer

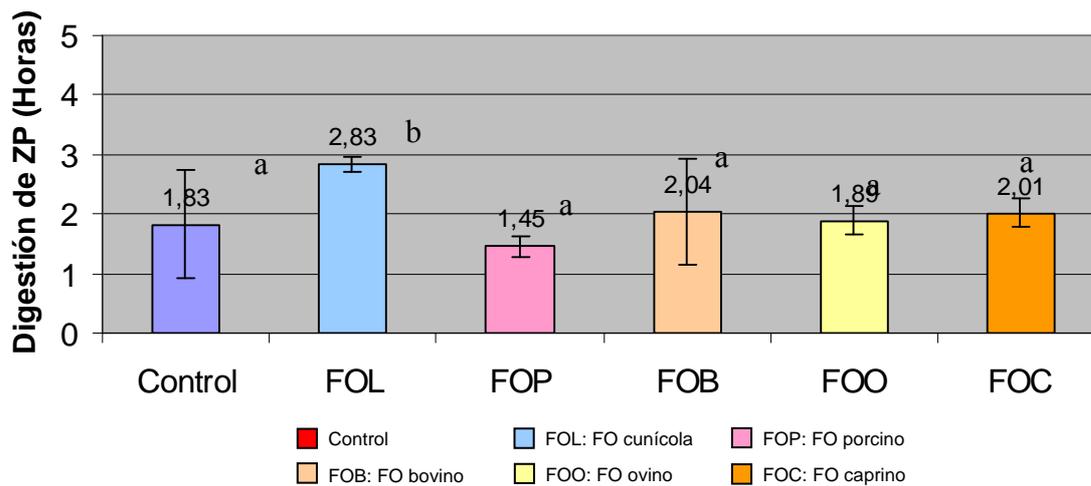


Figura 37. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de mujer cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

6.1.3.2.6. Ovocito de cerda

Las ZPs de ovocitos de cerda madurados *in vitro* no tratados con ningún FO u ovocitos control muestran un tiempo de digestión en pronasa de 0'05 horas (3'21 ± 0'44 minutos). Cuando los ovocitos son tratados con FO cunícola o bovino aumenta el tiempo de digestión respecto al control anterior (tabla 26). En el caso del ovocito de cerda también es el FO cunícola es el que más aumenta la resistencia a la proteólisis seguido del FO bovino. El resto de FOs porcino, caprino y ovino no producen RDE según el estadístico (Fig. 38).

Tabla 26. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de cerda cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Control	30	0'05±0'01 ^a (0'02-0'17)
FO Cunicola	10	288'00±0'00 ^b (288'00-288'00)
FO Porcino	10	9'20±2'24 ^a (1'42-16'00)
FO Bovino	10	98'30±38'57 ^c (3'17-240'00)
FO Ovino	10	4'51±0'28 ^a (3'12-5'50)
FO Caprino	10	5'15±1'24 ^a (2'17-15'50)
Total	80	P<0'05

a, b, c, Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre grupos.

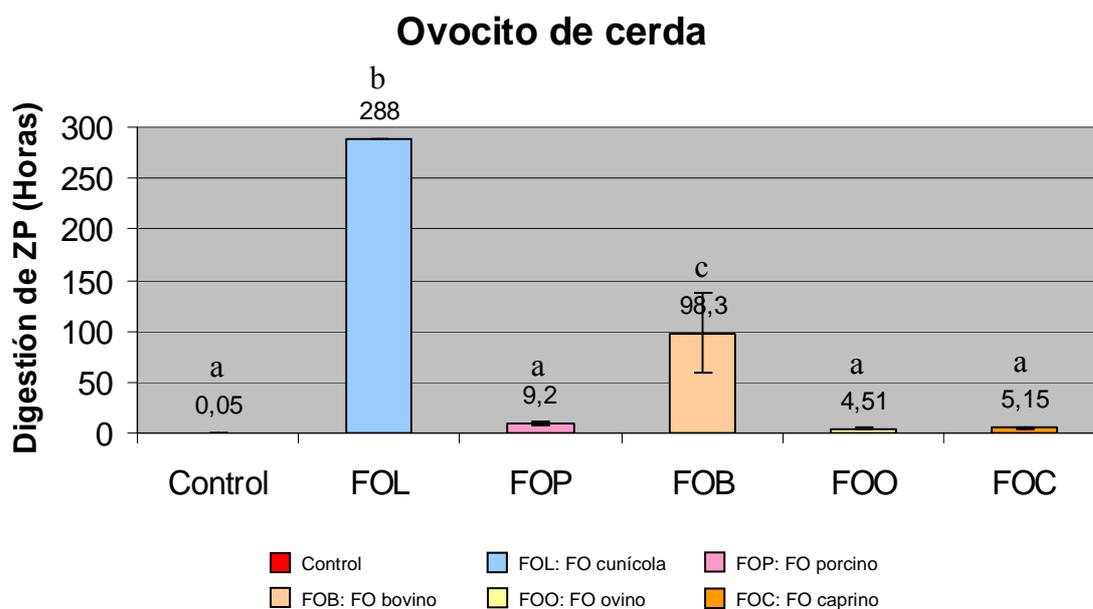


Figura 38. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de cerda cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

6.1.3.2.7. Ovocito de vaca

Las ZPs de ovocitos de vaca madurados *in vitro* no tratados con ningún FO u ovocitos control muestran un tiempo de digestión en pronasa de 0'05 horas ($2'7 \pm 0'50$ minutos). Cuando los ovocitos son tratados con FO cunicola, bovino, ovino y caprino aumenta el tiempo de digestión respecto al control (tabla 27). En el caso del ovocito de vaca, el FO cunicola es también el que más aumenta la RDE, seguido del FO homólogo,

posteriormente el FO caprino y el FO ovino. El FO porcino no produce incremento en la RDE según el estadístico (Fig. 39).

Tabla 27. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos bovinos cuando son incubados 30 minutos con FO de diferentes especies.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Control	28	0'05±0'01 ^a (0'03-0'06)
FO Coneja	10	288'00±0'00 ^b (288'00-288'00)
FO Porcino	10	1'78±0'29 ^a (0'17-2'77)
FO Bovino	10	196'50±28'56 ^c (21'00-288'00)
FO Ovino	10	105'90±25'37 ^d (10'00-168'00)
FO Caprino	10	172'10±34'59 ^{cd} (10'00-240'00)
Total	78	P<0'05

a,b, c Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre grupos.

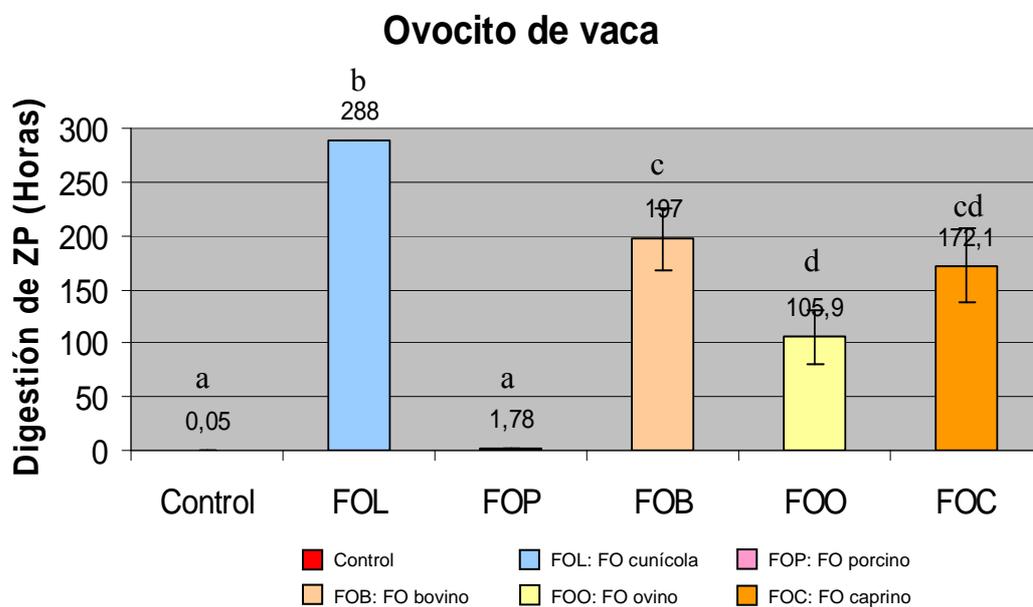


Figura 39. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos bovinos cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

6.1.3.2.8. Ovocito de oveja

La ZPs de ovocitos de oveja madurados *in vitro* no tratados con ningún FO u ovocitos control muestran un tiempo medio de digestión en pronasa de unas 0'09 horas ($5'42 \pm 0'60$ minutos). Cuando los ovocitos son tratados con FO cunícola, bovino o caprino aumenta el tiempo de digestión respecto al control (tabla 28), siendo el FO cunícola el que más aumenta la RDE, seguido del FO homólogo y posteriormente del FO bovino. Los FO porcino y caprino no muestran RDE según el estadístico (Fig. 40). En la figura 41 se muestran ovocitos de oveja en diferentes situaciones.

Tabla 28. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de oveja cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (HORAS) ± SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Control	20	0'09±0'01 ^a (0'03-0'23)
FO Cunícola	10	168'00±0'00 ^b (168'00-168'00)
FO Porcino	10	0'48±0'13 ^a (0'08-0'95)
FO Bovino	10	76'86±32'55 ^c (0'58-240'00)
FO Ovino	10	88'27±32'54 ^c (0'50-240'00)
FO Caprino	10	0'60±0'14 ^a (0'22-1'22)
Total	70	P<0'05

a, b, c Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre grupo.

Ovocito de oveja

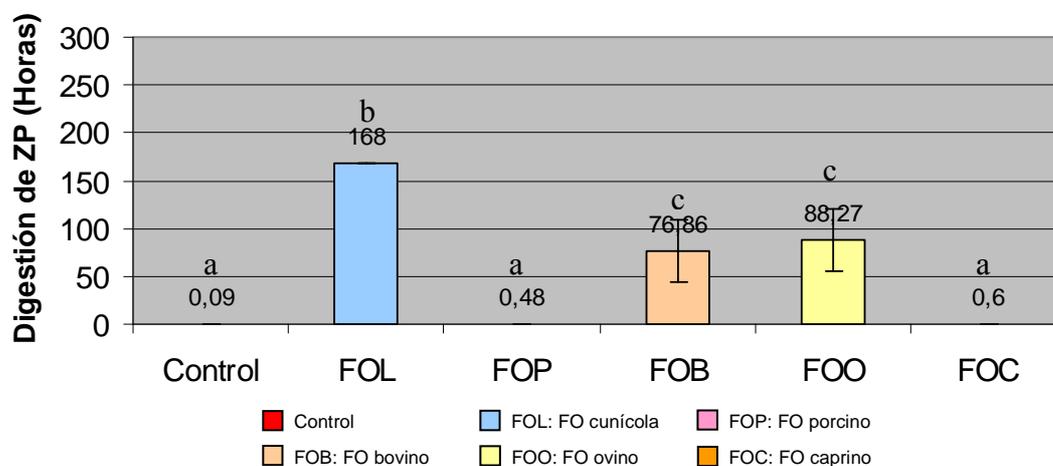


Figura 40. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos de oveja cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

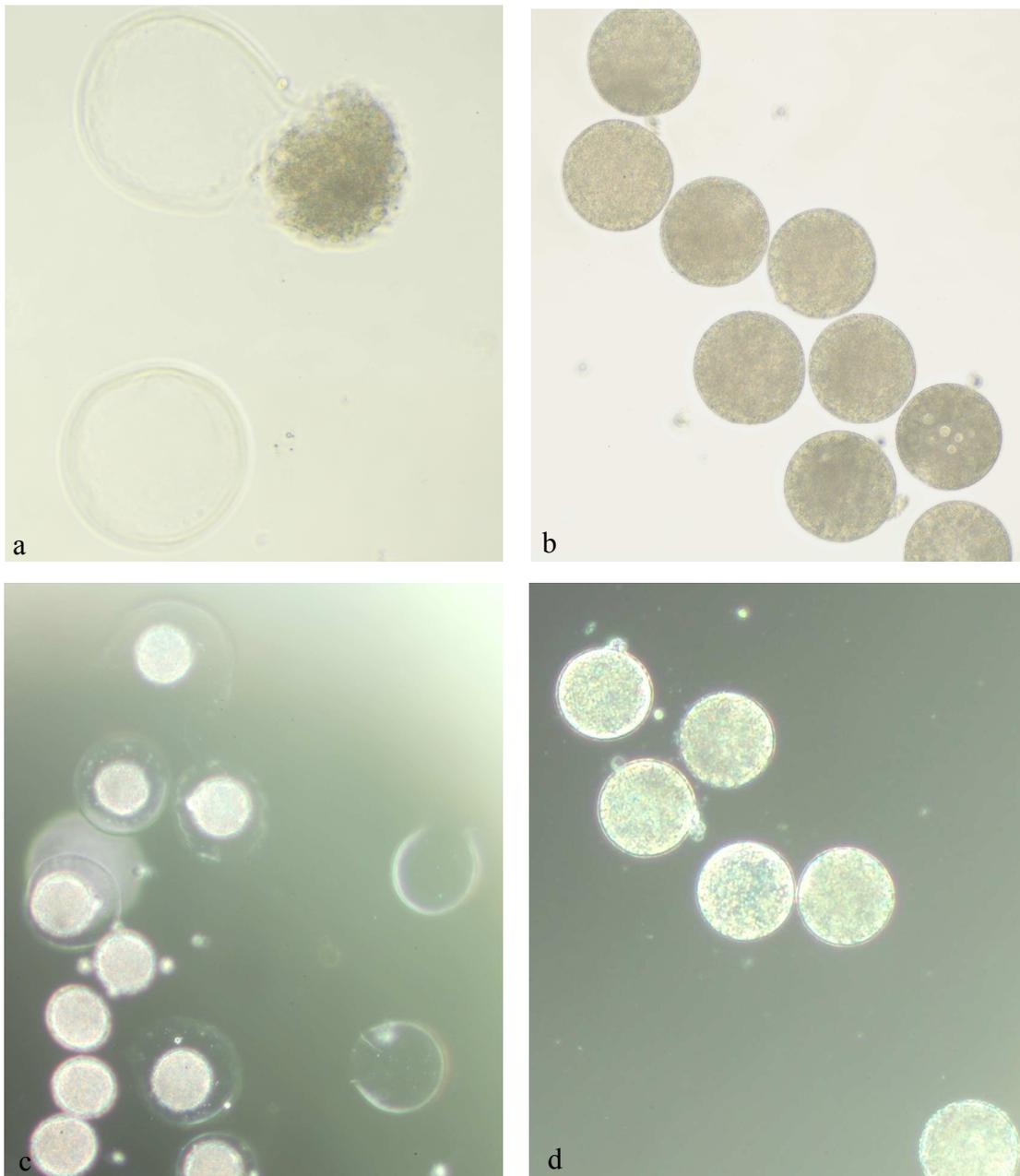


Figura 41. Ovocitos de oveja preincubados 30 minutos con diferentes FOs en el test enzimático de pronasa transcurridos 40 minutos desde el inicio. a) Ovocitos de oveja preincubados en FO bovino. b) Ovocitos de oveja preincubados en FO caprino. c) Ovocitos de oveja preincubados en FO ovino. d) Ovocitos de oveja preincubados en FO porcino.

6.1.3.2.9. Ovocito de cabra

Las ZPs de ovocitos de cabra madurados *in vitro* no tratados con ningún FO u ovocitos control muestran un tiempo de digestión en pronasa de 0'06 horas ($3'77 \pm 0'32$ minutos). Cuando los ovocitos son tratados con FO cunicola u ovino aumenta el tiempo de digestión de la ZP respecto al control (tabla 29). En el caso del ovocito de cabra, el FO cunícola es el que más aumenta la RDE seguido del FO ovino. Los FOs porcino, bovino y el homólogo no producen RDE (Fig. 42).

Tabla 29. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos caprinos cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (HORAS) \pm SEM. (VALOR MÁXIMO Y MÍNIMO)
Control	17	0'06 \pm 0'01 ^a (0'04-0'10)
FO Cunicola	10	240'00 \pm 0'00 ^b (240'00-240'00)
FO Porcino	10	0'72 \pm 0'24 ^a (0'08-2'50)
FO Bovino	10	42'15 \pm 22'13 ^a (5'00-240'00)
FO Ovino	10	120'10 \pm 32'76 ^c (24'50-240'00)
FO Caprino	10	13'45 \pm 3'70 ^a (0'87-24'50)
Total	67	P<0'05

a, b, c Diferentes letras en la misma fila indican diferencia significativa entre grupos.

Ovocito de cabra

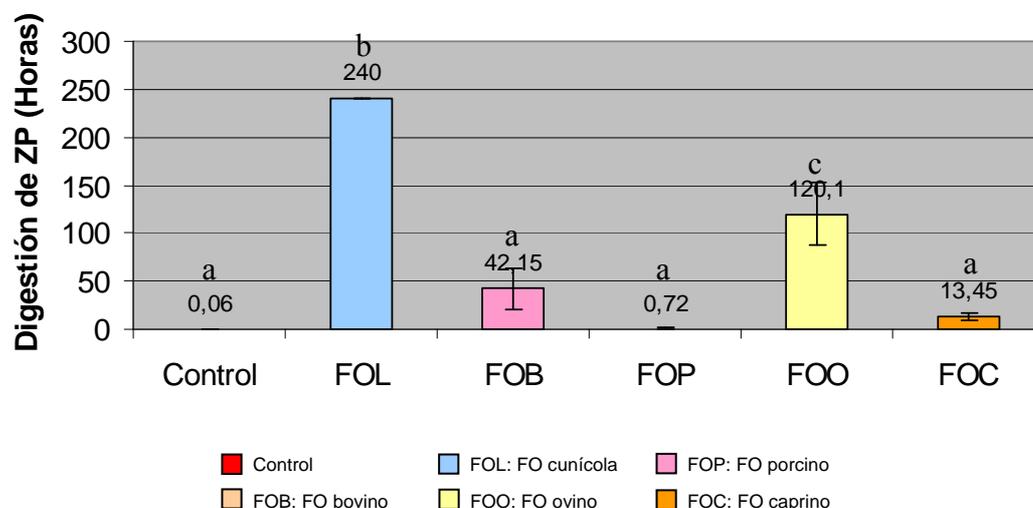


Figura 42. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos caprinos cuando son incubados 30 minutos con FOs de diferentes especies.

6.1.4. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN POR PRONASA DE LA ZONA PELÚCIDA DE OVOCITOS PORCINOS INCUBADOS CON FLUIDO OVIDUCTAL CARENTE DE OVIDUCTINA

Los ovocitos porcinos madurados *in vitro* sin incubar e incubados 30 minutos en FO de yegua muestran un tiempo medio de digestión en pronasa de unos 2 minutos aproximadamente (tabla 30), resultados que indican que los ovocitos no adquieren RDE con este tipo de FO.

Tabla 30. Tiempo de digestión de la ZP de ovocitos porcinos cuando son incubados 30 minutos con FO de yegua.

TRATAMIENTO	N	TIEMPO DE DIGESTIÓN DE LA ZP (MINUTOS) ± SEM
Control-	30	2'32±0'14 (1'33-4'50)
FO Yegua	40	2'41±0'14 (1'17-4'50)
Total	70	

6.2. OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HEPARINA Y ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS MISMOS SOBRE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LA ZONA PELÚCIDA

6.2.1. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La separación del FO bovino mediante cromatografía de afinidad nos reveló que existen en él componentes que tienen diferente afinidad por la heparina (Fig. 43). También se puede observar que hay componentes que no quedan retenidos por la columna, posiblemente porque no tienen afinidad o porque la columna está saturada. En cuanto a los componentes retenidos por la columna podemos distinguir diferentes afinidades por la heparina las cuales están relacionadas con la cantidad de cloruro sódico (NaCl) necesario para separarlos de ella y obtenerlos en las diferentes fracciones.

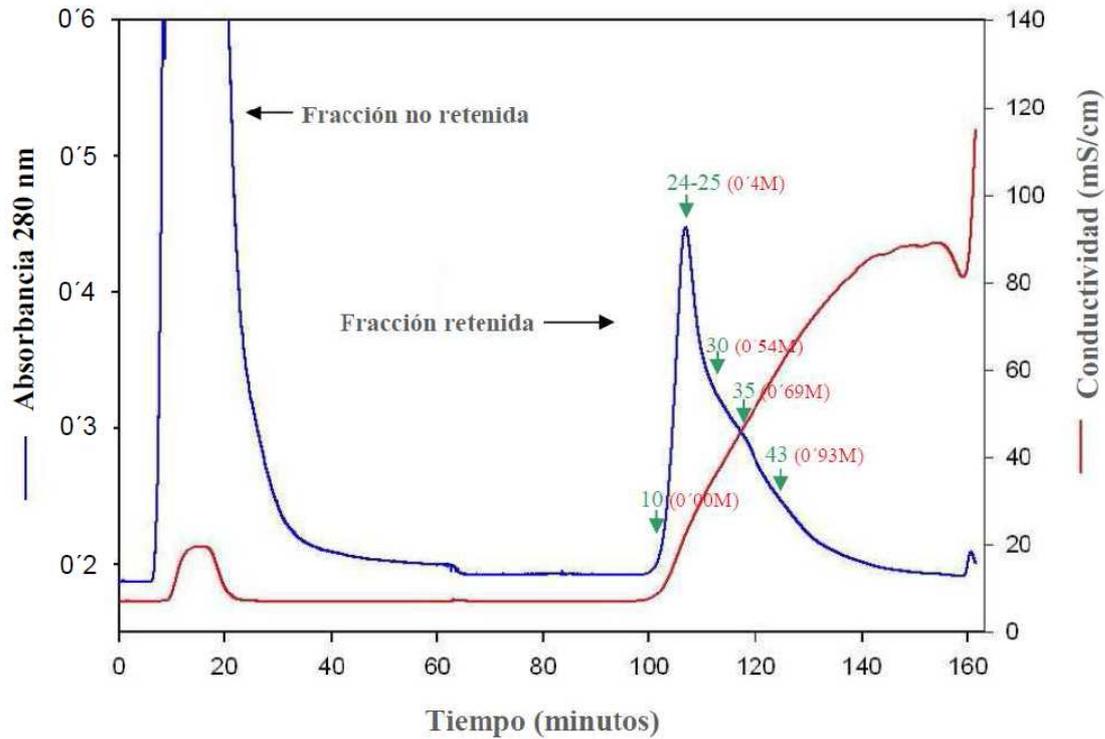


Figura 43. Fraccionamiento de FO bovino. Imagen del procesamiento realizado en el FPLC al final de uno de los replicados. En ella, la línea azul representa las proteínas cuando salen de la columna y son captadas por el espectrofotómetro a una absorbancia de 280 nm y la línea roja indica la conductividad (mS/cm) del tampón que se usó en cada momento del fraccionamiento. En el eje horizontal se representa el tiempo en el que se realizó el proceso. En verde se indica el momento en el que se separaron algunos de los fraccionados mostrando en rojo y entre paréntesis la concentración de NaCl necesaria para separarlos de la columna de heparina.

Los resultados obtenidos en esta fase experimental nos muestran que en nuestras condiciones experimentales la mayor parte de las proteínas con ponentes del FO bovino en fase folicular tardía no se unen a la heparina, bien porque no tengan afinidad por ella o bien porque exista saturación de la columna de afinidad. El FO posee gran cantidad de proteínas con una media de unos 54.28 ± 3.71 μg de proteínas/ μl de FO en fase folicular (Carrasco, 2007), por lo que no se pueden descartar que existan dichos fenómenos de saturación. Los componentes del FO que pasan a través de la columna sin quedarse retenidos en ella representan el primer pico de la figura 43 a la que llamamos fracción no retenida (FNR), cuyo máximo se sale fuera del rango y su amplitud abarca de los 5 a 35 minutos aproximadamente del procedimiento.

La fracción de muestra que no se une a la heparina sale poco a poco de la columna gracias al flujo constante del tampón de lavado cuya absorbancia es mostrada

por la línea roja hasta aproximadamente los 100 minutos. La línea azul de la figura en el intervalo de tiempo entre los 60-100 minutos nos muestra que la fracción no retenida ya ha salido de la columna. A partir de ese tiempo (100 minutos) se comienza a introducir el tampón de elución a una concentración creciente de NaCl, evolución mostrada por la línea roja (a partir de los 100 minutos) que comienza a ascender, y comienzan a salir de la columna aquellas proteínas que sí fueron retenidas por la heparina y que denominamos fracción retenida. Ésta representa el segundo pico azul de la figura. Este segundo pico abarca entre los 100 y 140 minutos del procedimiento.

Tras extrapolar los resultados de conductividad a concentración de NaCl, podemos observar que las fracciones de proteínas de FO bovino con capacidad para unirse a la columna de heparina comienzan a separarse de ella cuando se les aporta una concentración de NaCl de 0'05 M (tabla 31) y lo siguen haciendo hasta una concentración aproximada de 0'7 M; por encima de dicha concentración ya no aparecen muchas más proteínas unidas a la heparina de la columna.

6.2.2. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA (RDE) PROVOCADA POR LAS DIFERENTES FRACCIONES OBTENIDAS

Los resultados obtenidos en la prueba de RDE para los ovocitos porcinos control (no preincubados) nos ofreció una media de $2'66 \pm 0'23$ minutos y para los ovocitos preincubados durante 30 minutos en la FNR por la columna (a $10 \mu\text{g}/\text{ovocito}$) nos ofreció una media de $14'36 \pm 3'58$ minutos (Tabla 31).

Los resultados obtenidos con el análisis de la varianza y tras las pruebas post hoc del test de Tukey nos muestran que ambos grupos (control y fracción no retenida) no poseen diferencias significativas entre sí para $p < 0'05$.

El FO bovino de partida presenta una RDE de más de 6 horas para la mayoría de los ovocitos analizados (tabla 31). El test pos hoc de Tukey indica que existen diferencias significativas entre el grupo pre-tratado con el FO bovino de partida y los grupos control y pre-incubado con la fracción no retenida.

Tabla 31. Digestión de la ZP de ovocitos porcinos preincubados 30 minutos con el FO bovino de partida (FOB, 1µl/ovocito), las diferentes fracciones obtenidas (10 µg de proteína/ovocito) y fracción no retenida (FNR, 1 µl/ovocito).

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE NA CL (M)	N	DIGESTIÓN DE LA ZP (MINUTOS) ±SEM
Control	-	64	2'66±0'23 ^a
FOB	-	1	357'19±2'82 ^b
		15	* >6horas
FNR	-	18	14'36±3'58 ^a
14	0'05	8	2'96±0'26 ^a
15	0'08	14	1'53±0'16 ^a
16	0'11	17	2'79±1'17 ^a
17	0'14	18	2'55±0'55 ^a
18	0'17	9	2'66±0'51 ^a
19	0'2	10	28'83±8'66 ^a
20	0'24	8	71'5±6'2 ^{ac}
21	0'27	12	64'28±15'61 ^{ac}
22	0'3	19	101'09±23'73 ^{acd}
23	0'34	17	87'69±17'26 ^{ac}
24	0'37	17	144'18±29'02 ^{cd}
25	0'4	1	248'5±50'24 ^{be}
		17	* >6horas
26	0'43	18	200'37±21'08 ^{be}
27	0'46	13	151'5±24'82 ^{cde}
		1	* >6 horas
28	0'48	16	36'89±4'91 ^a
29	0'51	17	72'18±10'58 ^{ac}
30	0'54	15	50'2±7'1 ^{ac}
31	0'57	16	20'69±2'46 ^a
32	0'6	18	53'12±15'56 ^{ac}
33	0'63	13	12'85±3'21 ^a
34	0'66	13	17'02±3'09 ^a
35	0'69	2	2'5±0'01 ^a
Total	-	413	-

a,b,c,d,e Diferentes letras en la columna indican diferencias entre grupos.

En los resultados resumidos en la tabla 31 se puede observar que en las primeras fracciones de muestra, en las que aparecen proteínas, estas no producen RDE a las ZPs de los ovocitos porcinos, es ya en la fracción 24 donde aparece RDE estadísticamente significativa. Esta RDE va creciendo progresivamente en las fracciones siguientes (evolución que se puede observar en la figura 44), hasta alcanzar un máximo en la fracción 25 (que ha necesitado 0'4 M de NaCl para separarse de la heparina). En esta

fracción 25, se observa una RDE de más de 6 horas para la mayoría de los ovocitos analizados, al igual que el FO bovino usado de partida para el fraccionamiento. Posteriormente, la RDE descende hasta alcanzar un dato estadísticamente similar al control en la fracción 28. En algunos replicados aparece alguna fracción más hasta un valor de NaCl de 0,8 M pero carentes de efecto sobre la RDE.

Resistencia a la digestión enzimática

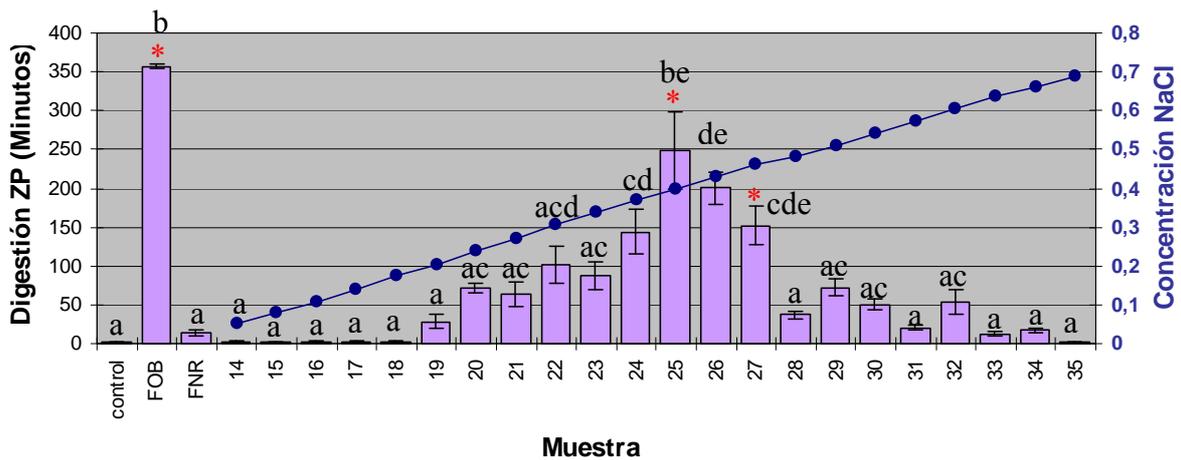


Figura 44. RDE de la ZP de ovocitos porcinos preincubados 30 minutos con el FO bovino de partida (1 μ l de FOB/ovocito), las diferentes fracciones obtenidas (10 μ g de proteína/ovocito) y fracción no retenida (FT a 1 μ l de FOB/ovocito). * indica que se ha representado el valor medio de los datos tomando como dato de 6 horas (360 minutos) para aquellos ovocitos que presentaban un dato de resistencia a la digestión enzimática de más de 6 horas.

6.2.3. ELECTROFORESIS Y TINCIÓN DE PLATA

Para conocer el patrón de bandas de las fracciones que se unían a la heparina y su similitud con el FO de partida, se realizó una tinción de plata usando 5 μ g de proteína de cada una de las muestras y del FO bovino de partida (Fig. 45).

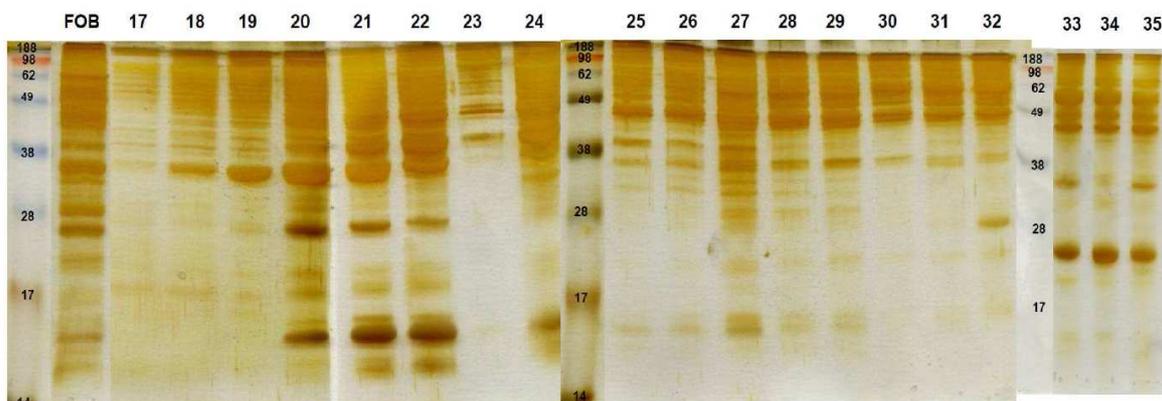


Figura 45. Patrón de bandas proteicas del FO bovino de partida y de las diferentes muestras obtenidas en su fraccionamiento en la columna de heparina.

Como se puede observar, aunque la fracción de proteínas que se retienen en la columna es solamente una porción del total presentes en el FO de partida, existe gran cantidad de proteínas que poseen capacidad de unirse a la heparina, ya que como se observa las fracciones retenidas están compuestas también por un número elevado de proteínas. Se puede observar también que las proteínas con afinidad por la heparina son predominantemente de elevado peso molecular.

Como podemos observar en la figura 43, la fracción retenida por la columna es mucho menor que la FNR, aún así, podemos indicar que cada fracción obtenida posee gran cantidad de proteínas ya que en el gel teñido con plata se observan multitud de bandas en cada fracción.

6.3. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y GENÓMICO DEL OVIDUCTO PORCINO Y BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA.

Como hemos mencionado anteriormente, el estudio de la composición del oviducto porcino y bovino en la fase folicular tardía se abordó mediante dos tipos de metodologías (proteómica y genómica) cuyos resultados se muestran a continuación.

6.3.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO

El contenido proteico de los FOs porcino y bovino se separó en diferentes bandas en base a su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Tras la tinción con plata se observaron los patrones de bandas típicos de los dos tipos de fluidos analizados en el presente trabajo (Fig. 46).

En ambos casos existió un predominio de proteínas de alto peso molecular siendo más abundantes aquellas proteínas con un peso molecular superior a 45-50 kDa en el caso del FO porcino y superior a 30 kDa en el caso del FO bovino. Por debajo de ese peso molecular existen proteínas pero el número de bandas que se observó fue menor.

A partir del análisis proteómico de las diferentes bandas recortadas de los geles de poliacrilamida de uno y otro fluido se identificaron diferentes péptidos

correspondientes a las proteínas que se muestran en los anexos I y II del presente trabajo. Los nombres de las proteínas se indican en inglés debido a que es el idioma usado en las diferentes bases de datos especializadas y herramientas informáticas que se usaron para el análisis (PubMed, UniProtKB, DAVID e Ingenuity).

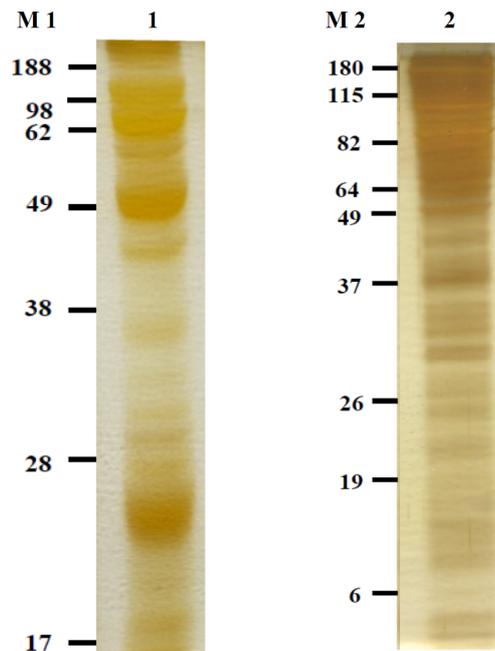


Figura 46. Patrón proteico del FO en fase folicular tardía. M1) marcador molecular (Invitrogen, LC 5925). M2) marcador molecular (Invitrogen, 10748-010). 1) FO porcino (50 µg). 2) FO bovino (216 µg).

6.3.1.1 Análisis proteómico del fluido oviductal porcino

En el caso del **FO porcino** se identificaron 291 proteínas. Estas proteínas fueron detectadas a partir de las secuencias de péptidos presentes tanto en proteínas de la especie porcina como en proteínas de otras especies como se puede observar en el anexo I. Esto se debe a que el genoma de la especie porcina no se ha completado y algunos de los resultados se obtienen por similitud a proteínas de otras especies. Por ello, es conveniente la validación de estos datos mediante otros métodos como el análisis molecular para la detección de la expresión del ARNm correspondiente (PCR).

El análisis de estos datos según la clasificación realizada por Avilés *et al.*, (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) modificada, indicó la existencia de los siguientes grupos de proteínas: factores de crecimiento, citoquinas, receptores e inhibidores; hormonas y sus receptores; proteasas e inhibidores; protectores de la acción oxidante; agentes de defensa; glicosidasas y glicosiltransferasas; otras enzimas; chaperonas y proteínas de estrés o choque térmico (Heat Shock Proteins, HSP); proteínas del plasma sanguíneo; otras proteínas y proteoglicanos (anexo I). El grupo denominado otras proteínas fue clasificado también según la localización celular de las mismas en diferentes grupos: nucleares, citoplasmáticas, componentes de membrana, secretadas, de localización múltiple (descritas en varias zonas de la célula) y de localización no caracterizada actualmente. Las proteínas incorporadas en este último grupo se corresponden con proteínas de las que apenas se posee información en las bases de datos por lo que no se pueden incorporar en ningún otro grupo. En el anexo I se indica también si la proteína referida es glicoproteína (G) y/o secretada (S).

Los resultados generales del presente estudio organizados según la modificación de Avilés *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) para el FO porcino en fase folicular tardía son los mostrados en la tabla 32, donde se puede observar que predomina el grupo otras enzimas (21'6%) y otras proteínas (59'5%).

En este análisis encontramos un total de 27 proteínas secretadas (9'3%) que se encuentran repartidas en los grupos: factores de crecimiento, citoquinas, receptores e inhibidores (grupo 1); proteasas e inhibidores (grupo 3); agentes de defensa (grupo 5); glicosidasas y glicosiltransferasas (grupo 6); proteínas del plasma sanguíneo y proteínas sanguíneas (grupo 9); otras proteínas secretadas (grupo 10.4) y proteoglicanos (grupo 11), como se puede ver en el anexo I.

Tabla 32. Distribución de los resultados proteicos porcinos.

GRUPO DE LA CLASIFICACIÓN	PROTEÍNAS
1. Factores de crecimiento, citoquinas, receptores e inhibidores	4 (1'4%)
2. Hormonas y receptores	1 (0'3%)
3. Proteasas e inhibidores	9 (3'1%)
4. Protección antioxidante	1 (0'3%)
5. Agente de defensa	15 (5'2%)
6. Glicosiltransferasa	1 (0'3%)
7. Otros enzimas	63 (21'6%)
8. Chaperonas y HSP	13 (4'5%)
9. Proteínas del plasma y de la sangre	10 (3'4%)
10. Otras proteínas: 10.1. Nucleares	30 (10'3%)
10.2. Citoplasmáticas	36 (12'4%)
10.3. Componentes de membrana	29 (10'0%)
10.4. Secretadas	16 (5'5%)
10.5. Localización múltiple (núcleo/citoplasma/membrana)	29 (10'0%)
10.6. No caracterizado	33 (11'3%)
11. Proteoglicanos	1 (0'3%)
Total	291

De los resultados obtenidos, mostramos la comprobación peptídica realizada para la validación de los datos de dos de las proteínas detectadas: *HSP 90-alpha* y *Serotransferrin* (Figs. 47 y 48). En la figura 47, se muestran los péptidos identificados para la proteína porcina *HSP 90-alpha* (HSP90AA1) y la cobertura de estos péptidos representa el 42'2% de la proteína total. En la figura 48 se muestran los péptidos identificados para la proteína porcina *Serotransferrin* y la cobertura de los péptidos detectados representa el 19'3% de la proteína total.

1 MPEETQTQDQPMEEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNSSDALDKIRYESLTDP SKL
 71 DSGKELHINLIPNKQDRTLTIVDTGIGMTKADLINNLTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYS
 141 AYLVAEKVTVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVRTDTGPEMGRGTKVILHLKEDQTEYLEEERRIKEIVKKH
 210 SQFIGYPITLFVEKERDKVSDDEAEEKEDKEEKEKEEKESEDKPEIEDVGSDEEEEEKDGDKKKKKK
 280 IKEKYIDQEELNKTPIWTRNPDDITNEEYGEFYKSLTNDWEDHLAVKHF SVEGQLEFRALLFVPRRAPF
 350 DLFENRKKKNNIKLYVRRVFIMDNCEELIPEYLNFI RGVVDS EDLPLNISREMLQQSKILKVIRKNLVKK
 420 CLELFTELAEDKENYKKFYEQFSKNIKLGIHEDSQNRKKLSELLRYYTSASGDEMVS LKDYCTRMKENQK
 490 HIYYITGETKDQVANS AFVERLRKHGLEVIYMI EPID EYCVQQLKEFEGKTLVSVTKEGLELPEDEEEKK
 560 KQEEKKTKFENLCKIMKDILEKKVEKV VVSNRLVTSPCCIVTSTYGWTANMERIMKAQALRDNSTMGYMA
 630 AKKHLEINPDHSI IETLRQKAEADKNDKSVKDLVILLYETALLSSGFSLEDPQTHANRIYRMIKLG LGID
 700 EDDPTADDSSAAVTEEMPPLLEGDDDTSRMEEVD

Figura 47. Secuencia de aminoácidos de la proteína *HSP 90-alpha* (HSP90AA1), (Acceso NCBI/GenBank: 47522774/NP_999138.1) Los péptidos muestran una cobertura del 42'2%.

1 VAQKTVRWCTISNQEANKCSSFRENMSKAVKNGPLVSCVKKSSYLD CIKAIRDKEADAVTL DAGLVFEAG
 71 LAPYNLKPVVAEFYQKDNPQTHYAVAVVKKGSNFQWNQLQGKRSCHTGLGRSAGWIIPMGLLYDQLPE
 141 PRKPIEKAVASFFSSSCVPCADPVNFPKLCQQCAGKGAEK CACSNEHPYFGYAGAFNCKEDAGDVA FVK
 210 HSTVLENLPDKADRQYELLCRDNTRRPVDDYENCYLAQVP SHAVVARSV DQGEDSIWELLNQAQEHFGR
 280 DKSPDFQLFSSSHGKDLLFKDSANGFLKIPSKMDSSLYLGYQYVTALRNLREEISPSSKNECKKVRWCA
 350 IGHEETQKCDAWS INSGGKIECVSAENT ED CIAKIVKGEADAMSLDGGYIYIAGKCGLVPVLAENYKTEG
 420 ENCVNTPEKGYLAVAVVKKSSGPD LNWNNLK GKKSCHTAVDR TAGWNI PMGLLYNKINSCKFDQFFGEGC
 490 APGSQRNSSLCALCIGSERAPGRECLANNHERYYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKDQVVQONTDGNKDDWA
 560 KDLKQMDFELL CQNGAREPVDNAENCHLARAPNHAVVARD DKVTCVAEELLKQQAQFGRHVTDCSSSFCM
 630 FKSNTKDLLFRDDTQCLARVGT TYESYLGADYITAVANLRKCSTSKLLEACTFHSAKNPRVETTT

Figura 48. Secuencia de aminoácidos de la proteína *Serotransferrin* (Acceso NCBI/GenBank: 136192/P09571.2). Los péptidos muestran una cobertura del 19'3%.

Las proteínas identificadas también se analizaron mediante la base de datos bioinformática DAVID para agruparlas del siguiente modo: proteínas secretadas (1'7%), nucleares (2'4%), proteínas presentes en el aparato de Golgi (2'1%), proteínas de membrana (2'4%), proteínas mitocondriales (1'4%), proteínas de ribosomas (1'4%), del citoesqueleto (4'8%), aquellas que el programa no reconoce junto con aquellas que

no es capaz de clasificar (21'6%) y otras proteínas que no se han clasificado aunque son componentes celulares y por lo tanto se encuentran presentes en la célula y forman parte de nuestros resultados (62'3%). Estos resultados están representados en la figura 49.

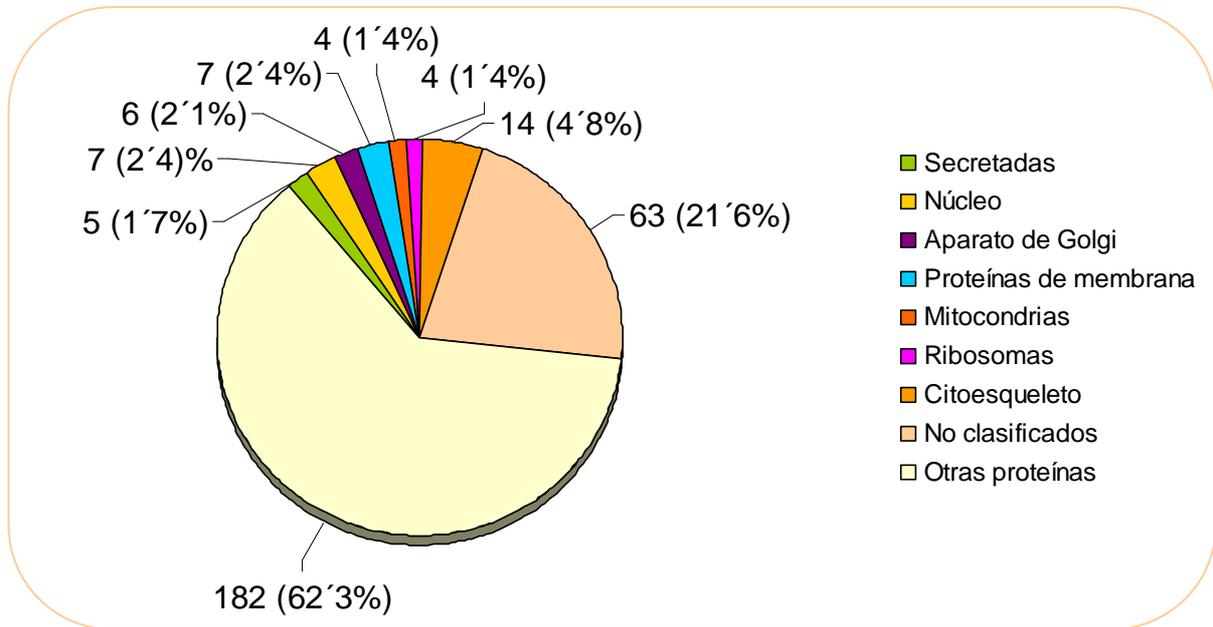


Figura 49 Diagrama circular representativo de los resultados obtenidos del análisis del fluido oviductal porcino en la fase folicular tardía según la plataforma DAVID.

Los resultados de proteómica obtenidos también se analizaron con el programa bioinformático Ingenuity, el cual agrupa a las proteínas según redes funcionales en 24 grupos (anexo III).

6.3.1.2 Análisis proteómico del fluido oviductal bovino

En el caso del **FO bovino** se identificaron 270 proteínas. Estas proteínas fueron detectadas como péptidos presentes tanto en proteínas de la especie bovina como en proteínas de otras especies como se puede observar en el anexo II. Por ello, consideramos conveniente la validación de estos datos mediante otros métodos como hemos mencionado previamente.

Los resultados generales del presente estudio organizados según la modificación de Avilés *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) para el FO bovino en fase folicular tardía son los mostrados en el anexo II y en la tabla 33. Como se puede observar en el

presente análisis predominan también los grupos de otras enzimas (14'4%) y otras proteínas (50'0%) al igual que en describimos previamente para la especie porcina.

En este análisis encontramos un total de 38 proteínas secretadas (14'1%) que se encuentran repartidas en los todos los grupos excepto en los incluidos en otras proteínas: nucleares (grupo 10.1), citoplasmáticas (grupo 10.2), componentes de membrana (grupo 10.3), de localización múltiple (grupo 10.5) y de localización desconocida actualmente (grupo 10.6) como se puede ver en el anexo II, en el cual también se indica si la proteína referida es glicoproteína (G) y/o secretada (S).

Tabla 33: Distribución de los resultados proteicos bovinos.

GRUPO DE LA CLASIFICACIÓN	PROTEÍNAS
1. Factores de crecimiento, citoquinas, receptores e inhibidores	7 (2'6%)
2. Hormonas y receptores	3 (1'1%)
3. Proteasas e inhibidores	14 (5'2%)
4. Protección antioxidante	6 (2'2%)
5. Agente de defensa	20 (7'4%)
6. Glicosidasas y glicosiltransferasas	1 (0'4%)
7. Otros enzimas	39 (14'4%)
8. Chaperonas y HSP	16 (5'9%)
9. Proteínas del plasma y de la sangre	28 (10'4%)
10. Otras proteínas:	
10.1. Nucleares	7 (2'6%)
10.2. Citoplasmáticas	16 (5'9%)
10.3. Componentes de membrana	20 (7'4%)
10.4. Secretadas	11 (4'1%)
10.5. Localización múltiple (núcleo/citoplasma/membrana)	13 (4'8%)
10.6. No caracterizado	68 (25'2%)
11. Proteoglicanos	1 (0'4%)
Total	270

De los resultados obtenidos, mostramos los péptidos identificados en dos de las proteínas detectadas: *Oviduct-specific glycoprotein* y *Heat shock 70 kDa protein 1B* (figuras 50 y 51). En la figura 50 se muestran los péptidos identificados para la proteína *Oviduct-specific glycoprotein* y la cobertura de estos péptidos representa el 22'7%. En

la figura 51 se muestran los péptidos identificados para la proteína bovina *Heat shock 70 kDa protein 1B* y la cobertura de los péptidos detectados representa el 18'9%.

```

1  LLLCVGLLLLVLKHHDGAAHKLVCYFTNWAFSRPGPASILPRDLDPFLCTHLVFAFASMSNNQIVPKDPQD
71  EKILLYPEFNKLKERNRGLKTLLSIGGWNFGTVRFTTMLSTFSNRERFVSSVIALLRTHGFDGLDLFFLYP
141 GLRGSPARDRWTFVFLLEELLQAFKNEAQLTMRPRLLLSAAVSGDPHVQKAYEARLLGRLLDFISVLSY
210 DLHGSWEKVTGHNSPLFSLPGDPKSSAYAMNYWRQLGVPPEKLLMGLPTYGRTFHLLKASQNELRAQAVG
280 PASPGKYTKQAGFLAYYEICCFVRRAKKRWINDQYVPYAFKGKEWVGYDDAISFGYKAFFIKREHFGGAM
350  VWTLDLDDFRGYFCGTGPFPLVHTLNNLLVNDEFSSSTPSPKFWFSTAVNSSRIGPEMPTMTRDLTTGLGI
420  LPPGGEAVATETHRKSETMTITPKGEIATPTRTPLSFGRHTAAPEGKTESPGEKPLTTVGH LAVSPGGIA
490  VGPVRLQTGQKVTPPGRKAGVPEKVTTPSGKMTVTPDGRAETLERRL

```

Figura 50. Secuencia de aminoácidos de la proteína *Oviduct-specific glycoprotein* (Acceso NCBI/GenBank: 2493675/Q28042.1). Los péptidos muestran una cobertura del 22'7%.

```

1  MAKNTAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDA
71  KRLLIGRKFQDPVQSDMKHWPFRVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPEEISSMVLTKMKEIAEAYLGHPVT
141  NAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLRIINEPTAAAIAYGLDRGTGKGERNVLIIDLGGGTFDVSIL
210  TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLRTACERAKRTLSSSTQA
280  SLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLL
350  QDFFNGRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLETAGGVM TALIKRNSTI
420  PTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTRDNNLLGRFELSGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVTA
490  TDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAEKYKADEVQRERVSANKNALESYAFNMKSAVEDEGLKG
560  KISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPIISRLYQGAGGPGAGGFGAQQPKGG
630  SSGSGPTIEEVD

```

Figura 51. Secuencia de aminoácidos de la proteína *Heat shock 70 kDa protein 1B* (Acceso NCBI/GenBank: 2495339/Q27965.1). Los péptidos muestran una cobertura del 18'9%.

Las proteínas obtenidas también se analizaron mediante la base de datos bioinformática DAVID, lo que nos permitió clasificarlas en los siguientes grupos: proteínas secretadas (2'6%), componentes del retículo endoplasmático (0'7%), proteínas de membrana (2'9%), proteínas que el programa no reconoce junto con aquellas que no es capaz de clasificar (40'4%) y otras proteínas que no se han clasificado aunque son

componentes celulares y por lo tanto se encuentran presentes en la célula y forman parte de nuestros resultados (53'3%), (Fig. 52).

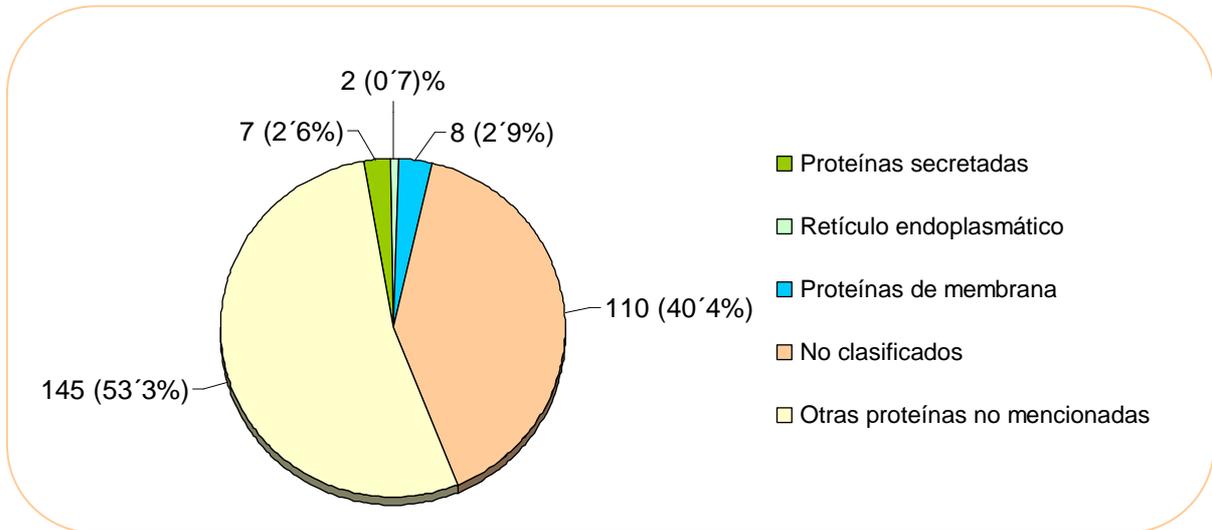


Figura 52. Diagrama circular representativo de los resultados obtenidos del análisis del fluido oviductal bovino en la fase folicular tardía según la plataforma DAVID

Los resultados obtenidos también se analizaron con el programa bioinformático Ingenuity, el cual agrupa a las proteínas según redes funcionales en 12 grupos (anexo IV).

6.3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El análisis genómico del oviducto porcino se realizó a partir de muestras de la porción ampular-ístmica de 4 hembras adultas en estado pre-ovulatorio. Este análisis se realizó mediante una micromatriz de la especie porcina que abarca 43.803 sondas de ADN aunque esas sondas no se corresponden con 43.803 genes porcinos conocidos. Este estudio nos mostró que en el oviducto de cerda se están expresando 2.941 genes.

No se realizó esta experiencia para la especie bovina debido a que existen para esta especie estudios previos de expresión génica en oviductos de hembras prepúberes (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004), en el cual se exponen públicamente sólo aquellos genes que están sobre-expresados tanto en estro como en diestro, y que corresponden a 37 genes en estro y 40 genes en diestro.

El análisis de los resultados mediante el método de Análisis de Componentes Principales (ACP), nos muestra que nuestros datos poseen un comportamiento muy similar por lo que se puede decir que son muy homogéneos. Esta homogeneidad se muestra en la figura 53 donde los resultados globales de las 4 hembras se agrupan en el espacio claramente.

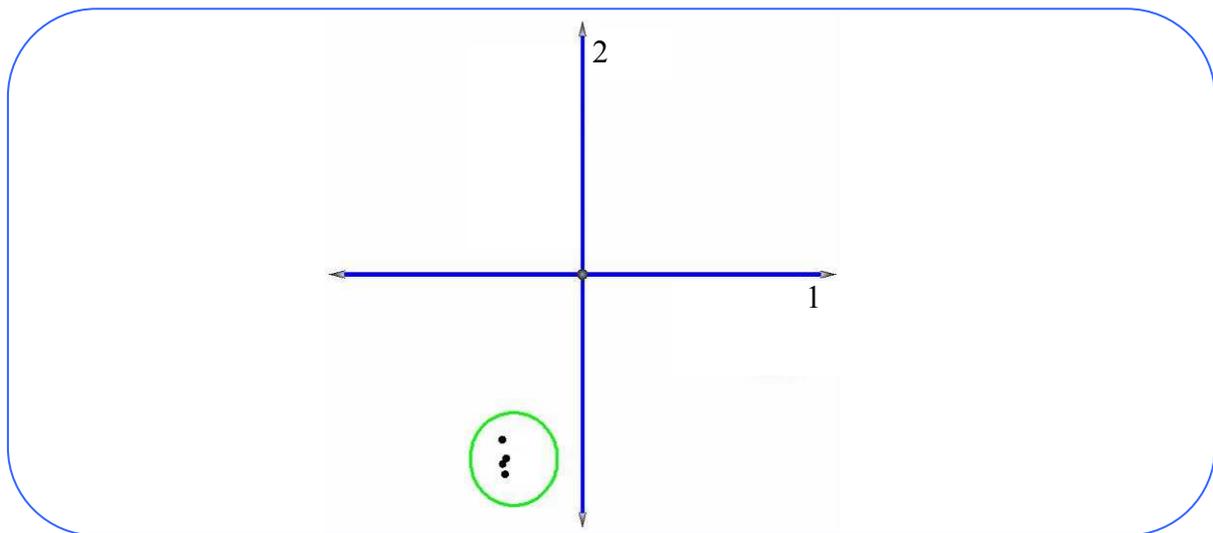


Figura 53. Análisis de Componentes Principales (APC) de la porción ampular-ístmica del oviducto porcino en fase folicular tardía de las cuatro hembras analizadas.

Los resultados del análisis genómico se analizaron con el programa DAVID. Los grupos analizados y los resultados fueron los siguientes: proteínas secretadas (7'7%), nucleares (5'0%), componentes del retículo endoplasmático (0'7%), proteínas del aparato de Golgi (1'5%), proteínas de membrana (13'3%), proteínas de lisosomas (0'6%), de mitocondrias (1'0%), de ribosomas (0'8%), del citoesqueleto (0'4), proteínas de unión celular (0'5%), aquellas que el programa no reconoce junto con aquellas que no es capaz de clasificar (57'4%) y otras proteínas que no se han clasificado aunque son componentes celulares y por lo tanto se encuentran presentes en la célula y forman parte de nuestros resultados (10'9%) (Fig. 54).

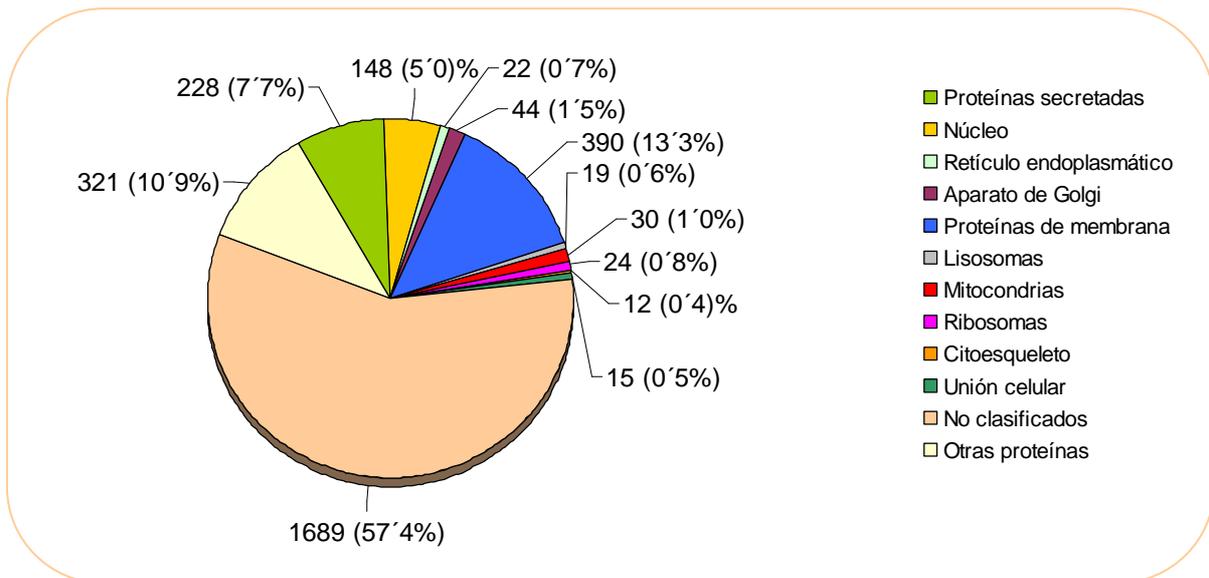


Figura 54. Diagrama circular representativo de los resultados obtenidos en el análisis de genómica del oviducto porcino en fase folicular tardía según la plataforma DAVID.

Los genes también fueron objeto de análisis mediante el software del servidor Ingenuity (www.ingenuity.com/), mediante el cual se forman 25 grupos funcionales (anexo V).

6.3.3. ANÁLISIS DE COINCIDENCIAS

Los análisis de expresión génica del oviducto porcino nos indicaron, como se ha mencionado anteriormente que se expresan 2.941 genes en la fase folicular tardía. En los resultados de proteómica del FO porcino de este mismo trabajo identificamos 291 proteínas, como también se ha comentado. Cuando comparamos ambos grupos, observamos que existían resultados coincidentes, identificando 35 proteínas a las que denominamos coincidencias. Estas proteínas se muestran en rojo y negrita en el anexo I.

Los resultados generales de estas coincidencias según la clasificación basada en Avilés *et al.*, (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) son los mostrados en la tabla 34, donde se puede observar que predomina el grupo de las enzimas (34'3%), seguido de proteínas citoplasmáticas (14'3%). Las proteínas secretadas coincidentes son 8 (22'8%) distribuidas en los grupos: proteasas e inhibidores (grupo 3), agente de defensa (grupo 5), proteínas del plasma sanguíneo y proteínas sanguíneas (grupo 9) y las 4 del grupo otras proteínas secretadas, como se puede observar en el anexo I.

Tabla 34. Distribución de los resultados coincidentes entre el análisis proteómico y genómico en la especie porcina.

GRUPO DE LA CLASIFICACIÓN	PROTEÍNAS
2. Hormonas y receptores	1 (2'9%)
3. Proteasas e inhibidores	2 (5'7%)
5. Agente de defensa	3 (8'6%)
7. Otros enzimas	12 (34'3%)
8. Chaperonas y HSP	1 (2'9%)
9. Proteínas del plasma y de la sangre	3 (8'6%)
10. Otras proteínas: 10.1. Nucleares	3 (8'6%)
10.2. Citoplasmáticas	5 (14'3%)
10.3. Componentes de membrana	1 (2'9%)
10.4. Secretadas	4 (11'4%)
Total	35



DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Consideraciones preliminares:

Diferentes estudios han observado que existen cambios en las propiedades de la ZP dependiendo del grado de maduración del ovocito (folicular y oviductal) y tras la fecundación (Braden, Astin *et al.*, 1954; Braden y Austin, 1954; Oikawa, Sendai *et al.*, 1988; Tesarík, Pilka *et al.*, 1988; Moller y Wassarman, 1989; Oehninger, Veeck *et al.*, 1991; Ducibella y Buetow, 1994; Avilés, Castells *et al.*, 1999; Avilés, El-Mestrah *et al.*, 2000; Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Los cambios observados descritos en la bibliografía se corresponden con cambios en la afinidad por los espermatozoides, resistencia a la digestión con tratamientos químicos, físicos o enzimáticos, etc. (Gulyas y Yuan, 1985; Zhang, Rutledge *et al.*, 1992; Schiewe, Araujo *et al.*, 1995; DeMeestere, Barlow *et al.*, 1997; Iwamoto, Ikeda *et al.*, 1999; Manna, Rienzi *et al.*, 2001; Coy y Romar, 2002; Coy, Romar *et al.*, 2005; Kolbe y Holtz, 2005; Killian 2011). Estos cambios se pueden corresponder a cambios producidos por diferentes glicosidasas sobre los azúcares de las glicoproteínas de la ZP en su paso por el oviducto y tras la liberación del contenido de los GC (Velásquez, Cánovas *et al.*, 2007; Carrasco, Romar *et al.*, 2008), pero también a la acción de otras moléculas tipo proteasas.

Una de las técnicas que se ha usado para evaluar cambios en la resistencia a la digestión de la ZP de los ovocitos y embriones de diferentes especies ha sido la digestión de la ZP mediante enzimas proteolíticas, donde cambios en las propiedades de la ZP se relacionan con cambios en el tiempo de digestión de la misma (Trounson y Moore, 1974) mediante dichas enzimas (Inoue y Wolf, 1974; Menino y Wright, 1982; Dell'Aquila, De Felici *et al.*, 1999; Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011 y revisado por Coy y Avilés, 2010).

En nuestro caso, hemos usado la enzima pronasa, y como paso previo a su utilización en experimentos posteriores, hemos analizado en la misma una serie de parámetros para testar la validez de los resultados que obtuviéramos.

7.1. ANÁLISIS DEL EFECTO QUE PRODUCE EL FLUIDO OVIDUCTAL DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA A LA DIGESTIÓN USANDO LA ENZIMA PRONASA

7.1.1. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA PRONASA

En un primer estudio quisimos conocer cómo actúa la enzima pronasa con los controles del primer bloque de esta tesis, es decir, con aquellos ovocitos que no se someten a ningún tratamiento. Este estudio lo prolongamos en el tiempo para observar la **cinética enzimática de la pronasa** a la concentración que usamos para nuestro estudio. Con los dos experimentos de análisis de la cinética enzimática se ha podido observar que la pronasa es capaz de digerir tras 24-48 horas el mismo número de ZPs en el mismo tiempo que las digiere cuando se utiliza a tiempo cero ($2'04\pm 0'18$, $3'40\pm 0'36$ y $3'31\pm 0'30$ minutos para tiempo igual a cero, 24 y 48 horas respectivamente). A partir de ese momento, el tiempo que la enzima necesita para digerir el mismo número de ZP aumenta progresivamente pero sin dejar de ser efectiva incluso el último día de nuestro estudio (día decimoséptimo). Por ello, podemos decir que la enzima pronasa mantiene su actividad con respecto al tiempo aunque ésta va disminuyendo progresivamente a partir de 48 horas ($5'30\pm 0'25$, $11'20\pm 0'64$ y $40'80\pm 3'93$ minutos a las 72, 192 y 360 horas respectivamente).

En una publicación reciente de nuestro grupo se ha mostrado que el FO bovino en fase folicular tardía produce modificaciones en la ZP de ovocitos porcinos lo cual provoca un aumento en la resistencia a la acción proteolítica de la enzima pronasa con respecto a los ovocitos no tratados (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). A partir de esta información, y antes de comenzar nuestros experimentos para comprobar si este efecto se producía en diferentes especies, decidimos analizar la influencia del grado de dilución del FO sobre su efecto en el incremento de la resistencia de la ZP a la digestión en pronasa.

7.1.2. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA DE LA CERDA EN DIFERENTES DILUCIONES DEL FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA

Los resultados obtenidos nos muestran que conforme se **diluye el FO bovino** de partida se produce una disminución en el tiempo que precisa la enzima para digerir el mismo número de ZPs o, lo que es lo mismo, las ZP son cada vez más sensibles a la enzima pronasa y tardan menos tiempo en digerirse debido a que la concentración de factores que le confieren resistencia a la ZP es menor cuanto más diluido está el fluido que los contiene. En nuestro caso, las ZPs tratadas con el FO bovino diluido 20 veces dejan de mostrar algún efecto de resistencia en presencia de la enzima pronasa. Por otro lado Kim *et al.* (Kim, Funahashi *et al.*, 1996) observaron que el pretratamiento de los ovocitos porcinos en un medio con el 30% de FO porcino aumenta la RDE cuando lo analizaban con pronasa al 0'1% en el momento de la fecundación.

Uno de los componentes que ha sido implicado en la resistencia de la ZP a ser digerida por enzimas ha sido la proteína OVGPI (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). En la especie caprina se ha observado que el tratamiento de ovocitos de cabra madurados *in vitro* bajo concentración creciente de esta proteína aumenta la resistencia a la proteólisis de la ZP cuando se trata con pronasa al 0'1% (4'36±0'05, 4'36±0'05, 7'70±0'39, 11'30±0'56 y 14'72±0'61 minutos para 0, 10, 50 y 100µg de la proteína OVGPI) (Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011). Por lo tanto, el agente o agentes presentes en el FO que producen la modificación o modificaciones en la ZP que la hacen resistente son dosis dependientes o por lo menos se necesita una cantidad determinada para que se produzca un efecto.

En nuestro ensayo hemos usado FO en fase folicular tardía o etapa inmediatamente previa a la ovulación. La ovulación se produce un cierto tiempo tras el pico de LH ocurriendo ésta en los diferentes animales estudiados tras diferentes tiempos: en cerdo ocurre tras 42 horas (ciclo estral de 21 días); en la vaca tras 30 horas (ciclo estral de 21 días); en la oveja tras 34 horas (ciclo estral de 17 días) y en la cabra tras 36 horas (ciclo estral de 21 días) (Bearden y Fuquay, 1997).

Se ha usado FO de esta fase debido a que en estudios previos hemos observado que esta etapa, junto con la post-ovulatoria temprana, es la única en la que se produce el aumento de la RDE cuando se usa FO porcino para la incubación de los ovocitos (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Además, cuando se utiliza FO de otras especies es ésta fase la que mayores efectos de resistencia a la proteólisis produce sobre las ZPs. Por ejemplo, hemos podido comprobar que cuando se tratan ovocitos porcinos con FO de oveja en diferentes fases del ciclo estral, los tratados con FO ovino en fase folicular tardía se mantienen en pronasa aproximadamente 11 horas, frente a las 2 horas de las fases luteal temprana y luteal tardía respectivamente (datos no publicados). Este efecto producido sobre la ZP (que la hace más resistente a la acción proteolítica) del FO en fase folicular tardía también ha sido observado por otros autores aún usando metodología diferente, como es el caso de ovocitos foliculares pre-ovulatorios de vaca colocados durante 120 minutos en el interior de oviductos homólogos que se encontraban en diferentes fases del ciclo estral (fase folicular, luteal temprana y luteal), en los que la mayor resistencia a la proteólisis se encontró en las ZPs de ovocitos que habían sido mantenidos en oviductos en fase folicular con medias de 1.553'5, 260'7 y 484'4 minutos en la enzima pronasa al 0'1% respectivamente (Smorag y Katska, 1988).

Los ovocitos se han usado libres de células para facilitar la manipulación y observación de la digestión de la ZP. Con respecto al tiempo de digestión de las ZP con o sin CC existe controversia ya que algunos autores afirman que las ZP libres tienen mayor RDE que las que poseen CC (Smorag y Katska, 1988) y otros en las que los tiempos son similares (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). En el trabajo de Smorag y Katska (Smorag y Katska, 1988) se realizó el análisis de digestión en ovocitos de vaca con y sin CC, previamente mantenidos en oviductos de vaca durante 120 minutos y la RDE fue de unos 6 y 200 minutos respectivamente. Por otro lado, Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) analizaron ovocitos porcinos madurados *in vitro* con y sin CC tratados durante 30 minutos en FO bovino y los datos obtenidos fueron de unos 30 minutos en ambos grupos. Quizás los resultados obtenidos por Smorag y Katska (Smorag y Katska, 1988) sean fruto de la variabilidad individual entre los oviductos donde se realizó la incubación, o quizá sean debidos a posibles interacciones entre las CC y las células oviductales que podrían potenciar el efecto del fluido sobre la ZP.

7.1.3. EFECTO RELATIVO DE LA RESISTENCIA A LA DIGESTIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA DE NUEVE ESPECIES DIFERENTES TRAS LA INCUBACIÓN EN EL FLUIDO OVIDUCTAL EN LA FASE FOLICULAR TARDÍA DE CINCO ESPECIES

Los resultados obtenidos en la mayoría de nuestros **ovocitos controles** es decir ovocitos no incubados con ningún FO en el análisis de resistencia a la digestión con la enzima pronasa son consistentes con los datos utilizando ovocitos foliculares pre-ovulatorios y ovocitos madurados *in vitro* obtenidos por otros autores, para los cuales las ZPs son muy sensibles al tratamiento con las enzimas proteolíticas. Sin embargo, la ZP de ovocitos de hámster es una excepción en este grupo.

7.1.3.1 Análisis del efecto producido por cinco tipos de fluido oviductal en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de especies diferentes

7.1.3.1.1. Control

A continuación comentaremos los resultados obtenidos en los **ovocitos control** de las diferentes especies analizadas en cuanto a la resistencia de su ZP a la digestión en pronasa.

Ovocitos madurados *in vivo*, es decir, ovocitos obtenidos a partir de folículos ováricos pre-ovulatorios o madurados *in vitro* de diferentes especies (ratona, cerda y vaca) muestran resultados similares a los de nuestro estudio, aún usando una metodología enzimática igual, similar o diferente (véase Coy y Avilés, 2010).

Las ZPs de los **ovocitos de ratona** obtenidos de folículos ováricos en el estudio de Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) se digieren en pronasa en un periodo similar al presentado en el actual estudio, de unos 3 minutos aproximadamente.

Las ZPs de los **ovocitos oviductales de rata** han mostrado una media de digestión en quimotripsina de algo más de un minuto (Zhang, Rutledge *et al.*, 1992) mientras que en el presente trabajo lo hacen en unos 4 minutos. En ambos casos la RDE

no es elevada por lo que se puede considerar que no existe modificación de la ZP por factores oviductales, a diferencia de otras especies. Al igual que en el caso anterior, posibles diferencias en el resultado pueden deberse a la diferente enzima proteolítica usada.

Los datos existentes acerca de la RDE de las ZPs de **ovocitos humanos** son contradictorios. En el caso de ovocitos procedentes de folículos ováricos (madurados *in vivo*) que se han testado con quimotripsina (Schiewe, Araujo *et al.*, 1995; Manna, Rienzi *et al.*, 2001), se observó un tiempo medio de digestión de la ZP de unos 25 minutos, mientras que cuando se usa pronasa al 0'5% el tiempo medio de digestión es de algo más de 1 minuto (Coy y Avilés, 2010). Estos últimos datos son similares a los obtenidos en esta tesis con un tiempo medio de digestión de menos de 2 minutos. A simple vista, los resultados nos hacen pensar que los diferentes valores obtenidos pueden deberse a la enzima usada en cada caso: probablemente la cinética enzimática o la constante catalítica (K_{cat}) de ambas sea diferente.

La ZP de los **ovocitos foliculares de hámster** posee una resistencia a la digestión en pronasa de unas 24 horas. Este tiempo de digestión es significativamente diferente de los resultados obtenidos por los grupos control de las demás especies analizadas, que se digieren en la enzima pronasa, en nuestras condiciones, en menos de 6 minutos. El motivo por el que los tiempos de digestión son superiores es desconocido a día de hoy.

Los ovocitos de hámster sufren la disminución de la capacidad de ser fecundados correlacionada con la liberación de sus GCs, de modo que cuando ya no hay GC bajo el oolema el ovocito resulta impenetrable para los espermatozoides (Yanagimachi y Chang, 1961). Los ovocitos de hámster sufren una rápida activación espontánea cuando se colocan en un medio con Ca^{2+} (Sun, Yue *et al.*, 2002) y son capaces de sufrir una reacción de zona completa en tan sólo 8 minutos tras ser activados eléctricamente (Gwatkin, Williams *et al.*, 1973). Existen precedentes en el endurecimiento espontáneo de la ZP de ovocitos de otras especies como por ejemplo en la yegua (Dell'Aquila, De Felici *et al.*, 1999; Hinrichs, Love *et al.*, 2002), en la ratona (Dodson, Minhas *et al.*, 1989) y en ratas (Zhang, Rutledge *et al.*, 1991). En alguna de estas especies la causa de la RDE se debe a una liberación prematura de los GC

motivada por el medio usado. En el caso de la rata se produce la resistencia a la digestión de la ZP a la quimotripsina por el contacto de los ovocitos con medio carente de suero fetal bovino (SFB) (Zhang, Rutledge *et al.*, 1991).

Puesto que el medio de lavado usado para nuestros ovocitos es el DPBS-PVA-FR, que contiene cloruro cálcico, es posible que éste provocara la activación de los ovocitos de hámster y fuera la causa de dicha diferencia en la RDE respecto al resto de especies de animales analizadas en esta tesis. Sin embargo, para afirmar esto, sería necesario demostrar que en nuestras condiciones experimentales los ovocitos de hámster sufren una reacción cortical espontánea y el resto no.

Otro posible motivo es la diferente composición de la ZP en las diferentes especies estudiadas (número de glicoproteínas y glicosilación). En el hámster existen 4 glicoproteínas mientras que en la ratona, la cerda y la vaca hay tres (Izquierdo-Rico, Jimenez-Movilla *et al.*, 2009). Jiménez-Movilla *et al.* (Jiménez-Movilla, Martínez-Alonso *et al.*, 2009) observaron que el porcentaje de identidades que compartían los aminoácidos de ZP2, ZP3 y ZP4 de cerda, hámster y ratón oscilan entre el 17% y 67% por lo que existe gran variabilidad en la secuencia de las mismas en las diferentes especies. Esta diferente composición podría afectar a la capacidad de proteólisis de pronasa. Posiblemente, la diferente glicosilación y sobre todo la heterogeneidad y grado de glicosilación observada en la ZP de hámster comparada con otras especies puede ser responsable de esta mayor resistencia a la proteólisis. Es conocido que la glicosilación protege a las proteínas frente a la proteólisis (Varki 2011).

Todo esto hace muy difícil indicar el motivo por el cual la ZP de los ovocitos de hámster bajo nuestras condiciones se presente endurecida y por lo tanto otros estudios serían necesarios para esclarecer esta singularidad.

En cuanto a los **ovocitos de vaca**, resultados similares a nuestro estudio han sido obtenidos al analizar **ovocitos** foliculares pre-ovulatorios de esta especie, en los cuales las ZPs se digieren en un intervalo de 0 a 20 minutos, siendo más del 80% de ellas digeridas en los primeros 10 minutos (Smorag y Katska, 1988; Katska, Kauffold *et al.*, 1989). Se puede entender que la diferencia en el tiempo de digestión de los datos entre los trabajos mencionados de Katska *et al.* y los del presente estudio (alredor de 2

minutos) se debe a la diferente concentración de la enzima pronasa empleada ya que los primeros la usan al 0'1% y en el presente estudio se hace al 0'5%. La mayor concentración de pronasa utilizada en nuestro estudio puede explicar una acción proteolítica más rápida en nuestros datos, por lo que los resultados pueden ser considerados como similares en cuanto a que no se produce en las ZPs incremento significativo de la RDE.

La digestión de la ZP de **ovocitos ovinos** en el presente estudio se produjo en algo más de 5 minutos, tiempo inferior al obtenido por Trounson y Moore (Trounson y Moore, 1974) que observaron que la ZP de ovocitos ováricos pre-ovulatorios se digiere en los primeros 30 minutos en pronasa al 0'5%. Estas diferencias pueden ser debidas al diferente tipo de maduración y /o a la edad de los ovocitos.

Las ZPs de **ovocitos de cabra** madurados *in vitro* se digieren en pronasa al 0'1% (Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011) en un tiempo similar al del presente estudio, unos 4 minutos.

7.1.3.1.2. Fluido oviductal de coneja

En los resultados obtenidos en el presente estudio se puede observar que cuando los ovocitos de cualquiera de las especies estudiadas en este trabajo **son incubados con FO de coneja**, la ZP de los mismos sufre un incremento significativo de la RDE con respecto a los valores de los correspondientes ovocitos controles, siendo este efecto de resistencia de la ZP a la pronasa producido por el FO de coneja mucho más elevado que el que se obtiene con el fluido de cualquier otra especie.

Katska *et al.* (Katska, Smorag *et al.*, 1988), observaron el efecto de diferentes tipos de oviductos de coneja y de diferentes tiempos de tratamiento sobre ovocitos ováricos pre-ovulatorios de vaca. Estos autores observaron que cuando los ovocitos de vaca se mantenían durante 2 horas en el interior de oviductos de coneja (*in vivo* o *in vitro*, en oviductos aislados y colocados en las mismas condiciones que los ovocitos *in vitro*) aumenta la resistencia a la digestión en pronasa al 0'1% de modo que un 42% y un 56% en cada grupo respectivamente tardaron en digerirse entre 2 y 12 horas, (siendo la ZP del grupo control digerida en los primeros 10 minutos) (Katska, Smorag *et al.*,

1988). Cuando trataron a los ovocitos durante 4-5 horas en oviductos de coneja *in vivo* el 86% de las ZPs de los ovocitos se digirieron en un periodo mayor de 4 horas, siendo el 57% de ellas digeridas en un periodo de tiempo superior a 24 horas, (siendo el control digerido en este caso en los primeros 20 minutos) (Katska, Kauffold *et al.*, 1989).

Estos resultados, al igual que los obtenidos en el presente estudio muestran que el contenido oviductal de la coneja produce un aumento significativo en la RDE de la ZP de los ovocitos de un modo no específico, aunque los resultados obtenidos en este trabajo en cuanto a tiempo de digestión son mayores que los obtenidos por Katska *et al.* (Katska, Kauffold *et al.*, 1989). En nuestro caso, los ovocitos son tratados con FO centrifugado carente de la mayor proporción de mucinas del fluido. Quizás el factor o factores causantes de tal efecto predominan en la fase soluble de modo que al quitar la mayor parte de mucinas del fluido permitimos una mayor o mejor interacción entre éste/estos y las glicoproteínas de la ZP de los ovocitos produciendo un mayor efecto de RDE.

Hace ya algunos años se indicó que en ovocitos de coneja *in vivo* la pérdida de la capacidad de ser fecundado era debida a la deposición sobre la ZP de una cubierta de mucina que bloquea la penetración de los espermatozoides a través de la misma (revisado por Yanagimachi y Chang, 1961). Esta cubierta de mucina es capaz de depositarse en diferentes elementos introducidos en el oviducto de la coneja como embriones de ratón en estado de 8-16 células, ovocitos de coneja con y sin ZP, ZPs y esferas de látex (El-Gayar y Holtz, 2009). Este h indica que ciertos componentes del FO de coneja son capaces de unirse o depositarse de modo no específico sobre elementos sintéticos y sobre ovocitos homólogos y heterólogos.

Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) han observado que en el fenómeno de RDE se encuentra implicada (entre otros factores) una mucina, la MUC-9 u OVGP1. En el caso del FO de coneja la OVGP1 presente es la que posee menor longitud (475aa, véase tabla 1 homologías de OVGP1 (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) si se compara con las OVGP1 procedentes de los FOs del resto de especies estudiadas en esta tesis. Actualmente se conoce que algunas mucinas son capaces de ensamblarse entre ellas formando estructuras complejas (Perez-Vilar y Hill, 1999), por lo que probablemente, OVGP1 de conejo al ser la más pequeña es capaz de unirse y solaparse sobre la ZP de tal modo que deja escasos o reducidos espacios entre ella cubriendo o

envolviendo en alto grado la ZP y dejando por lo tanto inaccesible tridimensionalmente el lugar de proteólisis de la enzima. Esta podría ser una causa que explicara por qué es más efectivo este fluido en cuanto a la RDE en pronasa de la ZP. Futuros estudios son necesarios para poder confirmar esta hipótesis.

También puede ocurrir que el factor o factores responsables se unan a la ZP por la secuencia específica de corte de la enzima modificando dicha secuencia y por lo tanto dejando sin sustrato a la enzima por lo que es incapaz de llevar a cabo la digestión proteolítica. Esta opción parece bastante más complicada y revelaría una mayor especificidad entre las moléculas implicadas por lo que resulta menos probable aunque posible.

Hay que mencionar que el aspecto mostrado por las ZP de la mayoría de los ovocitos tratados con el FO de coneja, cuando se mantienen en la prueba de digestión en la enzima pronasa varios días, es prácticamente el mismo que a tiempo cero (véase figura 24 imágenes e y f). Por ello, en un caso (ovocitos porcinos a los 3 y a los 7 días en pronasa) los grupos de los ovocitos fueron trasladados a gotas de pronasa recientes de comprobada actividad proteolítica en las cuales tampoco se produjeron modificaciones. Esto hace pensar que es el sitio de corte de la enzima lo que está enmascarado o modificado, de modo que ésta es incapaz de llevar a cabo su actividad y explicaría la invariabilidad del aspecto mostrado por la ZP.

Este ensayo también indica, por ejemplo, que la RDE mostrada en nuestros resultados no es debida a posibles fallos o deficiencias de las características o condiciones del mantenimiento/almacenamiento de las muestras durante el tiempo que transcurre el mismo.

7.1.3.1.3. Fluido oviductal porcino

En los resultados obtenidos en el presente estudio se puede observar que cuando los ovocitos **son tratados con FO porcino**, el tiempo de digestión de la ZP obtenido es muy variable. Existen especies en las que este FO produce un aumento significativo respecto al control de la RDE de la ZP y otras en las que no.

Los diferentes patrones de los resultados de resistencia a la proteólisis encontrados en la ZP de los ovocitos de coneja, hámster, cerda, vaca, oveja y cabra podrían deberse a diferencias en la composición glicoproteica de la ZP (número de proteínas y glicosilación). La ZP de estas especies se encuentra formada por 3 glicoproteínas (ZP2, ZP3 y ZP4) con la excepción del hámster y la coneja que tienen 4 (además de ellas la ZP1). Por ello, la composición de la ZP de hámster y la coneja resultan excepciones en los resultados de las especies que poseen 4 ZPs (ratona, rata y mujer) ya que todas ellas se digieren en pronasa en unos minutos.

En la bibliografía no aparecen otros estudios que usen el FO u oviducto porcino para estudios de RDE heterólogos o inter-específicos por lo que no se puede realizar un estudio comparativo entre los resultados inter-específicos obtenidos en el presente trabajo con los de otra publicación. Sin embargo, existen algunos datos de experiencias similares realizadas en estudios homólogos que son los que se comentan a continuación.

Broerman *et al.* (Broermann, Xie *et al.*, 1989) observaron que la ZP de ovocitos oviductales y ovocitos mantenidos durante 30 minutos en el oviducto porcino desaparecía en unas 24 y 21 horas respectivamente cuando los trataron con una solución de tripsina y pronasa (ambas al 0'1%). En otro análisis Kolbe y Holtz (Kolbe y Holtz, 2005) observaron que la ZP de ovocitos porcinos ovulados oviductales desaparece en pronasa al 0'5% tras unos 47 minutos. Kim *et al.* (Kim, Funahashi *et al.*, 1996) analizaron la ZP de los ovocitos porcinos tras tratarlos en un medio con un 30% de FO porcino desapareciendo éstas en pronasa al 0'1% en algo más de 6 minutos. En todos los casos anteriores los resultados obtenidos en el tratamiento enzimático con ovocitos controles madurados *in vivo* o madurados *in vitro* son de algo más de 1 minuto. Los resultados observados en el presente estudio fueron de alrededor de 9 horas en los ovocitos tratados y 3 minutos en los ovocitos porcinos madurados *in vitro*. Por lo tanto, todos estos resultados son similares en cuanto a la existencia de diferencias significativas en la RDE de los ovocitos oviductales o los tratados con respecto a los ovocitos ováricos pre-ovulatorios o los madurados *in vitro*, considerando a éstos últimos como similares en cuanto al tiempo de digestión de su ZP.

La diferencia puntual en cuanto a tiempo de digestión de la ZP con respecto a los resultados de

Broerman *et al.* (Broermann, Xie *et al.*, 1989) puede deberse al diferente porcentaje del enzima usado para la observación de la RDE y con los de Kim *et al.* (Kim, Funahashi *et al.*, 1996) al diferente porcentaje usado del FO.

Otro motivo por el cual se pueden producir las diferencias encontradas entre los ensayos de Kolbe y Holtz, (Kolbe y Holtz, 2005) y los de este estudio son las características diferenciales del material animal usado (microambiente oviductal o FO) ya que como hemos visto en nuestro laboratorio, diferentes lotes de FO producen en las ZP porcinas diferentes tiempos en cuanto a la RDE.

Por otro lado, se ha observado que ovocitos porcinos extraídos de oviductos homólogos poseen diferente contenido macromolecular de su ZP como resultado del anclaje a la misma de varias glicoproteínas procedentes del FO (Brown y Cheng, 1986; Hedrick, Wardrip *et al.*, 1987). Estas glicoproteínas poseen un peso en condiciones no reductoras de 250, 90 y 78 kDa, son adquiridas cuando el ovocito transita por el oviducto y cuando el ovocito se incuba durante 0'5 horas en el FO (Hedrick, Wardrip *et al.*, 1987) y se encuentran presentes en el FO en la fase estral del ciclo pero no en la luteal. Estas proteínas se mantienen unidas a la ZP ovocitaria hasta al menos el estado embrionario de 2-4 células (Brown y Cheng, 1986). Estudios en los que se observa la morfología de la ZP de embriones porcinos tras su tratamiento durante 3 minutos en pronasa al 5% indican que en los embriones oviductales de 2-3 células poseen mayor RDE que los embriones uterinos de 6-8 células (Menino y Wright, 1982), por lo que esas proteínas se mantendrían produciendo RDE incluso en el cigoto oviductal. Por lo tanto es posible que la adición de estas glicoproteínas produzca cambios estructurales en la ZP o algún tipo de cubierta protectora que se deposita sobre la ZP de los ovocitos oviductales (Kolbe y Holtz, 2005).

Las proteínas encontradas por Brown y Cheng (Brown y Cheng, 1986) son similares a algunas de las glicofomas descritas por Buhi *et al.* (Buhi, Alvarez *et al.*, 1990) en el FO porcino (100, 85 y 75 kDa), por lo que diferentes glicofomas porcinas podrían estar implicadas en la resistencia a la digestión como ya observaron Coy *et al.* en el FO bovino (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

7.1.3.1.4. Fluido oviductal bovino

Los ovocitos tratados con **FO bovino** muestran también cierta variabilidad en los resultados obtenidos en cuanto a la RDE de sus ZPs. Al igual que el resultado obtenido para el FO porcino, existen especies en las que este FO produce un aumento significativo respecto al control en los tiempos de digestión de las ZPs y otras en las que no. Además, las especies que presentan ZPs resistentes y ZPs sensibles son las mismas indicadas para el FO porcino del apartado anterior pero con diferencias en el tiempo de digestión. En este caso, los mayores tiempos de RDE los presentan las ZPs de los ovocitos porcinos con una media de cerca de 200 horas en pronasa.

Existen datos previos que indican que el FO bovino posee la capacidad tanto homóloga como heteróloga de producir RDE. Los más recientes son los referidos por Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), en los que el FO produce dicho efecto en la ZP de los ovocitos porcinos y bovinos y además se implica de modo directo a glicofomas de la proteína OVGP1 bovina (75 y 95 kDa) en la resistencia a la acción proteolítica de la ZP de los ovocitos porcinos.

Estudios anteriores de Katska *et al.* (Katska, Smorag *et al.*, 1988; Smorag y Katska, 1988; Katska, Kauffold *et al.*, 1989) muestran en diferentes situaciones que las secreciones oviductales bovinas son capaces de producir un aumento en el tiempo de digestión de las ZPs de ovocitos ováricos pre-ovulatorios bovinos y demuestran además el mismo efecto en los ovocitos oviductales. De modo que para ovocitos bovinos pre-ovulatorios mantenidos durante 2 horas en oviductos bovinos aislados (*in vitro*) se obtuvo un dato de digestión enzimática de la ZP de entre 2 y 12 horas para el 100% de ellas, mientras que las ZPs de los controles desaparecieron en los primeros 20 minutos (Katska, Smorag *et al.*, 1988). En el caso de ovocitos oviductales (post-ovulatorios) las ZPs desaparecieron en un intervalo de 5 a 240 minutos, encontrándose el 85% de los datos de digestión entre un intervalo de 1 a 4 horas, mientras los controles lo hicieron en los primeros 20 minutos (Katska, Kauffold *et al.*, 1989). También han demostrado que el tiempo necesario para la digestión de las ZPs de ovocitos foliculares pre-ovulatorios de vaca aumenta conforme aumenta el periodo de permanencia de los ovocitos en el oviducto homólogo aislado, observando incluso que el 33% de las ZPs de ovocitos de

vaca mantenidos durante 120 minutos en el oviducto homólogo tienen una media de digestión en pronasa al 0'1% de más de 24 horas (Smorag y Katska, 1988; Katska, Kania *et al.*, 1999).

El efecto de aumento de la RDE descrito anteriormente es reversible con líquido folicular (Smorag y Katska, 1988) y en medio TALb sin heparina (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Esto sugiere que los diferentes componentes que se adhieren a la ZP que producen este endurecimiento de la ZP no lo hacen de un modo covalente o estable.

7.1.3.1.5. Fluido oviductal ovino

Los ovocitos **tratados con FO ovino** muestran también cierta variabilidad en los resultados obtenidos al igual que lo indicado previamente para los FOs porcino y bovino. También existen especies en las que este FO produce un aumento significativo de la resistencia a la digestión de la ZP respecto al correspondiente control y otras en las que no, siendo las especies con ZP resistente y ZP sensible las mismas que las mencionadas para los FO bovino y porcino.

En un estudio previo realizado por Trounson y Moore (Trounson y Moore, 1974) se observó que la ZP de ovocitos oviductales de oveja obtenidos el día 2 del ciclo estral tardaba en digerirse más de 2 horas en pronasa al 0'5% mientras que los ovocitos ováricos pre-ovulatorios lo hacen en los primeros 30 minutos. En nuestro caso también hemos observado que el FO ovino produce resistencia a la digestión en la ZP de los ovocitos de oveja (unas 88 horas respecto al control de casi 6 minutos). En ambos casos observamos que el FO ovino aumenta significativamente la RDE, aunque el dato mostrado en nuestro estudio es bastante mayor. Este efecto puede ser debido a las diferencias del momento del ciclo en las secreciones oviductales o a posibles factores maternos que provocarían que la ZP de los ovocitos procedentes de una hembra sea más o menos resistente a la acción de la pronasa que los de otra (Moor y Cragle, 1971). Moor y Cragle (Moor y Cragle, 1971) observaron que la ZP de los ovocitos oviductales (recogidos 72 horas tras el estro) de una hembra se digerían en pronasa en 15 a 25 minutos, mientras que los de otras 3 hembras lo hacían en menos de 3 minutos en las mismas condiciones.

Katska *et al.* (Katska, Smorag *et al.*, 1988), observaron el efecto que produce el oviducto de oveja (*in vivo*) sobre ovocitos ováricos de vaca pre-ovulatorios. La ZP de los ovocitos de vaca mantenidos en el oviducto durante 2 horas aumenta significativamente su resistencia a ser digerida con pronasa al 0'1% (ya que el 100% de las ZP desaparecen en la pronasa en un periodo comprendido entre 2 y 12 horas), con respecto al control (ovocitos ováricos, en los que las ZPs desaparecen en los primeros 10 minutos). En nuestro caso los ovocitos de vaca tratados con FO ovino poseen una media de digestión en pronasa de unas 100 horas lo cual difiere significativamente del control que lo hace en casi 3 minutos. Por lo tanto el endurecimiento producido por el contenido oviductal ovino no es específico de especie.

7.1.3.1.6. Fluido oviductal caprino

Los ovocitos tratados con **FO caprino** muestran también cierta variabilidad en los resultados obtenidos al igual que los resultados indicados previamente para los FOs porcino, bovino y ovino. También existen especies en las que este FO produce un aumento significativo de la resistencia a la digestión de la ZP respecto al correspondiente control y otras en las que no, aunque en este caso el FO de cabra muestra una diferencia con respecto a los FO previamente mencionados de ungulados, ya que es capaz de producir resistencia a la proteólisis a la ZP de los ovocitos de ratona. El motivo por el que este hecho diferencial ocurre es desconocido a día de hoy.

Con respecto a estudios homólogos ya hemos mencionado que la ZP de ovocitos de cabra aumenta su resistencia a la digestión proteolítica cuanto mayor es el contenido de OVGPI caprina purificada presente en el medio (Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011). Este aumento de RDE es muy leve si se compara con nuestros resultados por lo que se podría afirmar que la OVGPI por si sola no es capaz de producir una resistencia a la digestión enzimática mantenida y necesitaría de otros componentes como por ejemplo glicosaminoglicanos del FO descritos por Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Posiblemente este sea uno de los primeros análisis heterólogos de resistencia a la digestión proteolítica debido a que en la bibliografía no se observan estudios previos a excepción de los mencionados. También hay que señalar que las comparaciones son factibles debido a que los lotes de FO de partida de cada una de las especies son los

mismos y por lo tanto con los mismos componentes y cualidades por lo que las diferencias que se aprecien se deben a factores específicos de la ZP.

Como hemos observado, el FO de coneja mantiene el efecto de la resistencia a la digestión proteolítica excepto en los ovocitos humanos y de un modo muy prolongado en el tiempo. Esta característica de producir RDE es compartida también con los FOs de cerda, vaca, oveja y cabra. Estos últimos en general poseen las tres excepciones de la ratona, la rata y la mujer y poseen también un efecto más variable que el FO de coneja. Esta diferencia de capacidad de producir RDE y la diferente intensidad se puede deber a la distancia filogenética entre la coneja y los ungulados.

7.1.3.2. Análisis del efecto producido en la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de 9 especies diferentes por el fluido oviductal de 5 especies diferentes.

7.1.3.2.1 Ovocito de coneja

Los **ovocitos de coneja** responden en su mayoría al tratamiento en los diferentes FOs aumentando significativamente la resistencia de su ZP a ser digerida por la enzima pronasa con respecto a las ZPs de los ovocitos controles.

Como ya hemos mencionado sobre la ZP de los ovocitos de coneja *in vivo* se deposita una cubierta de mucina que bloquea la penetración de los espermatozoides (Yanagimachi y Chang, 1961; El-Gayar y Holtz, 2009), bloqueo que se ha relacionado con el aumento de la RDE (Hoodbhoy y Talbot, 1994).

En la bibliografía no aparecen datos previos en los que se analice la característica de la resistencia de la ZP a la digestión enzimática de las ZPs de la coneja por lo que no podemos realizar ningún estudio comparativo o discusión. Lo que si podemos indicar es que en el presente estudio las ZP de coneja son capaces de adquirir resistencia con prácticamente la totalidad de los FOs analizados, entre otros, el FO homólogo de coneja, por lo que podemos intuir que este efecto de resistencia a la digestión proteolítica también es un efecto que se produce *in vivo* en esta especie.

7.1.3.2.2. Ovocito de ratona

La ZP de los **ovocitos de ratona** responden de modo diferente al tratamiento en los diferentes FOs. La ZP de estos ovocitos aumenta su resistencia a la digestión proteolítica cuando es tratada con el FO de coneja, siendo el único que lo aumenta de modo estadísticamente significativo respecto al control.

Inoue y Wolf (Inoue y Wolf, 1974) describieron que la ZP de los ovocitos no fecundados y los fecundados tanto *in vitro* como *in vivo* eran diferentes bajo la acción de soluciones ácidas, 2-mercaptoetanol y peryodato sódico y revisaron trabajos en los que se obtuvo el mismo resultado bajo elevadas temperaturas, tripsina, pronasa y β glucuronidasa. Estos autores afirmaron que el oviducto murino no parece contribuir a los cambios de solubilidad de la ZP. Resultados más actuales en los que se analiza el tiempo de digestión de la ZP de ovocitos oviductales de ratona mediante la enzima quimotripsina muestran resultados contradictorios ya que para Gulyas y Yuan (Gulyas y Yuan, 1985) este resultado oscila entre 0'5 y 2'5 minutos y para DeMeestere *et al.* (DeMeestere, Barlow *et al.*, 1997) el resultado es bastante más elevado siendo de unos 40 minutos. El dato de Gulyas y Yuan es similar al obtenido por Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) en el que la ZP de los ovocitos oviductales de ratón se digieren en pronasa al 0'1% en unos 3 minutos.

Estos resultados junto con los obtenidos por Gulyas y Yuan tanto en los ovocitos oviductales (ya mencionados) como en los fecundados, los cuales pierden la ZP tras 270 minutos en quimotripsina, y los de Inoue y Wolf, indican que el efecto de la resistencia a la proteólisis es un efecto post-fecundación (Gulyas y Yuan, 1985; Zhang, Rutledge *et al.*, 1992), y no pre-fecundación como se ha demostrado en la vaca y la cerda (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Con todo esto, en el caso que nos ocupa obtenemos resultados en los que un FO produce ese efecto de RDE pre-fecundación de modo muy claro. El que el FO de coneja produzca dicho efecto en estos ovocitos no es particular, puesto que lo hace de modo generalizado en las diferentes especies de roedores analizadas en este estudio, pero sí lo es el aumento del efecto que produce en esta especie el FO caprino.

Se ha demostrado que una pequeña fracción de la OVGPI murina es capaz de unirse a la ZP (Lyng y Shur, 2009) y como hemos mencionado anteriormente la proteína OVGPI ha sido implicada en el fenómeno del aumento de la resistencia de la ZP a la digestión proteolítica (Coy, Cánovas *et al.*, 2008; Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011) por lo que quizás en el caso del ratón ésta posea una unión a la ZP muy débil o limitante para la función de producción de RDE mencionada y/o incluso puede no establecer las uniones mencionadas con los glicosaminoglicanos para mantener y estabilizar su efecto. La OVGPI de cabra posee una elevada tasa de identidades (97%, tabla 1) con respecto a la misma proteína ovina y ambas poseen 539 AA, por lo tanto el efecto debería ser similar para ambos tipos de fluido. Por ello, la causa diferencial del efecto de RDE o no se puede encontrar en la zona de la OVGPI donde no comparten homologías las dos secuencias o la existencia de otro factor determinante en el FO caprino y de coneja no existente en el ovino, bovino y porcino que por evolución se haya perdido, adquirido o modificado, ya que las proteínas reproductivas sufren cambios evolutivos rápidos (Swanson, Yang *et al.*, 2001; Swanson y Vacquier, 2002; Turner y Hoekstra, 2008; Clark, Gasper *et al.*, 2009). Si esto es así, desconocemos cuál es ese factor y su modo de actuación. Esta última hipótesis podría apoyarse en el hecho de que la OVGPI no es un factor determinante para la fecundación *in vivo* en ratón ya que existen ratones knockout para la OVGPI que son fértiles (Araki, Nohara *et al.*, 2003) y por lo tanto quizás evolutivamente es una proteína a perder en roedores como ya lo ha sido en la rata. Por ello, existe por lo tanto la posibilidad de la existencia de otra proteína evolutivamente relacionada, de la misma familia que la OVGPI, que pudiera desempeñar un papel semejante.

Esta hipótesis también es consistente con resultados de digestión en pronasa obtenidos tras incubar ovocitos de vaca y cerda en el interior de oviductos murinos (datos no publicados). Estos ovocitos no mostraron RDE aún tras permanecer diferentes tiempos en el oviducto por lo que debe existir alguna diferencia importante en el FO murino con respecto al de los ungulados y el cunícola.

7.1.3.2.3. Ovocito de rata

La ZP de los **ovocitos de rata** no modifica el tiempo medio de su digestión tras el tratamiento con los diferentes FOs respecto a los ovocitos controles, con la excepción

de cuando son tratados con el FO de coneja el cual les produce un aumento en la resistencia a la digestión que es estadísticamente significativo respecto al control.

Se ha demostrado previamente que el efecto del aumento a la RDE de la ZP de rata se produce después de la fecundación o tras la activación artificial (Gulyas y Yuan, 1985; Zhang, Rutledge *et al.*, 1992; DeMeestere, Barlow *et al.*, 1997) y además que en esta especie la OVGP1 no se expresa (Araki, Nohara *et al.*, 2003).

La bibliografía previa nos indica que la ZP de los ovocitos oviductales de rata carece de resistencia a la proteólisis desapareciendo en quimotripsina en algo más de 1 minuto. Al igual que en ratón, este fenómeno de RDE pre-fecundación se puede deber a algún factor perdido evolutivamente en el fluido de ungulados y que se mantiene siendo válido para esta especie en el FO de coneja o la existencia de alguna proteína evolutivamente relacionada con la OVGP1, que pudiera desempeñar un papel semejante.

Salvo este análisis de ovocitos procedentes de oviducto homólogo, la carencia en la bibliografía de análisis similares nos lleva a no poder realizar ningún estudio comparativo o discusión.

7.1.3.2.3. Ovocito de hámster

La ZP de los **ovocitos de hámster** responde adquiriendo resistencia a la digestión de modo significativamente diferente a los resultados del control aunque de un modo variable dependiendo del FO que se trate.

Este no es el primer estudio en el que se observa que la ZP de los ovocitos de hámster se encuentra endurecida, ya que en un estudio de fecundación *in vitro* realizado con ovocitos y espermatozoides de hámster recogidos de oviducto se observó que existe un retraso de 4 horas desde el apareamiento hasta la fusión de los gametos aunque los espermatozoides de hámster son capaces de llegar al lugar de la fecundación en tan sólo 1 hora (Yanagimachi, 1966). Estos autores indican que este retraso podría deberse a la capacitación espermática o a cambios (maduración) que quizás necesitara el ovocito previos a la fecundación para hacerlos “penetrables” por los espermatozoides, lo que

sería un fenómeno a la inversa del descrito por Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) en la cerda y la vaca.

En esta especie también se ha descrito que la proteína OVGP1 es capaz de unirse a la ZP homóloga (Kan, St-Jacques *et al.*, 1989), por lo que es posible, como se ha descrito en otras especies, que los diferentes componentes que se unan a la ZP en el oviducto (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) sean capaces de aumentar el tiempo de RDE de las ZPs.

También se ha observado que las ZPs de los ovocitos ováricos de hámster son diferentes a las de los ovocitos oviductales. Éstas últimas poseen una densidad óptica heterogénea y poseen mayor capacidad para inducir la RA (Yang y Yanagimachi, 1989). Además, la diferente densidad óptica parece deberse a factores del FO (glicoproteínas) que se integran a la ZP y pueden mejorar varias funciones de la misma. Aún observando estas diferencias, en este estudio la RDE de las ZP de los dos grupos (ováricos y oviductales) usando la enzima tripsina a una concentración de 0'01% a intervalo de temperatura 23-25°C, no muestran diferencias significativas desapareciendo ambos tipos de ZPs en unos 10 minutos (Yang y Yanagimachi, 1989). Estos resultados son diferentes a los observados en nuestro caso lo que se puede deber a las diferentes condiciones del análisis y/o al enzima usada. La tripsina posee un tamaño de casi la mitad (P00761, de 231AA) que la pronasa (P20910.1, de 550 AA) por lo que el este menor tamaño podría hacerle más accesible los sitios de corte en el entramado de ZP y posibles GAGs y por lo tanto aumenta la velocidad de la degradación.

7.1.3.2.5. Ovocito de mujer

La ZP de los **ovocitos de mujer** no aumenta su tiempo medio de digestión en pronasa tras el tratamiento con los diferentes FOs siendo los datos similares a los ovocitos controles aunque existiendo estadísticamente diferencias significativas cuando se trata con el FO de coneja. Estas diferencias no las consideramos como tales respecto a la resistencia de la digestión de la ZP debido a que su aumento es mínimo (algo más de un minuto), comparado con otros resultados en otras especies (de horas).

Los estudios existentes hasta la fecha en cuanto al análisis de la resistencia de la ZP humana a enzimas proteolíticas se han realizado pre y post-fecundación. Schiewe *et al.* (Schiewe, Araujo *et al.*, 1995) observaron pequeñas diferencias significativas en la digestión con alfa quimotripsina (unos 26 y 32 minutos pre y post-fecundación respectivamente) mientras que Manna *et al.* (Manna, Rienzi *et al.*, 2001) observaron diferencias en la cohorte de ovocitos en metafase II de modo que hay una porción que presenta una digestión más rápida de su ZP, de unos 24 minutos, mientras que otra lo hace de un modo bastante más lento, unos 45 minutos. Estos datos pueden llevar a pensar que el fenómeno de endurecimiento es post-fecundación aunque la existencia de resultados contradictorios como los aportados por Coy *et al.* (Coy y Avilés, 2010) ($1'62\pm 0'32$ y $1'36\pm 0'07$ minutos respectivamente) nos indican que las posibles diferencias puedan encontrarse en los diferentes ovocitos de procedencia o la diferente enzima empleada.

En el caso que nos ocupa, estas ZP responden de modo similar a las de roedores en la mayoría de los tratamientos realizados y al igual que en el hámster se sabe que OVGP1 humana parcialmente purificada es capaz de unirse a la ZP humana (O'Day-Bowman, Mavrogianis *et al.*, 1996), aunque no se ha probado su eficacia en la producción de RDE de la ZP. La mujer posee la OVGP1 con más AA (678) después de la de la ratona (721). Posibles modificaciones en esta proteína pueden ir paralelas a modificaciones en la ZP de modo que ésta o los GAGs responsables del mantenimiento del entramado (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) no se unan a la ZP y no se modifique la resistencia a la acción enzimática.

7.1.3.2.6. Ovocito de cerda

La ZP de los **ovocitos de cerda** responde al tratamiento con los diferentes FOs adquiriendo resistencia a la digestión en pronasa significativamente diferente a los resultados del control aunque de un modo variable dependiendo del FO que se trate.

Ya hemos mencionado las similitudes encontradas entre los análisis realizados por Broermann *et al.*; Kolbe y Holtz (Broermann, Xie *et al.*, 1989; Kolbe y Holtz, 2005) y los de esta tesis con respecto a estudios homólogos en la especie porcina. Otras similitudes se observan en el trabajo desarrollado por Coy *et al.* 2008 (Coy, Cánovas *et*

al., 2008) en el que la ZP de ovocitos porcinos tratados con FO bovino en las mismas condiciones en que se ha desarrollado el presente trabajo aumentaban el tiempo de digestión en pronasa de modo significativo respecto a los controles (unos 48 y 2 minutos respectivamente). La carencia de otros estudios heterólogos limita nuestras comparaciones.

Podemos mencionar que en el caso de los FOs de ungulados el FO bovino posee un efecto más acentuado en la producción de la RDE sobre la ZP pelúcida porcina y el resto se mantienen en un nivel muy similar por lo que en este caso un FO heterólogo muy cercano filogenéticamente al cerdo produce mayor efecto que el correspondiente homólogo. Esto se puede deber a que los componentes implicados se encuentren en mayor proporción para producir dicho efecto en el FO de la vaca que en la cerda, oveja y cabra o que se haya perdido o modificado algún factor implicado aunque no determinante en el FO de la cerda.

En este mismo estudio de Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) se ha comprobado que dos glicofomas de la proteína OVGPI bovina (75 y 95 kDa) se encuentran implicadas en este proceso de endurecimiento pre-fecundación heterólogo.

7.1.3.2.7. Ovocito de vaca

La ZP de los **ovocitos de vaca** responde al tratamiento con los diferentes FOs adquiriendo resistencia a la digestión en pronasa de modo significativamente diferente a los resultados del control aunque de un modo variable dependiendo del FO que se trate.

Como ya hemos mencionado previamente existen similitudes entre nuestros resultados y los de otros autores usando el modelo homólogo (Katska, Smorag *et al.*, 1988; Smorag y Katska, 1988; Katska, Kauffold *et al.*, 1989) y heterólogo con el FO porcino (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Es muy probable que al igual que ocurre con las ZPs porcinas, la OVGPI sea la responsable del aumento de la RDE en estos ovocitos ya que la proteína implicada ha sido precisamente la OVGPI bovina junto con los glicosaminoglicanos similares a la heparina.

7.1.3.2.8. Ovocito de oveja

También la ZP de los **ovocitos de oveja** responde al tratamiento con los diferentes FOs adquiriendo resistencia a la digestión en pronasa en comparación con los resultados del control aunque de un modo variable dependiendo del FO que se trate.

En este ensayo, el FO homólogo es, de todos los FOs de ungulados analizados, uno de los que producen un mayor efecto de RDE en las ZPs. Posiblemente los cambios evolutivos en las proteínas de la ZP y el FO sean más paralelos en aquellos resultados en los que observamos este efecto importante de RDE producido por el FO de la misma especie.

Al igual que ocurre con estudios homólogos de cerdo, en homólogos ovinos se ha observado que las secreciones oviductales son las que proporcionan a la ZP el efecto que les produce el aumento de la resistencia a la proteólisis y además que dicho efecto se revierte en cuanto los embriones entran en el útero (Trounson y Moore, 1974), por lo que no se descarta que los responsables sean los mismos mencionados.

7.1.3.2.9. Ovocito de cabra

La ZP de los **ovocitos de cabra** también incrementa su resistencia a la digestión en pronasa tras el tratamiento con los diferentes FOs con respecto a los ovocitos control. Este efecto es variable dependiendo del FO que se trate.

Ya hemos mencionado que la ZP de ovocitos de cabra aumenta su resistencia a la digestión proteolítica cuanto mayor es el contenido de OVGPI caprina purificada presente en el medio (Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011). Los resultados ofrecidos por Pradeep *et al.* presentan un máximo de RDE de 15 minutos, periodo muy inferior a los mostrados en el actual trabajo. Esto nos indica que la OVGPI está implicada pero carece de la capacidad suficiente para mantenerse adherida a la ZP por sí sola y mantener dicho efecto de RDE. Los GAGs del tipo de la heparina presentes en el FO serían, no se conoce si junto con algunos factores más, los responsables del mantenimiento del efecto a mayor largo plazo tal y como han descrito Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

La carencia de bibliografía en cuanto a ensayos similares a los nuestros con ovocitos caprinos nos limita la realización de cualquier estudio comparativo. La cercanía filogenética con el resto de ungulados analizados en el presente trabajo y los resultados mostrados por Pradeep *et al.* (Pradeep *et al.*, 2011) nos llevan a postular para todos ellos el mismo origen del aumento de resistencia a la digestión proteolítica cuando son tratados con los diferentes FOs.

Cuando analizamos la **ZP** de las diferentes especies estudiadas observamos que poseen diferente composición glicoproteica en cuanto al número de proteínas que la componen (3 ó 4). También conocemos que entre ellas existen diferentes identidades o porcentajes de homología, además de una diferente glicosilación (Skinner y Dunbar, 1992; Bauskin, Franken *et al.*, 1999; Ikeda, Yonezawa *et al.*, 2002; Jiménez-Movilla, Martínez-Alonso *et al.*, 2009; von Witzendorff, Maass *et al.*, 2009).

Una posible causa de la RDE prefecundación pudiera ser la compleja estructura tridimensional de la ZP (Jiménez-Movilla, Martínez-Alonso *et al.*, 2009) que se encuentre más empaquetada o entrecruzada en ciertas situaciones de modo que el lugar en el cual la enzima produce la rotura proteolítica se encuentre inaccesible a dicha enzima (Green 1997). En ratones se ha propuesto que la rotura en ZP2 (tras la fecundación) produce una serie de cambios conformacionales que provocan el aumento de la RDE (Sun 2003; Dean 2004; Lindsay y Hedrick, 2004) y en el hámster hemos mencionado que parece ocurrir un efecto a la inversa, necesitando disminuir la resistencia de su ZP para poder ser fecundada. Pudiera ser que la ZP modificara su empaquetamiento por la acción de diferentes componentes como proteasas presentes en el FO.

Además se ha demostrado que algunas proteínas que la forman (ZP2 y ZP3) junto con la OVGPI sufren cambios evolutivos que además en las proteínas reproductivas suelen ser rápidos (Swanson, Yang *et al.*, 2001; Swanson y Vacquier, 2002). Estos cambios podrían modificar en pequeño grado la microestructura de la ZP y ser los responsables de las diferencias en los patrones de RDE entre especies.

Una de las proteínas descrita como implicada en el endurecimiento pre-fecundación ha sido la **OVGP1** (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), de modo que cuando analizamos sus características en los diferentes FOs observamos también diferencias. Por ejemplo, se han descrito diferentes isoformas en una misma especie, como en el conejo (Merchán, Peiró *et al.*, 2007) y en el hámster (Paquette, Merlen *et al.*, 1995) y la presencia de diferentes glicofomas en el cerdo (Buhi, Alvarez *et al.*, 1990; Buhi, O'Brien *et al.*, 1993), en la vaca (Abe, Numazawa *et al.*, 1993; Coy, Cánovas *et al.*, 2008) y en la oveja (Gandolfi, Brevini *et al.*, 1989). Además, en el hámster se ha observado que el componente mayoritario de la misma son los carbohidratos (Malette y Bleau, 1993) por lo que diferentes glicosilaciones en las diferentes secuencias pueden ser los responsables del diferente papel biológico de OVGP1 (McBride, Boisvert *et al.*, 2004b; McBride, Brockhausen *et al.*, 2005).

Comparando las porciones terminales de la **OVGP1** en las diferentes especies se ha conocido que existe un alto grado de conservación en el extremo N-terminal en el que se encuentra el dominio quitinasa (aunque a esta proteína no se le ha identificado actividad enzimática) mientras que en el C-terminal existe una considerable divergencia (Verhage, Fazleabas *et al.*, 1997a). De este extremo C-terminal se conoce además que está implicado en la división embrionaria (Yong, Gu *et al.*, 2002) y que posiblemente desempeñe un papel protector alrededor del ovocito y el embrión temprano (Malette, Paquette *et al.*, 1995). Otro factor a tener en cuenta es que algunas mucinas se ensamblan por ambos extremos y forman estructuras muy complejas aunque no se ha identificado aún cual es la estructura de la OVGP1 y si ésta se ensambla, pero por su naturaleza es muy probable (Pérez-Vilar y Hill, 1999) que lo haga. Esta complejidad lleva incluso a desconocer la zona por la que la OVGP1 se une a los gametos y cual define su funcionalidad, aunque por la diferente variabilidad, este último podría localizarse en la zona C-terminal.

Según Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), la concentración presente en el FO de GAGs puede ser determinante en el mantenimiento de las estructuras hipotéticas planteadas y ser también factor responsable de los diferentes tiempos obtenidos en las pruebas de digestión. El contenido en GAGs en el oviducto es mayor en la vaca (Bergqvist y Rodríguez-Martínez, 2006) que en la cerda (Tienthai, Kjellén *et al.*, 2000) y resulta que el FO bovino es capaz de producir mayor resistencia a la digestión

proteolítica que el FO porcino (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), también han evidenciado que si los ovocitos resistentes a la digestión proteolítica se colocan en un medio sin heparina disminuye la RDE por lo que existiría un efecto “lavado” en el caso de la disminución de la concentración de la OVGP1 y/o los GAGs en el oviducto proximal y por lo tanto en el ambiente uterino. Quizás ese entramado protege al ovocito y posterior embrión de la acción de diferentes enzimas proteolíticas presentes en el oviducto y por lo tanto en el FO, pero una vez ese entramado se ha ido liberando por el efecto lavado o la posible acción de proteasas y/o glicosidasas específicas de GAGs (como por ejemplo la Heparanasa) hace a la ZP susceptible a la degradación proteolítica, datos que serían aplicables también a los resultados obtenidos por otros autores (Trounson y Moore, 1974; Menino y Wright, 1982).

Ese efecto lavado también lo han observado Smorag y Katska (Smorag y Katska, 1988) con el fluido folicular. Esto nos puede indicar que no son sólo la presencia de GAGs (abundantes en el fluido folicular) si no una relación concreta de los componentes implicados es necesaria para que se mantenga la estructura, o quizás la presencia de otro componente actualmente desconocido.

Es sorprendente que la ZP no sea degradada por el FO puesto que se ha descrito previamente la existencia de proteasas en él (Gabler, Killian *et al.*, 2001; Roldan-Olarte, Jimenez-Diaz *et al.*, 2005; Tsantarliotou, Zervos *et al.*, 2005; Gabler, Odau *et al.*, 2008; Töpfer-Petersen, Ekhlesi-Hundrieser *et al.*, 2008). En el FO también se conoce la existencia de inhibidores de proteasas (Kouba, Alvarez *et al.*, 2000; Kouba, Burkhardt *et al.*, 2000; Gabler, Killian *et al.*, 2001). La presencia de ambos también se da en el útero y en éste la acción de las proteasas ayuda a la eclosión del embrión (Trounson y Moore, 1974). Entonces, en la coexistencia de ambos ¿por qué en una fracción del genital femenino se protege la ZP y en otra se promueve su destrucción? ¿Hay quizás una relación perfecta de enzimas en una y otra fracción que producen una función opuesta? Es posible, pero también lo es el que los componentes del FO (OVGP1 y glicosaminoglicanos, según Coy *et al.*, 2008) que se adhieren a la ZP formen un entramado que proteja a la ZP del sitio de acción de las enzimas y no puedan degradarlo. Por ello, las ZPs a las que no se le agregan otros componentes procedentes

del FO (OVGP1 y glicosaminoglicanos, según Coy *et al.*, 2008) desaparecen rápidamente en las enzimas proteolíticas.

No podemos dejar de mencionar que pueden existir otros elementos presentes en el FO que probablemente estén implicados y que desconocemos actualmente, por lo que es necesario realizar más estudios en el futuro.

Una posible explicación al efecto del FO de coneja sobre todos los ovocitos estudiados (con la excepción de la ZP humana) es que en las ZPs tratadas se adhieren glicoproteínas oviductales del modo descrito anteriormente. La OVGP1 de conejo es la que posee menor tamaño molecular (475 AA) por lo que podría formar un entramado con mayor complejidad. La exposición de los lugares de acción de la enzima pronasa serían escasos o nulos y la enzima no actuaría. Esta explicación sería totalmente coherente con las observaciones de la mayoría de los ovocitos tratados con FO de coneja que se encuentran iguales al primer día tras tratamientos prolongados en la enzima pronasa. En nuestro caso no se observó la cubierta de mucina descrita por otros autores (El-Gayar y Holtz, 2009), aunque sí una cierta diferencia en algunos ovocitos entre las porciones interna y externa (véase figura 32b) de ésta como también han observado otros autores (Kim, Funahashi *et al.*, 1996).

Como hemos mencionado, en nuestras muestras no se aprecian cubiertas de mucina sobre los ovocitos tras la incubación en el FO de coneja, a diferencia de lo que ocurre cuando se introducen diferentes objetos, gametos y embriones en el oviducto de la coneja (El-Gayar y Holtz, 2009). Esto se puede deber al procesado de nuestras muestras en la que se prescinde de la mayoría de las mucinas cuando tras la recolección se le aplica una centrifugación previa a la conservación de las mismas como hemos descrito en el apartado materiales y métodos.

Por otro lado, Kim *et al.* 1996 (Kim, Funahashi *et al.*, 1996) observaron que en el FO porcino existía un factor necesario para una homogénea y completa reacción de los gránulos corticales y que además con la preincubación de los ovocitos porcinos en un medio con el 30% de FO aumentaba el tiempo de digestión de la ZP porcina en pronasa al 0'1% en el tiempo de la penetración espermática. Estos autores (Kim, Funahashi *et al.*, 1996) implicaron a algún factor presente en el FO como el responsable

de estimular la liberación prematura (antes de la fecundación) de los GC. Por otro lado, se conoce la existencia de diferentes poblaciones de GC en el ovocito en base a las características electrodensas que presentan en microscopía electrónica (Nicosia, Wolf *et al.*, 1977; Cran 1985). La proteína OVGP1 es capaz de unirse a diferentes estructuras ovocitarias como ZP y oolema (Buhi, 2002) por lo que también podría activar de algún modo la exocitosis parcial de los GC, exocitosis que se completaría tras la fecundación.

Por supuesto que esta última hipótesis necesitaría de otras pruebas confirmativas como microscopía confocal o electrónica.

Algunas observaciones previas han demostrado que los ovocitos con su ZP resistente a la proteólisis son penetrables y por lo tanto fecundables por espermatozoides disminuyendo la tasa de polispermia *in vitro* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Por extensión, aunque en este trabajo no se han realizado experimentos de FIV, se puede sospechar que por lo menos en el caso de los mamíferos ungulados (oveja y cabra por ser cercanos filogenéticamente a la cerda y la vaca) se produciría un efecto similar con la mayoría de los FOs usados (aquellos que les producen RDE). Algo más de incertidumbre plantea el resultado obtenido en la prueba de digestión de la ZP de todas las especies mediado por el FO de coneja, debido a la gran RDE que produce, aunque Katska *et al* (Katska, Kauffold *et al.*, 1989) estimaron que la tasa de fecundación de ovocitos bovinos (RDE) tratados en oviducto homólogo y en el de coneja fue la misma.

Una curiosidad observada en el presente trabajo y no mencionada previamente ocurre cuando se colocan ovocitos que han sido tratados en FO en el ensayo de la pronasa. En los ovocitos que presentan capacidad para resistir la acción proteolítica en su ZP de modo general, se ha observado que al cabo de un tiempo de permanecer en pronasa (de unos 30 minutos a 3 horas aproximadamente o incluso más) se produce la aparición de un orificio en la ZP. En ocasiones esa oquedad prolifera de modo que permite la salida del resto del ovocito, como puede verse claramente en la figura 41 de los resultados de este apartado. Es muy curioso por un lado que la oquedad se produzca por una zona concreta de la ZP y por otro su similitud con el proceso de la eclosión. Quizá estamos cerca sin saberlo de observar un espacio en la ZP predestinado para la eclosión, en la que la unión de las moléculas mencionadas anteriormente sea más débil

o de menor cuantía de modo que sea capaz de resistir la acción de las proteasas oviductales (ayudado o no por los inhibidores de proteasas) y sea en el ambiente uterino donde sea más sensible a las proteasas o proteasa específica o tenga un mayor efecto lavado por la debilidad de las uniones del entramado. Este fenómeno puede ser el punto de partida para el desarrollo de estudios interesantes en la eclosión como la inhibición del mismo para la producción de anticonceptivos.

Finalmente, lo que pone de manifiesto el estudio realizado en esta tesis es que cualquiera de los FOs analizados es capaz de producir sobre determinadas ZPs RDE y que ese efecto se produce de un modo no específico de especie. Este efecto es generalizado y similar entre las especies de ungulados analizadas por lo que con alta probabilidad los componentes implicados o al menos parte de ellos pueden ser los mismos. Con los resultados obtenidos en el presente estudio no se esclarece el motivo por el que las ZP de especies de roedores y la mujer no sufren tales modificaciones cuando se tratan con determinadas sustancias oviductales y sí lo sufren con otras.

Para terminar, la yegua, es un animal que posee ovocitos ováricos resistentes a la digestión proteolítica (Dell'Aquila, De Felici *et al.*, 1999) y en el trabajo que nos ocupa hemos observado que ocurre algo similar con el hámster. En el resto de especies estudiadas y según lo descrito en la bibliografía, lo más habitual y por lo tanto el proceso seleccionado por evolución es el mecanismo contrario, ZP blandas que adquieren RDE (pre o post-fecundación) para evitar la entrada de espermatozoides adicionales. La cerda, una especie en la que se ha observado polispermia *in vitro* (Hunter, 1991a; Coy y Romar, 2002; Hao, Mathialagan *et al.*, 2006), necesita de factores oviductales para prevenir ese fenómeno (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Otras especies de ungulados como la cabra y la oveja también poseen elevada tasa de polispermia *in vitro* (Fukui, Glew *et al.*, 1988; De Smedt, Crozet *et al.*, 1992). Los resultados observados por Coy *et al.* y los mostrados en el presente trabajo llevan a pensar que el efecto que produce el FO proporcionando RDE a la ZP y favoreciendo la monospermia es un mecanismo general para ungulados y posiblemente para otros mamíferos cercanos filogenéticamente. Por todo ello el fenómeno que produce el FO descrito en el presente trabajo es importante desde el punto de vista biológico.

7.2. OBTENCIÓN DE FRACCIONES DE FLUIDO OVIDUCTAL BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA MEDIANTE COLUMNA DE HEPARINA

La proteína OVGP1 ha sido recientemente implicada en el proceso de maduración oviductal de la ZP de las especies porcina y bovina, estando además implicadas en el proceso dos glicofomas de la misma (75 y 95 kDa) presentes en el FO bovino en fase folicular tardía (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). En este mismo trabajo mencionado se ha observado que la heparina es capaz de mantener estable la unión de esas glicofomas a la ZP y la resistencia de la ZP a la digestión proteolítica, relacionándose además con una disminución de la polispermia *in vitro*. Por lo tanto, los factores implicados en ese proceso deben de ser capaces de unirse a heparina.

Por este motivo, el segundo bloque experimental de este estudio se centró en la identificación de las posibles fracciones de FO con afinidad por heparina que son capaces de producir RDE en las ZPs.

Los resultados del presente trabajo muestran, la existencia de diferentes proteínas capaces de unirse a la heparina. El patrón proteico obtenido es un dato no expuesto hasta ahora por ningún trabajo previo de purificación de secreciones oviductales por lo cual podemos afirmar que de las proteínas existentes en el FO bovino en fase folicular tardía existe una baja proporción de las mismas con afinidad a la heparina como se puede observar en la imagen obtenida del FPLC tras el fraccionamiento (figura 43). El diferente patrón de afinidad a la heparina mostrado, separándose de la misma entre los valores de 0'05 y 0'9 M de NaCl, indica posibles diferencias funcionales entre las diferentes fracciones. Una de esas diferencias se ha puesto de manifiesto cuando se analiza el patrón de resistencia a la digestión enzimática que produce cada una de estas fracciones sobre las ZP de ovocitos de cerda cuando se incuban los mismos durante 30 minutos. Las primeras fracciones (14 a 19) y las últimas (28 y de la 30 a 35) no poseen diferencias estadísticamente significativas en su efecto sobre la RDE comparadas con el control (ovocitos madurados *in vitro*). Sin embargo, podemos afirmar que en las fracciones comprendidas entre la 20 a 28 se encuentran los factores responsables del incremento en la RDE. Asignar este efecto a una sola proteína es complicado debido a las diferentes proteínas obtenidas por fracción por lo que son necesarios otros estudios que determinen las proteínas implicadas en este proceso. Es posible que sean varias proteínas o incluso una misma proteína pero con distintas

glicoformas que pudieran tener diferente afinidad por heparina. Así, previamente se ha visto que al menos dos glicoformas de la OVGP1 de 75 y 95 kDa están implicadas en este proceso (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Kouba *et al.* (Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000), usaron una metodología similar a la desarrollada en el presente trabajo. Estos autores obtuvieron OVGP1 porcina altamente purificada tras pasar por una columna de heparina el sobrenadante procedente del cultivo de explantes oviductales. En ambos casos se usa también para la elución de las proteínas unidas a la columna un gradiente de NaCl con la diferencia de que en el trabajo de Kouba *et al.* (Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000), se empleó solamente la fracción eluida con 0'4 M de NaCl para el resto de análisis. Estos autores afirman que usando este tipo de purificación, la fracción mencionada posee un contenido del 80 al 85% en OVGP1 porcina y una menor proporción de proteínas oviductales que contienen secuencias de unión a heparina. En el presente trabajo esa molaridad de NaCl eluye en la fracción número 25 una de las fracciones más similares al FO bovino de partida en cuanto a la capacidad de producir resistencia a la digestión enzimática de la ZP porcina (más de 6 horas), aunque en nuestro caso no podemos indicar la concentración o porcentaje de la proteína OVGP1 presente en dicha fracción. Al no realizar una coloración con Azul de Coomassie no observamos cuál o cuales son las proteínas mayoritarias en cada fracción; lo que sí podemos observar es que existen muchas proteínas en dicha fracción como se puede observar en la tinción de plata.

Estos autores (Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000) demuestran la presencia en esa fracción de varias glicoformas (4) de la proteína OVGP1 y sin embargo no obtienen resistencia a la digestión enzimática en pronasa al 0'1% cuando incuban ovocitos porcinos durante 4 horas con diferentes concentraciones de dicha fracción (0, 0'1, 1, 10, 50 y 100 µg/ml) a diferencia de lo obtenido en nuestros resultados. El motivo de esta diferencia puede encontrarse probablemente en el hecho de que son necesarios otros componentes tal y como observaron Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), ya que cuando los ovocitos porcinos se incuban en un medio carente de heparina, la RDE provocada por el fluido oviductal disminuye drásticamente en los primeros 15 minutos, con lo que el factor o factores responsables son fácilmente lavados en un medio carente de heparina. Kouba *et al.* (Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000) incuban los ovocitos solo con la OVGP1 por lo que los elementos que la mantienen unida a la ZP no intervienen y por

lo tanto no se adquiere RDE en la ZP. Nosotros incubamos los ovocitos en las fracciones durante 30 minutos y evaluamos inmediatamente la RDE, por lo que el efecto aún pudo observarse. Además nosotros trabajamos con una fracción enriquecida en proteínas con capacidad de unirse a heparina, por lo que estos datos confirmarían el hecho de que otros componentes oviductales son necesarios aparte de la OVGP1 para la producción de RDE. Estos autores usan un enriquecido de OVGP1 procedente de un explante de oviducto por lo que también carecen de un componente importante de la solución oviductal que son los componentes del plasma y que pueden estar implicados. Por todo ello, consideramos que el análisis de todos los componentes de las fracciones con capacidad para producir RDE de las ZPs es importante y se abordará en posteriores análisis.

Pradeep *et al.* (Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011), observaron que la OVGP1 purificada de cabra mediante cromatografía de afinidad a WGA sí produce resistencia de la ZP caprina a la digestión proteolítica con pronasa al 0'1% e incluso que ésta producía mayor resistencia cuanto mayor era la concentración de la proteína analizada (0, 10, 15 y 100 µg/ml). En este caso, se obtuvieron diferentes bandas correspondientes a la OVGP1 caprina, una mayoritaria de 95 kDa y otras bandas menos visibles desde los 60 hasta los 95 kDa. Por lo tanto, en este caso no se puede descartar que la funcionalidad que estamos analizando (RDE), se deba a una o a varias glicofomas de la OVGP1, como en el caso de Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008). Estos autores (Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011), incubaron los ovocitos durante 4 horas con las diferentes concentraciones de OVGP1 mencionadas, en medio de fecundación *in vitro* fert-TALP (Parrish, Susko-Parrish *et al.*, 1988) y observaron que se produce RDE de hasta unos 14 minutos con la mayor concentración de OVGP1, datos muy por debajo de los obtenidos en el actual trabajo de algo más de 13 horas, cuando se incuban los ovocitos de cabra durante 30 minutos con FO caprino.

Estos datos confirmarían de nuevo y al igual que lo mencionado para la especie porcina, la necesidad de la presencia de otros componentes procedentes del FO para estabilizar la unión de OVGP1 u otro elemento implicado en producir dicha resistencia a la digestión proteolítica de la ZP como ocurre con los GAGs observados por Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008).

Por otro lado, estos autores usan la pronasa a temperatura ambiente a 25°C y nosotros trabajamos en platinas calefactadas a 37°C por lo que Pradeep *et al.* (Pradeep, Jagadeesh *et al.*, 2011) pudieron tener una menor actividad enzimática de la pronasa en comparación con nuestro estudio que aumentara el resultado de la digestión aunque los resultados control que se han obtenido en ambos casos con los ovocitos de cabra oscilan entre los 4 minutos por lo que se puede descartar tal efecto.

Otros autores han purificado la OVGPI bovina también en base a su afinidad a la WGA (Sendai, Abe *et al.*, 1994), obteniendo tras una segunda fase de purificación por intercambio iónico una fracción de 95 kDa aunque el extracto oviductal de partida muestra otra fracción más minoritaria de 55 kDa posiblemente correspondiente a la OVGPI deglicosilada. Estos autores no realizaron ensayos de resistencia de la ZP a la acción proteolítica aunque de los resultados derivados en el trabajo de Coy *et al.* (Coy, Cánovas *et al.*, 2008), conocemos que al menos la fracción de 95 kDa es responsable de la RDE. Lo que no conocemos es si ésta glicofoma por sí sola sería capaz de producir RDE y si lo produce en unos valores similares a los observados utilizando el FO o una fracción de éste.

En nuestro caso, observando la tinción de plata no podemos confirmar que existan glicofomas de OVGPI en nuestras fracciones y en el caso de su existencia tampoco decir en qué fracciones y qué glicofomas de la OVGPI bovina se encuentran presentes aunque debe de estar presente en alguna o algunas fracciones ya que la OVGPI posee al menos un sitio de unión a heparina. Aún así, podemos indicar que es posible que las glicofomas mencionadas de 95 y 75 kDa descritas como responsables de la resistencia a la digestión enzimática en la especie bovina (Coy, Cánovas *et al.*, 2008) se encuentren presentes en alguna de nuestras fracciones debido a que en el gel teñido con plata se tiñen bandas del mismo peso molecular (95 y 75 kDa) en fracciones en las que se ha obtenido RDE. Creemos que sería de interés continuar estos estudios utilizando un anticuerpo anti-OVGPI que nos pudiera detectar por Western Blot cuales de las bandas obtenidas contienen OVGPI, siendo además necesario identificar el resto de componentes presentes en estas fracciones del FO separadas mediante cromatografía de afinidad.

En la oveja, se han descrito dos glicofomas de la proteína OVGP1 (de 92 y 46 kDa) que se unen a la ZP (Sutton, Nancarrow *et al.*, 1984; Gandolfi, Brevini *et al.*, 1989; Gandolfi, Modina *et al.*, 1991), pero en este caso la proteína OVGP1 no ha sido purificada ni se ha relacionado con el endurecimiento pre-fecundación o RDE de la ZP. Sin embargo, los resultados de la primera parte experimental de este estudio demuestran que el FO de oveja produce RDE y por proximidad filogenética con el resto de ungulados analizados, podría ser la OVGP1 la responsable de la misma y quizás la glicofoma de mayor peso molecular podría estar implicada, aunque por supuesto, son necesarios estudios complementarios para corroborar esta hipótesis.

Otra proteína oviductal que se ha descrito como capaz de unirse a heparina y a los gametos femeninos es la **osteopontina (OPN)** (Elisa, 2007). La OPN es sintetizada y secretada por las células oviductales y está presente en el FO en el que se han detectado tres formas glicoproteicas de 25, 48 y 55 kDa, siendo esta última la predominante en la fase no luteal aunque en la zona de la ampolla en esta misma fase se observan además otras 2 glicofomas de unos 42 y 70 kDa (Gabler, Chapman *et al.*, 2003; Killian 2004; Killian 2011). En los fraccionados con mayor efecto en la RDE comienzan a aparecer proteínas a partir de unos 30 kDa (fraccionado 25) y a partir de 15 kDa (fraccionado 27) por lo que si solo tenemos en cuenta los pesos moleculares nos ocurre igual que con la OVGP1. Por lo tanto, es probable que la OPN se encuentre presente al menos en alguna de las glicofomas mencionadas, porque posee capacidad de unirse a la heparina, aunque no podemos afirmar con rotundidad el fraccionado y la glicofoma, ya que para ello sería necesario la comprobación mediante otros métodos como el western blot mediante el uso de un anticuerpo específico.

Otra proteína capaz de unirse a la heparina y descrita en el FO porcino es la heparin binding-EGF de 208 AA descrita por Buhi *et al.* (Buhi, Alvarez *et al.*, 2000). Estos mismos autores, pocos años después, a partir del medio de cultivo de un explante de oviducto porcino purificaron parcialmente mediante heparina varias proteínas: componente del complemento C3b de 65 kDa, región variable de la cadena pesada de la Ig A de 60 kDa (detectada también en el FO bovino analizado en esta tesis de ~55 kDa) y la secuencia carboxiterminal del pre-procolágeno de 35 kDa (Buhi y Alvarez, 2003). De los datos obtenidos en nuestro estudio, no podemos afirmar que estas proteínas no

tengan un papel en la RDE porque en las fracciones de FO que produjeron incremento de RDE se observan bandas de pesos similares.

Una de las proteínas identificadas mediante la proteómica del FO bovino en fase folicular tardía del presente trabajo, como comentaremos en el siguiente apartado, ha sido la azurocidina (~46 kDa), proteína de función antimicrobiana de unión a heparina, descrita en el genoma porcino de 219 AA (en el genoma de bovino se ha descrito la azurocidin 1 preproprotein-like de 246 AA; XP_002689188).

Estos últimos componentes observados en el FO con capacidad para unirse a heparina, con la información que se tiene actualmente, pueden encontrarse presentes en alguna de las diferentes fracciones obtenidas en el presente trabajo. Se carece de datos de su posible pertenencia a una fracción u otra y se carece de datos de su implicación en la RDE de la ZP por lo que son necesarios posteriores estudios para esclarecer en cada especie los componentes implicados en la resistencia a la digestión proteolítica y sus características.

7.3. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y GENÓMICO DEL OVIDUCTO PORCINO Y BOVINO EN FASE FOLICULAR TARDÍA.

El patrón de bandas mostrado por los dos tipos de FO se ha considerado normal si tenemos en cuenta los análisis previos realizados en la especie bovina (Sendai, Abe *et al.*, 1994). No se ha podido comparar el resultado del FO porcino debido a que los análisis previos con dicho FO se han realizado mediante electroforesis bidimensional (Buhi, Alvarez *et al.*, 1996; Kouba, Abeydeera *et al.*, 2000; Buhi, 2002).

El estudio proteómico del presente trabajo tras el análisis de las diferentes bandas que se separan en el transcurso de la electroforesis nos ha mostrado la presencia de casi 300 proteínas en el caso del FO porcino y 270 proteínas en el FO bovino (anexos I y II).

El FO usado en el presente estudio procede de la fase folicular tardía del ciclo estral, fase en la que no ha ocurrido la ovulación por lo que no puede haberse producido

una influencia en el perfil secretor de la presencia de los ovocitos como se ha visto en estudios previos (Georgiou, Sostaric *et al.*, 2005; Georgiou, Snijders *et al.*, 2007).

Los oviductos de las cerdas y vacas usadas en este estudio proceden de matadero por lo que se desconoce si, previamente al sacrificio, las mismas han sido montadas aunque esta hipótesis es poco probable puesto que la monta lleva consigo un esfuerzo económico no comprensible si se va a proceder al posterior sacrificio en el matadero. Por todo ello, se puede indicar en general que los oviductos, y por lo tanto el FO usado, no se encontraban bajo la influencia del gameto femenino y con alta probabilidad tampoco del masculino.

En la presente discusión se van a mostrar los resultados obtenidos que compartimos con otros autores en diferentes tablas para exponerlos de modo comprensible. Éstos aparecerán en los apartados de proteómica o genómica según los datos que se estén comparando en cada caso.

7.3.1. PROTEÓMICA PORCINA

El estudio de las proteínas oviductales porcinas nos indica la presencia de 291 proteínas, siendo bajo el porcentaje de las mismas que son secretadas (9'3%, según nuestra clasificación). Es decir, las proteínas secretadas y por lo tanto presentes en el FO porcino en dicha fase son una minoría en los resultados obtenidos.

En el procesado proteómico de las muestras obtenidas a partir del FO se reconocen aquellas proteínas presentes en mayor cantidad, por lo que las proteínas detectadas en nuestro estudio pueden ser, con elevada probabilidad, proteínas que podrían jugar un papel relevante en el oviducto en esta fase y, en consecuencia podrían tener influencia sobre los gametos y el embrión temprano.

En publicaciones previas se han descrito proteínas en el FO que han sido igualmente encontradas en el presente estudio. Dichas coincidencias con el análisis **proteómico de la especie porcina** se muestran en la tabla 36, mostrando también la/s especie/s en la/s que se ha detectado la proteína.

Tabla 36. Proteínas del fluido oviductal porcino descritas en el presente trabajo que coinciden con algunos resultados previamente publicados por otros autores.

ESPECIE EN LA QUE SE HA DESCRITO LA PROTEÍNA	PROTEÓMICA PORCINA	AUTOR/ES
Cerda	Alpha-enolase (NP_776474), Heat shock 70kda protein 1A (Q59EJ3), Immunoglobulin lambda chain C (P01846.1), Protein FAM10A5 (Q99L47), Triosephosphate isomerase 1 (NP_001013607).	Georgiou et al., 2005.
Cerda	Alpha-1-antitrypsin (P50447), IgG heavy chain (AAC37626), Immunoglobulin lambda chain C (P01846.1), Serotransferrin (P09571), Vitamin D-binding protein (Q3MHN5).	Georgiou et al., 2007.
Cerda	Ezrin (NP_776642, P15311).	Seytanoglu et al., 2008
Cerda	Choline acetyltransferase (P13222)	Steffl, Schweiger et al., 2006.
Cerda	Heat shock protein A8 (HSPA8, P19120)	Elliott, Lloyd et al., 2009.
Cerda	HSP90-alpha (Q5CAQ7)	Topfer-Petersen, Ekhlesi-Hundrieser et al., 2008.
Cerda	Endoplasmin (HSP90B1, GRP94, GP96, CAA62352).	Seytanoglu et al., 2008;
Mujer Ratona Cerda Vaca	Superoxide dismutase Cu-Zn (P04178)	Georgiou et al., 2005 ; revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán et al., 2010.
Coneja Cerda Vaca	Haptoglobin (NP_999165)	Georgiou et al., 2005 ; revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán et al., 2010.
Coneja Mujer Ratona Cerda Vaca	Immunoglobulins	Revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán et al., 2010.
Coneja Mujer	Albumin (ABM92961.1)	Revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán et al.,

Mona Cerdeja Vaca		2010; Buhi <i>et al.</i> , 1996; Georgiou <i>et al.</i> , 2007.
Coneja Mujer Babuina Ratona Hámster Cerdeja Vaca Oveja Cabra	OVGP1 (Q28990)	Revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán <i>et al.</i> , 2010. Georgiou <i>et al.</i> , 2007.

Además de mostrar resultados similares a los de nuestro trabajo en la tabla anterior, los autores Georgiou *et al.* (Georgiou, Sostaric *et al.*, 2005) observaron en la especie porcina que la presencia de los gametos de modo individual o conjunta modificaba al alza o a la baja el perfil secretor de las proteínas oviductales. Georgiou *et al.* (Georgiou, Snijders *et al.*, 2007) identificaron 32 proteínas porcinas, 20 de las cuales se encontraban reguladas sólo por los espermatozoides y una de ellas solamente por los ovocitos (Ig kappa Light chain VJ region, regulada al alza). Tres proteínas son reguladas por ambos gametos de las cuales sólo una lo es en sentido opuesto. Ésta última proteína es el Complement Component C3, (regulada al alza por los espermatozoides y a la baja por los ovocitos) la cual no ha sido detectada por nuestros análisis de proteómica en la especie porcina al igual que la inmunoglobulina kappa mencionada previamente. Esto nos confirmaría que los oviductos analizados no se encontrarían influenciados por los gametos ya que estas proteínas no se estarían expresando en una cantidad suficientemente elevada como para ser detectadas por nuestro análisis proteómico.

La proteína Ezrin (tabla 36) se ha identificado como proteína porcina que se presenta incrementada más de dos veces en la fase folicular respecto a la luteal (Seytanoglu, Georgiou *et al.*, 2008). Esta proteína posee una función potencial para la supervivencia de las células mediante la activación de la ruta fosfatidil-inositol 3 quinasa/Ark. También se ha descrito en embriones de ratón en el desarrollo pre-

implantacional por lo que estos autores han propuesto que su incremento en la fase folicular puede contribuir a la preparación del oviducto para la supervivencia del cigoto (Seytanoglu, Georgiou *et al.*, 2008).

La proteína Endoplasmin (protein kinase, GP96 o GRP94) ha sido identificada por dos de los trabajos revisados, uno proteómico porcino (Seytanoglu *et al.*, 2008) y otro de expresión génica de oviducto bovino (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004). Es una chaperona oviductal que se presenta incrementada en la fase folicular respecto a la luteal (Seytanoglu, Georgiou *et al.*, 2008).

Kane *et al.* (Kane, Morgan *et al.*, 1997), realizaron una revisión de diferentes factores de crecimiento embrionario, ligandos y receptores presentes en el oviducto de ratón, mujer, coneja, rata, mofeta moteada oriental, primates no humanos y animales domésticos (cerda, vaca, oveja y yegua), (Kane, Morgan *et al.*, 1997). En los actuales resultados no se ha observado ninguna coincidencia con los mostrados en dicha revisión. En nuestros resultados hemos detectado a la interleukina 23 (IL-23) la cual no se corresponde con ninguna de las mencionadas en los trabajos revisados en dicha publicación.

La comparación de los datos proteómicos porcinos con la publicación/revisión de Avilés *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) donde analiza la presencia de diferentes proteínas en diferentes especies nos muestra una coincidencia de 11 proteínas. Algunas de ellas son descritas por primera vez en el oviducto porcino en este trabajo como por ejemplo la proteína Doublecortin domain-containing protein 2 (DCDC2) y la proteína Deleted in malignant brain tumors 1 isoform b.

A excepción de OVGPI, en este estudio no se ha detectado ninguna proteína indicada como secretada por el epitelio oviductal porcino por Buhi *et al.* (Buhi, Alvarez *et al.*, 2000).

Todos estos análisis nos muestran que en el presente estudio, y teniendo en cuenta los trabajos comparados, se han detectado por primera vez en el oviducto de la especie porcina 269 proteínas, de las cuales 22 son secretadas y por lo tanto de interés en la fase del ciclo estral analizada (ver nuevas (N) en el anexo I). Entre ellas nos

encontramos por ejemplo a las proteínas ADAM-TS2 y Whey acidic protein (WAP). La proteína ADAM-TS2 es una glicoproteína secretada que se encarga de cortar propéptidos de colágeno tipo I y II previo al ensamblaje de las fibras de colágeno y se expresa en aquellos tejidos ricos en colágeno tipo I como piel, hueso, tendones y la arteria aorta. La proteína secretada Whey acidic protein posee las funciones de inhibidor de proteasas y actividad antimicrobiana directa participando en la opsonización bacteriana, inducción de la respuesta inmune y promoción de la reparación de los tejidos (Wilkinson, Roghanian *et al.*, 2011).

Las proteínas obtenidas se han analizado mediante la base de datos bioinformática DAVID para clasificarlas en diferentes grupos. Los grupos analizados son los mismos para los tres grupos de resultados del presente estudio: proteínas porcinas, proteínas bovinas y ARNm porcino, para poder comparar entre ellos. Aún así, parece no haber datos suficientes como para que la comparación se pueda llevar a cabo en todos los grupos de la clasificación tenida en cuenta. Este resultado puede deberse a las limitaciones que posee el programa a la hora de agrupar un número bajo de proteínas. Por otro lado, también se han analizado los datos mediante la base bioinformática Ingenuity y se ha obtenido una clasificación funcional de 24 grupos. Cada agrupación se basa no sólo en una funcionalidad sino en dos o tres funciones diferentes que pueden estar o no relacionadas. De este modo observamos que usando bases de datos informáticas diferentes es muy complicado el análisis de una cierta cantidad de información y por lo tanto también es compleja la interpretación que se puede extraer de los mismos.

7.3.2. PROTEÓMICA BOVINA

El estudio de las proteínas oviductales bovinas nos indica la presencia de 270 proteínas. La cantidad de proteínas secretadas es de un 14'1% las cuales, al igual que en el estudio proteómico de la especie porcina, son una porción minoritaria de los resultados obtenidos.

Al igual que en la especie porcina, hemos podido observar que en publicaciones previas de diferentes especies se han descrito proteínas que han sido igualmente

encontradas en el presente estudio. Estas coincidencias con el análisis **proteómico de la especie bovina** se muestran en la tabla 37.

Tabla 37. Proteínas del fluido oviductal bovino descritas en el presente trabajo que coinciden con algunos resultados previamente publicados por otros autores. Las proteínas indicadas en azul son de primera identificación en el fluido oviductal bovino.

ESPECIE EN LA QUE SE HA DESCRITO LA PROTEÍNA	PROTEÓMICA BOVINA	OTROS AUTORES
Cerda	Clusterin (clu, Q9XSC5)	Buhi, Alvarez <i>et al.</i> , 2000.
Cerda	Apolipoprotein A-I (NP_776667.2), Heat shock 70kDa protein 1A (Q59EJ3), Peroxiredoxin 2 (NP_777188.1), Superoxide dismutase 1 (XP_584414.4), Thioredoxin (XP_532029.2), Triosephosphate isomerase 1 (NP_001013607).	Georgiou <i>et al.</i> , 2005.
Cerda	Alpha-1 acid glycoprotein (NP_001035592.1), Hemoglobin alpha-1 globin chain (AAK37554.1), Hemoglobin beta (NP_776342.1), Serotransferrin precursor (Q29443.1).	Georgiou <i>et al.</i> , 2007.
Cerda	Creatine kinase B-type (XP_510185.3),	Seytanoglu <i>et al.</i> , 2008.
Cerda (Vaca)	Endoplasmin precursor (GRP94, HSP90B1, NM_174700)	Seytanoglu <i>et al.</i> , 2008; (Bauersachs, Rehfeld <i>et al.</i> , 2004).
Cerda Vaca	Chromogranin A (P04404)	Revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán <i>et al.</i> , 2010.
Ratona Cerda Vaca	Colony stimulating factor 1 (csf1,O77709)	Arceci, Shanahan <i>et al.</i> , 1989; Kane, Morgan <i>et al.</i> , 1997; Avilés, Gutiérrez- Adán <i>et al.</i> , 2010.
Ratona Vaca	Glutathione peroxidase_(A6QLY2)	Revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán <i>et al.</i> , 2010.
Mujer Vaca	Matrix metalloprotease (MMP-1,_Q9TVA5)	Revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán <i>et al.</i> , 2010.

<p>Coneja Mujer Ratona Cerde Vaca</p>	<p>Immunoglobulins Immunoglobulin heavy chain (BAB38840.1, AAS85954.1), Immunoglobulin kappa variable region (AAR99911.1).</p>	<p>Revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán <i>et al.</i>, 2010; Georgiou <i>et al.</i>, 2007.</p>
<p>Coneja Mujer Mona Cerde Vaca</p>	<p>Albumin (P02769)</p>	<p>Revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán <i>et al.</i>, 2010; Buhi <i>et al.</i>, 1996.</p>
<p>Coneja Mujer Babuina Ratona Hámster Cerde Vaca Cabra Oveja</p>	<p>Oviductal glycoprotein 1(Q28042)</p>	<p>Revisado por Avilés, Gutiérrez-Adán <i>et al.</i>, 2010; Georgiou <i>et al.</i>, 2007.</p>

Analizando algunos resultados concretos respecto a las proteínas obtenidas en el FO bovino del presente trabajo, se puede observar que la proteína Clusterin detectada en el presente estudio es una chaperona, la cual ha sido descrita como proteína secretada por el oviducto porcino en la fase folicular tardía por los autores Buhi *et al.* (Buhi, Alvarez *et al.*, 2000). Esta proteína es sintetizada por todos los segmentos oviductales aunque de forma mayoritaria en la zona del infundíbulo y ampolla (Buhi, Alvarez *et al.*, 2000).

Las proteínas Endoplasmin precursor y Creatine kinase B-type son dos proteínas que se presentan incrementadas en la fase folicular respecto a la luteal (Seytanoglu, Georgiou *et al.*, 2008). La proteína endoplasmin no es de primera descripción en esta especie debido a que la expresión de su ARNm en el oviducto bovino ha sido descrito previamente por Bauersachs *et al.* (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004), como veremos en un apartado posterior.

La proteína Albumin o albúmina es una proteína sintetizada en el hígado y que llega al oviducto procedente del suero. Se ha observado incrementada en la fase luteal

respecto a la folicular (Seytanoglu, Georgiou *et al.*, 2008). Como hemos mencionado en la revisión de este mismo trabajo, esta proteína representa prácticamente entre el 60-80% de las proteínas séricas presentes en el oviducto y es además muy importante por su capacidad para unirse a lípidos, péptidos o catecolaminas (Menezo y Guerin, 1997). Esta proteína se encuentra en elevadas cantidades en la fase folicular tardía (aunque estos autores la encuentran incrementada en la fase luteal) y es capaz de transportar vitaminas, lípidos y hormonas (Gonçalves, Staros *et al.*, 2008). Ha sido implicada en la capacitación espermática captando el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide por lo que se usa en los medios de capacitación *in vitro* (Du Mesnil Du Boisson y Dauzier, 1955; Feki, Théron *et al.*, 2004) y también se ha descrito que la albúmina de 62-74 kDa es capaz de unirse a la ZP de ovocitos bovinos en los que posee un papel potencial para la unión espermática, fecundación y desarrollo embrionario (Gonçalves, Staros *et al.*, 2008).

Por otra parte, hemos detectado la proteína sérica Ig kappa Light chain o variable region de la cual se ha indicado que se encuentra incrementada en el oviducto porcino como consecuencia de la presencia de los ovocitos (Georgiou, Snijders *et al.*, 2007), aunque en las muestras del presente trabajo no había puntos de ovulación en el ovario ipsilateral del oviducto seleccionado.

La proteína Colony stimulating factor 1 es una citoquina de membrana producida por las células oviductales que parece estar implicada en la división embrionaria y en la estimulación de la formación del embrión (Lee y Yeung, 2006). Esta proteína posee su receptor en el embrión por lo que el oviducto parece estar preparado ya en esta fase para el desarrollo embrionario.

La comparación de nuestros datos con los de la publicación de Avilés *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) nos muestra una coincidencia de unas 8 proteínas (MMP-1, protease inhibitors, glutathione peroxidase, immunoglobulins, Albumin, Chromogranin A, Clusterin y OVGPI); alguna de ellas es descrita por primera vez en el oviducto bovino en el presente trabajo como por ejemplo la proteína Clusterin.

Todos estos análisis nos muestran que en el presente estudio, y teniendo en cuenta los trabajos comparados, se han detectado por primera vez en el oviducto de la

especie bovina 256 proteínas, de las cuales 35 son secretadas y por lo tanto de interés en la fase del ciclo estral analizada (ver nuevas (N) en anexo II). Entre estas proteínas de nueva descripción nos encontramos a las proteínas serpin peptidase inhibitor (Serpini2) y plasminogen (PLG). La proteína Serpini2 ha sido descrita como reguladora de la proteólisis inhibiendo la acción de otras proteínas y el plasminógeno (proteína procedente del suero) participa en la ruta fibrinolítica de la coagulación sanguínea y en la rotura de la pared del folículo ovárico en la ovulación (Bridges, Cho *et al.*, 2011). Recientes descubrimientos en nuestro laboratorio implican al plasminógeno en el bloqueo de la polispermia favoreciendo la liberación de los espermatozoides no fecundantes o excedentes unidos a la ZP (Grullón, 2010).

Las proteínas bovinas también han sido analizadas mediante las herramientas bioinformáticas DAVID e Ingenuity. La primera nos ofrece unos resultados algo pobres respecto a la clasificación buscada, clasificando a las proteínas en 5 grupos de los 12 propuestos. Esto parece deberse a que es necesario un número mayor de proteínas para que pueda realizar las agrupaciones. La base de datos Ingenuity ordena los mismos en base a su funcionalidad en 12 grupos de modo muy general. Por ello, podemos ratificarnos en la opinión previa de que el análisis, aún usando una base de datos informática, es muy complicado y por lo tanto también es compleja la interpretación que se puede hacer del mismo.

Cabe mencionar que la luz del oviducto está recubierta por epitelio, el cual sufre la descamación propia de sus células para su renovación. Por ello, en el análisis proteómico tanto porcino como bovino, también observamos otros componentes, no secretados, es decir, de localización intracelular (nuclear, citoplasmática, de membrana, etc), los cuales proceden de la descamación normal de las células epiteliales que se produce como resultado de la regeneración epitelial, por lo que pueden existir restos celulares procedentes de estas células en degradación. Otras proteínas típicas de organelas celulares como por ejemplo las chaperonas o HSP procedentes del retículo endoplasmático también se encuentran presentes en el fluido oviductal y han sido descritas por varios autores (Neuer, Spandorfer *et al.*, 2000) por lo que pueden ser producidas por las células epiteliales oviductales y secretadas a la luz oviductal (Boilard, Reyes-Moreno *et al.*, 2004) donde se les ha relacionado, por ejemplo, con el incremento de la supervivencia de los espermatozoides (Lloyd, Elliott *et al.*, 2009).

7.3.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

El **análisis genómico** de todos los datos obtenidos en el oviducto porcino nos ha mostrado que en el oviducto de cerda se están expresando 2.942 genes conocidos. En este trabajo se ha determinado solamente la presencia de los genes, sin cuantificar el nivel de expresión que presentan, ya que como hemos mencionado en la revisión bibliográfica la producción de proteínas se encuentra fundamentalmente bajo control hormonal por lo que varía durante el ciclo estral (Seytanoglu, Georgiou *et al.*, 2008) y al parecer también por la presencia de los gametos (Seytanoglu, Georgiou *et al.*, 2008). El nivel de expresión de dichos genes se abordará en posteriores estudios de nuestro laboratorio.

Al igual que en los casos anteriores, mostramos las diferentes coincidencias encontradas con otros autores aunque en la presente comparación se tienen en cuenta por un lado los genes que se están expresando (ARNm) en el oviducto porcino y por otro bien genes o bien la proteína producida a partir de ese gen, y que se expresa en el oviducto de diferentes especies, ya descrita por otros autores (tabla 38).

Tabla 38. Comparación de los genes expresados en el oviducto porcino identificados en el presente estudio y por otros autores. Los genes indicados en azul son de primera identificación en el oviducto porcino.

ESPECIE EN LA QUE SE HA DESCRITO PREVIAMENTE	GENÓMICA PORCINA	OTROS AUTORES
Cerde	<p><i>Clusterin (CLU, NM_213971)</i></p> <p><i>TIMP metallopeptidase inhibitor 1 (TIMP1, NM_213857)</i></p>	<p>Buhi, Alvarez <i>et al.</i>, 2000.</p>
Cerde	<p><i>40kDa Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase [TC263114],</i></p> <p><i>Apolipoprotein A-I [NM_214398],</i></p> <p><i>Cathepsin D [NM_001037721],</i></p> <p><i>Esterase D [NM_214060],</i></p> <p><i>Extracellular superoxide dismutase [NM_001078688],</i></p> <p><i>Haptoglobin [NM_214000],</i></p> <p><i>Lamin A/C [NM_00111257],</i></p>	<p>Georgiou <i>et al.</i>, 2005.</p>

	<p><i>Osteoclast stimulating factor</i> [NM_214005], <i>Superoxide dismutase</i> [NM_001078688], <i>Thioredoxin (TXN)</i> [NM_214313], <i>Triosephosphate isomerase 1</i> [NM_001037151].</p>	
Cerda	<p><i>Alpha-albumin</i> [TC249509], <i>Antileukoproteinase</i> [NM_213870], <i>Complement component 3</i> [NM_214009], <i>Hyaluronidase o hemopexin</i> [NM_213953], <i>Ig kappa Light chain o variable region</i> [TC283050], <i>IgG2b</i> [AK237225], <i>Inhibitor of carbonic anhydrase</i> [NM_213847], <i>Inter-alpha (globulin) inhibitor H4</i> [NM_001001537], <i>OVGP1</i> [NM_214070], <i>RBP2</i> [NM_214451], <i>RBP4</i> [NM_214057], <i>Vitamin D-binding protein</i> [AY60955]</p>	Georgiou et al., 2007.
Cerda	<i>Epidermal growth factor receptor (EGFR, NM_214007)</i>	Swanchara, Henricks et al., 1995.
Ratona Cerda	<i>Epidermal growth factor (EGF, NM_214020)</i>	Revisado por Kane, Morgan et al., 1997.
Cerda Vaca	<i>Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A, IGF2, NM_213883)</i>	Revisado por Kane, Morgan et al., 1997.
Mujer Rata Vaca	<p><i>Fibroblast growth factor 2 (FGF2 gene, AJ577089)</i> <i>Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R, NM_214172)</i></p>	Revisado por Kane, Morgan et al., 1997.
Vaca	<i>Deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1, NM_001048188)</i>	Bauersachs, Rehfeld et al., 2004.
Mujer	1627 genes	Tone, et al., 2008.
Mujer Rata Cerda Vaca	<i>Insulin-like growth factor 1</i> [NP1115405]	Revisado por Kane, Morgan et al., 1997.
Mujer	<p><i>Leukemia inhibitory factor (LIF, NM_214402)</i> <i>Interleukins (1, 2,4 ,5, 6,7, 8, 10, 12A, 12B, 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 26, 27)</i> <i>Interferons (A1,B, E1)</i></p>	Srivastava, Lippes et al., 1996
Ratona	<i>Interleukin1</i>	Dalton, Kover et al., 1994.

En este trabajo se ha encontrado ARNm de dos proteínas descritas como secretadas por Buhi *et al.* : TIMP1 y Clusterin (Buhi, Alvarez *et al.*, 2000).

La proteína TIMP-1 es secretada por el epitelio oviductal de forma diferencial entre istmo y ampolla, secretándose fundamentalmente en el istmo. Es una proteína inhibidora específica de metaloproteinasas tales como colagenasas, estromelinas y gelatinasas. En el oviducto posee el papel potencial de mejorar la tasa de división embrionaria, retrasar la eclosión y prevenir la degradación del embrión, ya que promueve el desarrollo y regulación de la matriz extracelular remodelando la del embrión temprano y la superficie oviductal (Buhi, Alvarez *et al.*, 2000). En este trabajo, además de la TIMP-1 se ha detectado la expresión de otras TIMP metallopeptidase inhibitor: TIMP-2 (AK238377) y TIMP-3 (EW274452).

Georgiou *et al.* (Georgiou, Snijders *et al.*, 2007) mostraron que la presencia de los espermatozoides incrementaba significativamente la expresión del factor de complemento C3, OVGP1 y proteínas de unión a retinol (RBP o Retinol binding proteins), aunque estas últimas también se incrementan significativamente en presencia de los ovocitos. Nuestros resultados del **análisis genómico de la especie porcina**, indican que se expresan tres RBPs, además de dos enzimas relacionadas: retinol dehydrogenase 12 (RDH12, TC253814) y retinol dehydrogenase 10 (RDH10, EU056577).

El análisis genómico porcino ha detectado ARNm de proteínas previamente descritas por Georgiou *et al.* (Georgiou, Snijders *et al.*, 2007) como reguladas por los ovocitos: Ig kappa Light chain o variable region, (AY518128 [TC283050]; AY518154 [TC282974] y AY518168 [TC284106]) y complement component 3 [NM_214009], reguladas por los gametos en sentido opuesto.

La expresión de la proteína C3 está estimulada por las hormonas esteroides e inhibida por la progesterona en el oviducto de ratonas. Se ha visto que esta proteína se transforma en el factor embriotrófico iC3b con la presencia del embrión preimplantacional (Lee, Cheong *et al.*, 2009).

No se han encontrado coincidencias con Seytanoglu *et al.* (Seytanoglu, Georgiou *et al.*, 2008) aunque, por el contrario, sí se han detectado gran cantidad de coincidencias con el análisis de Tone *et al.* (Tone, *et al.*, 2008) en la mucosa humana, concretamente en 1.627 genes de los casi tres mil detectados en la especie porcina. En el caso de la mucosa de la trompa de Falopio humana se han detectado más de 50 mil sondas y la expresión génica es muy elevada (Tone, *et al.*, 2008).

También se han detectado gran cantidad de factores, ligandos y receptores importantes para el crecimiento embrionario (tabla 38) revisados en la publicación de Kane *et al.* (Kane, Morgan *et al.*, 1997) y por lo tanto también lo deben de ser en esta fase de fecundación y desarrollo temprano.

La comparación de nuestros datos con los de la publicación de Avilés *et al.* (Avilés, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2010) nos muestra una coincidencia de 107 resultados, 73 de las cuales se han descrito por primera vez en el oviducto porcino en el presente trabajo (ver (N) en el anexo VI). Entre éstas tendríamos por ejemplo el ARNm de la proteína chaperona Grp78, la cual ha sido descrita en la superficie luminal del oviducto bovino y trompa de Falopio de la mujer en estado peri-ovulatorio. Esta proteína es capaz de unirse al espermatozoide y es capaz de modular la interacción espermatozoide-ZP de un modo dependiente de calcio (Boilard, Reyes-Moreno *et al.*, 2004; Lachance *et al.*, 2007; Marín-Briggiler *et al.*, 2010).

Todos estos análisis nos muestran que en el presente trabajo se ha descrito por primera vez en el oviducto de la especie porcina el ARNm de 2.889 genes.

Los **resultados genómicos** obtenidos en la especie porcina han sido clasificados mediante el programa David según la implicación celular. Hemos observado que las proteínas secretadas son en torno a un 8% del total de proteínas identificadas por el mencionado programa, el cual ha presentado claramente que existen limitaciones en el estudio bioinformático de los datos, ya que en este caso no nos ha podido analizar un 51'3% de los genes obtenidos, por lo que los mismos están sujetos a posteriores revisiones para optimizar la información.

Debido a que en este trabajo se ha determinado solamente la existencia de expresión génica total oviductal somos conscientes de que algunos de nuestros datos son ruido de fondo del análisis por micromatrices. Un ejemplo claro lo tenemos en la expresión del RNAm para la albúmina, proteína de síntesis hepática o las inmunoglobulinas que proceden de los linfocitos B. Estos dos ejemplos los tenemos en nuestros datos y en los de Tone, *et al.*, por lo que posteriores estudios moleculares como PCR son necesarios para la confirmación de la expresión génica oviductal de los datos aportados.

En nuestro caso, no se ha realizado ningún estudio comparativo en la expresión de los genes observados en la especie porcina durante las diferentes fases del ciclo debido a que el propósito de este estudio fue conocer los componentes potenciales del FO en esta fase, aunque serán analizados posteriormente.

7.3.3.1. Análisis de coincidencias en los estudios de proteómica y genómica en la especie porcina y bovina

En este apartado se comparan las proteínas detectadas en los actuales resultados de proteómica (porcina y bovina) y la expresión del correspondiente gen en el oviducto de la especie bovina.

Con referencia al análisis de las coincidencias entre los resultados del presente trabajo en la especie porcina (proteómica y genómica) podemos indicar que se han identificado 35 coincidencias (resaltadas en rojo y negrita en el anexo I).

Por otro lado, cuando analizamos las coincidencias entre los resultados de proteómica bovina de la presente tesis y el trabajo de expresión génica del oviducto bovino de Bauersachs *et al.* (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004) podemos indicar que se han encontrado solamente 4 resultados coincidentes: *tumour rejection antigen* (gp96, endoplasmin precursor o *GPR94*, (NM_174700); *DNAJ homologue subfamily B, member 11* (*DNAJB11*, NM_016306); *anterior gradient 2 homologue* (*AGR2*, NM_006408) y *95kDa oviduct-specific glycoprotein* (*OVGP1*, D16639). Bauersachs *et al.* indicaron que estos 4 genes se sobre-expresan en la fase de estro. La comparación

con los genes sobre-expresados en diestro referenciados por Bauersachs *et al.* (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004) no mostró ninguna coincidencia.

La diferencia entre ambos resultados se puede deber entre otras cosas al mayor número de genes y proteínas comparados en la especie porcina (2.943 genes/291 proteínas) que los comparados en la bovina (77 genes/270 proteínas). Además en la especie bovina, los trabajos previos realizados se limitan al de Bauersachs *et al.* (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004), de modo que solamente se han podido comparar las proteínas obtenidas en el presente trabajo con las mostradas en la publicación mencionada ya que dichos autores no han puesto a disposición de la comunidad científica, en forma de publicación o depósito en bases de datos, la información completa de sus resultados.

La comparación de la proteómica porcina del presente estudio con el trabajo de Bauersachs *et al.* (Bauersachs, Rehfeld *et al.*, 2004) nos muestra que ambos trabajos comparten 4 resultados: *Endoplasmic precursor* (GRP94, HSP90B1, NM_174700); *DCDC2 protein* (DCDC2, AAH50704); *Deleted in malignant brain tumors 1 isoform b precursor* (DMBT1, XP_853838) y *95kDa oviduct-specific glycoprotein* (OVGP1, D16639 siendo dos de ellos de nueva descripción en cerda (*DCDC2* y *DMBT1*).

7.3.3.2. Análisis de coincidencias de los resultados de proteómica y genómica del presente trabajo con los de genómica humana

La comparación realizada entre los datos proteómicos porcinos propios y los del trabajo de Tone *et al.* (Tone *et al.*, 2008), de expresión génica en la mucosa de la trompa de Falopio humana nos permite indicar que de las 291 proteínas porcinas descritas, se ha detectado la expresión del ARNm de 235 de ellas en la mucosa de la trompa de Falopio humana (véase **(T)** en anexo I). Actualmente no se conoce el genoma porcino y por lo tanto tampoco el proteoma por lo que posiblemente las coincidencias sean mucho mayores. Estos datos nos confirman que genes que se expresan en la mucosa de la trompa humana se encuentran en el FO y posiblemente sean secretados por las células epiteliales.

A su vez, la comparación realizada entre los datos proteómicos bovinos propios y los del trabajo de Tone *et al.* (Tone *et al.*, 2008) nos muestra que de las 270 proteínas bovinas descritas, se ha detectado la expresión del ARNm de 147 de ellas en la mucosa de la trompa de Falopio humana (véase (T) en anexo II). Al igual que ocurre en la especie porcina, este dato nos indica que ambas especies comparten gran cantidad de sus componentes oviductales y aumenta la confianza en nuestros resultados.

Por otro lado, en la comparación de la expresión génica del oviducto porcino con la expresión génica de las células de la mucosa de las trompas de Falopio humanas (Tone, *et al.*, 2008) se han detectado 1.627 genes coincidentes.

Estas coincidencias se han analizado al igual que los datos obtenidos en el presente estudio mediante la base de datos DAVID y los resultados son los siguientes: secretadas (0'6%), nucleares (1'1%), proteínas de membrana (1'7%), mitocondrias (0'9%), ribosomas (0'4%), aquellas que el programa no reconoce junto con aquellas que no es capaz de clasificar (45'5%) y otras proteínas celulares no analizadas en el presente estudio (49'9%) Estos resultados obtenidos se muestran en la figura 57.

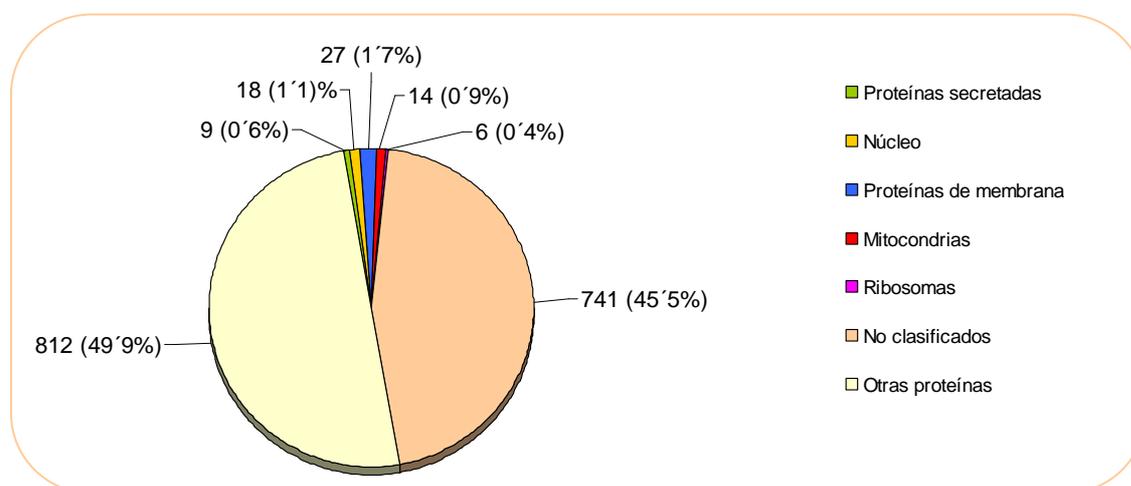


Figura 57. Diagrama circular representativo de los resultados obtenidos en el análisis de genómica del oviducto porcino en fase folicular tardía según la plataforma DAVID coincidentes con los reportados previamente por Tone, *et al.* (Tone, *et al.*, 2008)

Al igual que ocurre con la proteómica, el elevado número de datos coincidentes nos indica que ambas especies comparten gran cantidad de sus componentes oviductales y aumenta la confianza en nuestros resultados debido a que como hemos mencionado

previamente, el genoma porcino no está totalmente descrito y muchas identificaciones de las proteínas porcinas se hacen por similitud a otras descritas en otras especies como la humana.

Por otro lado, la base de datos DAVID nos ha mostrado que es incapaz de reconocer y/o clasificar gran cantidad de las proteínas obtenidas del FO porcino y bovino, mostrando por lo tanto ciertas limitaciones del mismo para el análisis de los resultados. Aún así, es una herramienta muy valiosa para el análisis de gran cantidad de datos como la realizada en el análisis genómico de la presente tesis y que sería imposible de realizar de modo manual. Por otro lado, la base de datos bioinformática Ingenuity nos ha agrupado los genes expresados en 25 grupos. Estos resultados nos muestran la complejidad para agrupar o clasificar los datos (incluso para una base de datos) ya que en ocasiones repite en diferentes grupos la categoría de agrupación como es el caso de las funciones siguientes: metabolismo lipídico y bioquímica de moléculas pequeñas.

Algunas proteínas que se han descrito como importantes en el proceso de la fecundación y que se han detectado en alguno de los resultados de esta tesis se mencionan a continuación.

La proteína OVGPI1 ha sido identificada en todos los análisis realizados, lo que es indicativo de que se encuentra presente en grandes cantidades en el oviducto y su expresión es mayoritaria en esta fase. Esta proteína ha sido implicada en diferentes procesos relacionados con los gametos en la fase folicular tardía, procesos que se han descrito en la revisión bibliográfica.

La proteína Osteopontina (OPN) ha sido identificada en el estudio de expresión génica porcina del presente trabajo. Esta proteína consta de diferentes glicofomas alguna de las cuales se ha descrito previamente en el oviducto de cerdas jóvenes (50kDa) (Hao *et al.*, 2006) y en el oviducto de vacas (25, 48 y 55kDa) (Gabler *et al.*, 2003).

También se ha descrito la presencia del plasminógeno, proteína que ha sido relacionada con el bloqueo en la ZP de la entrada de espermatozoides adicionales al

ovocito en recientes trabajos de nuestro laboratorio y por lo tanto de interés para el bloqueo de la polispermia en especies con dicho problema, sobre todo en los sistemas *in vitro* (Grullón, 2010).

Se han identificado proteínas de la familia de las *Heat shock proteins* (HSP) descritas previamente como importantes en la reproducción debido a que se ha demostrado que son proteínas que se relacionan en esta etapa de la fecundación con los diferentes gametos, como por ejemplo Heat shock 70kDa protein 8 o HSP8 (Elliott, Lloyd *et al.*, 2009), HSP60 (Boilard, Reyes-Moreno *et al.*, 2004) y algunas HSP que pueden actuar como agentes de defensa ante patógenos microbianos (Neuer, Spandorfer *et al.*, 2000).

La proteína Awn, perteneciente a la familia de las espermadhesinas, ha sido detectada en el útero, en la unión utero-tubárica, en el istmo y en la ampolla oviductal de la cerda aunque no ha sido detectada en el FO. Esta proteína se encuentra presente en el plasma seminal e interacciona directamente con los fosfolípidos de la membrana plasmática que recubren la vesícula acrosomal siendo ampliamente liberada en la capacitación oviductal. Se ha hipotetizado que estas proteínas del plasma seminal se deben de eliminar durante el transporte espermático hacia el ovocito debido a que pueden unirse a la ZP y así bloquear la unión del espermatozoide (Song *et al.*, 2010). Este razonamiento no parece compatible con su producción en el oviducto a no ser que se trate de proteínas de selección espermática. Actualmente se desconoce el papel de esta proteína en el tracto genital femenino aunque se ha propuesto que puede modular la respuesta inmune (Song *et al.*, 2010).

Lo más importante a mencionar es que los resultados obtenidos en este apartado del trabajo constituyen una fuente muy valiosa de información: 269 proteínas de primera descripción en el FO porcino, 22 de ellas secretadas; 256 proteínas de primera descripción en el FO bovino, 35 de ellas secretadas y la primera observación de la expresión de casi 2.890 genes en el oviducto porcino. Estos datos dejan campos para investigar en cuanto al esclarecimiento funcional e interacciones con los gametos de las diferentes proteínas identificadas, constituyendo por lo tanto un importante punto de partida para futuras investigaciones.



CONCLUSIONES

1. El efecto del fluido oviductal sobre la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida es inversamente proporcional a su grado de dilución.
2. Los ovocitos de coneja, ratona, rata y mujer madurados *in vivo* y los ovocitos de cerda, vaca, oveja y cabra madurados *in vitro* tienen una zona pelúcida con una resistencia a la digestión enzimática muy baja, a diferencia de los ovocitos de hámster madurados *in vivo* cuya zona pelúcida es muy resistente a la digestión enzimática.
3. Los fluidos oviductales en fase folicular tardía de las especies cunícula, porcina, bovina, ovina y caprina producen resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de modo intra e inter-específico. El grado de resistencia producido es variable dependiendo de la especie analizada.
4. El tratamiento con fluido oviductal de coneja produce una elevada resistencia de la zona pelúcida a la digestión enzimática en todas las especies analizadas (cunícula, murina, cricetina, porcina, bovina, ovina y caprina) exceptuando la especie humana.
5. El tratamiento con fluido oviductal bovino, ovino y caprino produce de un modo general una resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida mayor en ovocitos de coneja, hámster, cerda, vaca, oveja y cabra que en el resto de animales analizados.
6. El fluido oviductal porcino produce de modo general los valores más bajos de resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida. La resistencia producida por este fluido en las zonas pelúcidas de los ovocitos de hámster es la más elevada de entre de entre las distintas especies estudiadas.
7. El fluido oviductal de yegua, carente de proteína OVGPI, no produce un incremento de la resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida de ovocitos de cerda.
8. Los componentes del fluido oviductal bovino de fase folicular tardía se pueden separar en diferentes fracciones de acuerdo a su afinidad por la heparina. Estas fracciones poseen diferente capacidad para inducir la resistencia de la zona pelúcida a la digestión enzimática.

9. La fracción de fluido oviductal bovino que se separa de la columna de heparina con una solución 0´4 Molar de NaCl es la que produce un efecto de resistencia a la digestión enzimática de la zona pelúcida similar a la del fluido sin fraccionar y por lo tanto aquella que concentra las proteínas fundamentales provocar para este proceso.

10. Nuestro estudio identifica en el fluido oviductal porcino un total de 291 proteínas, 27 de ellas secretadas. Del total de proteínas identificadas, 269 son de nueva descripción y 22 de ellas son proteínas de secreción.

11. Nuestro estudio identifica en el fluido oviductal bovino un total de 270 proteínas, 38 de ellas secretadas. Del total de proteínas identificadas, 265 son de nueva descripción y 35 de ellas son proteínas de secreción.

12. El análisis de la expresión génica en la porción ampular-ístmica del oviducto porcino en la fase folicular tardía muestra la expresión de 2.943 genes, 2.889 de los cuales se describen por primera vez en la especie porcina.



CONCLUSIONS

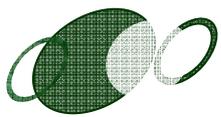
1. The effect of oviductal fluid on the resistance of the zona pellucida to enzymatic digestion is inversely proportional to its degree of dilution.
2. The *in vivo* matured oocytes from rabbit, mice, rats and women and *in vitro* matured cow, sow, sheep and goat oocytes have a very low resistance of the zona pellucida to enzymatic digestion, in contrast to oocytes *in vivo* matured hamster which zona pellucida is highly resistant to enzymatic digestion.
3. Oviductal fluids from cuniculi, pig, cattle, sheep and goat species on late follicular phase induce a resistance of the oocyte's zona pellucida to enzymatic digestion in an intra- and inter-specific manner. The resistance degree depends on the analyzed species.
4. Treatment with rabbit oviductal fluid produces a high resistance of the zona pellucida to enzymatic digestion in all studied species (rabbit, murine, cricetines, pig, cow, sheep and goat) except humans.
5. Treatment with bovine, ovine and caprine oviductal fluid induces in general a higher resistance of the zona pellucida to enzymatic digestion in rabbit, hamster, pig, cow, sheep and goat oocytes than in the other analyzed species.
6. Porcine oviductal fluid produces in general the lower values of resistance to enzymatic digestion of the zona pellucida. The resistance produced by this oviductal fluid on the zona pellucida of hamster oocytes is the highest of all studied species.
7. Mare oviductal fluid, lacking of OVGPI protein, does not produce a resistance of the zona pellucida to enzymatic digestion in pig oocytes.
8. The components of bovine oviductal fluid collected on late follicular phase can be separated into different fractions according to their affinity for heparin. These fractions have a different ability to induce a resistance of the zona pellucida to enzymatic digestion.
9. The bovine oviductal fluid fraction separated from the heparin column with a 0.4 M NaCl solution is the one producing a resistance of the zona pellucida to enzymatic

digestion similar to the one of unfractionated fluid. Therefore this fraction concentrates the essential proteins to induce this process.

10. Our study identifies a total of 291 proteins in the pig oviductal fluid 27 being secreted proteins. From the identified proteins, 269 are new description and 22 of them are secreted proteins.

11. Our study identifies a total of 270 proteins in bovine oviductal fluid, 38 being secreted proteins. From the identified proteins, 265 are new description and 35 of them are secreted proteins.

12. The gene expression analysis of ampullar-isthmic region of pig oviduct obtained at the late follicular phase shows the expression of 2943 genes, 2889 of which are described for the first time in pigs,



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AA: aminoácidos

ACP: análisis de componentes principales

ADN: ácido desoxiribonucleico

ADNc: ácido desoxiribonucleico complementario

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

ARN: ácido ribonucleico

ARNc: ácido ribonucleico complementario

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

BSA: albúmina de suero bovino

BSP: plasma seminal porcino

CCO: complejo cúmulo-ovocito

CEO: células epiteliales oviductales

CETAB: bromuro de hexadecil-trimetilamonio

CID: disociación inducida por colisión

CO: cúmulo ovífero

CO₂: anhídrido carbónico

DAVID: base de datos para anotación, visualización y detección integrada

dbAMPc: dibutilil AMP cíclico

DPBS: tampón fosfato salino de Dubecco

END2: endotelina 2

EPV: espacio perivitelino

ESI: interfase tipo electrospray

FO: fluido oviductal

RF: rojo fenol

FSH: hormona folículo estimulante

GAG: glicosaminoglicano

GAG-S: glicosaminoglicano sulfatado

GC: gránulos corticales

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

HA: hialuronano o ácidohialurónico

hCG: gonadotropina coriónica humana

HPA: aglutinina de *helix pomatia*

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia
HSP: proteínas de choque térmico
IAA: iodoacetamida
LC/MSD: cromatografía líquida/detector selectivo de masas
LDH: lipoproteínas de alta densidad
LH: hormona luteinizante
L-PGDS: prostaglandina D sintasa tipo lipocalina
MCO: medio de colección de ovocitos
MIV: maduración *in vitro*
MS/MS: espectrometría de masas en tándem
m/z: relación masa-carga
MΩ/cm: mili osmios por centímetro
OPN: osteopontina
OVGP1: glicoproteína específica del oviducto, Mucina-9 u Oviductina
PAI: inhibidor del activador del plasminógeno
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PFA: paraformaldehido
PFF: fluido folicular porcino
PKA: protein kinasa A
PMSG: gonadotropina sérica de yegua gestante
PNA: aglutinina de *Arachis hipogea*
Psi: libra-fuerza por pulgada cuadrada
PVA: polivinil- alcohol
RA: reacción acrosómica
RDE: resistencia a la digestión en pronasa
RGD: arginina-glicina-ácido aspártico
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
SDS: dodecil sulfato sódico
SNC: sistema nervioso central
SSF: solución salina fisiológica
TBP: tributilfosfina
TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TFA: ácido trifluoroacético

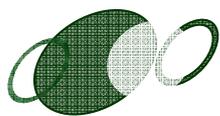
UI: unidades internacionales

VG: vesícula germinal

WGA: aglutinina de germen de trigo

ZP: zona pelúcida

%: tanto por ciento/ porcentaje



ANEXOS

Anexo I. Proteínas identificadas en el fluido oviductal porcino en fase folicular tardía. Se indica el símbolo oficial de cada una de ellas junto con el número de acceso a la base de datos del PubMed o UniProt, además de indicar la especie en la que se ha detectado el péptido, el “score” y el número de péptidos detectados. También se indican en rojo y negrita las coincidencias con los resultados de genómica.*Predicted , Recname. Full. (G) Glicoproteína. (S) Secretada. (T) Descrita por Tone, *et al.*, 2008 (Tone, Begley et al., 2008), (N) descrita por primera vez en el oviducto de porcino**

Proteínas del fluido oviductal porcino en fase folicular tardía		Símbolo oficial	Número de acceso	Especie	“Score”	Péptidos
1. Factores de crecimiento, citoquinas y receptores						
1.	Growth/differentiation factor 7 (G) (S) (N)**	Gdf7	P43029	<i>Mus musculus</i>	18'29	2
2.	Interleukin-23 subunit alpha IL23A (S) (T) (N)	IL23A	Q9EQ14	<i>Mus musculus</i>	9'61	1
3.	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 9 (G) (T) (N)**	MEGF9	Q9H1U4	<i>Homo sapiens</i>	8'63	1
4.	Similar to Stabilin-1 precursor (FEEL-1 protein) (MS-1 antigen) (T) (N)*	STAB1	XP_541851	<i>Canis familiaris</i>	8'86	1
2. Hormonas y receptores						
5.	Neuropeptide Y receptor type 4 (G) (T) (N)	ppyr1	Q61041	<i>Mus musculus</i>	8'34	1
3. Proteasas e inhibidores						
6.	Calpain 12 (T) (N)	CAPN12	NP_653292	<i>Homo sapiens</i>	8'60	1
7.	Calpastatin (T) (N)	cast	P08855	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	8'03	1
8.	Kiaa0239 (N)	psmb2	XP_532564	<i>Homo sapiens</i>	8'68	1
9.	Serine protease inhibitor Kazal-type 5 long isoform SPINK5 (G) (T) (N)	SPINK5	ABA06535	<i>Homo sapiens</i>	10'72	1
10.	Similar to ADAMTS-2 precursor (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2) (ADAM-TS 2) (ADAM-TS2) (Procollagen I/II amino-propeptide processing enzyme) (Procollagen I N-proteinase) (PC I-NP) (Procollagen N-endopeptidase) (pnpi... Iso (G) (S) (T) (N)*	ADAMTS2	XP_848937	<i>Canis familiaris</i>	10'27	1
11.	Similar to F-box and leucine-rich repeat protein 2 (T) (N)*	Fbxl2	XP_542692	<i>Canis familiaris</i>	9'17	2
12.	Similar to Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 precursor (Proprotein convertase PC5) (Subtilisin/kexin-like protease PC5) (PC6) (Subtilisin-like proprotein convertase 6) (SPC6) (T) (N)*	PCSK5	XP_541276	<i>Canis familiaris</i>	8'62	1
13.	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 21 (T) (N)	USP21	B2GUX4	<i>Rattus norvegicus</i>	8'65	1
14.	Whey acidic protein (S) (N)	WAP	P01174	<i>Rattus norvegicus</i>	9'01	1
4. Protección antioxidante						
15.	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (T)	SOD1	P04178	<i>Sus scrofa</i>	12'40	2
5. Agente de defensa						
16.	APG12 autophagy 12-like (T) (N)	Atg12	NP_004698	<i>Homo sapiens</i>	8'43	1
17.	Autophagy-related protein 10 (T) (N)**	atg10	Q8R1P4	<i>Mus musculus</i>	9'92	1
18.	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 (T) (N)	birc6	Q9NR09	<i>Homo sapiens</i>	8'00	1
19.	B-lymphocyte activation antigen B7-2 (CD86) (T) (N)	CD86	BAB11688	<i>Felis catus</i>	9'14	1
20.	CDS: This CDS feature is included to show the translation of the corresponding C_region. Presently translation qualifiers on C_region features are illegal (N)		AAA51296	<i>Sus scrofa</i>	25'07	2

21.	DCDC2 protein (T) (N)	DCDC2	AAH50704	<i>Homo sapiens</i>	8'54	1
22.	Ig heavy chain V region HPCM6 (T) (N)	C16orf63	123811	<i>Homo sapiens</i>	14'83	1
23.	IgG heavy chain variable region		AAB69659 AAZ08677 AAZ08982 CAD44700	<i>Homo sapiens</i>	44'56	5
24.	Immunoglobulin heavy chain VDJ region		AAA52628	<i>Homo sapiens</i>	8'55	1
25.	Immunoglobulin lambda light		CAJ75487	<i>Homo sapiens</i>	8'78	1
26.	Integrin alpha-M (G) (T) (N)	ITGAM	P05555	<i>Mus musculus</i>	11'14	1
27.	Lymphocyte antigen 75 (G) (T) (N)	Ly75	Q60767	<i>Mus musculus</i>	15'31	2
28.	Similar to deleted in malignant brain tumors 1 isoform b precursor (G) (S) (N)*	LOC611105 DMBT1	XP_853838	<i>Canis familiaris</i>	54'04	3
29.	Stathmin-like 2 (T) (N)	STMN2	NP_079561	<i>Mus musculus</i>	8'57	1
30.	Tripartite motif-containing 22 (T) (N)	TRIM22	NP_006065	<i>Homo sapiens</i>	8'33	1
6. Glicosil transferasa						
31.	2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase precursor (T) (N)	UGT8	NP_062149	<i>Rattus norvegicus</i>	8'13	1
7. Otros enzimas						
32.	Acetyl-coa acetyltransferase, cytosolic (T) (N)	Acat2	Q8CAY6	<i>Mus musculus</i>	8'97	1
33.	Alpha-enolase (T)	Eno1	NP_776474	<i>Bos taurus</i>	65'85	5
34.	Carbonic anhydrase II (T) (N)	CA2	NP_848667	<i>Bos taurus</i>	17'82	1
35.	Choline O-acetyltransferase (T) (N)	chat	P13222	<i>Sus scrofa</i>	8'43	1
36.	Death-associated protein kinase 3 (T) (N)	dapk3	O43293	<i>Homo sapiens</i>	11'66	1
37.	DNA polymerase zeta catalytic subunit (T) (N)	REV3L	AAD40184	<i>Homo sapiens</i>	9'04	1
38.	DOT1-like, histone H3 methyltransferase (T) (N)	Dot1l	NP_955354	<i>Mus musculus</i>	8'71	1
39.	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1 (T) (N)	Hectd1	Q9ULT8	<i>Homo sapiens</i>	8'03	1
40.	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2 (T) (N)	mib2	Q96AX9	<i>Homo sapiens</i>	9'69	1
41.	Enx-2 (T) (N)	EZH1	BAA20842	<i>Homo sapiens</i>	13'35	2
42.	Estradiol 17 beta-dehydrogenase 8 (T) (N)	HSD17B8	NP_055049	<i>Canis familiaris</i>	9'93	1
43.	Eukaryotic translation elongation factor 2 (T) (N)	Eef2	NP_00106858 9	<i>Bos taurus</i>	22'00	3
44.	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F (T) (N)	Eif3f	Q9DCH4	<i>Mus musculus</i>	9'82	1
45.	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kda (T) (N)	EIF3I	NP_003748	<i>Homo sapiens</i>	18'86	2
46.	Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (T) (N)	SLC9A3R1	Q3SZK8	<i>Bos taurus</i>	26'04	2
47.	Glucose-6-phosphatase, catalytic subunit (T) (N)	G6PC	NP_037230	<i>Rattus norvegicus</i>	10'25	1
48.	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	HSD17B12	NP_062631	<i>Mus</i>	32'69	3

	(T) (N)			<i>musculus</i>		
49.	Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1 (T) (N)	HSD11B1	NP_001038216	Mus musculus	8'97	1
50.	Kalirin (T)	KALRN	O60229	<i>Homo sapiens</i>	9'10	1
51.	Liver carboxylesterase B-1 (G) (N)	Ces1l	Q63010	<i>Rattus norvegicus</i>	8'13	1
52.	L-lactate dehydrogenase A-like 6B (T) (N)	LDHAL6B	Q3T056	<i>Bos taurus</i>	8'63	1
53.	L-lactate dehydrogenase B chain (T) (N)**	ldhb	Q5E9B1	Bos taurus	44'19	4
54.	LMTK3 protein (G) (T) (N)	LMTK3	BAB67776	<i>Homo sapiens</i>	9'52	1
55.	MAP kinase-activated protein kinase 5 (T) (N)	MAPKAPK5	NP_034895	<i>Mus musculus</i>	24'78	3
56.	Microtubule associated serine/threonine kinase 1 (T) (N)	MAST1	BAA76817	<i>Homo sapiens</i>	10'20	1
57.	Mitochondrial trna-specific 2-thiouridylase 1 (T) (N)	trmU	Q9DAT5	<i>Mus musculus</i>	10'88	2
58.	Myotonin-protein kinase (T) (N)	DMPK	Q09013	<i>Homo sapiens</i>	8'10	1
59.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1 (T) (N)	NDUFA1	NP_004532	<i>Homo sapiens</i>	9'59	1
60.	Peptidylarginine deiminase (T) (N)	PADI3	NP_001009791	<i>Ovis aries</i>	10'25	1
61.	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 6 (T) (N)	PPIL6	Q1RMP7	<i>Bos taurus</i>	9'30	1
62.	Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55) (T) (N)	PIK3R3	BAE36592	<i>Mus musculus</i>	17'93	2
63.	Phosphofructokinase, platelet (T) (N)	pfkp	XP_535201	<i>Canis familiaris</i>	8'06	1
64.	Phosphoglycerate kinase 1 (T) (N)	PGK1	Q7SIB7	<i>Sus scrofa</i>	16'09	2
65.	Phospholipase B1, membrane-associated (T) (N)	PLB1	Q3TTY0	<i>Mus musculus</i>	8'24	1
66.	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 (T) (N)**	ATP2B1	P20020	Homo sapiens	8'08	1
67.	Profilin-1(N)	LOC786699	NP_001015592	<i>Bos taurus</i>	26'63	2
68.	Putative E1-E2 ATPase (T) (N)	ATP9A	AAF08396	<i>Mus musculus</i>	10'89	1
69.	Pyridoxal kinase (T) (N)	pdxK	P82197	Ovis aries	8'42	1
70.	Pyruvate kinase, liver and RBC (T) (N)	PKLR	NP_001069644	<i>Bos taurus</i>	9'84	1
71.	Similar to A-kinase anchor protein 13 isoform 2 (T) (N)*	AKAP13	XP_536182	Canis familiaris	36'71	5
72.	Similar to alanine aminotransferase 2 (N)*	LOC609510	XP_851866	<i>Canis familiaris</i>	8'18	1
73.	Similar to dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting) (N)*	Dusp11 Pir1	XP_543940	<i>Canis familiaris</i>	8'73	1
74.	Similar to muscle-type acylphosphatase 2 (T) (N)*	Acyp2	XP_531824	<i>Canis familiaris</i>	8'90	1
75.	Similar to PITPNM family member 3 (T) (N)*	PITPNM3	XP_546563	<i>Canis familiaris</i>	8'32	1
76.	Similar to SH3 domain containing ring finger 2 isoform 1 (T) (N)*	sh3rf2	XP_535227	<i>Canis familiaris</i>	9'76	1
77.	S-phase kinase-associated protein 1(N)	LOC477992	XP_851513	<i>Canis familiaris</i>	10'89	1
78.	Succinyl-coa ligase [ADP-forming] subunit	SUCLA2	Q9Z219	Mus	8'25	1

	beta, mitochondrial (T) (N)			<i>musculus</i>		
79.	Testis-specific kinase 2 (T) (N)	TESK2	NP_596887	<i>Rattus norvegicus</i>	8'30	1
80.	Thiosulfate sulfurtransferase (T) (N)	TST	XP_538396	<i>Canis familiaris</i>	9'23	1
81.	Titin (T) (N)	TTN	Q8WZ42	<i>Homo sapiens</i>	45'98	7
82.	Transitional endoplasmic reticulum ATPase (T) (N)	Vcp	P46462	<i>Rattus norvegicus</i>	30'58	2
83.	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 (T) (N)**	GART	BAE27107	<i>Mus musculus</i>	14'93	2
84.	Trinucleotide repeat-containing gene 18 protein (T) (N)	TNRC18	O15417	<i>Homo sapiens</i>	8'21	1
85.	Triosephosphate isomerase 1 (T)	TPI1	NP_001032228	<i>Sus scrofa</i>	12'47	1
86.	Trna methyltransferase 1 isoform 1 (T) (N)	Trmt1	NP_060192	<i>Homo sapiens</i>	10'29	2
87.	Tubulin polyglutamylase TTLL13 (T) (N)	TTLL13	A4Q9F6	<i>Mus musculus</i>	8'14	1
88.	Tyrosinase (G) (T) (N)	tyr	P14679	<i>Homo sapiens</i>	10'71	2
89.	Tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide (T) (N)	YWHAE	BAC36106	<i>Mus musculus</i>	49'85	4
90.	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 (T) (N)	PTPN13	Q12923	<i>Homo sapiens</i>	8'72	1
91.	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 (T) (N)	UHRF1	NP_001008882	<i>Rattus norvegicus</i>	8'87	1
92.	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y-linked (T) (N)	UTY	NP_001009002	<i>Pan troglodytes</i>	9'17	1
93.	Valosin-containing protein(N)	Vcp	XP_866191	<i>Canis familiaris</i>	62'13	6
94.	V-type ATPase C2 subunit a isoform (T) (N)	ATP6V1C2	AAT44904	<i>Rattus norvegicus</i>	9'26	1
8. Chaperonas y HSP						
95.	Chaperonin (T) (N)	cct4	AAA37418	<i>Mus musculus</i>	31'43	3
96.	Endoplasmic precursor (G) (T)	Hsp90b1	CAA62352	<i>Sus scrofa</i>	12'25	1
97.	Heat shock 70 kDa protein 12B (T) (N)	Hspa12b	Q9CZJ2	<i>Mus musculus</i>	9'67	1
98.	Heat shock 70kDa protein 1A variant [Fragment] (T)	HSPA1A	Q59EJ3	<i>Homo sapiens</i>	141'43	9
99.	Heat shock 70 kDa protein 8 isoform 1, Heat shock cognate 71 kDa protein (T)	HSPA8 HSC70	BAE37056	<i>Mus musculus</i>	66'17	6
			CAA37823 P19120	<i>Bos taurus</i>	102'09	10
100.	Heat shock 90 kDa protein 1, alpha (T)	HSP90AA1	ABC40730	<i>Homo sapiens</i>	216'20	17
101.	Heat shock protein HSP 90-alpha (T)	HSP90AA1	Q5CAQ7	<i>Homo sapiens</i>	43'59	3
			Q4R4P1	<i>Macaca fascicularis</i>	98'31	8
102.	Heat shock protein HSP 105 kDa (Kiaa0201) (T) (N)	HSPH1	BAA13192	<i>Homo sapiens</i>	10'50	1
103.	Midasin (T) (N)	MDN1	Q9NU22	<i>Homo sapiens</i>	13'33	2

104.	Protein disulfide-isomerase A3 (T) (N)	PDIA3	P38657	<i>Bos taurus</i>	12'86	1
105.	Protein FAM10A5 (T)	st13	Q99L47	<i>Mus musculus</i>	9'00	1
106.	Sacsin (T) (N)	SACS	Q9NZJ4	<i>Homo sapiens</i>	9'32	2
107.	SHC-transforming protein 2(N)	SHC2	O70142	<i>Rattus norvegicus</i>	8'87	1
9. Proteínas del plasma sanguíneo y proteínas sanguíneas						
108.	Albumin (T)	alb	AAA30988 ABM92961.1	<i>Sus scrofa</i>	1.195'19	35
109.	Haptoglobin precursor (G) (S) (T)	HP	NP_999165	<i>Sus scrofa</i>	27'51	2
110.	Alpha-1-antitrypsin (S) (T)	SERPINA1	P50447	<i>Sus scrofa</i>	15'77	1
111.	IgE-binding protein (T) (N)	LGALS3	AAA35607	<i>Homo sapiens</i>	24'49	2
112.	Immunoglobulin-like domain-containing 1 (G) (S) (T)	IGSF1	CAA71535	<i>Homo sapiens</i>	8'14	1
113.	Immunophilin homolog ARA9 (T) (N)	aip	AAB59004	<i>Homo sapiens</i>	9'42	1
114.	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III (T) (N)**	FCGR3	Q8SPW2	<i>Macaca fascicularis</i>	8'37	1
115.	Rh blood CE group antigen polypeptide (T) (N)	RHCE	BAA82627	<i>Homo sapiens</i>	21'77	2
116.	Serotransferrin (G) (S) (T)	TRFE	P09571	<i>Sus scrofa</i>	131'86	14
117.	Vitamin D-binding protein (S) (T)	gc	Q3MHN5	<i>Bos taurus</i>	13'50	2
10. Otras proteínas						
10.1. Nucleares						
118.	Additional sex combs like 3 (Drosophila) (T) (N)	ASXL3	XP_853069	<i>Canis familiaris</i>	8'27	1
119.	Antigen of the monoclonal antibody Ki-67 (T) (N)	MKI67	CAA46519	<i>Homo sapiens</i>	9'69	2
120.	Arsenite-resistance protein 2 (T) (N)	SRRT	Q9BXP5	<i>Homo sapiens</i>	10'58	1
121.	BRCA2 and CDKN1A interacting protein (T) (N)	bccip	NP_079668	<i>Mus musculus</i>	10'04	1
122.	Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog (T) (N)	BRCA1	NP_848668	<i>Bos taurus</i>	8'30	0
123.	Chromodomain helicase DNA binding protein 7 (T) (N)	chd7	NP_001074886	<i>Mus musculus</i>	9'01	1
124.	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 (T) (N)	CHD1	XP_546008	<i>Canis familiaris</i>	11'83	2
125.	Chromosome 6 open reading frame 118 (T) (N)	C6orf118	AAH26278	<i>Homo sapiens</i>	8'29	1
126.	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like isoform 1 (T) (N)	hnrp1l	XP_532938	<i>Canis familiaris</i>	19'69	2
127.	Minichromosome maintenance deficient 10 (S. Cerevisiae) (T) (N)	Mcm10	AAH94576	<i>Mus musculus</i>	9'59	1
128.	Mmmre11b (T) (N)	mre11a	NP_061206	<i>Mus musculus</i>	8'91	1
129.	Muts homolog 4 (T) (N)	Msh4	NP_002431	<i>Homo sapiens</i>	8'82	1
130.	Nuclear receptor coactivator 5 (T) (N)	NCOA5	NP_659141	<i>Mus musculus</i>	8'12	1
131.	Nuclear receptor interacting protein 1 (T) (N)	NRIP1	NP_775616	<i>Mus</i>	9'85	1

				<i>musculus</i>		
132.	Protein atonal homolog 1 (T) (N)	ATOH1	P48985	<i>Mus musculus</i>	9'23	1
133.	Putative homeodomain transcription factor 2 (T) (N)	phtf2	Q8N3S3	<i>Homo sapiens</i>	8'16	1
134.	Remodeling and spacing factor 1 (T) (N)	rsf1	Q96T23	<i>Homo sapiens</i>	8'95	1
135.	Ring finger protein 40 (T) (N)	RNF40	BAA31636	<i>Homo sapiens</i>	8'00	1
136.	Similar to AHNAK nucleoprotein isoform 1(N)*		XP_855059	<i>Canis familiaris</i>	8'25	1
137.	Similar to ALL1 fused gene from 5q31 isoform 5(T) (N)*	AFF4	XP_861273	<i>Canis familiaris</i>	10'93	2
138.	Similar to transcription factor 20 isoform 2 isoform 2 (T) (N)*	TCF20	XP_857454	<i>Canis familiaris</i>	8'12	1
139.	Similar to trna splicing endonuclease 54 homolog (SEN54, S. Cerevisiae) (T) (N)*	TSEN54	XP_540434	<i>Canis familiaris</i>	8'35	1
140.	STIP1 protein (T) (N)	stip1	AAH39299	<i>Homo sapiens</i>	25'90	2
141.	THAP domain-containing protein 3 (T) (N)	THAP3	NP_001068815	<i>Mus musculus</i>	8'28	1
142.	Transcription cofactor vestigial-like protein 4 (T) (N)	VGLL4	Q14135	<i>Homo sapiens</i>	8'09	1
143.	U5 snRNP-associated 102 kDa protein (T) (N)	PRPF6	XP_534481.3	<i>Canis familiaris</i>	12'84	2
144.	Unnamed protein product (T) (N)	Maff	BAE26685	<i>Mus musculus</i>	8'76	1
145.	Unnamed protein product (T) (N)	ZNF573	BAC11047	<i>Homo sapiens</i>	10'17	2
146.	Unnamed protein product (T) (N)	GATA4	BAE22221	<i>Mus musculus</i>	8'52	1
147.	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 4 (T) (N)	ZKSCAN4	NP_061983	<i>Homo sapiens</i>	8'52	1
10.2. Citoplasmáticas						
148.	14-3-3 protein zeta/delta (T) (N)**	YWHAZ	XP_850323	<i>Canis familiaris</i>	356'50	4
149.	Actin, cytoplasmic 2 (T) (N)	ACTG1	P63259	<i>Rattus norvegicus</i>	32'73	2
150.	Actin, gamma 1 propeptide (T) (N)	ACTB	BAE30358	<i>Mus musculus</i>	81'49	6
151.	Actin-binding LIM protein 2 (T) (N)	ABLIM2	NP_808346	<i>Mus musculus</i>	15'76	2
152.	Adenylyl cyclase-associated protein (T) (N)	CAP1	XP_532545	<i>Canis familiaris</i>	8'22	1
153.	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited) (T) (N)	ARFGEF2	NP_001078964	<i>Mus musculus</i>	9'18	1
154.	Annexin VI (T) (N)	ANXA6	AAB47570	<i>Bos taurus</i>	20'87	2
155.	Axin-2 (T) (N)*	Axin2	O88566	<i>Mus musculus</i>	8'82	1
156.	Axonemal dynein heavy chain 8 long form(N)	Dnahc8	AAK60623	<i>Mus musculus</i>	8'28	1
157.	BCL-3 binding protein (T) (N)	N4bp2	AAP22172	<i>Homo sapiens</i>	8'25	1
158.	Calmodulin (N)	Calm-ps2	P62161	<i>Rattus norvegicus</i>	8'61	1

159.	CCR4-NOT transcription complex subunit 10 (T) (N)	Cnot10	Q9H9A5	<i>Homo sapiens</i>	10'43	2
160.	Deleted in liver cancer 1 (Rho GTPase-activating protein 7) (T) (N)	DLC1	AAD51760	<i>Mus musculus</i>	8'24	1
161.	Dihydropyrimidinase-like 2 (T) (N)	Dpysl2	XP_543233	<i>Canis familiaris</i>	41'35	3
162.	Fatty acid binding protein 5, epidermal (T) (N)	Fabp5	NP_665885	<i>Rattus norvegicus</i>	10'95	1
163.	Hypothetical protein XP_537341 (T) (N)*	CEP192	XP_537341	<i>Canis familiaris</i>	8'58	1
164.	Keratin, type I cytoskeletal 10 (T) (N)	KRT10 KPP	P13645 AAA60544	<i>Homo sapiens</i>	117'31	9
165.	Keratin, type I cytoskeletal 9 (T) (N)	KRT9	P35527	<i>Homo sapiens</i>	68'21	4
166.	Keratin, type II cytoskeletal 1 (T) (N)	KRT1	P04264	<i>Homo sapiens</i>	56'92	4
167.	Kinesin-like protein KIF21A (T) (N)	kif21a	Q7Z4S6	<i>Homo sapiens</i>	8'07	1
168.	Krt9(N)	KRT9	Q0IJ47	<i>Homo sapiens</i>	59'19	4
169.	LYR motif-containing protein 8 (T) (N)	SDHAF1	A8PU71	<i>Bos taurus</i>	10'19	1
170.	Mu-crystallin homolog (T) (N)	CRYM	NP_00103937 9	<i>Bos taurus</i>	45'84	3
171.	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (T) (N)	NOD2	Q53B87	<i>Pan troglodytes</i>	9'16	1
172.	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58 (T) (N)*	dhx58	Q99J87	<i>Mus musculus</i>	9'35	1
173.	Rho guanine nucleotide exchange factor 1(N)	Arhgef1	NP_067726 Q5BK37	<i>Rattus norvegicus</i>	8'99	2
174.	Similar to BAG-family molecular chaperone regulator-3 (BCL-2 binding athanogene-3) (BAG-3) (Bcl-2-binding protein Bis) (Docking protein CAIR-1) (T) (N)*	bag3	XP_544046	<i>Canis familiaris</i>	8'79	1
175.	Similar to CG2174-PA (T) (N)*	Plekh3	XP_548084	<i>Canis familiaris</i>	11'66	1
176.	Similar to sodium channel associated protein 1 (T) (N)*	SCLT1	XP_540949	<i>Canis familiaris</i>	8'19	1
177.	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 (T) (N)	Argbp2	O35413	<i>Rattus norvegicus</i>	22'22	2
		SORBS2	Q3UTJ2	<i>Mus musculus</i>	14'32	2
178.	Sulfatase-modifying factor 2 (G) (N)**	LOC10004767 5	Q8BPG6	<i>Mus musculus</i>	8'65	1
179.	Tubulin alpha-1A chain (T) (N)	TUBA1A	P02550	<i>Sus scrofa</i>	49'96	3
180.	Tubulin, beta 2C (T) (N)	LOC607735	XP_856209	<i>Canis familiaris</i>	74'29	7
		TUBB2C	AAH24038	<i>Homo sapiens</i>	45'01	5
181.	Tubulin beta-3 chain (T) (N)	MC1R	Q13509	<i>Homo sapiens</i>	17'00	1
182.	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 (T) (N)	Tppp3	NP_00100963 9	<i>Rattus norvegicus</i>	55'30	5
183.	Tubulin, alpha 1B(N)	Gm14150	NP_035784	<i>Mus musculus</i>	125'58	10
10.3. Componentes de membrana						
184.	ABC transporter 7 protein (T) (N)	ABCB7	BAA28861	<i>Homo sapiens</i>	9'60	1

185.	ATP-binding cassette sub-family G member 2 (T) (N)	Abcg2	Q7TMS5	<i>Mus musculus</i>	9'44	1
186.	Ca2+ release channel(N)	RYR-2	AAA31179	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	9'50	1
187.	Coiled-coil domain containing 108 isoform 1 (T) (N)	ccdc108	NP_919278	<i>Homo sapiens</i>	9'07	1
188.	Extracellular matrix protein FRAS1 (G) (T) (N)*	FRAS1	Q86XX4	<i>Homo sapiens</i>	8'83	1
189.	Flamingo 1 (G) (T) (N)	CELSR2	BAA84070	<i>Mus musculus</i>	8'54	1
190.	Glutamate receptor 1 (G) (T) (N)	GRIA1	P19490	<i>Rattus norvegicus</i>	59'02	5
191.	Golgi reassembly-stacking protein 2 (T) (N)*	gorasp2	XP_545517	<i>Canis familiaris</i>	8'01	1
192.	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 (T) (N)	GLIPR2	Q9H4G4	<i>Homo sapiens</i>	8'64	1
193.	Keratin 1(N)	KRT1	A5A6M6	<i>Pan troglodytes</i>	249'38	16
194.	KIAA1837 protein (G) (T) (N)	KIAA0319L	BAB47466	<i>Homo sapiens</i>	9'26	1
195.	Limbin isoform 1 (G) (T) (N)	EVC2	NP_667338	<i>Homo sapiens</i>	8'96	1
196.	Similar to von Willebrand factor type A and cache domain containing 1 (G) (T) (N)*	CACHD1	XP_536680	<i>Canis familiaris</i>	18'61	2
197.	Nuclear pore membrane glycoprotein 210 (G) (T) (N)	Nup210	Q9QY81	<i>Mus musculus</i>	8'16	1
198.	Olfactory receptor Olf62(N)	Olf62	NP_001000129	<i>Rattus norvegicus</i>	8'22	1
199.	Olfactory receptor, family 5, subfamily B, member 3 (G) (N)	OR5B3	NP_001005469	<i>Homo sapiens</i>	8'21	1
200.	Potassium channel, subfamily K, member 5 (T) (N)	KCNK5	NP_003731	<i>Homo sapiens</i>	8'31	1
201.	Receptor protein tyrosine phosphatase (T) (N)	PTPRT	XP_543002	<i>Canis familiaris</i>	9'59	1
202.	Similar to achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia (Allgrove, triple-A) (T) (N)*	AAAS	XP_849797	<i>Canis familiaris</i>	8'23	1
203.	Similar to ATP binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13 (T) (N)*	ABCA13	XP_848555	<i>Canis familiaris</i>	10'29	1
204.	Similar to brother of CDO (G) (T) (N)*	BOC	XP_545101	<i>Canis familiaris</i>	9'51	1
205.	Similar to potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3 (G) (T) (N)*	KCNE3	XP_542315	<i>Canis familiaris</i>	9'42	1
206.	Similar to secretory carrier membrane protein 4 (T) (N)*	SCAMP4	XP_855051	<i>Canis familiaris</i>	8'80	1
207.	Similar to Solute carrier family 40, member 1 (Ferroportin-1) (Iron-regulated transporter 1) (G) (T) (N)*	SLC40A1	XP_535999	<i>Canis familiaris</i>	9'05	1
208.	Solute carrier family 26, member 4 (T) (N)	slc26a4 Pendrin	NP_062087	<i>Rattus norvegicus</i>	8'73	1
209.	Sortilin-related receptor (G) (N)	LOC100047936	O88307	<i>Mus musculus</i>	11'55	2
210.	Thrombospondin type-1 domain-containing protein 7B (G) (T) (N)	THSD7B	Q6P4U0	<i>Mus musculus</i>	36'19	4
211.	Transmembrane receptor (G) (T) (N)	ROR1	AAA60275	<i>Homo sapiens</i>	9'22	1

212.	Zinc transporter 1 (T) (N)	slc30a1	XP_600542	<i>Bos taurus</i>	12'20	1
10.4. Secretadas						
213.	Cell recognition molecule CASPR3 CNTNAP3 contactin associated protein-like 3 (G) (S) (T) (N)	CNTNAP3	AAG52889	<i>Homo sapiens</i>	8'47	1
214.	Chondromodulin-1(G) (S) (T) (N)	LECT1	Q9Z1F6	<i>Mus musculus</i>	9'33	1
215.	Deleted in malignant brain tumors 1 protein (G) (S) (N)	DMBT1	Q4A3R3.1	<i>Sus scrofa</i>	76'39	4
216.	Gelsolin (G) (S) (T) (N)	Gsn	P20305	<i>Sus scrofa</i>	72'4	8
			Q5T0I2	<i>Homo sapiens</i>	10'58	1
217.	Hemopexin precursor (S) (T) (N)	HPX	NP_999118	<i>Sus scrofa</i>	9'04	1
218.	Hypothetical protein LOC23078 isoform a (G) (S) (T) (N)	KIAA0564	NP_055873	<i>Homo sapiens</i>	8'01	1
219.	Mucin (G) (S) (T)	HAB1	CAA58319	<i>Homo sapiens</i>	8'66	1
220.	Mucin-12 (S) (N)	LOC10013071 6	Q9UKN1	<i>Homo sapiens</i>	8'77	1
221.	N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2 ^a isoform 1 precursor (S) (T) (N)	GRIN2A	NP_000824	<i>Homo sapiens</i>	8'08	1
222.	Oviductal glycoprotein (G) (S) (T)	Ovgp1	Q28990	<i>Sus scrofa</i>	396'62	32
223.	P2X7 receptor (S) (T) (N)	P2RX7	CAA73360	<i>Homo sapiens</i>	8'58	1
224.	PKHD domain-containing transmembrane protein FLJ22222 (S) (T) (N)	C17orf101	Q6PK18	<i>Homo sapiens</i>	9'03	1
225.	Similar to Collagen alpha 2(IV) chain precursor (G) (S) (N)*	LOC607353	XP_849071	<i>Canis familiaris</i>	9'96	1
226.	Similar to heparanase (G) (S) (T) (N)*	HPSE	XP_850908	<i>Canis familiaris</i>	8'05	1
227.	Submandibular gland protein C precursor (G) (S) (T) (N)	Smgc Muc19	NP_945121	<i>Mus musculus</i>	10'74	2
228.	Uteroferrin-associated protein precursor (G) (S) (N)	UFBP	NP_00112332 0 P16708	<i>Sus scrofa</i>	25'12	2
10.5. Varias localizaciones (núcleo/ citoplasma/ membrana)						
229.	Catenin, delta 1 isoform 1 (T) (N)	CTNND1	XP_859079	<i>Canis familiaris</i>	9'92	1
230.	Cdc42 effector protein 1 (T) (N)*	cdc42ep1	Q91W92	<i>Mus musculus</i>	8'77	1
231.	COFILIN protein(N)	COFILIN	NP_00100404 3	<i>Sus scrofa</i>	47'05	5
232.	Coronin-1A (T) (N)	Coro1a	O89053	<i>Mus musculus</i>	8'60	1
233.	Ezrin (T)	EZR	NP_776642 P15311	<i>Bos taurus</i> ; <i>Homo sapiens</i>	39'02	3
234.	Golgi phosphoprotein 3 (T) (N)	Golph3	Q9ERE4	<i>Rattus norvegicus</i>	8'70	1
235.	Hypothetical protein (T) (N)	ARHGAP19	CAH18254	<i>Homo sapiens</i>	8'11	1
236.	Hypothetical protein (T) (N)	HYDIN	CAB70660	<i>Homo sapiens</i>	17'59	2
237.	Interferon-induced very large gtpase 1(N)	Gm1966	Q80SU7	<i>Mus musculus</i>	8'40	1

238.	Kinesin-like protein KIF22 (T) (N)	Kif22	Q3V300	<i>Mus musculus</i>	8'56	1
239.	Kinesin-like protein KIFC1(N)	Gm4137	Q9QWT9	<i>Mus musculus</i>	8'84	1
240.	Kinesin-like protein KIFC3 (T) (N)	Kifc3	Q9BVG8	<i>Homo sapiens</i>	9'98	1
241.	Microtubule-actin cross-linking factor (T) (N)	MACF1	Q9QXZ0	<i>Mus musculus</i>	10'55	1
242.	Mkiaa1 128 protein(N)	Gcap14	BAC98105	<i>Mus musculus</i>	8'85	1
243.	Nuclear receptor coactivator 3 (T) (N)	NCOA3	O09000	<i>Mus musculus</i>	8'37	1
244.	Proteasome 26S non-ATPase subunit 13 isoform 1 (T) (N)	PSMD13	NP_002808	<i>Homo sapiens</i>	22'04	2
245.	Proteasome 26S non-ATPase subunit 8 (T) (N)	PSMD8	XP_533681	<i>Canis familiaris</i>	10'27	1
246.	Proteasome beta 2 subunit (T) (N)	psmb2	XP_532564	<i>Canis familiaris</i>	8'69	1
247.	Rho guanine nucleotide exchange factor 1 (T) (N)**	Arhgef1	Q9Z1I6	<i>Rattus norvegicus</i>	10'21	1
248.	S100C protein (T) (N)	S100A11	NP_001004045	<i>Sus scrofa</i>	35'88	3
249.	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3 (T) (N)	SHANK3	Q4ACU6	<i>Mus musculus</i>	9'02	2
250.	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1 (T) (N)	SIPA1L1	O35412	<i>Rattus norvegicus</i>	12'16	2
251.	Similar to centrosome protein cep290 isoform 1 (T) (N)*	CEP290	XP_539708	<i>Canis familiaris</i>	8'30	1
252.	Similar to NEDD4-binding protein 3 (N4BP3) (N)*	LOC513032	XP_590649	<i>Bos taurus</i>	10'36	1
253.	Similar to nesprin 1 isoform beta (T) (N)	SYNE1	XP_541154	<i>Canis familiaris</i>	8'05	1
254.	Similar to titin isoform N2-B(N)*	LOC610299	XP_852863	<i>Canis familiaris</i>	8'77	1
255.	Similar to zinc finger protein 289, ID1 regulated isoform 4 (T) (N)*	ARFGAP2	XP_861278	<i>Canis familiaris</i>	9'9	1
256.	Unnamed protein product (T) (N)	STK11	BAE42728	<i>Mus musculus</i>	18'07	1
257.	Zinc finger protein DZIP1 (T) (N)	DZIP1	Q8BMD2	<i>Mus musculus</i>	8'89	1
10.6. Localización desconocida actualmente						
258.	1700029F09Rik protein(N)	C13orf27	XP_854368	<i>Canis familiaris</i>	9'21	1
259.	Bmp2k protein (T) (N)	bmp2k	AAH98765	<i>Rattus norvegicus</i>	8'29	1
260.	Coiled-coil domain containing 8 (T) (N)	CCDC8	AAX31380	<i>Bos taurus</i>	8'36	1
261.	Enhancer of polycomb 1 (T) (N)	epc1	XP_535156	<i>Canis familiaris</i>	8'20	1
262.	Glutaredoxin domain-containing cysteine-rich protein 2(N)	GRXCR2	Q3TYR5	<i>Mus musculus</i>	10'45	1
263.	Granule cell antiserum positive 14 isoform 1(N)		NP_081321	<i>Mus musculus</i>	8'13	1
264.	Hypothetical protein (T) (N)	OTUD4	CAB70748	<i>Homo sapiens</i>	16'52	2
265.	Hypothetical protein (N)		BAB46911	<i>Macaca fascicularis</i>	8'01	1
266.	Hypothetical protein (N)	DKFZp781N10	CAH10480	<i>Homo</i>	9'49	1

		49		<i>sapiens</i>		
267.	Hypothetical protein XP_541959 (T) (N)*	OCEL1	XP_541959	<i>Canis familiaris</i>	8'58	1
268.	Hypothetical protein XP_849920 (N)*	LOC612183	XP_855013	<i>Canis familiaris</i>	11'18	1
269.	Hypothetical protein XP_849972(N)*	LOC612235	XP_855065	<i>Canis familiaris</i>	8'36	1
270.	Hypothetical protein XP_851242(N)*	LOC606948	XP_856335	<i>Canis familiaris</i>	9'96	1
271.	Hypothetical protein XP_859601(N)*		XP_864694.1	<i>Canis familiaris</i>	9'36	1
272.	Hypothetical protein XP_863612(N)*	LOC612214	XP_868705	<i>Canis familiaris</i>	8'01	1
273.	Neurofibromin (T) (N)	BLNK	548350	<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	8'67	1
274.	Probable fibrosin-1 long transcript protein (T) (N)	FBRS	Q9HAH7	<i>Homo sapiens</i>	11'10	1
275.	Protein FAM178A (T) (N)*	Fam178a	Q6P9P0	<i>Mus musculus</i>	8'27	1
276.	RICTOR protein (T) (N)	RICTOR	BAD32604	<i>Mus musculus</i>	9'76	2
277.	Similar to F-box only protein 41 (T) (N)*	Fbxo41	XP_540229	<i>Canis familiaris</i>	9'09	1
278.	Similar to La ribonucleoprotein domain family member 2 isoform 1 (T) (N)*	Larp1b	XP_533293	<i>Canis familiaris</i>	8'93	1
279.	Similar to prematurely terminated mrna decay factor-like (N)	LOC487907	XP_545030	<i>Canis familiaris</i>	8'01	1
280.	Similar to RNA-binding protein 7 (RNA binding motif protein 7) (T) (N)*	Rbm7	XP_853905	<i>Canis familiaris</i>	10'62	1
281.	Similar to splicing factor, arginine/serine-rich 2, interacting protein (T) (N)*	SFRS2IP	XP_534828	<i>Canis familiaris</i>	8'68	1
282.	Similar to suppressor of G2 allele of SKP1(N)*	LOC477951	XP_535139	<i>Canis familiaris</i>	28'13	3
283.	Similar to zinc finger, ZZ-type with EF hand domain 1 isoform 1 (T) (N)*	ZZEF1	XP_546554	<i>Canis familiaris</i>	8'68	1
284.	Uncharacterized protein c1orf158 (T) (N)	C1orf158	Q8N1D5	<i>Homo sapiens</i>	9'29	1
285.	Uncharacterized protein c20orf152 (N)	QtsA-11192	Q95JR6	<i>Macaca fascicularis</i>	10'71	1
286.	Unnamed protein product (N)	Gm10372	BAE23433	<i>Mus musculus</i>	8'48	1
287.	Unnamed protein product (N)	Gm10860	BAE21659	<i>Mus musculus</i>	8'45	1
288.	Unnamed protein product (N)		CAA43596	<i>Rattus norvegicus</i>	30'75	3
289.	Unnamed protein product (T) (N)	C3orf36	BAB15249	<i>Homo sapiens</i>	8'06	1
290.	Zinc finger protein 160 (N)	Zfp160	AAH15291	<i>Mus musculus</i>	10'10	1
11. Proteoglicanos						
291.	Glypican 6 isoform 2 (G) (S) (N)	Gm4672	NP_035951	<i>Mus musculus</i>	8'78	1

Anexo II. Proteínas identificadas en el fluido oviductal bovino en fase folicular tardía. Se indica el símbolo oficial de cada una de ellas junto con el número de acceso a la base de datos del PubMed o UniProt, además de indicar la especie en la que se ha detectado el péptido, el “score” y el número de péptidos detectados.*Predicted , Recname. Full. (G) Glicoproteína. (S) Secretada. (T) Descrita por Tone, et al., 2008 (Tone, Begley et al., 2008), (N) descrita por primera vez en el oviducto de bovino.**

Proteínas del fluido oviductal bovino en fase folicular tardía		Símbolo oficial	Número de acceso	Especie	“Score”	Péptidos
1. Factores de crecimiento, citoquinas, receptores e inhibidores						
1.	Colony stimulating factor 1 (macrophage) (T)	csf1	NP_776451.1 O77709	<i>Bos taurus</i>	22'01	2
2.	Colony stimulating factor 3 (granulocyte) (T) (N)	CSF3	EDM05943.1 P97712	<i>Rattus norvegicus</i>	8'08	1
3.	Interleukin 17 receptor E (G) (T) (N)	IL17RE	NP_001004091.1 Q6AZ51	<i>Rattus norvegicus</i>	8'78	1
4.	Interleukin-1 receptor antagonist protein precursor (IL-1ra) (IL-1RN) (IRAP) (IL1 inhibitor) (G) (S) (T) (N)	PDS5B	O18999.1 O18999	<i>Equus caballus</i>	18'69	2
5.	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor) (S) (T) (N)	MIF	NP_001028780.1 P80177	<i>Bos taurus</i>	14'88	1
6.	Similar to Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 (Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) (RANKL) (TNF-related activation-induced cytokine) (TRANCE) (Osteoprotegerin ligand) (OPGL) (Osteoclast differentiation factor) (ODF) (T) (N)*	Tnfsf11	XP_851765.1	<i>Canis familiaris</i>	9'86	1
7.	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial), isoform CRA_a		EDL15588.1	<i>Mus musculus</i>	11'31	1
2. Hormonas y receptores						
8.	Chromogranin-A precursor (cga) [Contains: Pancreastatin] (G) (S)	Pancreastatin	P04404	<i>Sus scrofa</i>	8'52	1
9.	Melanocortin 1 receptor variant L93R (T) (N)	MC1R	AAO21073.1 Q86YW1	<i>Homo sapiens</i>	9'71	1
10.	Prolactin receptor, isoform CRA_c (S) (N)	pip	NP_002643.1	<i>Homo sapiens</i>	15'34	1
3. Proteasas e inhibidores						
11.	A desintegrin and metallopeptidase domain 34-like (Testase 7) (N)	Adam34	Q7M765	<i>Mus musculus</i>	11'04	1
12.	A desintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9 (T) (N)	Adam9	NP_001182331.1 E1ACC5	<i>Canis familiaris</i>	9'48	1
13.	A desintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9 (T) (N)	ADAMTS9	XP_848393.1 E2RDJ3	<i>Canis familiaris</i>	9'25	1
14.	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 17 (G) (S) (T) (N)	ADAMTS17	XP_618325.4	<i>Bos taurus</i>	36'32	4
15.	Brain-specific serine protease 4 (G) (S) (N)*	BSSP4	XP_510756.3	<i>Pan troglodytes</i>	8'07	1
16.	Calpain-6 isoform 3(N)*		XP_001147100.1	<i>Pan troglodytes</i>	8'39	1
17.	Inter-alpha (globulin) inhibitor H5 (G) (S) (T) (N)	itih5	NP_001095986.1 A2VE29	<i>Bos taurus</i>	10'17	1
18.	Inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (G) (S) (T) (N)	ITIH4	NP_001001537.1 P79263	<i>Sus scrofa</i>	10'49	1
19.	Lysozyme-like 6 (predicted) (T) (N)	LYZL6	EDM06275.1 D3ZSK1	<i>Rattus norvegicus</i>	8'93	1
20.	Neutrophil collagenase (G) (S) (T) (N)*	MMP8	XP_001098000.2	<i>Macaca</i>	8'40	1

				<i>mulatta</i>		
21.	Pregnancy-associated glycoprotein-18 isoform 3(N)*		XP_876734.3	<i>Bos taurus</i>	8'25	1
22.	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5 (T) (N)	Serpine1	NP_001091549.1	<i>Bos taurus</i>	22'71	2
23.	Serpin peptidase inhibitor, clade I (pancpin), member 2 (G) (S) (T) (N)	SerpinI2	XP_851407.1	<i>Canis familiaris</i>	9'76	1
24.	Similar to Interstitial collagenase precursor (Matrix metalloproteinase-1) (MMP-1) (Fibroblast collagenase) (T)*	Mmp1	XP_546546.2	<i>Canis familiaris</i>	10'04	1
4. Protección antioxidante						
25.	Casein alpha s1 (S) (T) (N)	Csn1s1	NP_851372.1 P02662	<i>Bos taurus</i>	13'02	1
26.	Glutamine-rich protein 2 (T) (N)	Qrich2	NP_115510.1 Q9H0J4	<i>Homo sapiens</i>	9'41	1
27.	Glutathione peroxidase 7 (S) (T)	GPX7	EDL30742.1 Q99LJ6	<i>Mus musculus</i>	9'26	1
28.	Peroxiredoxin 2 (T) (N)	PRDX2	NP_777188.1	<i>Bos taurus</i>	40'13	4
29.	Peroxiredoxin-1 (T) (N)	Prdx1	NP_035164.1 P35700	<i>Mus musculus</i>	17'68	2
30.	Superoxide dismutase 1, soluble (T) (N)	SOD1	XP_002692276.1	<i>Bos taurus</i>	15'46	1
5. Agente de defensa						
31.	Activated leukocyte cell adhesion molecule (G) (T) (N)	Alcam CD166	CAC35029.1	<i>Sus scrofa</i>	10'45	1
32.	Alpha CD4 mab immunoglobulin heavy chain VDJ region(N)	DXGgc1e	CAA46217.1	<i>Mus musculus</i>	8'84	1
33.	Anti-DNA immunoglobulin light chain IgG		AAB48794.1	<i>Mus musculus</i>	8'00	1
34.	Anti-oxidized LDL immunoglobulin light chain Fab(N)		AAO49738.1	<i>Homo sapiens</i>	8'04	1
35.	Azurocidin (Cationic antimicrobial protein CAP37) (Heparin-binding protein) (HBP) (G) (N)	HBP	P80015.1	<i>Sus scrofa</i>	9'38	1
36.	Bb1(N)	BB1	AAA85372.1	<i>Rattus norvegicus</i>	9'25	1
37.	CD4 antigen (T) (N)	CD4	ABD65476.1 Q19VJ6	<i>Ovis aries</i>	9'02	1
38.	CD80 antigen (T) (N)	CD80	NP_999252.1 Q9BE99	<i>Sus scrofa</i>	10'99	1
39.	FLJ45422 protein	HLA-L	A5D8X1	<i>Homo sapiens</i>	79'44	8
40.	KIT ligand (G) (S) (T)	KITLG	NP_001009343.1 P79169	<i>Felis catus</i>	9'56	1
41.	MHC class I antigen (N)	SLA-1	AAL76983.1 O19075	<i>Sus scrofa</i>	18'13	2
42.	MHC class II antigen (N)	SLA-DQB	AAN35088.1 Q8HX77	<i>Sus scrofa</i>	44'09	4
43.	NK cell type I receptor protein 2B4(N)	LOC719800	XP_001117630.2	<i>Macaca mulatta</i>	9'40	1
44.	Semaphorin-3E (G) (S) (T) (N)*	SEMA3E	XP_001369777.2	<i>Equus caballus</i>	8'74	1
45.	Similar to defensin, beta 104A (N)*	DEFB104A	XP_001083286.1	<i>Macaca mulatta</i>	8'60	1

46.	Similar to Intersectin-2 (SH3 domain-containing protein 1B) (SH3P18) (SH3P18-like WASP-associated protein), partial (T) (N)*	ITSN2	XP_001254764.3	<i>Bos taurus</i>	9'24	1
47.	Similar to leukocyte-associated Ig-like receptor 1 isoform b precursor) (G) (T) (N)*	Lair1	XP_541424.2	<i>Canis familiaris</i>	146'44	15
48.	T cell receptor beta chain(N)		AAV44245.1	<i>Mus musculus</i>	9'32	1
49.	T-cell receptor alpha chain(N)		AAK09289.1	<i>Capra hircus</i>	10'58	1
50.	T-cell receptor beta chain TCRBV13.1.2J2 variable region(N)		CAC03898.1	<i>Homo sapiens</i>	9'55	1
6. Glicosidasas y glicosil transferasas						
51.	Similar to mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isoenzyme A (G) (S) (T) (N)	MGAT4A	XP_849639.1	<i>Canis familiaris</i>	10'44	1
7. Otros enzimas						
52.	2-aminoethanethiol dioxygenase (Cysteamine dioxygenase) (N)	Ado	Q6PDY2	<i>Mus Musculus</i>	11'54	1
53.	3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase, cyclic-GMP inhibited(N)	pde	A49166	<i>Homo sapiens</i>	9'43	
54.	Adenylate kinase 8	LOC615606	NP_001193179.1	<i>Bos taurus</i>	8'65	1
55.	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1 (T) (N)	aldh1a1	NP_776664.1 P48644	<i>Bos taurus</i>	27'43	4
56.	bifunctional purine biosynthesis protein PURH (T) (N)	ATIC	20127454 NP_004035.2 P31939	<i>Homo sapiens</i>	8'23	1
57.	Centaurin delta 1 isoform 1 (T) (N)*	Arap2	XP_545958	<i>Canis familiaris</i>	9'97	1
58.	Creatine kinase B-type (T) (N)*	CKB	XP_510185.3	<i>Pan troglodytes</i>	10'72	1
59.	Cytoplasmic aconitase (T) (N)	ACO1	CAD20353.1 Q8VDC3	<i>Mus musculus</i>	8'55	1
60.	Delta-aminolevulinic acid dehydratase isoform 10 (T) (N)*	Alad	XP_001152445.2	<i>Pan troglodytes</i>	11'54	1
61.	Doublecortin-like kinase 2 (T) (N)*	DCLK2	XP_616231.5	<i>Bos taurus</i>	9'41	1
62.	Dual specificity protein kinase CLK3 (CDC-like kinase 3) (T) (N)	clk3	P49761.3	<i>Homo sapiens</i>	8'34	
63.	Dual specificity testis-specific protein kinase 1 (T) (N)*	Tesk1	XP_520558.3	<i>Pan troglodytes</i>	8'27	1
64.	Enolase-phosphatase E1-like(N)*	LOC699388	XP_001094685.1	<i>Macaca mulatta</i>	11'27	1
65.	Glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1 (glycogen branching enzyme) (S) (N)*	GBE1	XP_516593.2	<i>Pan troglodytes</i>	8'01	1
66.	Glutathione S-transferase P (GST class-pi) (N)	LOC475191	XP_854117.1	<i>Canis familiaris</i>	13'35	1
67.	Glutathione S-transferase pi (T) (N)	GSTP1	NP_803482.1 P28801	<i>Bos taurus</i>	69'22	4
68.	Hydroxysteroid dehydrogenase like 2 (T) (N)	hsd12	NP_001020868.1 Q4V8F9	<i>Rattus norvegicus</i>	8'21	
69.	Kinase D-interacting substance 220, isoform CRA_e (T) (N)	KIDINS220	EDM03196.1	<i>Rattus norvegicus</i>	8'20	1
70.	Kinase D-interacting substrate of 220 kda(N)	KIDINS220	BAA86564.2 Q9ULH0	<i>Homo sapiens</i>	9'11	1

71.	Low quality protein: Fast kinase domain-containing protein 1-like (T) (N)*	FASTKD5	XP_001494398.2	<i>Equus caballus</i>	11'11	1
72.	Low quality protein: ribose-5-phosphate isomerase (T) (N)*	RPIA	XP_001497518.3	<i>Equus caballus</i>	9'35	1
73.	Lowe oculocerebrorenal syndrome protein (T) (N)	OCRL	AAA59964.2 Q01968	<i>Homo sapiens</i>	25'67	3
74.	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1 (T) (N)	MDGA1	XP_532128.2 F1PGE1	<i>Canis familiaris</i>	9'33	1
75.	Mixed lineage kinase domain-like (T) (N)*	MLKL	XP_001256760.1 E1BGC6	<i>Bos taurus</i>	9'47	1
76.	N-acetylneuraminic acid phosphate synthase (T) (N)	NANS	XP_538746.2 E2QWN4	<i>Canis familiaris</i>	12'03	1
77.	Neurologin-1 (T) (N)	NLGN1	NP_001192902.1 Q0II35	<i>Bos taurus</i>	9'03	1
78.	Nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes) (T) (N)	NOS2	NP_001070267.1 Q27995	<i>Bos taurus</i>	11'67	1
79.	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide (T) (N)	Pik3ca	NP_032865.2 Q0VVGQ5	<i>Mus musculus</i>	9'30	1
80.	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 4 (T) (N)	PTPN13	NP_542416.1	<i>Homo sapiens</i>	9'18	1
81.	Quinoid dihydropteridine reductase (T) (N)	QDPR	NP_001069960.1 Q3T0Z7	<i>Bos taurus</i>	16'53	2
82.	Serine/threonine protein phosphatase with EF-hand motifs 2 (T) (N)*	PPEF2	XP_526584.2	<i>Pan troglodytes</i>	8'83	1
83.	Serine/threonine-protein phosphatase (T) (N)	Ppp3cc	AAH46617 Q80XK0	<i>Mus musculus</i>	8'46	1
84.	Serine-protein kinase ATM (Ataxia telangiectasia mutated homolog) (A-T, mutated homolog) (T) (N)	ATM	152031564 Q6PQD5.2	<i>Sus scrofa</i>	11'83	1
85.	Similar to alpha-aminoadipate aminotransferase* (T) (N)	aadat	XP_543185.2	<i>Canis familiaris</i>	10'22	1
86.	Similar to serum-inducible kinase isoform 3(N)*	LOC737886	XP_001140689.1	<i>Canis familiaris</i>	9'86	1
87.	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5 precursor (G) (S) (N)	TR-AP	NP_999374.1 P09889	<i>Sus scrofa</i>	8'91	1
88.	Transketolase (T) (N)	TKT	NP_001003906.1 Q6B855	<i>Bos taurus</i>	12'57	1
89.	Triosephosphate isomerase 1 (T) (N)	TPI1	NP_001013607.1 Q5E956	<i>Bos taurus</i>	76'4	5
90.	WD repeat and SOCS box-containing 1 isoform 2 (T) (N)	WSB1	NP_599027.1	<i>Homo sapiens</i>	8'20	1
8. Chaperonas y HSP						
91.	Clusterin (G) (S) (T) (N)	clu	NP_001075518.1 Q9XSC5	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	9'05	1
92.	Endoplasmic precursor (G) (T)	GRP94 HSP90B1	NP_777125.1 Q95M18	<i>Bos taurus</i>	147'66	11
93.	Heat shock 27 kDa protein 1 (T) (N)	Hspb1	NP_001020740.1 E1BEL7	<i>Bos taurus</i>	51'93	4
94.	Heat shock 70 kDa protein 1B (HSP70.2) (N)	HSPA1B	Q27965.1	<i>Bos taurus</i>	154'14	12
95.	Heat shock 70 kDa protein 1A variant (T) (N)	HSPA1A	Q59EJ3	<i>Homo sapiens</i>	176'29	40
96.	Heat shock 70 kDa protein 2 (T) (N)	Hspa2	XP_510002.3 Q6UIP2	<i>Pan troglodytes</i>	9'57	1
97.	Heat shock protein beta-1(N)	Hspb1	BAE27553.1 P14602	<i>Mus musculus</i>	187'65	14

98.	Heat shock protein HSP 90-alpha isoform 1(N)	HSP90A1	NP_001017963.2	<i>Homo sapiens</i>	5'09	3
99.	Heat shock transcription factor, Y linked 2(N)	Hsfy2	XP_001249635.1 Q3SYT2	<i>Bos taurus</i>	8'16	1
100.	Protein disulfide isomerase-associated 3 (T) (N)	PRLR	EDL03308.1	<i>Mus musculus</i>	9'99	1
101.	Protein disulfide-isomerase A3 precursor (T) (N)	PDIA3	NP_776758.2	<i>Bos taurus</i>	11'09	1
102.	Protein disulfide-isomerase A4 precursor (T) (N)	PDIA4	NP_004902.1	<i>Homo sapiens</i>	25'26	2
103.	Protein FAM69B (T) (N)	Fam69b	BAA92750.1 Q99ML4	<i>Mus musculus</i>	8'81	1
104.	rcDNAJ9(N)	RcDNAJ9	ABB92454.1 Q2VIL4	<i>Homo sapiens</i>	9'48	1
105.	Similar to DNAJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16 (T) (N)*	Dnajc16	XP_544556.2	<i>Canis familiaris</i>	8'23	1
106.	Similar to Stress-induced-phosphoprotein 1 (ST11) (Hsc70/Hsp90-organizing protein) (Hop) (Transformation-sensitive protein IEF SSP 3521) (N)*	ST11	XP_854960.1	<i>Canis familiaris</i>	21'99	3
9. Proteínas del plasma sanguíneo y proteínas sanguíneas						
107.	Albumin (T)	ALB	AAI02743.1 NP_851335.1	<i>Bos taurus</i>	436'27	29
			P02768	<i>Homo sapiens</i>	12'81	1
108.	Alpha-1 acid glycoprotein (G) (S) (T) (N)	ORM1	NP_001035592.1 Q3SZR3	<i>Bos taurus</i>	28'01	2
109.	Alpha-1-macroglobulin precursor (Alpha-1-M) [Contains: Alpha-1-macroglobulin 165 kda subunit (S) (T) (N)]	PZP	Q63041.1	<i>Rattus norvegicus</i>	10'88	1
110.	Alpha-lactalbumin precursor (G) (S) (T) (N)	LALBA	NP_001075521.1 P00716	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	8'25	1
111.	Apolipoprotein A-I (T) (N)	APOA1	NP_776667.2	<i>Bos taurus</i>	27'95	3
112.	Apolipoprotein E precursor (G) (S) (T) (N)	APOE	NP_000032.1 P02649	<i>Homo sapiens</i>	23'33	2
113.	Complement factor I (G) (S) (T) (N)*	CFI	XP_001502956.2	<i>Equus caballus</i>	9'62	1
114.	Delta globin (T) (N)	HBD	NP_000510.1 A0N071	<i>Homo sapiens</i>	8'95	1
115.	Hemochromatosis splice variant 861-2305del (T) (N)	HFE	AAG29576.1 Q9HC69	<i>Homo sapiens</i>	8'38	1
116.	Hemoglobin alpha-1 globin chain (G) (N)	HBA1 HBA2	P69905	<i>Homo sapiens</i>	60'68	8
117.	Hemoglobin fetal subunit beta-like*		XP_001249460.2	<i>Bos taurus</i>	12'38	1
	Hemoglobin, beta (T) (N)	HBB	NP_776342.1 D4QBB4	<i>Bos taurus</i>	64'71	4
119.	Ig heavy chain variable region, VH3 family		AAQ05366.1	<i>Homo sapiens</i>	9'41	1
120.	Immunoglobulin A heavy chain		CAA05669.1	<i>Homo sapiens</i>	10'30	1
121.	Immunoglobulin E monoclonal antibody 63E8 heavy chain		ABY66172.1	<i>Mus musculus</i>	9'21	1
122.	Immunoglobulin heavy chain		BAB38840.1	<i>Mus musculus</i>	8'78	1

123.	Immunoglobulin heavy chain		AAS85954.1	<i>Homo sapiens</i>	9'42	1
124.	Immunoglobulin heavy chain variable region		AAF79966.1 ABK81367.1 G44881.1 CAB95708.1 CAD60283.1 CAE45445.1 CAC01142.1 CAL03917.1 CAL04765.1	<i>Homo sapiens</i>	82'05	9
125.	Immunoglobulin heavy chain VHDJ region		BAC01983.1	<i>Homo sapiens</i>	9'37	1
126.	Immunoglobulin kappa variable region		AAR99911.1	<i>Sus scrofa</i>	8'82	1
127.	Immunoglobulin lambda chain		AAO53409.1	<i>Mus musculus</i>	8'28	1
128.	Immunoglobulin lambda light chain variable region		ABA70853.1	<i>Homo sapiens</i>	8'40	1
129.	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 NP_001077269.1		XP_002701782.1	<i>Bos taurus</i>	13'3	1
130.	Plasminogen (G) (S) (T) (N)	PLG	AAH60513.1 P00747	<i>Homo sapiens</i>	196'94	13
131.	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, gamma subunit 29kda (T) (N)	PAFAH1B3	NP_777090.1 Q29460	<i>Bos taurus</i>	11'62	1
132.	Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1-metal-binding globulin) (G) (S) (T) (N)	TF	Q29443.1	<i>Bos taurus</i>	57'58	5
133.	Similar to Complement factor H precursor (H factor 1) isoform 2 (G) (S) (T) (N)*	CFH	XP_536110.2	<i>Canis familiaris</i>	8'41	1
134.	Similar to serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 11 (G) (S) (N)*	SERPINA11	XP_855206.1	<i>Canis familiaris</i>	8'42	1
10. Otras proteínas						
10.1. Nucleares						
135.	Bromodomain testis-specific protein isoform 4 (T) (N)*	brdt	XP_524767.3	<i>Pan troglodytes</i>	8'95	1
136.	FSDH region gene 2 protein(N)*	FRG2-like-1	XP_001134667.1	<i>Pan troglodytes</i>	8'66	1
137.	MAX gene associated isoform 2 (T) (N)*	MAX	XP_874348.4	<i>Bos taurus</i>	9'49	1
138.	Similar to Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B- like(N)*		XP_001494421.2	<i>Equus caballus</i>	10'68	1
139.	Zinc finger protein 167 (T) (N)	ZNF167	AAI48261.1 A7MAY2	<i>Homo sapiens</i>	10'49	1
140.	Zinc finger protein 40(N)*	ZFP40	XP_001495311.2	<i>Equus caballus</i>	8'40	1
141.	Zinc finger protein 485 [Pan troglodytes] (T) (N)*	ZNF485	XP_001151446.2	<i>Pan troglodytes</i>	20'04	2
10.2. Citoplasmáticas						
142.	40S ribosomal protein S10-like(N)	LOC456081	XP_512706.2	<i>Pan troglodytes</i>	41'35	4
143.	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein isoform 3(N)*		114568488 XP_001166791.2	<i>Pan troglodytes</i>	20'87	2
144.	Activated leukocyte cell adhesion molecule (T) (N)	KRT78	XP_543640.2	<i>Canis familiaris</i>	9'07	1
145.	Coiled-coil domain containing 77 (T) (N)	Ccdc77	NP_080304.1	<i>Mus</i>	8'70	1

			Q9CZH8	<i>musculus</i>		
146.	Echinoderm microtubule-associated protein-like 6 [Bos taurus] (N)	Eml6	NP_001179386.1	<i>Bos taurus</i>	10'87	1
147.	Guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 2, isoform CRA_b (N)	Gdi2	BAE25494.1 Q3UPA3	<i>Mus musculus</i>	9'76	1
148.	Microtubule-associated tumor suppressor 1 homolog isoform 1(N)*	Mtus1	XP_001488915.2	<i>Equus caballus</i>	10'03	1
149.	P4HB protein (T) (N)	P4HB	AAI46272.1 A6H7J6	<i>Bos taurus</i>	11'54	1
150.	Periaxin isoform L (T) (N)	Prx	BAD32498.1 Q69ZE6	<i>Mus musculus</i>	8'29	1
151.	RAB20, member RAS oncogene family (T) (N)	RAB20	NP_060287.1 Q9NX57	<i>Homo sapiens</i>	9'78	1
152.	Ribosomal protein S4, X-linked X-like isoform 1*(N)	rpsD	XP_002683909.1	<i>Bos taurus</i>	8'12	1
153.	Ropporin, raphilin associated protein 1B (T) (N)	ROPN1B	NP_001012337.1 Q9BZX4	<i>Homo sapiens</i>	19'54	2
154.	Similar to quattro (N)*	quo	XP_542992.2	<i>Canis familiaris</i>	9'08	1
155.	T-complex protein 1 subunit delta (N)		DAA24606.1	<i>Bos taurus</i>	12'78	2
156.	Unnamed protein product (T) (N)	Rps23	BAB28145.1 Q9CSN9	<i>Mus musculus</i>	8'64	1
157.	Unnamed protein product (T) (N)	Ap3b2	BAE23684.1 Q3UUE3	<i>Mus musculus</i>	8'51	1
10.3. Componentes de membrana						
158.	Anoctamin-6 (G) (T) (N)	ANO6	NP_001101578.1	<i>Rattus norvegicus</i>	9'86	1
159.	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1(N)		NP_001075232.1 Q0NXS1	<i>Equus caballus</i>	9'54	1
160.	Cadherin-11(N)	LOC1000527 14	NP_001137422.1 B8K205	<i>Equus caballus</i>	9'82	1
161.	Cadherin-related family member 3(G) (T) (N)*	Cdhr3	XP_001491917.1	<i>Equus caballus</i>	8'53	1
162.	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1B subunit (T) (N)	Cacna1b	NP_777057.1 Q9TTA4	<i>Bos taurus</i>	8'58	1
163.	Chloride intracellular channel 6, isoform CRA_b (T) (N)	Clic6	EDM10769.1 Q811Q2	<i>Rattus norvegicus</i>	10'21	1
164.	Down syndrome cell adhesion molecule-like protein (T) (N)	Dscam1	AAL99984.1 Q8R4B4	<i>Mus musculus</i>	22'96	2
165.	Hypothetical protein (T) (N)	GPRIN1	CAD38868.1 Q7Z2K8	<i>Homo sapiens</i>	8'33	1
166.	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor (G) (T) (N)	ICAM1	NP_776773.1 Q95132	<i>Bos taurus</i>	8'34	1
167.	Leucine-rich repeat-containing protein 33 (G) (T) (N)	Lrrc33	BAC31275.1 Q8BMT4	<i>Mus musculus</i>	70'91	11
168.	Olfactory receptor, family 11, subfamily G, member 2-like (G) (N)*	LOC784214	XP_001252621.1	<i>Bos taurus</i>	9'47	1
169.	Potassium channel tetramerisation domain containing 15 (T) (N)	KCTD15	NP_001069036.1 Q0VD00	<i>Bos taurus</i>	12'14	1
170.	Protein RIC1 homolog*(N)	CG9063	114623686 XP_520477.2	<i>Pan troglodytes</i>	10'83	1
171.	Receptor accessory protein 4, isoform CRA_e (T) (N)	REEP4	EAW63714.1 Q9H6H4	<i>Homo sapiens</i>	10'38	1
172.	Ring finger protein 149, isoform CRA_c (T) (N)	Rnf149	EAX01819.1	<i>Homo sapiens</i>	11'52	1
173.	Scavenger receptor class B, member 1,	SCARB1	EAW98458.1	<i>Homo</i>	10'18	1

	isoform CRA_a (G) (T) (N)			<i>sapiens</i>		
174.	SEC14-like protein 1 (T) (N)	Sec14l1	Q92503.2	<i>Homo sapiens</i>	8'39	1
175.	Teneurin-4 (G) (T) (N)*	ODZ4	114639526 XP_508667.3	<i>Pan troglodytes</i>	9'26	1
176.	Transmembrane protein 132E-like(N)*		XP_001501565.2	<i>Equus caballus</i>	8'39	1
177.	Von Willebrand factor A domain-containing protein 3B-like(N)*	CADH1	XP_001101760.2	<i>Macaca mulatta</i>	9'03	1
10.4. Secretadas						
178.	Anterior gradient homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>) (S) (T)	Agr2	NP_001035590.1 Q3ZC20	<i>Bos taurus</i>	16'41	2
179.	Decorin, isoform CRA_a (S) (T) (N)	DCN	EAW97450.1	<i>Homo sapiens</i>	9'64	1
180.	ENOX2 protein (G) (S) (N)	ENOX2	XP_595997.4	<i>Bos taurus</i>	12'38	1
181.	Nephronectin-like (S) (T) (N)*	Npnt	XP_001503223.3	<i>Equus caballus</i>	8'58	1
182.	Oviduct-specific glycoprotein (G) (S) (T)	OVGP1	A1L579 Q28042	<i>Bos taurus</i>	382'76	21
183.	Pigment epithelium-derived factor (G) (S) (T) (N)	Serpinf1	BAA09051.1 P97298	<i>Mus musculus</i>	8'57	1
184.	Prolactin-inducible protein precursor (G) (S) (T) (N)	PIP	P12273	<i>Homo sapiens</i>	15'34	1
185.	Similar to Lactadherin precursor (Milk fat globule-EGF factor 8) (MFG-E8) (O-acetyl GD3 ganglioside synthase) (AGS) (MFGM) (G) (S) (T) (N)*	MFGE8	XP_545848.2	<i>Canis familiaris</i>	16'34	2
186.	SLIT1-Sb splicing product (G) (S) (T) (N)	Slit1	EDL41859.1	<i>Mus musculus</i>	11'66	1
187.	Testican 3 isoform 4 (S) (T) (N)*	SPOCK3	XP_001102343.2	<i>Macaca mulatta</i>	8'12	1
188.	Unnamed protein product (S) (N)		BAE31440.1	<i>Mus musculus</i>	8'43	1
10.5. Varias localizaciones (núcleo, citoplasma y membrana)						
189.	B-cell linker protein (T) (N)	BLNK BASH	CAJ55325.1 Q2MD55	<i>Homo sapiens</i>	10'10	1
190.	Brain and kidney protein - synaptotagmin-17 (T) (N)	Syt17	NP_620204.1 Q62807	<i>Rattus norvegicus</i>	8'81	1
191.	Gamma-tubulin complex component 2-like (N)*		XP_001499047	<i>Equus caballus</i>	38'27	3
192.	Human immunodeficiency virus type 1 enhancer binding protein 3 (T) (N)	Hivep3	NP_034787.2 A2A884	<i>Mus musculus</i>	8'82	1
193.	Secretory carrier membrane protein 2 (T) (N)	SCAMP2	NP_076445.1 Q5U2U4	<i>Rattus norvegicus</i>	9'51	1
194.	SH3 domain containing 19 isoform 3 (T) (N)*	SH3D19	XP_615615.4	<i>Bos taurus</i>	8'59	1
195.	SH3 domain-containing protein 19 isoform 4(N)*	SH3D19	XP_001152369.2	<i>Pan troglodytes</i>	8'98	1
196.	Similar to talin 2 (T) (N)*	Tln2	XP_236367.4	<i>Rattus norvegicus</i>	9'48	1
197.	Similar to Thioredoxin (ATL-derived factor) (ADF) (Surface associated sulphhydryl protein) (SASP) (N)*	TRX1	XP_532029.2	<i>Canis familiaris</i>	15'90	1
198.	Tensin 3	RGD1564174	XP_341257.4 C5NTX8	<i>Rattus norvegicus</i>	8'37	1
199.	Testis cDNA clone: QtsA-18303, similar to human SMC4 structural maintenance of	SMC4L1	BAE02412.1 Q4R3A5	<i>Macaca fascicularis</i>	9'11	1

	chromosomes 4-like 1(yeast) (SMC4L1), rCG63395(N)					
200.	Unnamed protein product Rab GDP dissociation inhibitor beta (T) (N)	Gdi2	BAC37725.1 Q61598	<i>Mus musculus</i>	9'60	1
201.	Unnamed protein product (T) (N)	Rb1cc1	BAC25611.1 Q8BT47	<i>Mus musculus</i>	9'74	1
10.6. Localización desconocida actualmente						
202.	Ankyrin repeat domain-containing protein 6 (T) (N)	ANKRD6	NP_001192406.1 Q17R12	<i>Bos taurus</i>	18'49	3
203.	ATH1, acid trehalase-like 1 (yeast) (G) (N)*	ATH1	XP_002683778.1	<i>Bos taurus</i>	115'53	7
204.	BAH domain and coiled-coil containing 1-like (N)*		XP_001081783.1	<i>Rattus norvegicus</i>	8'99	1
205.	Beta-lactoglobulin (N)	LGB	AAD15975.1 O97877	<i>Felis catus</i>	8'08	1
206.	Coiled-coil domain-containing protein 130 (T) (N)	CCDC130	NP_001032733.1 Q32PZ9	<i>Rattus norvegicus</i>	8'66	1
207.	Coiled-coil domain-containing protein 148 (T) (N)*	CCDC148	XP_001492262	<i>Equus caballus</i>	8'99	1
208.	Coiled-coil domain-containing protein 154 (T) (N)*	CCDC154	XP_001497693	<i>Equus caballus</i>	8'02	1
209.	Coiled-coil domain-containing protein 68 isoform 1(T)*	CCDC68	XP_001083248.1	<i>Macaca mulatta</i>	19'12	2
210.	Coiled-coil domain-containing protein 73(N)*	ccdc73	XP_521880.3	<i>Pan troglodytes</i>	9'61	1
211.	Coiled-coil domain-containing protein 87 (T) (N)	Ccdc87	NP_001102997 B2GV49.1	<i>Rattus norvegicus</i>	35'16	4
212.	EF-hand domain-containing protein c3orf25 (T) (N)	C3orf25	NP_001103976.1	<i>Mus musculus</i>	12'57	1
213.	Expression inversely correlated with estrogen receptor expression in breast cancer (T) (N)	DFNA5	AAC39635.2 O60443	<i>Homo sapiens</i>	9'27	1
214.	FAM105B protein(N)	LOC606770	XP_848253.1 E2QT25	<i>Canis familiaris</i>	8'03	1
215.	Family with sequence similarity 122B (T) (N)	Fam122b	NP_001077263.1 A2VDS8	<i>Bos taurus</i>	9'09	1
216.	FLJ20436(N)		AAO47890.1 Q861R7	<i>Capra hircus</i>	8'7	1
217.	hCG 2023567, isoform CRA_a (T) (N)	C3orf26	XP_535716.2 E2RB18	<i>Canis familiaris</i>	9'01	1
218.	hCG 2041441 (N)		EAW64413.1	<i>Homo sapiens</i>	9'70	1
219.	hCG1990170, isoform CRA_c (N)		D6W4X8	<i>Homo sapiens</i>	11'16	1
220.	hCG1992986 (N)		EAW55872.1	<i>Homo sapiens</i>	9'11	1
221.	Hypothetical LOC100132249 (N)	LOC100132249	F1T0E9	<i>Homo sapiens</i>	9'29	1
222.	Hypothetical protein (N)		I38022	<i>Homo sapiens</i>	10'69	1
223.	Hypothetical protein (N)		BAB18158 Q9GKU8	<i>Macaca fascicularis</i>	8'49	1
224.	Hypothetical protein LOC100039042 (N)	Gm16368	NP_001116134.1	<i>Mus musculus</i>	9'02	1
225.	Hypothetical protein LOC100613474 (N)*		XP_003311469.1	<i>Pan troglodytes</i>	16.85	2

226.	Hypothetical protein LOC285556 (T) (N)*	LOC285556	XP_001717475.1	<i>Homo sapiens</i>	9'51	1
227.	Hypothetical protein LOC292078 (N)	RGD1561507	NP_001099665.1 D3Z8L2	<i>Rattus norvegicus</i>	18'45	2
228.	Hypothetical protein LOC507810 (T) (N)	FAM166B	NP_001033602.1 Q2TBR5	<i>Bos taurus</i>	8'54	1
229.	Hypothetical protein LOC512887 (N)	LOC512887	NP_001095435.1 A6QP41	<i>Bos taurus</i>	10'05	1
230.	Hypothetical protein LOC515411 (N)	MGC165780	NP_001095493.1 A6QQV1	<i>Bos taurus</i>	9'57	1
231.	Hypothetical protein LOC70864 (T) (N)	Fam47a	NP_001158211.1	<i>Mus musculus</i>	9'11	1
232.	Hypothetical protein LOC72355 (N)	2210021J22R ik	NP_932115.2 E9PUA4	<i>Mus musculus</i>	16'48	2
233.	Hypothetical protein LOC73347 (N)	1700042B14 Rik	NP_001075140.1 Q9D9N2	<i>Mus musculus</i>	8'00	1
234.	Hypothetical protein XP_537173 (N)*	LOC480051	XP_537173.2	<i>Canis familiaris</i>	18'50	2
235.	Hypothetical protein XP_863263 (N)*	LOC611520	XP_868356.1	<i>Canis familiaris</i>	16'24	2
236.	Hypothetical protein (N)*	LOC784700	XP_001252219.1	<i>Bos taurus</i>	9'32	
237.	Hypothetical protein (N)*		XP_001256479.2	<i>Bos taurus</i>	8'01	1
238.	Hypothetical protein (N)*		XP_609226.4	<i>Bos taurus</i>	10'54	1
239.	Leucine zipper transcription factor-like 1 (T) (N)	LZTFL1	NP_001029597.1 Q3ZBL4	<i>Bos taurus</i>	14'65	1
240.	mCG1032950(N)		EDL18341	<i>Mus musculus</i>	8'33	1
241.	mCG118705-like(N)*		XP_608817.5	<i>Bos taurus</i>	36'41	3
242.	mCG12033-slit homolog 3 protein (N)precursor (T) (N)	Slit3	NP_035542.2	<i>Mus musculus</i>	8'64	1
243.	Phytoene synthase-like precursor(N)	C14H8ORF3 8	NP_001098859.1	<i>Bos taurus</i>	8'23	1
244.	Possible J 56 gene segment (HCG2039797) (N)	Tcr-alpha	AAB86742.1 A0N4V7	<i>Homo sapiens</i>	10'62	1
245.	Protein PIEZO2 (G) (N)	Tcr-alpha	NP_071351.2 Q9H5I5	<i>Homo sapiens</i>	8'85	1
246.	Protein S100-A15A-like(N)*	S100-A15A	XP_001110484.2	<i>Macaca mulatta</i>	10'76	1
247.	Protein THEMIS3 (N)	Themis3	Q9CU24	<i>Mus musculus</i>	10'04	1
248.	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1-like (N)*		UPI0001DEAFB 3	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	23'90	2
249.	Shroom, isoform CRA_b (N)		EAX05795.1	<i>Homo sapiens</i>	8'43	1
250.	Similar to KIAA0753(N)*	LOC512933	XP_590544.3	<i>Bos taurus</i>	8'65	1
251.	Similar to Uncharacterized protein c20orf26(N)*	LOC1000501 60	XP_001489722.1	<i>Equus caballus</i>	8'28	1
252.	Sperm flagellar protein 2 (Protein KPL2) (T) (N)	Spef2	Q9R095.2	<i>Rattus norvegicus</i>	10'49	1
253.	Survival motor neuron domain containing 1, isoform CRA_b(N)		EDL01698.1	<i>Mus musculus</i>	10'07	1
254.	Testis expressed 15 (T) (N)	TEX15	XP_001084805.2	<i>Macaca mulatta</i>	11'21	1
255.	Unknown (protein for MGC:159455) (N)		AAI42385.1 A5PK72	<i>Bos taurus</i>	7'99	1
256.	Unnamed protein product (N)		BAA87885.1	<i>Mus</i>	9'08	1

			Q9QYM3	<i>musculus</i>		
257.	Unnamed protein product (N)		BAB14000.1	<i>Homo sapiens</i>	8'51	1
258.	Unnamed protein product (N)		BAC27998.1 Q8BSK9	<i>Mus musculus</i>	47'18	4
259.	Unnamed protein product (N)	Gm10265	BAC33463.1 Q8C800	<i>Mus musculus</i>	16'43	2
260.	Unnamed protein product (N)	Tmem65	BAC25462.1 Q8CES4	<i>Mus musculus</i>	8'61	1
261.	Unnamed protein product cDNA FLJ27197 fis, clone SYN02846 (N)		BAC85409.1 Q6ZNT6	<i>Homo sapiens</i>	8'22	1
262.	Unnamed protein product cDNA FLJ16727 fis, clone UTERU3015069 (N)		BAD18653.1 Q6ZMS2	<i>Homo sapiens</i>	18'11	2
263.	Unnamed protein product (N)	1700062I23R ik	BAE20795.1 Q3V2K2	<i>Mus musculus</i>	9'09	1
264.	Unnamed protein product (N)		BAE88510.1	<i>Macaca fascicularis</i>	101'04	11
265.	Unnamed protein product (N)		BAE89746.1	<i>Macaca fascicularis</i>	8'99	1
266.	Unnamed protein product cDNA FLJ44107 fis, clone TESTI4044296 (N)		BAC86437.1 Q6ZTZ0	<i>Homo sapiens</i>	12'60	1
267.	Unnamed protein product (N)		BAC3582.1	<i>Mus musculus</i>	20'82	2
268.	Unnamed protein product (N)		BAE88285.1	<i>Macaca fascicularis</i>	8'11	1
269.	WD repeat-containing protein on Y chromosome-like [Pan troglodytes] (N)*	Efcab8	XP_530284.3	<i>Pan troglodytes</i>	8'13	1
11. Proteoglicanos						
270.	Dentin sialophosphoprotein preproprotein (G) (S) (T) (N)	Dspp	NP_055023.2 Q9NZW4	<i>Homo sapiens</i>	9'73	1

Anexo III. Proteínas del fluido oviductal porcino en fase folicular tardía obtenidas en el presente estudio analizadas y agrupadas según la plataforma <http://www.ingenuity.com/>

Grupos	Funciones	Genes implicados
1	Modificación post-traducciona , plegamiento proteico, enfermedades y condiciones dermatológicas	AIP, ALB, ANXA6, BAG3, CD86, Cytokeratin, Dynamin, ERK1/2, HSP, Hsp90, HSP90AA1, HSP90B1, HSPA8, HSPA12B, HSPA1A/HSPA1B, HSPH1, Ige, IgG, IgG1, IL12 (complex), KRT1, KRT9, KRT10, LGALS3, MAPKAPK5, MHC Class I (complex), NADPH oxidase, OVGPI, PDIA3, RICTOR, SACS, SERPINA1, ST13, STIP1, TF
2	Ensamblaje y organización celular, morfología celular, función y mantenimiento celular	ABLIM2, ACTB, ACTG1, Actin, AKAP13, Alpha Actinin, ARHGEF1, CAP1, Chymotrypsin, Cofilin, CORO1A, CTNND1, DHX58, DLC1, DPYSL2, EZR, F Actin, FABP5, G-Actin, GSN, HP, HPX, IL23A, NFAT (complex), NFkB (complex), NOD2, P2RX7, PTPN13, Ras homolog, RhoGap, Rock, S100A11, TESK2, TPI1, TTN
3	Metabolismo de los carbohidratos, cancer, enfermedad del sistema reproductor	ABCG2, AFF4, Alpha tubulin, Beta Tubulin, CCT4, CHD7, DOT1L, Eif4g, ENO1, EPC1, Estrogen Receptor, G6PC, GC, GORASP2, Growth hormone, HISTONE, Hsp27, Hsp70, KIF22, Laminin, LDHB, MRE11A, NCOA3, NRIP1, PCSK5, PFKP, PGK1, PI3K (complex), PIK3R3, SLC9A3R1, STMN2, T3-TR-RXR, TUBA1A, TUBB2C, Tubulin
4	Enfermedad neurológica, trastorno genético, trastorno esquelético y muscular	14-3-3, 26s Proteasome, Akt, ATP2B1, ATP9A, BIRC6, BRCA1, Calpain, CaMKII, Caspase, CAST, CHAT, Ck2, Creb, CRYM, Cytochrome c, EEF2, FSH, GRIA1, GRIN2A, Gsk3, HPSE, KALRN, KIF21A, MACF1, NMDA Receptor, PDXK, PSMD8, PSMD13, Rb, SORBS2, TYR, Ubiquitin, VCP, YWHAE
5	Expresión génica, trastorno genético, enfermedad metabólica	Alpha actin, ATG10, ATG12, BLNK, BMP2K, GATA4, hCG, Histone h3, HSD11B1, IL1, Immunoglobulin, Insulin, Interferon alpha, Jnk, LARP1B, LDL, Lh, LY75, MAFF, MCM10, MIB2, MKI67, NDUFA1, OTUD4, P38 MAPK, Pka, Pkc(s), PKLR, PLB1, PLC gamma, RNA polymerase II, STAB1, TRIM22, UHRF1, Vegf

6	Enfermedades y condiciones dermatológicas, trastorno genético, morfología celular	ADCY3, ARRB1, ASXL3, ATP2B2, Ca ²⁺ , CACHD1, CHD1, CLEC3B, DLG4, EZH1, EZH2, FRAS1, GPRC6A, HECTD1, IGSF1, JUN, Keratin, KIAA0947, MYRIP, PADI3, PLEKHH3, RANBP10, RSF1, SCYL2, SDK1, SDK2, SIPA1L1, SLC30A1, TCF20, THSD7B, TMC6, TMC8, USP21, USP24, ZMIZ1
7	Ciclo celular; replicación, recombinación y reparación del AND; desarrollo y función del sistema reproductor	ABCA13, ABCB7, ATAD2, ATP, AURKA, BCCIP, CA1, CA2, CALU, CDCA3, CDKN1A, CEP192, DMPK, EPO, FBXL2, FBXO9, FBXO41, FECH, FXN, FXYD1, HDAC4, HDAC11, KCNK5, LOC728622/SKP1, MSH4, MSH5, N4BP2, NMNAT1, REV3L, RORA, STK11, TM7SF4, TNFSF11, VGLL4, XRCC3
8	Desarrollo celular, crecimiento y proliferación celular, desarrollo y función del tejido conectivo	ARFGEF2, ARHGAP19, ATP13A3, BMP2, CAPN12, CNOT10, CPEB3, DHRS7, ERBB2, EVC2, FASLG, GDF6, GGPS1, GOLPH3, Histone h4, HSD17B, HSD17B8, HSD17B12, HSD17B13, KCNG1, KIFC3, LTBP3, MFI2, NFYB, NUP210, OSM, PITPNM3, RHCE/RHD, SH3RF2, SLIT3, SOLH, SPAG4, TAX1BP3, TGFB1, TOB1
9	Trastorno genético, trastorno esquelético y muscular, expresión génica	ADAMTS2, ATOH1, AXIN2, CDC42EP1, CLEC2A, DLEU1, DPAGT1, GDF7, Hydrogen peroxide, Let-7, LOC643751, MDN1, Mir-7, Mir-99, Mir-214, Mir-342, MIR17HG, Myb, MYC, Rn5s, Rps20, SCAF11, SCPEP1, SKIL, SMAD7, SPRR3, SUCLA2, TMEM2, Tretinoin, TRMT1, TST, UGT8, WNT2B, WNT3A, ZZEF1
10	Desarrollo y función del sistema cardiovascular, desarrollo de organismos, señalización e interacción célula-célula	ACAT2, CELSR2, Collagen(s), ERK, Focal adhesion kinase, Gpcr, GPR61, GPR84, GPR113, GPR114, GPR144, GPR152, GPR162, GPR171, GPR174, GPR180, GPR89A/GPR89B, GPR89C, ITGAM, Mapk, MC1R, NCOA5, PDGF BB, PLC, PPYR1, Rac, Ras, ROR1, SCLT1, SHC2, SYNE1, TAAR3, TAAR8, VN1R2, VN1R3

11	Muerte celular, desarrollo y función del sistema esquelético y enfermedad inflamatoria	APBB2, APP, Aspartyl Protease, ATP5O, CEP290, COX6A1, Egfr dimer, EIF3F, EIF3I, EIF3M, ESD, GRB2, HARS, HPCA, HTT, KCNC4, KCNE3, MAST1, NPTX1, Ntrk1 dimer, PITRM1, Plasminogen Activator, PLG, PRAP1, PSMB2, RBM7, RNF40, SLC40A1, SPINK5, SRRM2, SRRT, TRAF6, TRAFD1, ZNF274, ZNF675
12	Morfología celular, respuesta inmune mediada por células, desarrollo celular	ATF4, BOC, CASP5, Cbp, CDKN2AIP, CLEC10A, CLEC4E, CMIP, DAPK3, DNASE2, FYN, GART, Gbp1, GLIPR2, GPNMB, HNRPLL, HRH1, Ifi47, IFNG, IL13, IL22RA2, IL31RA, Ly6, PCF11, POLR2A, PTPRT, SCGB3A1, SHANK3, SLC26A4, SNCA, STAT3, TPPP3, TSEN2, TSEN34, TSEN54
13	Enfermedad cardiovascular, desarrollo y función del sistema cardiovascular, desarrollo de órganos	LECT1, SP3
14	Ensamblaje y organización celular, metabolismo de los aminoácidos, transporte molecular	APBA1, CNTNAP3
15	Ciclo celular, desarrollo y función del sistema reproductor, función y mantenimiento celular	LMTK3, ZBTB16
16	Lesión y anomalías de los organismos, compromiso celular, enfermedad gastrointestinal	KEAP1, KIAA0564
17	Enfermedad auditiva, trastorno genético, trastorno neurológico	TRMU, tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferase
18	Muerte celular, desarrollo y	

	funcion del sistema reproductor, morfología tisular	DAZ1/DAZ4, DZIP1
19	Bioquímica de moléculas pequeñas	Acylphosphatase, ACYP2
20	Desarrollo y función del sistema reproductor, ensamblaje y organización celular, desarrollo y función del sistema nervioso	FAM178A, OPTN, SCHIP1
21	Carbohydrate Metabolism, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hair and Skin Development and Function	HCFC1, OGT, THAP3
22	Daño y reparación del ARN, expresión génica, modificación post-transcripcional del ARN	HNRNPD, L-lactate dehydrogenase, LDHAL6B
23	Desarrollo y función del sistema cardiovascular, desarrollo embrionario, morfología tisular	NCOA6, TLE1, TLE2, UTY
24	Transporte molecular; replicación, recombinación y reparación del ADN, producción energética	ATP6V1C2, H ⁺ -exporting ATPase, H ⁺ -transporting two-sector ATPase, Vacuolar H ⁺ ATPase, VMA21

Anexo IV. Proteínas del fluido oviductal bovino en fase folicular tardía obtenidas en el presente estudio analizadas y agrupadas según la plataforma <http://www.ingenuity.com/>

Grupos	Funciones	Proteínas implicadas
1	Morfología celular, función y desarrollo del sistema hematológico, hematopoyesis	ACO1, ADAMTS9, ALAD, APOA1, APOE, DSPP, Elastase, Ferritin, Fibrin, Fibrinogen, Growth hormone, HBB, HBD, HDL, Hemoglobina, HFE, ITIH5, Laminin, LDL, lymphotoxin-alpha 1-beta2, MIF, MMP1, NFkB (complex), Nos, PLG, PLK2, PRDX2, Pro-inflammatory Cytokine, PTPN13, SAA, SCARB1, Sod, TF, Tnf receptor, Trypsin
2	Señalización e interacción célula-célula, ensamblaje y organización celular, función y mantenimiento celular	AP3B2, BUD31, CCDC85B, CDHR1, CLIC6, DFNA5, DLG4, DRD2, DSCAML1, GBE1, GDI2, GIN1, GPR63, GPR123, GPR137, GPX7, HNF4A, HSDL2, KRT78, LRRTM2, MSRB2, NLGN1, ODZ4, PIP, SBNO2, SCAND1, SIRT2, SLC35A1, SLC35A5, SLC39A1, SYT17, TGFB1, TTC22, VN1R1, ZNF167
3	Enfermedad metabólica, enfermedad renal y urológica, lesión del tubulo renal	Actin, Akt, ALB, Ap1, Calmodulin, Caspase, DNAJC16, Gm-csf, GSTP1, hCG, HSP, Hsp27, Hsp70, Hsp90, HSP90B1, HSPA1A/HSPA1B, HSPB1, ICAM1, IFN Beta, IgG, IL12 (complex), Insulin, Interferon alpha, Jnk, MHC Class II (complex), P38 MAPK, PDIA3, PDIA4, PI3K (complex), PPEF2, PRX, STIP1, Tlr, Tnf, TROVE2
4	Crecimiento y proliferación celular, hematopoyesis, desarrollo tisular	BLNK, CD40, Collagen Alpha1, Collagen type I, Collagen type IV, Collagen(s), CSF1, CSF3, Cyclin A, DCN, ERK1/2, IgG1, Igm, IL1, Immunoglobulin, Integrin, JINK1/2, LAIR1, MAP2K1/2, MFG8, NFAT (complex), Nfkb1-RelA, NOS2, OVGPI, p70 S6k, p85 (pik3r), Pdgf (complex), PDGF BB, PIK3CA, PLC gamma, Rap1, SERPINF1, SYK/ZAP, Tgf beta, TNFSF11
5	Morfología de los órganos, desarrollo y función del sistema reproductor, desarrollo y función del sistema renal y urológico	AGR2, ARHGEF5, CELSR3, Egfr-ErbB2, ERBB2, FAM122B, GH1, GPANK1, GPRIN1, GRB2, GSTZ1, IGF2, IGF2BP3, LSR, LZTFL1, MLXIP, MSMB, OCRL, PDAP1, PXN, Pzp, QDPR, RAE1, REEP4, RPL17, RPS23, SEMA7A, SFN, SH2D3A, SHROOM3, SMU1, SRD5A2, ST5, testosterone, TKT

6	Metabolismo de fármacos, metabolismo lipídico, bioquímica de moléculas pequeñas	ALDH1A1, ATIC, CCDC87, CKB, CKMT1A/CKMT1B, CYP4F2, EMR2, EMR3, FFAR3, GAPDH, GPR21, IL17RE, KCTD15, NAV2, P2RY11 (includes others), PLEKHB1, PPAR ligand-PPAR γ -Retinoic acid-RXR, PPP3CC, QRICH2, Retinoic acid-CRABP2-RAR-RXR, RRH, Rxr, SCAMP2, SLC8A2, SMNDC1, SREBF1, TGFBR1, TNFRSF11A, TPI1, TRAF6, Tretinoin, TSR1, Type I Receptor, WSB1, YWHAZ
7	Respuesta antimicrobiana, muerte celular transporte molecular	ANKRD6, ARAP2, BAI3, C11orf82, CCDC130, CHI3L2, CLEC5A, CLK3, DNAJB7, Gbp4, GIP2 (human), GPR87, GPR126, GPR146, GPR176, GSK3B, HSP90AB1, IFNG, IRF4, MC1R, Myhs, NANS, PAFAH1B3, RAB20, Raet1b, RB1CC1, RNF149, SERPINI2, SLC28A1, SLIT1, SOD2, Taok2 (mouse), TNF, TP53, TRAF2
8	Desarrollo y función del sistema cardiovascular, señalización e interacción célula-célula, compromiso celular	ABLIM, ADAM9, ADAM18, ADAM20, ADAM21, ADAM23, ADAM29, ADAM30, BRDT, CACNA1B, CFH, Ck2, Creb, CREBL2, ERK, ERMAP, FSH, Histone h3, Histone h4, KIDINS220, Lh, LOC81691, Mapk, Metalloprotease, Mmp, PDLIM3, Pka, Pkc(s), QRFP, Rac, Ras, RNA polymerase II, TESK1, TNFAIP1, Vegf
9	Morfología celular, desarrollo y función del sistema digestivo, morfología de los órganos	CCDC77, E2F4
10	Modificación post-Transcripcional del ARN	FAM69B, RBMS2
11	Metabolismo de carbohidratos, enfermedad gastrointestinal, trastorno genético	MLKL, PBX2, PITPNA
12	Bioquímica de moléculas pequeñas, compromiso celular, metabolismo de los aminoácidos	2-aminoadipate transaminase, 2-aminoadipic acid, AADAT, kynurenine-oxoglutarate transaminase

Anexo V. Genes obtenidos del análisis mediante micromatrices del oviducto porcino en fase folicular tardía analizados y agrupados según la plataforma <http://www.ingenuity.com/>

Grupos	Funciones	Genes implicados
1	Señalización celular, metabolismo de los ácidos nucleicos, bioquímica de moléculas pequeñas.	CALCR, CALCRL, CCRL2, CD97, CMKLR1, CXCR6, FFAR2, Gpcr, GPR83, GPRC5B, HCRTR1, HCRTR2, HRH4, HTR1D, HTR1F, KISS1R, LPAR3, LYST, MC1R, MC4R, MCHR1, NPY2R, OPN1SW, P2RY1, P2RY4, P2RY6, PPYR1, RAMP1, RAMP2, RAMP3, Relaxin, RXFP4, TAS1R3, VIPR1, XCR1
2	Muerte celular, enfermedades neurológicas, ciclo celular	APOE, AR, ATM, BAX, BRCA1, CASP3, CDS1, CETN3, CREB1, CTNNB1, EDN1, EPO, IKBKG, IL2, Il-4 receptor, IMPACT, LGALS3, Lh, LMCD1, MYC, NDP, ODAM, PROP1, PSME3, PTGFR, QPCT, RELA, RPL27, RPN1, RPS12, SEPHS2, SIRT5, SUCLA2, TRAF6, UBE2J1
3	Enfermedades inmunológicas, expresión génica, muerte celular	3 BETA HSD, APTX, BCL2, CD40, CD302, CD40LG, CEBPA, CEBPB, CSF2, FAS, FASLG, GHRHR, HNF1A, IGF1, IL8, IL10, Immunoglobulin, Interferon- α Induced, MAPK8, MBP, MC2R, NFKBIA, OSTF1, PGD, PTH1R, Scf Trecp beta, SLC11A1, SLC4A2, SLC7A2, Sphingomyelinase, SRSF1, ST8SIA4, TNFRSF1A, VPS33A, WNT10B
4	Enfermedades nutricionales, desarrollo y función del sistema digestivo, trastornos psicológicos	Adrenoceptor, AGRP, ASIP, ATRN, CHGA, CNN2, CPE, CPEB1, DIO1, DIO2, DIO3, Dynein, ERK, FAU, GALP, GNRH1, HCRT, IL-2R, LCN1, MCHR2, Ncx, PCDH11X/PCDH11Y, peroxidase (miscellaneous), PMCH, PRDX5, PRDX6, PREP, PSPH, RPS28, SCG2, SCG5, SLN, TFG, thyroxine deiodinase, TXN

5	Movimiento celular, señalización e interacción célula-célula, desarrollo y función del sistema hematológico	ADAM17, AFP, C-C CHEMOKINE RECEPTOR, C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR, CCL19, CCL20, CCL25, Ccr, CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CCRL1, CHEMOKINE, CHEMOKINE RECEPTOR, CX3CL1, CXCL2, CXCL9, CXCL14, CXCR2, CXCR3, CXCR4, DARC, HNF1B, IL4R, IL6R, Neurotrophin, OPRK1, P2RY2, TBK1, Tnf
6	Enfermedad inflamatoria, enfermedad oftálmica, morfología de órganos	AQP1, ARNTL, CGA, COX6B1, COX6C, COX7A1, COX7A2, CTSH, CTSL2, Cytochrome c, Cytochrome c oxidase, DDX39B, Glutathione peroxidase, GPX1, GPX2, GPX4, GPX5, IL2RA, LHX3, LOC100505503/RPS17, MCL1, MUT, Oas, PGK1, PMAIP1, PRKAA2, PRKAR1A, PRL, Ptk, REL/RELA/RELB, RNASEL, SFTPb, STAR, STAT, TMSB10/TMSB4X
7	Modificación post-transcripcional del ARN, síntesis de proteínas, expresión génica	ADRA2A, ADSSL1, AHCY, alcohol dehydrogenase, DHRS4, DPYD, EEF1A1, EIF4A, EIF4A1, EIF4A2, EIF4A3, EIF4E, EIF4E2, EIF4F, Eif4g, ELANE, GEM, HBXIP, Hsp27, KIF5B, PGLYRP1, PNN, PTBP1, RPS29, SDHA, SDHB, SDHD, SERPINB9, SFRS18, SLC27A2, Succinate dehydrogenase, succinate dehydrogenase (ubiquinone), TRA2B, YWHAQ, YWHAZ
8	Metabolismo lipídico, bioquímica de moléculas pequeñas	ABHD5, Acox, ACOX1, ACSL4, ANGPTL4, APOB, CALCB, CPT1, CPT1B, CYB5A, CYP17, CYP17A1, DBI, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase, EHHADH, FADS2, LDL-cholesterol, LEPR, LPL, PDYN, PLIN1, PNOC, PNPLA2, POMC, PPARA, PPARD, SCD, SCP2, Soat, SRSF2, SRSF4, SRSF6, Stearoyl-CoA 9-desaturase, THOP1, UCP2
9	Transporte molecular, metabolismo lipídico, bioquímica de moléculas	ACADM, AEBP1, AQP3, AQP5, AQP9, CD80/CD86, CIDEc, CLEC5A, CTNNA-CTNNB1-CTNNG-

	pequeñas	CDH5, Ecm, ETFA, ETFB, FADS1, FMO1, HEXA, HEXB, HLA-DQ, IDH2, Ifn gamma receptor, KLF7, KMO, MMD, MYOC, NR6A1, PEMT, PRM2, RNASE4, RNase A, ROMO1, SPARCL1, St3gal, ST3GAL1, ST3GAL3, TNF, TNF-A/B
10	Producción de energía, metabolismo de ácidos nucleicos, bioquímica de moléculas pequeñas	Adenosine-tetraphosphatase, aldo, ATP5G1, ATP5G2, ATP5I, ATP5J2, ATP5L, ATP6V1A, ATP6V1H, AVP, CKM, COMP, CTSD, DNMT1, DNMT3A, ENO3, Enolase, FBP1, GRN, H ⁺ -transporting two-sector ATPase, HBE1, Hexokinase, HK2, KCNA1, KCNA2, KCNA5, KCNE1, KDM1A, MEF2A, P-TEFb, PTGDS, Rsk, TMBIM6, Vacuolar H ⁺ ATPase, XIRP2
11	Movimiento celular, trastorno genético, trastornos esqueléticos y musculares	ACTB, ANGPTL2, ATM/ATR, BIRC5, CAV1, COL6A1, COL6A2, COL6A3, DUOX1, EFNB2, FN1, HN1L, HRAS, HTR2A, KDR, KITLG, KLF5, LY75, MDM2, MMP9, MYBPH, OXCT1, P38 MAPK, PPP2CA, PTH, SMAD3, SMAD3-SMAD4-TOB, SMPX, SNRPE, ST6GALNAC2, STAT3, Stat1-Stat3, TGFBR1, TNNC2, Vegf
12	Desarrollo celular, respuesta antimicrobiana, respuesta inflamatoria	ANGPTL6, CASP1, CASQ2, CXCL10, CYB561, Cytochrome p450, DNASE1, Endothelin, FADD, FUT2, HMBS, IFITM1, IFN Beta, Ifn gamma, IFNA1/IFNA13, IFNB1, IFNGR2, IL15, Interferon alpha, IRF1, IRF3, IRF8, IRF3 dimer, ISG20, NDUFA4, NPPA, PARK7, SLC2A11, SQLE, STAT1, STAT2, STAT4, SUMO1, TAP1, TNFSF10
13	Ciclo celular, montaje y organización celular, cáncer	BEST1, BTG2, CCNB1, CD34, Cdc2, CDC20, Cdk, CDKN1B, Cyclin A, Cyclin B, Cyclin E, DDC, DLAT, DLD, DLST, DUOX2, E2f, EF-1 alpha, FTH1, FZR1, GAST, GDF11, GFAP, MYO5A, PLA2G7, PTTG1, RAB14, RAB1B, Rnr, RPS16, SFN, SPDYA, TF, TFRC, TGFA

14	Enfermedad inflamatoria, señalización e interacción célula-célula, desarrollo tisular	Anti-inflammatory Cytokine, BGN, C1q, C1QA, C1QB, C1QC, C1R, C1S, CD72, CD80, Complement component 1, CRP, DCN, FBN1, FBN2, Fibrinogen, FMOD, HAS3, Iga, Igm, Integrin alpha V beta 3, ITGA2, ITGB6, ITGB8, Laminin, MSMB, MSTN, NAT6, PECAM1, PGRMC2, PIGR, PKIG, SLC23A2, Tenascin, TGFB1
15	Trastorno genético, enfermedad nutricional, metabolismo lipídico	ADIPOQ, ADM, AKAP13, ATP4A, BGLAP, CCND2, CD36, CFTR, CLPS, DDX4, GJA4, H+/K+-exchanging ATPase, Hat, hCG, Histone h3, Histone h4, Holo RNA polymerase II, MAEL, MRN, MUC13, NOS3, PCNA, PPARG, PRKACA, RNA polymerase II, RPL12, SCARB1, SCNN1A, SLC4A4, SPP1, STEAP1, TAF4B, TGFB2, TIP60, UBB
16	Enfermedades del tejido conectivo, enfermedad genética, enfermedades y condiciones de dermatológicas	15-LOX, AIMP1, ALOX15, COL10A1, COL1A1, COL1A2, COL4A3, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL8A1, Collagen type I, Collagen type III, Collagen(s), CSN2, CTSK, Eotaxin, FAAH, GAL, HBEGF, IBSP, ITGAV, KLF9, LALBA, MEOX2, MMP14, P4HA1, Pdgf Ab, PDGF-AA, Pkg, SELP, SPARC, VTN, VWF, Wnt
17	Movimiento celular, señalización celular, transporte molecular	AGTR2, Ap1, AVPR2, BDKRB1, Beta Arrestin, C5AR1, Cathepsin, CHRM2, DNAJA4, EDNRA, FGF2, FSHR, GBA, GNRH, GNRHR, Gαq, Mek, MET, Metalloprotease, MIF, NfkB1-RelA, OXTR, PLAU, PRKG1, RGS1, SCARB2, SELE, SSTR2, Tgf beta, THBS1, TIMP1, TRA2A, TSHR, TXNIP, VEGFA
18	Metabolismo de lipídico, transporte molecular, bioquímica de moléculas	ABCG5, ABCG8, Abcg5/Abcg8, ACSL, CBR1, CYP26A1, CYP4F2, EGFR, FABP, FABP1, FABP2,

	pequeñas	FABP3, FABP4, FABP5, FABP6, FABP7, FUT8, Grb2-Shc1-Sos, HR, IL17a dimer, LIPE, LXR ligand-LXR-Retinoic acid-RXR α , NCOR-LXR-Oxysterol-RXR-9 cis RA, Nr1h, NR1H3, OAZ1, POU3F3, PTGIS, Rxr, RXRG, SCAMP1, SLC5A1, sPla2, TBXAS1, TPI1
19	Producción de energía, metabolismo lipídico, bioquímica de moléculas pequeñas	Calbindin, Cg, CITED1, CNN3, CRAT, CS, CYP8B1, DECR1, ERCC2, ESR1, esr1/esr2, FH, GOT2, Gpd, Hsd11b, HSD11B1, HSD11B2, IDH3B, Malate dehydrogenase, MDH1, MDH2, NR3C2, Nuclear factor 1, PC, PLAGL1, PPAR α -RXR α , QKI, RBM39, RNA polymerase I, S100G, SEPX1, SLC27A1, TAF1B, TFAP2B, TFIIH
20	Ciclo celular, desarrollo embrionario, desarrollo de organismos	Alpha catenin, APC/APC2, Cadherin, Cadherin (E,N,P,VE), CaMK I, CAMK2G, CD70, CDH1, CDH5, CDH13, COPS2, COPS4, COPS5, Ctnna, CTNNA1, DYNC1H1, ENSA, EPRS, GNB2L1, HNRNPAB, IKBKB, JUP, LDLR, LRP, MAPRE1, MOBKL3, MYO7A, Ndpk, NME2, NPC1, Presenilin, PSEN1, PSEN2, Secretase gamma, TOR1A
21	Lesión y anormalidades de los organismos, trastornos esqueléticos y musculares, enfermedades infecciosas	AMPK, ATG5, ATXN10, CAPZA2, CAT, CCS, Creatine Kinase, Cyp2b, Cytoplasmic Dynein, DAB1, FASN, FOXO3, HMG CoA synthase, HYAL1, HYAL2, HYAL3, Hyaluronidase, INSIG1, Ldh, LDHB, MKI67, MUC1, Mucin, PAFAH1B1, PGRMC1, RETN, SCAP, SELL, SFXN1, SIRT1, SIRT2, Sod, SOD2, SRC, TKT
22	Metabolismo de los carbohidratos, metabolismo de los ácidos	AGPAT1, APEH, APP, ARL1, BPIL1, CALML4, CDCA7L, CMAH, CRYZL1, ECE2, ECI2, FEZF2,

	nucleicos, bioquímica de moléculas pequeñas	FZD3, GALM, HNF4A, HPD, IL4, KIAA0174, MAOA, MCEE, MRPS11, MTR, NLN, NUDT2, PET112L, PGM1, PGM3, PRR3, SLC35A3, SLC35D1, SLC7A11, SPAST, SUCLG1, TUFT1, ZAN
23	Señalización e interacción célula-célula, desarrollo y función del sistema reproductivo, montaje y organización celular	ACR, ALCAM, ALDH2, DCT, DLK1, ENAM, ERBB4 ligand, ERK1/2, Erk1/2 dimer, F11R, HSBP1, IL22R1-IL10R2, KCNA6, KCNAB1, KCND2, KCND3, KCNIP1, KLF13, Mac1, MFGE8, NPPC, OVGP1, PCBP2, PKC alpha/beta, Pki, Potassium Channel, RLN3, SLC12A4, SMAD1/5, Stat1/3, TCDD-AHR, TMEFF2, TNFRSF8, ZP2, ZP3
24	Desarrollo y función del sistema esquelético y muscular, morfología de los tejidos, trastornos esqueléticos y musculares	Actin, Alpha actin, Arp2/3, ATPase, DMD, ELSPBP1, F Actin, Fascin, FSCN3, HAND1, IGF1R, MEF2, MEF2C, MLPH, MYF6, MYH7, MYOCD, MYOD1, MYOG, PP1-C, PPP1CB, RPL7, RPS26, TMOD3, Tni, TNNI1, TNNI2, TNNT1, TNNT3, TPM1, TPM2, TPM3, TPM4, Tropomyosin, Troponin t
25	Expresión génica, metabolismolipídico, bioquímica de moléculas pequeñas	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, CNN1, CYP2R1, CYP7A1, ECH1, enoyl-CoA hydratase, ESR2, Esr1-Esr1-estrogen-estrogen, Estrogen Receptor, Gcn5l, GHR, HADHA, KDM5C, LHCGR, MED7, MED27, Mediator, N-cor, NCOA1, NCOA2, NCOR1, OLR1, p160, PEPCK, PGR, POLR2B, POU2F1, PRLR, Rar, RNF4, RXRA, TFAP2A, TFF1, TRAP/Media, VDR

AnexoVI. Genes obtenidos en análisis genómico mediante microarrays de secciones oviductales de hembras adultas en la fase folicular tardía del ciclo que han resultado descritas por otros autores en diferentes especies según Avilés *et al.*, (Avilés, Gutiérrez-Adán et al. 2010). Se muestra el nombre del gen, el símbolo general y la especie en la que han sido descritos previamente. Con una (N) se indica en su caso que la proteína es de nueva descripción en el oviducto de cerda

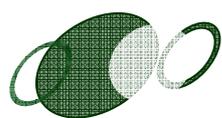
Descripción del gen	Símbolo	Número de acceso	Especie descrita anteriormente
1. Factores de crecimiento citoquinas y receptores			
Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	AREG	NM_214376	Ratona Cerde
clone:OVRM10183D03, expressed in ovary (N)	TGFB3	AK236343	Vaca
Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) (N)	CSF2	NM_214118	Ratona Mujer Vaca
Epidermal growth factor	EGF	NM_214020	Mujer Cerde
Epidermal growth factor receptor	EGFR	NM_214007	Mujer Cerde
Fibroblast growth factor 2 (N)	FGF2	AJ577089	Vaca
Fibroblast growth factor 9 (N)	FGF9	NM_213801	Vaca
Fibroblast growth factor receptor 2	FGFR2	NM_001099924	Cerde Vaca
Heparin-binding EGF-like growth factor (N)	HBEGF	NM_214299	Ratona Mujer
Insulin receptor substrate-1 (Fragment), complete (N)	TC253581	Q68H99	Buffala
Insulin-like growth factor	IGF1	NM_214256	Ratona Rata Mujer Vaca Oveja
Insulin-like growth factor 1 receptor (N)	IGF1R	NM_214172	Rata Mujer Oveja
Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	IGF2	NM_213883	Ratona Rata Vaca
Insulin-like growth factor binding protein 1, exon 1-4, complete cds (N)	IGFBP1	AB119126	Mujer
Insulin-like growth factor binding protein 2 (N)	IGFBP2	NM_214003	Mujer
Insulin-like growth factor binding protein 5 (N)	IGFBP5	NM_214099	Vaca
Insulin-like growth factor binding protein 6 (N)	IGFBP6	NM_001100190	Vaca
Insulin-like growth factor-binding protein 3 (N)	IGFBP-3	NM_001005156	Vaca Mujer
Interleukin 10	IL10	NM_214041	Cerde
Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35) (N)	IL12A	NM_213993	Mujer
Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40) (N)	IL12B	NM_214013	Mujer
Interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	NM_214399	Mujer Cerde

Interleukin 8 (N)	IL8	NM_213867	Mujer
Leukemia inhibitory factor (N)	LIF	NM_214402	Mujer
Transforming growth factor alpha	TGFA	AK233051	Ratona Mujer Cerde Buffala
Transforming growth factor, beta 1 (N)	TGFB1	NM_214015	Vaca
Transforming growth factor, beta 3 (N)	TGFB3	NM_214198	Vaca
Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa) (N)	TGFBR1	NM_001038639	Rata
Vascular endothelial growth factor	VEGFA	NM_214084	Mujer Cerde Vaca
2. Hormonas y receptores			
Activin A receptor, type IIB (N)	ACVR2B	NM_001005350	Rata
Activin receptor IIA (N)	NP277354	AAG31137.1	Rata
Adiponectin (N)	ADIPOQ	NM_214370	Rata
Adrenomedullin (N)	ADM	NM_214107	Ratona Rata
Angiotensin type II receptor, partial cds (N)	AGTR2	DQ250387	Mujer
Calcitonin receptor-like (N)	CALCRL	NM_214095	Rata
Endothelin 1 y 3 (N)	EDN1	NM_213882	Ratona Vaca
Endothelin receptor type A y B (N)	EDNRA	NM_214229	Ratona Rata
	ETB	NM_001038002	
Estrogen receptor 1 y 2 (N)	ESR1	NM_214220	Mujer Ratona Rata
	ESR2	NM_001001533	
Gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone) (N)	GNRH1	NM_214274	Rata
Gonadotropin-releasing hormone receptor (N)	GNRHR	NM_214273	Rata
Growth hormone receptor	GHR	NM_214254	Cerde
Leptin (OB)	OB	NM_213840	Ratona Rata Cerde
Leptin receptor (N)	LEPR	NM_001024587	Coneja
Natriuretic peptide precursor A	NPPA	NM_214260	Coneja Rata Cerde Vaca Yegua
Natriuretic peptide receptor 2, partial cds	NPR2	DQ487044	Cerde
Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) (N)	NOS3	NM_214295	Coneja Rata Vaca
Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib,	PAFAH1B1	NM_214250	Mujer

alpha subunit 45kDa (N)			
Progesterone receptor membrane component 1 y 2 (N)	PGRMC1 PGRMC2	NM_213911 NM_001097521	Mujer
Prolactin receptor (N)	PRLR	NM_001001868	Ratona Mujer
Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1 (N)	RAMP1	NM_214199	Rata
Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 2 (N)	RAMP2	NM_214082	Rata
Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 3 (N)	RAMP3	NM_214089	Rata
Relaxin (N)	RLN	NM_213872	Mujer
3. proteasas e inhibidores			
Aminopeptidase N	ANPEP CD130	NM_214277	Cerda
Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A)	ACE	NM_001083941	Cerda
Gelatinase A (Matrix metalloproteinase-2) (N)	MMP-2	NM_214192	Vaca
Kallikrein (N)	KLKB1	NM_214074	Mujer
Kallikrein 1 (N)	KLK1	NM_001001911	Mujer
Matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine) (N)	MMP-7	NM_214207	Mujer
Matrix metalloproteinase-1 (N)	MMP-1	AK231224	Mujer Vaca
Nexin-1 (PN-1) (N)	PN-1	NM_214287	Rata
Plasminogen activator (PLAU)	PLAU	NM_213945	Hamster Cerda Vaca
Plasminogen activator inhibitor I	PLANH1	NM_213910	Rata Cerda Vaca
Plasminogen activator, tissue (PLAT)	PLAT	NM_214054	Hamster Cerda Vaca
TIMP metallopeptidase inhibitor -1	TIMP-1	NM_213857	Cerda Vaca
4. Protección Antioxidante			
Catalase	CAT	NM_214301	Ratona Mujer Cerda Vaca
Glutathione peroxidase 1,2,4y5 (N)	GPX1	NM_214201	Ratona Vaca
	GPX2	DQ898282	
	GPX4	NM_214407	
	GPX5	NM_213886	
5. Agente de defensa			

CD59 molecule, complement regulatory protein (CD59), (N)	CD59	NM_214170	Mujer
Chemokine (C-C motif) ligand 20 (N)	CCL20	NM_001024589	Mujer
Complement component 2 (C2)	SBAB-707F1.3	NM_001101815	Cerda
Complement component 3 (C3)	C3	NM_214009	Ratona Mujer Vaca
Complement component 4 (N)	SBAB-514B12.5	EU076594	Mujer
Decay-accelerating factor CD55 (N)	DAF	NM_213815	Mujer
Elafin family member protein (N)	LOC396756	NM_213818	Mujer
Haptoglobin (HP)	HP	NM_214000	Coneja Vaca
Lysozyme (N)	LYZ	NM_214392	Mujer
Monocyte chemotactic protein (N)	MCP CD46	AK236944	Mujer
Prepro-beta-defensin 1 (N)	PBD-1	NM_213838	Mujer Vaca
Surfactant protein A (N)	L10124	L10124	Yegua
Surfactant, pulmonary-associated protein D (N)	SFTPD	NM_214110	Ratona Mujer Yegua
Toll-like receptor 1-10 (N)	TLR1-10	NM_001031775 NM_213761 NM_001097444 NM_001113039 NM_213760 NM_001097434 NM_214187 NM_213958 NM_001030534	Mujer
6. Glicosidasa			
Amylase, alpha 2B (pancreatic) (N)	AMY2B	NM_214195	Mujer
7.Otros enzimas			
Choline acetyltransferase	CHAT	NM_001001541	Cerda
Lipase, hormone-sensitive (N)	LIPE	NM_214315	Rata
Group XIIB secretory phospholipase A2-like protein (N)	PLA2G12B	AF349540	Coneja Vaca
Phospholipase A2, group IB (N)	PLA2G1B	NM_001004037	Coneja Vaca

Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma) (N)	PLA2G7	NM_001113013	Coneja Vaca
8. Chaperonas y HSP			
90-kDa heat shock protein	HSP90	NM_213973	Cerda
DnaJ homolog, subfamily A, member 4 (DNAJA4) (N)	Hsp40	NM_214339	Vaca
ERp57 (N)	TC284844	Q4VIT4	Vaca
Grp78 protein (N)	HSPA5	X92446	Mujer Vaca
Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1 (HSP90B1), endoplasmic.	GP96	NM_214103	Vaca
9. Otras proteínas			
Albumin (ALB)	ALB	NM_001005208	Coneja Mujer Mona Cerda Vaca
Annexin A2,8 (N)	ANXA2, ANXA8	NM_001005726 Q95L54	Vaca
Chromogranin A	CHGA	M20926	Cerda Vaca
Clusterin	CLU	NM_213971	Cerda
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (N)	CFTR	NM_001104950	Rata
Folate receptor 1 (adult) (N)	FOLR1	NM_214311	Mujer
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	LAMP-1	NM_001011507	Cerda
Mu opioid receptor (N)	MOR	NM_001001538	Yegua
Oviductal glycoprotein 1, 120kDa	OVGP1	NM_214070	Coneja Oveja
Phospholipid transfer protein (N)	PLTP	NM_214283	Ratona
Retinol binding protein 2, cellular	RBP2	NM_214451	Yegua
Retinol binding protein 4, plasma (RBP4)	RBP4	NM_214057	Yegua
Retinol binding protein 5, cellular {Homo sapiens} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete (N)	TC245753	BC029355	Yegua
Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1) (SPP1) (N)	SPP1	NM_214023	Mujer Vaca Yegua
Sperm associated AWN protein	AWN	NM_213829	Cerda
10. Proteoglicano			
Syndecan 4 (N)	SDC4	NM_214284	Vaca



BIBLIOGRAFÍA

- Abbott A, Ducibella T. 2001.** Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci* 6:D792-806.
- Abe H, Hoshi H. 2007.** Regional and cyclic variations in the ultrastructural features of secretory cells in the oviductal epithelium of the Chinese Meishan pig. *Reprod Domest Anim* 42(3):292-298.
- 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. *Reprod Domest Anim* 43(1):66-73.
- Abe H, Numazawa C, Abe M, Hoshi H, Oikawa T. 1993.** Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine oviductal glycoproteins. *J Exp Zool* 265(1):77-83.
- Abe H, Oikawa T. 1992.** Examination by scanning electron microscopy of oviductal epithelium of the prolific Chinese Meishan pig at follicular and luteal phases. *Anat Rec* 233(3):399-408.
- Abe H, Onodera M, Sugawara S, Satoh T, Hoshi H. 1999.** Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *J Anat* 195 (Pt 4):515-521.
- Abe H, Onodera M, Sugawara S. 1995.** Immunological detection and characterization of an estrus-associated antigen in the goat oviduct. *J Exp Zool* 272(2):134-141.
- 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. *J Reprod Fertil* 112(1):157-163.
- Abe H, Sendai Y, Satoh T, Hoshi H. 1995a.** Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev* 42(2):226-232.
- 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. *J Exp Zool* 272(1):54-61.
- Abe H. 1996.** The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol Histopathol* 11(3):743-768.
- Ahuja KK, Bolwell GP. 1983.** Probable asymmetry in the organization of components of the hamster zona pellucida. *J Reprod Fertil* 69(1):49-55.
- Almeida FF, Leal MC, França LR. 2006.** Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol Reprod* 75(5):792-799.

- Amari S, Yonezawa N, Mitsui S, Katsumata T, Hamano S, Kuwayama M, Hashimoto Y, Suzuki A, Takeda Y, Nakano M. 2001.** Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev* 59(2):221-226.
- Anderson E, Albertini DF. 1976.** Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* 71(2):680-686.
- Anderson E. 1968.** Oocyte differentiation in the sea urchin, *Arbacia punctulata*, with particular reference to the origin of cortical granules and their participation in the cortical reaction. *J Cell Biol* 37(2):514-539.
- Anderson SH, Killian GJ. 1994.** Effect of macromolecules from oviductal conditioned medium on bovine sperm motion and capacitation. *Biol Reprod* 51(4):795-799.
- 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 fertilization. *Biochem J* 374(Pt 2):551-557.
- Arceci RJ, Shanahan F, Stanley ER, Pollard JW. 1989.** Temporal expression and location of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and its receptor in the female reproductive tract are consistent with CSF-1-regulated placental development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(22):8818-8822.
- Arias EB, Verhage HG, Jaffe RC. 1994.** Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biol Reprod* 51(4):685-694.
- Austin CR. 1951.** Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian journal of scientific research Ser B: Biol Sci* 4(4):581-596.
- Austin CR. 1952.** The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170(4321):326.
- Austin CR. 1961.** Fertilization of mammalian eggs in vitro. *Int Rev Cytol* 12:337-359.
- Austin CR. 1974.** Principles of fertilization. *Proc R Soc Med* 67(9):925-927.
- Austin CR, Braden AW. 1953.** An investigation of polyspermy in the rat and rabbit. *Aust J Biol Sci* 6(4):674-692.
- Austin CR, Braden AWH. 1956.** Early Reactions of the Rodent Egg to Spermatozoon Penetration. *J Exp Biol* 33(2):358-365.
- Avilés M, Castells MT, Abascal I, Martínez-Menarguez JA, Draber P, Kan FW, Ballesta J. 1999.** Cytochemical localization of GalNAc and GalNAc β 1,4Gal β 1,4 disaccharide in mouse zona pellucida. *Cell Tissue Res* 295(2):269-277.

- Avilés M, El-Mestrah M, Jaber L, Castells M, Ballesta J, Kan F. 2000.** Cytochemical demonstration of modification of carbohydrates in the mouse zona pellucida during folliculogenesis. *Histochem Cell Biol* 113(3):207-219.
- Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. 2010.** Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* 16(12):896-906.
- Avilés M, Okinaga T, Shur B, Ballesta J. 2000.** Differential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 57(3):296-308.
- Baba D, Kashiwabara S, Honda A, Yamagata K, Wu Q, Ikawa M, Okabe M, Baba T. 2002.** Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem* 277(33):30310-30314.
- Baillie H, Pacey A, Warren M, Scudamore I, Barratt C. 1997.** Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampulla. *Hum Reprod* 12(9):1985-1992.
- Barros C, Capote C, Perez C, Crosby JA, Becker MI, De Ioannes A. 1992.** Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. *Biol Res* 25(1):31-40.
- Barros C, Yanagimachi R. 1971.** Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* 233(5317):268-269.
- Barros C, Yanagimachi R. 1972.** Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg. *J Exp Zool* 180(2):251-265.
- Bauersachs S, Rehfeld S, Ulbrich SE, Mallok S, Prella K, Wenigerkind H, Einspanier R, Blum H, Wolf E. 2004.** Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol* 32(2):449-466.
- Bauskin A, Franken D, Eberspaecher U, Donner P. 1999.** Characterization of human zona pellucida glycoproteins. *Mol Hum Reprod* 5(6):534-540.
- Bearden HJ, Fuquay JW. 1997.** Applied animal reproduction. 4th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.
- Bedford JM. 1969.** Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa. *J Reprod Fertil Supplement* 8 (Journal Article):Suppl 8:19+.
- Bedford JM. 1972.** An electron microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating. *Am J Anat* 133(2):213-254.
- Beier HM. 1974.** Oviducal and uterine fluids. *J Reprod Fertil* 37(1):221-237.

- Belve AR, McDonald MF. 1968.** Directional flow of fallopian tube secretion in the Romney ewe. *J Reprod Fertil* 15(3):357-364.
- Bendz A. 1977.** The anatomical basis for a possible counter current exchange mechanism in the human adnexa. *Prostaglandins* 13(2):355-362.
- Bendz A, Hansson HA, Svendsen P, Wiqvist N. 1982.** On the extensive contact between veins and arteries in the human ovarian pedicle. *Acta Physiol Scand* 115(2):179-182.
- Bergqvist AS, Killian G, Erikson D, Hoshino Y, Båge R, Sato E, Rodríguez-Martínez H. 2005.** Detection of Fas ligand in the bovine oviduct. *Anim Reprod Sci* 86(1-2):71-88.
- Bergqvist AS, Rodríguez-Martínez H. 2006.** Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct. *Anim Reprod Sci* 93(1-2):46-60.
- Bergqvist AS, Yokoo M, Heldin P, Frenidin J, Sato E, Rodríguez-Martínez H. 2005.** Hyaluronan and its binding proteins in the epithelium and intraluminal fluid of the bovine oviduct. *Zygote* 13(3):207-218.
- Betteridge KJ, Mitchell D. 1974.** Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare. *J Reprod Fertil* 39(1):145-148.
- Binor Z, Sokoloski J, Wolf D. 1982.** Sperm interaction with the zona-free hamster egg. *J Exp Zool* 222(2):187-193.
- Bishop DW. 1956.** Active secretion in the rabbit oviduct. *Am J Physiol* 187(2):347-352.
- Black DL, Duby RT, Riesen J. 1963.** Apparatus for the continuous collection of sheep oviduct fluid. *J Reprod Fertil* 6:257-260.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980.** Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 76(1):185-202.
- Blobel C, Wolfsberg T, Turck C, Myles D, Primakoff P, White J. 1992.** A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* 356(6366):248-252.
- Boatman DE, Magnoni GE. 1995.** Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster. *Biol Reprod* 52(1):199-207.
- Boatman DE, Robbins RS. 1991.** Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol Reprod* 44(5):806-813.

- Boice ML, Geisert RD, Blair RM, Verhage HG. 1990.** Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol Reprod* 43(3):457-465.
- Boice ML, Mavrogianis PA, Murphy CN, Prather RS, Day BN. 1992.** Immunocytochemical analysis of the association of bovine oviduct-specific glycoproteins with early embryos. *J of Exp Zool* 263(2):225-229.
- Boice ML, McCarthy TJ, Mavrogianis PA, Fazlebas AT, Verhage HG. 1990.** Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*Papio anubis*). *Biol Reprod* 43(2):340-346.
- Boilard M, Reyes-Moreno C, Lachance C, Massicotte L, Bailey JL, Sirard MA, Leclerc P. 2004.** Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. *Biol Reprod* 71(6):1879-1889.
- Borland RM, Biggers JD, Lechene CP, Taymor ML. 1980.** Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube. *J Reprod Fertil* 58(2):479-482.
- Borland RM, Hazra S, Biggers JD, Lechene CP. 1977.** The elemental composition of the environments of the gametes and preimplantation embryo during the initiation of pregnancy. *Biol Reprod* 16(2):147-157.
- Braden AW, Austin CR. 1954.** The number of sperms about the eggs in mammals and its significance for normal fertilization. *Aust J Biol Sci* 7(4):543-551.
- Braden AW, Austin CR, David HA. 1954.** The reaction of zona pellucida to sperm penetration. *Aust J Bioll Sci* 7(3):391-409.
- Brankin V, Mitchell MR, Webb B, Hunter MG. 2003.** Paracrine effects of oocyte secreted factors and stem cell factor on porcine granulosa and theca cells in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 1:55.
- Brewis IA, Winston RM, Leese HJ. 1992.** Energy metabolism of the human fallopian tube. *J Reprod Fertil* 95(1):257-262.
- Bridges PJ, Cho J, Ko C. 2011.** Endothelins in regulating ovarian and oviductal function. *Front Biosci (Schol Ed)* 3:145-155.
- Briton-Jones C, Lok IH, Cheung CK, Chiu TT, Cheung LP, Haines C. 2004.** Estradiol regulation of oviductin/oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid expression in human oviduct mucosal cells in vitro. *Fertil Steril* 81 Suppl 1:749-756.
- Briton-Jones C, Lok IH, Yuen PM, Chiu TT, Cheung LP, Haines C. 2001.** Regulation of human oviductin mRNA expression in vivo. *Fertil Steril* 75(5):942-946.

- Broermann DM, Xie S, Nephew KP, Pope WF. 1989.** Effects of the oviduct and wheat germ agglutinin on enzymatic digestion of porcine zona pellucidae. *J Anim Sci* 67(5):1324-1329.
- Brown C, Cheng W. 1986.** Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 92:183-191.
- Brüssow KP, Rátky J, Rodriguez-Martinez H. 2008.** Fertilization and early embryonic development in the porcine fallopian tube. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2:245-251.
- Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. 1990.** Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod* 43(4):543-547.
- Buhi WC. 2002.** Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123(3):355-362.
- Buhi WC, Alvarez IM, Sudhipong V, Dones-Smith MM. 1990.** Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. *Biol Reprod* 43(6):929-938.
- Buhi WC, Alvarez I, Choi I, Cleaver B, Simmen F. 1996.** Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biol Reprod* 55(6):1305-1314.
- Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ. 1997.** Oviductal regulation of fertilization and early embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* 52:285-300.
- Buhi W, Alvarez I, Kouba A. 2000.** Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs* 166(2):165-179.
- Buhi WC, Alvarez I. 2003.** Identification, characterization and localization of three proteins expressed by the porcine oviduct. *Theriogenology* 60(2):225-238.
- Buhi WC, O'Brien B, Alvarez I, 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. *Biol Reprod* 48(6):1274-1283.
- Buhi WC, Vallet J, Bazer F. 1989.** De novo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture. *J Exp Zool* 252(1):79-88.
- Burkman LJ, Overstreet JW, Katz DF. 1984.** A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviductal isthmus. *J Reprod Fertil* 71(2):367-376.

- Bylander A, Nutu M, Wellander R, Goksör M, Billig H, Larsson DG. 2010.** Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. *Reprod Biol Endocrinol* 8:48.
- Campbell DL, Douglas LW, Ramge JC. 1979.** Cannulation of the equine oviduct and chemical analysis of oviduct fluid. *Theriogenology* 12(2):47-59.
- Canipari R. 1994.** Cell-cell interactions and oocyte growth. *Zygote* 2(4):343-345.
- Carlson D, Black DL, Howe GR. 1970.** Oviduct secretion in the cow. *J Reprod Fertil* 22(3):549-552.
- Carney EW, Tobback C, Ellington JE, Foote RH. 1990.** Co-culture of rabbit 2-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells. *Mol Reprod Dev* 27(3):209-215.
- Carrasco L. 2007.** Actividad de siete exoglicosidasas, concentración de proteínas y cambios de volumen, en el fluido oviductal de las especies bovina y porcina a lo largo del ciclo estral. Tesis doctoral. Murcia. Universidad de Murcia, España.
- Carrasco L, Coy P, Avilés M, Gadea J, Romar R. 2008.** Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* 20(7):808-817.
- Carrasco L, Romar R, Avilés M, Gadea J, Coy P. 2008.** Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction* 136(6):833-842.
- Chang MC. 1951.** Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168(4277):697-698.
- Chegini N, Zhao Y, McLean FW. 1994.** Expression of messenger ribonucleic acid and presence of immunoreactive proteins for epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGF alpha) and EGF/TGF alpha receptors and 125I-EGF binding sites in human fallopian tube. *Biol Reprod* 50(5):1049-1058.
- Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. 1998.** Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281(5384):1857-1859.
- Cho WK, Stern S, Biggers JD. 1974.** Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool* 187(3):383-386.
- Churchill GA. 2002.** Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature genetics* 32 Suppl(Journal Article):490-495.
- Clark GF, Dell A. 2006.** Molecular models for murine sperm-egg binding. *J Biol Chem* 281(20):13853-13856.

- Clark NL, Gasper J, Sekino M, Springer SA, Aquadro CF, Swanson WJ. 2009.** Coevolution of interacting fertilization proteins. *PLoS Genet* 5(7):e1000570.
- Collins JL, Baltz JM. 1999.** Estimates of mouse oviductal fluid tonicity based on osmotic responses of embryos. *Biol Reprod* 60(5):1188-1193.
- Comer MT, Leese HJ, Southgate J. 1998.** Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium. *Hum Reprod* 13(11):3114-3120.
- Coonrod S, Naaby-Hansen S, Shetty J, Herr J. 1999.** PI-PLC releases a 25-40 kDa protein cluster from the hamster oolemma and affects the sperm penetration assay. *Mol Hum Reprod* 5(11):1027-1033.
- Cooper TG. 1995.** Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. *Adv Exp Med Biol* 377:87-101.
- Courot M, Hochereau MT, Ortavant R. 1970.** Spermatogenesis. *Aust J Zool.*
- Coy P, Avilés M. 2010.** What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol Rev Camb Philos Soc* 85(3):593-605.
- Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Saavedra MD, Romar R, Grullón L, Matás C, Aviles M. 2008.** Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Nat Acad Sci USA* 105(41):15809-15814.
- Coy P, Gadea J, Rath D, Hunter RH. 2009.** Differing sperm ability to penetrate the oocyte in vivo and in vitro as revealed using colloidal preparations. *Theriogenology* 72(9):1171-1179.
- Coy P, Gadea J, Romar R, Matás C, García E. 2002.** Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. *Reproduction* 124(2):279-288.
- Coy P, Grullón L, Canovas S, Romar R, Matas C, Aviles M. 2008.** Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* 135(1):19-27.
- Coy P, Lloyd R, Romar R, Satake N, Matas C, Gadea J, Holt W. 2010.** Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. *Theriogenology* 74(4):632-642.
- Coy P, Romar R, Payton RR, McCann L, Saxton AM, Edwards JL. 2005.** Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Reproduction* 129(1):19-26.
- Coy P, Romar R. 2002.** In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reproduction, fertility, and development* 14(5-6):275-286.

- Cran DG. 1985.** Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 74(1):237-245.
- Cross NL. 1996.** Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol Reprod* 54(1):138-145.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. 1988.** Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol Reprod* 38(1):235-244.
- Croxatto HB, Ortiz ME. 1975.** Egg transport in the fallopian tube. *Gynecol Invest* 6(3-4):215-225.
- Dale B, Defelice L. 2010.** Polyspermy prevention: facts and artifacts? *J Assist Reprod Genet.*
- Dalton T, Kover K, Dey SK, Andrews GK. 1994.** Analysis of the expression of growth factor, interleukin-1, and lactoferrin genes and the distribution of inflammatory leukocytes in the preimplantation mouse oviduct. *Biol Reprod* 51(4):597-606.
- Davis BK. 1981.** Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7560-7564.
- De Jonge C. 2005.** Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11(3):205-214.
- De los Reyes M, Barros C. 2000.** Immunolocalization of proacrosin/acrosin in bovine sperm and sperm penetration through the zona pellucida. *Anim Reprod Sci* 58(3-4):215-228.
- De Pol A, Marzona L, Vaccina F, Negro R, Sena P, Forabosco A. 1998.** Apoptosis in different stages of human oogenesis. *Anticancer Res* 18(5A):3457-3461.
- De Smedt V, Crozet N, Ahmed-Ali M, Martino A, Cognie Y. 1992.** In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* 37(5):1049-1060.
- Dean J. 2004.** Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays* 26(1):29-38.
- Dekel N, Beers WH. 1978.** Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(9):4369-4373.
- Dekel N, Kraicer PF. 1978.** Induction in vitro of mucification of rat cumulus oophorus by gonadotrophins and adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 102(6):1797-1802.

- Dell'Aquila ME, De Felici M, Massari S, Maritato F, Minoia P. 1999.** Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Biol Reprod* 61(2):533-540.
- DeMeestere I, Barlow P, Leroy F. 1997.** Hardening of zona pellucida of mouse oocytes and embryos in vivo and in vitro. *International journal of fertility and women's medicine* 42(3):219-222.
- DeMott R, Lefebvre R, Suarez SS. 1995.** Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod* 52(6):1395-1403.
- Denhardt DT, Guo X. 1993.** Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7(15):1475-1482.
- Desantis S, Zizza S, Accogli G, Acone F, Rossi R, Resta L. 2011.** Morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium during oestrus. *Theriogenology* 75(4):671-678.
- Desnoyers L, Manjunath P. 1992.** Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem* 267(14):10149-10155.
- DeSouza MM, Murray MK. 1995a.** 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 fertilization and embryo development. *Endocrinology* 136(6):2485-2496.
- DeSouza MM, Murray MK. 1995b.** An estrogen-dependent sheep oviductal glycoprotein has glycan linkages typical of sialomucins and does not contain chitinase activity. *Biol Reprod* 53(6):1517-1526.
- Díaz H, Esponda P. 2004.** Ageing-induced changes in the cortical granules of mouse eggs. *Zygote* 12(2):95-103.
- Dickens CJ, Comer MT, Southgate J, Leese HJ. 1996.** Human Fallopian tubal epithelial cells in vitro: establishment of polarity and potential role of intracellular calcium and extracellular ATP in fluid secretion. *Hum Reprod* 11(1):212-217.
- Dickens CJ, Maguiness SD, Comer MT, Palmer A, Rutherford AJ, Leese HJ. 1995.** Human tubal fluid: formation and composition during vascular perfusion of the fallopian tube. *Hum Reprod* 10(3):505-508.
- Dickens CJ, Southgate J, Leese HJ. 1993.** Use of primary cultures of rabbit oviduct epithelial cells to study the ionic basis of tubal fluid formation. *J Reprod Fertil* 98(2):603-610.
- Djakiew D, Jones RC. 1983.** Sperm maturation, fluid transport, and secretion and absorption of protein in the epididymis of the echidna, *Tachyglossus aculeatus*. *J Reprod Fertil* 68(2):445-456.

- Dobrinski I, Ignatz GG, Thomas PG, Ball BA. 1996.** Role of carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells in vitro. *Am J Vet Res* 57(11):1635-1639.
- Dobrinski I, Smith TT, Suarez SS, Ball BA. 1997.** Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 56(4):861-869.
- Dobrinski I, Suarez SS, Ball BA. 1996.** Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biol Reprod* 54(4):783-788.
- Dodson MG, Minhas BS, Curtis SK, Palmer TV, Robertson JL. 1989.** Spontaneous zona reaction in the mouse as a limiting factor for the time in which an oocyte may be fertilized. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 6(2):101-106.
- Domon M, Pinsker MC, Mintz B. 1973.** Thiocyanate assay for sublytic change in the zona pellucida of the mouse egg. *Biol Reprod* 9(3):246-253.
- Donahue RP, Stern S. 1968.** Follicular cell support of oocyte maturation: production of pyruvate in vitro. *J Reprod Fertil* 17(2):395-398.
- Donnelly K, Fazleabas A, Verhage H, Mavrogianis P, Jaffe R. 1991.** Cloning of a recombinant complementary DNA to a baboon (*Papio anubis*) estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Mol Endocrinol* 5(3):356-364.
- Downing Meisner A, Klaus AV, O'Leary MA. 2005.** Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). *J Morphol* 263(2):179-202.
- Drisdel RC, Mack SR, Anderson RA, Zaneveld LJ. 1995.** Purification and partial characterization of acrosome reaction inhibiting glycoprotein from human seminal plasma. *Biol Reprod* 53(1):201-208.
- Du Mesnil Du Boisson F, Dautier L. 1955.** The ascent of the spermatozoa of boar in the genital tract of the sow in estrus. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales* 149(1-2):76-79.
- Ducibella T, Buetow J. 1994.** Competence to undergo normal, fertilization-induced cortical activation develops after metaphase I of meiosis in mouse oocytes. *Dev Biol* 165(1):95-104.
- Ducibella T, Duffy P, Buetow J. 1994.** Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol Reprod* 50(3):467-473.
- Dunbar B, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel E, Skinner S, Wilkins B. 1994.** The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod Fertil Dev* 6(3):331-347.

- Dvorák M. 1989.** Ultrastructure and quantitative analysis of mouse and human oocytes. *Prog Clin Biol Res* 296:273-280.
- Edwards LJ, Leese HJ. 1993.** Glucose transport and metabolism in rabbit oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 99(2):585-591.
- Edwards RG. 1974.** Follicular fluid. *J Reprod Fertil* 37(1):189-219.
- Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. 1990.** Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* 25(2):195-204.
- Eichenlaub-Ritter U, Chandley AC, Gosden RG. 1986.** Alterations to the microtubular cytoskeleton and increased disorder of chromosome alignment in spontaneously ovulated mouse oocytes aged in vivo: an immunofluorescence study. *Chromosoma* 94(5):337-345.
- Einer-Jensen N, Hunter R. 2005.** Counter-current transfer in reproductive biology. *Reproduction* 129(1):9-18.
- Einer-Jensen N, Hunter R. 2005.** Counter-current transfer in reproductive biology. *Reproduction* 129(1):9-18.
- Einspanier R, Gabler C, Kettler A, Kloas W. 1999.** Characterization and localization of beta2-adrenergic receptors in the bovine oviduct: indication for progesterone-mediated expression. *Endocrinology* 140(6):2679-2684.
- Ekhlasi-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoлова M, Petrunina A, Töpfer-Petersen E. 2005.** Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biol Reprod* 73(3):536-545.
- El-Gayar M, Holtz W. 2009.** Coating of objects introduced into the oviduct of pseudopregnant rabbit does. *Reprod Domest Anim* 44(2):326-330.
- Elhassan YM, Wu G, Leanez AC, Tasca RJ, Watson AJ, Westhusin ME. 2001.** Amino acid concentrations in fluids from the bovine oviduct and uterus and in KSOM-based culture media. *Theriogenology* 55(9):1907-1918.
- Elisa M. 2007.** Osteopontin: reproductive and other functions. *Embryo transfer newsletter*:10-15.
- Ellerman DA, Myles DG, Primakoff P. 2006.** A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: evidence for the participation of ERp57. *Dev Cell* 10(6):831-837.
- Ellington JE. 1993.** The novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa. *Biol Reprod* 48(4):851-856.

- Ellington JE, Evenson DP, Wright RW, Jones AE, Schneider CS, Hiss GA, Brisbois RS. 1999.** Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro. *Fertil Steril* 71(5):924-929.
- Ellington JE, Samper JC, Jones AE, Oliver SA, Burnett KM, Wright RW. 1999.** In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. *Anim Reprod Sci* 56(1):51-65.
- Elliott RM, Lloyd RE, Fazeli A, Sostaric E, Georgiou AS, Satake N, Watson PF, Holt WV. 2009.** Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. *Reproduction* 137(2):191-203.
- El-Mestrah M, Castle PE, Borossa G, Kan FW. 2002.** Subcellular distribution of ZP1, ZP2, and ZP3 glycoproteins during folliculogenesis and demonstration of their topographical disposition within the zona matrix of mouse ovarian oocytes. *Biol Reprod* 66(4):866-876.
- Engle CC, Foley CW. 1975.** Certain physiochemical properties of uterine tubal fluid, follicular fluid, and blood plasma in the mare. *Am J Vet Res* 36(2):149-154.
- Engle CC, Witherspoon DM, Foley CW. 1970.** Technique for continuous collection of equine oviduct secretions. *Am J Vet Res* 31(10):1889-1896.
- Epifano O, Liang L, Familiari M, Moos MJ, Dean J. 1995.** Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* 121(7):1947-1956.
- Eppig JJ. 1979.** Gonadotropin stimulation of the expansion of cumulus oophori isolated from mice: general conditions for expansion in vitro. *J Exp Zool* 208(1):111-120.
- Eppig JJ. 1991.** Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 13(11):569-574.
- Erickson-Lawrence MF, Turner TT, Thomas TS, Oliphant G. 1989.** Effect of steroid hormones on sulfated oviductal glycoprotein secretion by oviductal explants in vitro. *Biol Reprod* 40(6):1311-1319.
- Erikson DW, Way AL, Chapman DA, Killian GJ. 2007.** Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Reproduction* 133(5):909-917.
- Evans JP. 2009.** Egg integrins: back in the game of mammalian fertilization. *ACS Chem Biol* 4(5):321-323.
- Familiari G, Nottola SA, Macchiarelli G, Micara G, Aragona C, Motta PM. 1992.** Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Mol Reprod Dev* 32(1):51-61.

- Fazeli A, Affara NA, Hubank M, Holt WV. 2004.** Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. *Biol Reprod* 71(1):60-65.
- Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. 1999.** Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod* 60(4):879-886.
- Fazleabas A, Verhage H. 1986.** The detection of oviduct-specific proteins in the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod* 35(2):455-462.
- Feki NC, Théron P, Couturier M, Liméa G, Legrand A, Jouannet P, Auger J. 2004.** Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. *Mol Hum Reprod* 10(2):137-142.
- Filicori M. 1999.** The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril* 71(3):405-414.
- Fischer B, Bavister BD. 1993.** Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99(2):673-679.
- Fissore RA, He CL, Vande Woude GF. 1996.** Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod* 55(6):1261-1270.
- Fléchon J, Hunter R. 1981.** Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell* 13(1):127-139.
- Flesch FM, Gadella BM. 2000.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469(3):197-235.
- Foresta C, Rossato M, Mioni R, Zorzi M. 1992.** Progesterone induces capacitation in human spermatozoa. *Andrologia* 24(1):33-35.
- Fortune JE. 1994.** Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 50(2):225-232.
- Foxcroft GR, Hunter MG. 1985.** Basic physiology of follicular maturation in the pig. *J Reprod Fertil Suppl* 33:1-19.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa OO. 2005.** First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *J Reprod Dev* 51(1):37-46.
- Fraser LR, Dandekar PV. 1973.** Fertilization of rabbit eggs in vitro without supplemental CO₂ in the atmosphere. *J Reprod Fertil* 33(1):159-161.

- Fraser LR, Maudlin I. 1979.** Incidence of polyspermy in mouse eggs fertilized in vivo and in vitro after administration of progesterone and oestradiol. *J Reprod Fertil* 55(2):407-410.
- Freeman DA, Woods GL, Vanderwall DK, Weber JA. 1992.** Embryo-initiated oviductal transport in mares. *J Reprod Fertil* 95(2):535-538.
- Fukui Y, Glew AM, Gandolfi F, Moor RM. 1988.** Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. *J Reprod Fertil* 82(1):337-340.
- Funahashi H, Day BN. 1993.** Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 98(1):179-185.
- Funahashi H, Ekwall H, Rodriguez-Martinez H. 2000.** Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biol Reprod* 63(5):1437-1442.
- Gabler C, Chapman DA, Killian GJ. 2003.** Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction* 126(6):721-729.
- Gabler C, Killian GJ, Einspanier R. 2001.** Differential expression of extracellular matrix components in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction* 122(1):121-130.
- Gabler C, Odau S, Muller K, Schon J, Bondzio A, Einspanier R. 2008.** Exploring cumulus-oocyte-complex-oviductal cell interactions: gene profiling in the bovine oviduct. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 9:29-42.
- Gaddum-Rosse P. 1985.** Mammalian gamete interactions: what can be gained from observations on living eggs? *Am J Anat* 174(3):347-356.
- Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, Epifano O, Dean J. 2010.** Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science* 329(5988):216-219.
- Gandolfi F. 1995.** Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. *Microsc Res Tech* 32(1):1-12.
- Gandolfi F, Brevini T, Moor R. 1989a.** Effect of oviduct environment on embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* 38:107-115.
- Gandolfi F, Brevini T, Richardson L, Brown C, Moor R. 1989b.** Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 106(2):303-312.
- Gandolfi F, Modina S, Brevini T, Galli C, Moor R, Lauria A. 1991.** Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida,

perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur J Basic Appl Histochem* 35(4):383-392.

Gandolfi F, Moor R. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* 81(1):23-28.

García M, Peiró R, Argente M, Merchán M, Folch J, Blasco A, Santacreu M. 2010. Investigation of the oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) gene associated with embryo survival and development in the rabbit. *J Anim Sci* 88(5):1597-1602.

García-Pascual A, Labadía A, Triguero D, Costa G. 1996. Local regulation of oviductal blood flow. *Gen Pharmacol* 27(8):1303-1310.

Gardner DK. 2008. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev* 20(1):9-18.

Gardner AJ, Evans JP. 2006. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod Fertil Dev* 18(1-2):53-61.

Gardner DK, 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. *Fertil Steril* 65(2):349-353.

Gardner DK, Leese HJ. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil* 88(1):361-368.

Gardner AJ, Williams C, Evans JP. 2007. Establishment of the mammalian membrane block to polyspermy: evidence for calcium-dependent and -independent regulation. *Reproduction* 133(2):383-393.

Georgiou A, Snijders A, Sostaric E, Aflatoonian R, Vazquez J, Vazquez J, Roca J, Martinez E, Wright P, Fazeli A. 2007. Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res* 6(12):4656-4666.

Georgiou AS, Sostaric E, Wong CH, Snijders AP, Wright PC, Moore HD, Fazeli A. 2005. Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4(11):1785-1796.

Gerena RL, Irikura D, Urade Y, Eguchi N, Chapman DA, Killian GJ. 1998. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol Reprod* 58(3):826-833.

Gerena RL, Killian GJ. 1990. Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *J of Exp Zool* 256(1):113-120.

Gibson C, Masters CJ. 1970. Oviductal lactate dehydrogenase. *J Reprod Fertil* 22(1):157-159.

- Ginther OJ. 1974.** Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. *J Anim Sci* 39(3):550-564.
- Glass LE. 1969.** Immunocytological studies of the mouse oviduct. In: Hafez E, editor: University of Chicago Press. p 54-72.
- Gonçalves RF, Chapman DA, Bertolla RP, Eder I, Killian GJ. 2008.** Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects in vitro fertilization and embryo development. *AnimReprodSci* 108(3-4):375-383.
- Gonçalves RF, Staros AL, Killian GJ. 2008.** Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo development. *Reprod Domest Anim* 43(6):720-729.
- Gonçalves RF, Wolinetz CD, Killian GJ. 2007.** Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alphaV and alpha5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology* 67(3):468-474.
- Gott AL, Gray SM, James AF, Leese HJ. 1988.** The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. *Biol Reprod* 39(4):758-763.
- Green CE, Bredl J, Holt WV, Watson PF, Fazeli A. 2001.** Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *Reproduction* 122(2):305-315.
- Green DP. 1997.** Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction* 2(3):147-156.
- Grippo AA, Henault MA, Anderson SH, Killian GJ. 1992.** Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J Dairy Sci* 75(1):58-65.
- Grippo AA, Way A, Killian GJ. 1995.** Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 105(1):57-64.
- Gross V, Wessel G, Florman H, Ducibella T. 2000.** A monoclonal antibody that recognizes mammalian cortical granules and a 32-kilodalton protein in mouse eggs. *Biol Reprod* 63(2):575-581.
- Grullón Yunén LA. 2010.** Función del sistema plasminógeno-plasmina en la fecundación de ovocitos bovinos y porcinos. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. Murcia.
- Gualtieri R, Mollo V, Duma G, Talevi R. 2009.** Redox control of surface protein sulphhydryls in bovine spermatozoa reversibly modulates sperm adhesion to the oviductal epithelium and capacitation. *Reproduction* 138(1):33-43.

- Guérin P, Guillaud J, Ménéz Y. 1995.** Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro. *Hum Reprod* 10(4):866-872.
- Guérin P, Ménéz Y. 1995.** Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. *Zygote* 3(4):333-343.
- Guérin P, Tappaz M, Guillaud J, Ménéz Y. 1995.** Demonstration of cysteine sulfinate decarboxylase (EC 4.1.1.29) in cultured oviduct epithelial cells in cows and goats. *C R Acad Sci III* 318(5):523-528.
- Gulyas BJ. 1980.** Cortical granules of mammalian eggs. *Int Rev Cytol* 63:357-392.
- Gulyas BJ, Schmell ED. 1980.** Ovoperoxidase activity in ionophore treated mouse eggs. I. Electron microscopic localization. *Gamete Research* 3(3):267-277.
- Gulyas BJ, Yuan LC. 1985.** Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol. *J of Exp Zool* 233(2):269-276.
- Gupta SK, Bansal P, Ganguly A, Bhandari B, Chakrabarti K. 2009.** Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J Reprod Immunol* 83(1-2):50-55.
- Gupta SK, Bhandari B. 2011.** Acrosome reaction: relevance of zona pellucida
- Gutiérrez-Adán A, Rizos D, Fair T, Moreira PN, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. 2004.** Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* 68(4):441-448.
- Gwathmey T, Ignatz G, Suarez SS. 2003.** PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 69(3):809-815.
- Gwatkin RB. 1964.** Effect of enzymes and acidity on the zona pellucida of the mouse egg before and after fertilization. *J Reprod Fertil* 7(Journal Article):99-105.
- Gwatkin RB, Williams DT, Hartmann JF, Kniazuk M. 1973.** The zona reaction of hamster and mouse eggs: production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules. *J Reprod Fertil* 32(2):259-265.
- Hafez ESE. 2000.** Reproducción e inseminación artificial en animales. Mc Graw-Hill Interamericana 7º ed.
- Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA. 1998.** Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5):2552-2557.

- Halbert SA, Becker DR, Szal SE. 1989.** Ovum transport in the rat oviductal ampulla in the absence of muscle contractility. *Biol Reprod* 40(6):1131-1136.
- Halbert SA, Tam PY, Blandau RJ. 1976.** Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. *Science* 191(4231):1052-1053.
- Hamner CE, Williams WL. 1964.** Identification of sperm stimulating factor of rabbit oviduct fluid. *Proc soc exp biol med* 117:240-243.
- Hao Y, Mathialagan N, Walters E, Mao J, Lai L, Becker D, Li W, Critser J, Prather RS. 2006.** Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod* 75(5):726-733.
- Harding JE. 2001.** The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 30(1):15-23.
- Harris SE, Gopichandran N, Picton HM, Leese HJ, Orsi NM. 2005.** Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* 64(4):992-1006.
- Hedrick JL, Wardrip NJ, Berger T. 1987.** Differences in the macromolecular composition of the zona pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *J of Exp Zool* 241(2):257-262.
- Herrero MB, Mandal A, Digilio LC, Coonrod SA, Maier B, Herr JC. 2005.** Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization. *Dev Biol* 284(1):126-142.
- Hill JL, Wade MG, Nancarrow CD, Kelleher DL, Boland MP. 1997.** Influence of ovine oviductal amino acid concentrations and an ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 47(2):164-169.
- Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD. 2002.** In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. *Biol Reprod* 67(1):256-262.
- Ho H, Suarez SS. 2001.** Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122(4):519-526.
- Hoffman LH, Olson GE, Carson DD, Chilton BS. 1998.** Progesterone and implanting blastocysts regulate *Muc1* expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* 139(1):266-271.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. 2003.** Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* 1:107.
- Holt WV, Fazeli A. 2010.** The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Mol Reprod Dev* 77(11):934-943.

- Holý L, Vanatka F, Lopatárová M. 1992.** [Descent of ova and embryos in cows superovulated with serum gonadotropin]. *Vet Med (Praha)* 37(7):353-364.
- Hoodbhoy T, Dandekar P, Calarco P, Talbot P. 2001.** p62/p56 are cortical granule proteins that contribute to formation of the cortical granule envelope and play a role in mammalian preimplantation development. *Mol Reprod Dev* 59(1):78-89.
- Hoodbhoy T, Dean J. 2004.** Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction* 127(4):417-422.
- Hoodbhoy T, Talbot P. 1994.** Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol Reprod Dev* 39(4):439-448.
- Horvath PM, Kellom T, Caulfield J, Boldt J. 1993.** Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 34(1):65-72.
- Høyer PE, Terkelsen OB, Grete Byskov A, Nielsen H. 2001.** Fetuin and fetuin messenger RNA in granulosa cells of the rat ovary. *Biol Reprod* 65(6):1655-1662.
- Hugentobler SA, Diskin MG, Leese HJ, Humpherson PG, Watson T, Sreenan JM, Morris DG. 2007.** Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol Reprod Dev* 74(4):445-454.
- Hugentobler SA, Humpherson PG, Leese HJ, Sreenan JM, Morris DG. 2008.** Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol Reprod Dev* 75(3):496-503.
- Huhtinen M, Koskinen E, Skidmore JA, Allen WR. 1996.** Recovery rate and quality of embryos from mares inseminated after ovulation. *Theriogenology* 45(4):719-726.
- Hunter RH. 1972.** Local action of progesterone leading to polyspermic fertilization in pigs. *J Reprod Fertil* 31(3):433-444.
- Hunter R. 1974.** Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*. *Anat Rec* 178(2):169-185.
- Hunter RH. 1976.** Sperm-egg interactions in the pig: monospermy, extensive polyspermy, and the formation of chromatin aggregates. *J Anat* 122(Pt 1):43-59.
- Hunter RH. 1980.** Physiology and technology of reproduction in female domestic animals. Editorial *Acribia*.
- Hunter RH. 1981.** Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* 63(1):109-117.

- Hunter RH. 1982.** Fisiología y tecnología de la reproducción de la hembra de los animales domésticos. Zaragoza: Acribia.
- Hunter RHF. 1988.** The Fallopian tubes : their role in fertility and infertility. Berlin: Springer.
- Hunter RH. 1989.** Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital tract. *Zool J Linn Soc* 95.
- Hunter RH. 1990.** Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil Supp* 40:211-226.
- Hunter RH. 1991a.** Fertilization in the pig and horse. In: O'Rand BSDaMG, editor. A comparative Overview of Mammalian Fertilization. New York: Plenum Press. p 329-349.
- Hunter RH. 1991b.** Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* 29(4):385-391.
- Hunter RH. 1993.** Sperm:egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol Reprod Dev* 35(3):324-327.
- Hunter RH. 1994.** Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 39(2):176-181.
- Hunter RH. 1998.** Have the Fallopian tubes a vital rôle in promoting fertility? *Acta Obstet Gynecol Scand* 77(5):475-486.
- Hunter RH. 2002.** Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Domest Anim* 37(4):186-190.
- Hunter RH. 2003.** Post-ovulatory fate of follicle and oocyte:contributions of somatic cells and follicular fluid. In: Press CU, editor. *Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation*. Cambridge. p 295-324.
- Hunter RH. 2005.** The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev* 45(3):281-290.
- Hunter RH, Cook B, Poyser NL. 1983.** Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 14(4):225-232.
- Hunter RH, Coy P, Gadea J, Rath D. 2011.** Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *J Assist Reprod Genet*.
- Hunter RH, Einer-Jensen N, Greve T. 2005.** Somatic cell amplification of early pregnancy factors in the fallopian tube. *Ital J Anat Embryol* 110(2 Suppl 1):195-203.

- Hunter RH, Nichol R. 1983.** Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool* 228(1):121-128.
- Hunter RH, Nichol R. 1986.** A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J Reprod Fertil* 77(2):599-606.
- Hunter RH, Nichol R. 1988.** Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res* 21(3):255-266.
- Hunter RH, Nichol R, Crabtree SM. 1980.** Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reproduction, nutrition, development* 20(6):1869-1875.
- Hunter RH, Vajta G, Hyttel P. 1998.** Long-term stability of the bovine block to polyspermy. *J Exp Zool* 280(2):182-188.
- Hunter RH, Wilmut I. 1984.** Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reproduction, nutrition, development* 24(5A):597-608.
- Hyde BA, Black DL. 1986.** Synthesis and secretion of sulphated glycoproteins by rabbit oviduct explants in vitro. *J Reprod Fertil* 78(1):83-91.
- Hyttel P, Greve T, Callesen H. 1989.** Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil Suppl* 38:35-47.
- Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T. 1986.** Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil* 78(2):615-625.
- Ignotz G, Lo M, Perez C, Gwathmey T, Suarez SS. 2001.** Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 64(6):1806-1811.
- Igusa Y, Miyazaki S, Yamashita N. 1983.** Periodic hyperpolarizing responses in hamster and mouse eggs fertilized with mouse sperm. *J Physiol* 340:633-647.
- Ijaz A, Lambert RD, Sirard MA. 1994.** In vitro-cultured bovine granulosa and oviductal cells secrete sperm motility-maintaining factor(s). *Mol Reprod Dev* 37(1):54-60.
- Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. 2010.** Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* 120(4):984-994.
- Ikawa M, Wada I, Kominami K, Watanabe D, Toshimori K, Nishimune Y, Okabe M. 1997.** The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility. *Nature* 387(6633):607-611.

- Ikeda K, Yonezawa N, Naoi K, Katsumata T, Hamano S, Nakano M. 2002.** Localization of N-linked carbohydrate chains in glycoprotein ZPA of the bovine egg zona pellucida. *Eur J Biochem* 269(17):4257-4266.
- 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.
- Inoue M, Wolf D. 1974.** Comparative solubility properties of the zonae pellucidae of unfertilized and fertilized mouse ova. *Biol Reprod* 11(5):558-565.
- Iritani A, Gomes WR, Vandemark NL. 1969.** Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biol Reprod* 1(1):72-76.
- Iritani A, Sato E, Nishikawa Y. 1974.** Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *J Anim Sci* 39(3):582-588.
- Iwamoto K, Ikeda K, Yonezawa N, Noguchi S, Kudo K, Hamano S, Kuwayama M, Nakano M. 1999.** Disulfide formation in bovine zona pellucida glycoproteins during fertilization: evidence for the involvement of cystine cross-linkages in hardening of the zona pellucida. *J Reprod Fertil* 117(2):395-402.
- Izquierdo-Rico MJ, Gimeno L, Jiménez-Cervantes C, Ballesta J, Avilés M. 2011.** Biosynthesis of hamster zona pellucida is restricted to the oocyte. *Theriogenology* 75(3):463-472.
- Izquierdo-Rico M, Jiménez-Movilla M, Llop E, Perez-Oliva A, Ballesta J, Gutierrez-Gallego R, Jiménez-Cervantes C, Aviles M. 2009.** Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *J Proteome Res* 8(2):926-941.
- Jaffe L, Cross N. 1986.** Electrical regulation of sperm-egg fusion. *Annu Rev Physiol* 48:191-200.
- Jahn R, Grubmuller H. 2002.** Membrane fusion. *Curr Op Cell Biol* 14(4):488-495.
- Jankovic SM, Protic BA, Jankovic SV. 2004.** Contractile effect of acetylcholine on isolated isthmic segment of fallopian tubes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26(2):87-91.
- Jansen RP. 1980.** Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *Am J Obstet Gynecol* 136(3):292-308.
- Jansen RP, Bajpai VK. 1982.** Oviduct acid mucus glycoproteins in the estrous rabbit: ultrastructure and histochemistry. *Biol Reprod* 26(1):155-168.
- Janson PO, Williams D, Petrucco OM, Amato F, Seamark RF, Findlay JK. 1983.** Blood flow in the ovary and adjacent structures of the non-pregnant sheep. *Acta Endocrinol (Copenh)* 103(2):259-265.

- Jewgenow K, Fickel J. 1999.** Sequential expression of zona pellucida protein genes during the oogenesis of domestic cats. *Biol Reprod* 60(2):522-526.
- Jiménez-Movilla M, Martínez-Alonso E, Castells MT, Izquierdo-Rico MJ, Saavedra MD, 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. *Histol Histopathol* 24(5):599-609.
- Jonáková V, Manásková P, Tichá M. 2007.** Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 849(1-2):307-314.
- Jones RC, Dacheux JL, Nixon B, Ecroyd HW. 2007.** Role of the epididymis in sperm competition. *Asian J Androl* 9(4):493-499.
- Kadam K, D'Souza S, Bandivdekar A, Natraj U. 2006.** Identification and characterization of oviductal glycoprotein-binding protein partner on gametes: epitopic similarity to non-muscle myosin IIA, MYH 9. *Mol Hum Reprod* 12(4):275-282.
- Kamwanja LA, Hansen PJ. 1993.** Regulation of proliferation of bovine oviductal epithelial cells by estradiol. Interactions with progesterone, interferon-tau and interferon-alpha. *Horm Metab Res* 25(9):500-502.
- Kan FW, 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.
- Kan FW, St-Jacques S, Bleau G. 1989.** Immunocytochemical evidence for the transfer of an oviductal antigen to the zona pellucida of hamster ova after ovulation. *Biol Reprod* 40(3):585-598.
- Kane M, Morgan P, Coonan C. 1997.** Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum Reprod Update* 3(2):137-157.
- Kaneko T, Moisyadi S, Suganuma R, Hohn B, Yanagimachi R, Pelczar P. 2005.** Recombinase-mediated mouse transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 64(8):1704-1715.
- Kanitz W. 2001.** Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Arch Tierz, Dummerstorf* 44(Special Issue, 9-23):9-23.
- Kano K, Miyano T, Kato S. 1998.** Effects of glycosaminoglycans on the development of in vitro-matured and -fertilized porcine oocytes to the blastocyst stage in vitro. *Biol Reprod* 58(5):1226-1232.

- Kapur R, Johnson L. 1985.** An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev Biol* 112(1):89-93.
- Kapur R, Johnson L. 1986.** Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J Exp Zool* 238(2):249-260.
- Kapur R, Johnson L. 1988.** Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes. *Anat Rec* 221(3):720-729.
- Katarzyna SM, Wiesław B, Anna R. 2010.** The tunica mucosa of the oviduct in case of ovarian cysts presence in sows. *Folia Histochem Cytobiol*:148-156.
- Katska L, Kania G, Smorag Z, Wayda E, Plucienniczak G. 1999.** Developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes with experimentally induced hardening of the zona pellucida. *Reproduction in Domestic Animals*:255-259.
- Katska L, Kauffold P, Smorag Z, Duschinski U, Torner H, Kanitz W. 1989.** Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 32(5):767-777.
- Katska L, Smorag Z, Gagda B. 1988.** Dissolution of the zona pellucida of bovine oocytes after holding in homo and heterological oviduct; Dublin.
- Kavanaugh JF, Killian GJ. 1988.** Bovine oviductal cannulations. *J Invest Surg* 1(3):201-208.
- Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R. 1997.** Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum Reprod* 12(6):1250-1252.
- Killian GJ. 2004.** Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *AnimReprodSci* 82-83(Journal Article):141-153.
- Killian GJ. 2011.** Physiology and endocrinology symposium: Evidence that oviduct secretions influence sperm function: A retrospective view for livestock. *J Anim Sci* 89(5):1315-1322.
- Killian GJ, Chapman DA, Kavanaugh JF, Deaver DR, Wiggin HB. 1989.** Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 86(2):419-426.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. 1993.** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 49(6):1202-1207.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. 2005.** Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm

through cumulus mass. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(50):18028-18033.

Kim E, Yamashita M, Kimura M, Honda A, Kashiwabara S, Baba T. 2008. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol* 52(5-6):677-682.

Kim NH, Funahashi H, Abeydeera LR, Moon SJ, Prather RS, Day BN. 1996. Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 107(1):79-86.

King RS, Anderson SH, Killian GJ. 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.

King RS, Killian GJ. 1994. Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biol Reprod* 51(3):34-42.

Kolbe T, Holtz W. 2005. Differences in proteinase digestibility of the zona pellucida of in vivo and in vitro derived porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 63(6):1695-1705.

Kölle S, Dubielzig S, Reese S, Wehrend A, König P, Kummer W. 2009. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biol Reprod* 81(2):267-274.

Kölle S, Dubois CS, Caillaud M, Lahuec C, Sinowatz F, Goudet G. 2007. Equine zona protein synthesis and ZP structure during folliculogenesis, oocyte maturation, and embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 74(7):851-859.

Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Palma G. 1998. Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Mol Reprod Dev* 49(4):435-443.

Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Totzauer I, Amselgruber W, Plendl J. 1996. Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *Histochem J* 28(6):441-447.

Kouba A, Abeydeera L, Alvarez I, Day B, Buhi W. 2000. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. *Biol Reprod* 63(1):242-250.

Kouba AJ, Alvarez IM, Buhi WC. 2000. Identification and localization of plasminogen activator inhibitor-1 within the porcine oviduct. *Biol Reprod* 62(3):501-510.

Kouba AJ, Burkhardt BR, Alvarez IM, Goodenow MM, Buhi WC. 2000. Oviductal plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): mRNA, protein, and hormonal

- regulation during the estrous cycle and early pregnancy in the pig. *MolReprodDev* 56(3):378-386.
- Kubagawa HM, Watts JL, Corrigan C, Edmonds JW, Sztul E, Browse J, Miller MA. 2006.** Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo. *Nat Cell Biol* 8(10):1143-1148.
- Kumaresan A, Ansari M, Garg A, Kataria M. 2006.** Effect of oviductal proteins on sperm functions and lipid peroxidation levels during cryopreservation in buffaloes. *Anim Reprod Sci* 93(3-4):246-257.
- Lachance C, Bailey J, Leclerc P. 2007.** Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Hum Reprod* 22(10):2606-2614.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lagow E, DeSouza MM, Carson DD. 1999.** Mammalian reproductive tract mucins. *Hum Reprod Update* 5(4):280-292.
- Landim-Alvarenga FC, Boyazoglu SE, Carvalho LR, Choi YH, Squires EL, Seidel GE. 2002.** Effects of fetuin on zona pellucida hardening, fertilization and embryo development in cattle. *Anim Reprod Sci* 71(3-4):181-191.
- Lane M, Maybach JM, Hooper K, Hasler JF, Gardner DK. 2003.** Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol Reprod Dev* 64(1):70-78.
- Lapensée L, Paquette Y, Bleau G. 1997.** Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertil Steril* 68(4):702-708.
- Lapointe S, Sirard MA. 1996.** Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 44(2):234-240.
- Lapointe S, Sullivan R, Sirard M. 1998.** Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 58(3):747-753.
- Lazzari G, Colleoni S, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Duchi R, Galli C. 2010.** Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology* 73(6):748-757.
- Lee D, Yanagimoto Ueta Y, Suzuki H. 2006.** Expression of amphiregulin during the pre- and post-implantation period in the mouse reproductive tract. *J Reprod Dev* 52(6):781-787.
- Lee KF, Chow JF, Xu JS, Chan ST, Ip SM, Yeung WS. 2001.** A comparative study of gene expression in murine embryos developed in vivo, cultured in vitro, and

- cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. *Biol Reprod* 64(3):910-917.
- Lee KF, Yeung WS. 2006.** Gamete/embryo - oviduct interactions: implications on in vitro culture. *HumFertil(Camb)* 9(3):137-143.
- Lee Y, Lee K, Xu J, He Q, Chiu J, Lee W, Luk J, Yeung W. 2004.** The embryotrophic activity of oviductal cell-derived complement C3b and iC3b, a novel function of complement protein in reproduction. *J Biol Chem* 279(13):12763-12768.
- Lee YL, Cheong AW, Chow WN, Lee KF, Yeung WS. 2009.** Regulation of complement-3 protein expression in human and mouse oviducts. *MolReprodDev* 76(3):301-308.
- Lee YL, Lee KF, Xu JS, Kwok KL, Luk JM, Lee WM, Yeung WS. 2003.** Embryotrophic factor-3 from human oviductal cells affects the messenger RNA expression of mouse blastocyst. *Biol Reprod* 68(2):375-382.
- Leese HJ. 1983.** Studies on the movement of glucose, pyruvate and lactate into the ampulla and isthmus of the rabbit oviduct. *Q J Exp Physiol* 68(1):89-96.
- Leese HJ. 1988.** The formation and function of oviduct fluid. *JReprodFertil* 82(2):843-856.
- Leese HJ. 1995.** Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update* 1(1):63-72.
- Leese HJ. 1998.** Human embryo culture: back to nature. *J Assist Reprod Genet* 15(8):466-468.
- Leese HJ, Hugentobler S, Gray S, Morris D, Sturmey R, Whitear S, Sreenan J. 2008.** Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Dev* 20(1):1-8.
- Leese HJ, Barton AM. 1985.** Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells. *J Exp Zool* 234(2):231-236.
- Leese HJ, Gray SM. 1985.** Vascular perfusion: a novel means of studying oviduct function. *Am J Physiol* 248(5 Pt 1):E624-632.
- Leese HJ, Hugentobler SA, Gray SM, Morris DG, Sturmey RG, Whitear SL, Sreenan JM. 2008.** Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Dev* 20(1):1-8.
- Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ. 2001.** Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* 121(3):339-346.

- Lefebvre J, Fan J, Chevalier S, Sullivan R, Carmona E, Manjunath P. 2007.** Genomic structure and tissue-specific expression of human and mouse genes encoding homologues of the major bovine seminal plasma proteins. *Mol Hum Reprod* 13(1):45-53.
- Léveillé M, Roberts K, Chevalier S, Chapdelaine A, Bleau G. 1987.** Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 36(1):227-238.
- Leyton L, Saling P. 1989.** 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57(7):1123-1130.
- Li R, Whitworth K, Lai L, Wax D, Spate L, Murphy CN, Rieke A, Isom C, Hao Y, Zhong Z, Katayama M, Schatten H, Prather RS. 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. *Mol Reprod Dev* 74(9):1228-1235.
- Liberda J, Manásková P, Prelovská L, Tichá M, Jonáková V. 2006.** Saccharide-mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *J Reprod Immunol* 71(2):112-125.
- Lindsay LL, Hedrick JL. 2004.** Proteolysis of *Xenopus laevis* egg envelope ZPA triggers envelope hardening. *Biochem Biophys Res Com* 324(2):648-654.
- Ling L, Lee YL, Lee KF, Tsao SW, Yeung WS, Kan FW. 2005.** Expression of human oviductin in an immortalized human oviductal cell line. *Fertil Steril* 84 Suppl 2(Journal Article):1095-1103.
- Lippes J, Enders RG, Pragay DA, Bartholomew WR. 1972.** The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception* 5(2):85-103.
- Liu L, Chan S, Ho P, Yeung W. 1998.** Partial purification of embryotrophic factors from human oviductal cells. *Hum Reprod* 13(6):1613-1619.
- Lloyd RE, Elliott RM, Fazeli A, Watson PF, Holt WV. 2009.** Effects of oviductal proteins, including heat shock 70 kDa protein 8, on survival of ram spermatozoa over 48 h in vitro. *Reproduction, fertility, and development* 21(3):408-418.
- Lloyd RE, Romar R, Matás C, Gutiérrez-Adán A, Holt WV, Coy P. 2009.** Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction* 137(4):679-687.
- Lok IH, Briton-Jones CM, Yuen PM, Haines CJ. 2002.** Variable expression of oviductin mRNA at different stages of human reproductive cycle. *J Assist Reprod Genet* 19(12):569-576.
- Lyng R, Shur B. 2007.** Sperm-egg binding requires a multiplicity of receptor-ligand interactions: new insights into the nature of gamete receptors derived from reproductive tract secretions. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65:335-351.

- Lyng R, Shur B. 2009.** Mouse oviduct-specific glycoprotein is an egg-associated ZP3-independent sperm-adhesion ligand. *J Cell Sci* 122(Pt 21):3894-3906.
- Maas DH, Storey BT, Mastroianni L. 1977.** Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* 28(9):981-985.
- Malayer JR, Hansen PJ, Buhi WC. 1988.** Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J Exp Zool* 248(3):345-353.
- Malette B, Bleau G. 1993.** Biochemical characterization of hamster oviductin as a sulphated zona pellucida-binding glycoprotein. *BiochemJ* 295 (Pt 2)(Pt 2):437-445.
- 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. *Mol Reprod Dev* 41(3):384-397.
- Manásková P, Jonáková V. 2008.** Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. *J Reprod Immunol* 78(1):40-48.
- Manásková P, Peknicová J, Elzeinová F, Tichá M, Jonáková V. 2007.** Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *J Reprod Immunol* 74(1-2):103-113.
- Manna C, Rienzi L, Greco E, Sbracia M, Rahman A, Poverini R, Siracusa G, De Felici M. 2001.** Zona pellucida solubility and cortical granule complements in human oocytes following assisted reproductive techniques. *Zygote* 9(3):201-210.
- Marín-Briggiler C, González-Echeverría M, Munuce M, Ghersevich S, Caille A, Hellman U, Corrigan V, Vazquez-Levin M. 2010.** Glucose-regulated protein 78 (Grp78/BiP) is secreted by human oviduct epithelial cells and the recombinant protein modulates sperm-zona pellucida binding. *Fertil Steril* 93(5):1574-1584.
- Martus NS, Verhage HG, Mavrogianis PA, Thibodeaux JK. 1998.** Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fertil* 113(2):323-329.
- Mastroianni L, Beer F, Shah U, Clewe TH. 1961.** Endocrine regulation of oviduct secretions in the rabbit. *Endocrinology* 68:92-100.
- McAvey BA, Wortzman GB, Williams CJ, Evans JP. 2002.** Involvement of calcium signaling and the actin cytoskeleton in the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Biol Reprod* 67(4):1342-1352.

- McBride D, Boisvert C, Bleau G, Kan F. 2004a.** 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. *J Histochem Cytochem* 52(8):1001-1009.
- McBride DS, Boisvert C, Bleau G, Kan FW. 2004b.** Evidence for the regulation of glycosylation of golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviductin during the estrous cycle. *Biol Reprod* 70(1):198-203.
- McBride DS, Brockhausen I, Kan FW. 2005.** Detection of glycosyltransferases in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviduct and evidence for the regulation of O-glycan biosynthesis during the estrous cycle. *Biochim Biophys Acta* 1721(1-3):107-115.
- McCauley TC, Buhi WC, Wu GM, Mao J, Caamano JN, Didion BA, Day BN. 2003.** Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod* 69(3):828-834.
- McCulloh D, Rexroad CJ, Levitan H. 1983.** Insemination of rabbit eggs is associated with slow depolarization and repetitive diphasic membrane potentials. *Dev Biol* 95(2):372-377.
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. 2000.** Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil* 118(1):163-170.
- McGee EA, Hsu SY, Kaipia A, Hsueh AJ. 1998.** Cell death and survival during ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 140(1-2):15-18.
- McGee EA, Hsueh AJ. 2000.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21(2):200-214.
- McLaughlin KC, Hamner CE. 1975.** Preliminary characterization of rabbit oviduct fluid trypsin inhibitors. *Biol Reprod* 12(5):556-565.
- McNutt TL, Killian GJ. 1991.** Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J Androl* 12(4):244-252.
- McNutt T, Rogowski L, Vasilatos-Younken R, Killian G. 1992.** Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. *Mol Reprod Dev* 33(3):313-323.
- Ménézo Y, Guérin P. 1997.** The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 73(1):99-104.
- Menino AR, Wright RW. 1982.** Variation in porcine zona pellucida morphology following pronase treatment. *J Anim Sci* 55(2):369-375.

- Merchán M, Peiró R, Argente M, Santacreu M, García M, Blasco A, Folch J. 2009.** Analysis of the oviductal glycoprotein 1 polymorphisms and their effects on components of litter size in rabbits. *Anim Genet* 40(5):756-758.
- Merchán M, Peiró R, Santacreu MA, Francino O, Folch JM. 2007.** Rabbit oviductal glycoprotein 1 gene: genomic organization polymorphism analysis and mRNA expression. *MolReprodDev* 74(6):687-693.
- Merchán M, Rendón M, Folch JM. 2006.** Assignment of the oviductal glycoprotein 1 gene (OVGP1) to porcine chromosome 4q22-->q23 by radiation hybrid panel mapping. *Cytogenet Genome Res* 114(1):93C.
- Meyers SA, Yudin AI, Cherr GN, VandeVoort CA, Myles DG, Primakoff P, Overstreet JW. 1997.** Hyaluronidase activity of macaque sperm assessed by an in vitro cumulus penetration assay. *Mol Reprod Dev* 46(3):392-400.
- Miller D, Macek M, Shur B. 1992.** Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* 357(6379):589-593.
- Miller DJ, Gong X, Decker G, Shur BD. 1993.** Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *The J Cell Biol* 123(6 Pt 1):1431-1440.
- Miller JG, Schultz GA. 1987.** Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod* 36(1):125-129.
- Mintz B. 1962.** Experimental Study of the Developing Mammalian Egg: Removal of the Zona Pellucida. *Science* 138(3540):594-595.
- Miyano T. 2003.** Bringing up small oocytes to eggs in pigs and cows. *Theriogenology* 59(1):61-72.
- Miyazaki S, Igusa Y. 1981.** Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. *Nature* 290(5808):702-704.
- Moller C, Wassarman P. 1989.** Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* 132(1):103-112.
- Monaco E, Gasparrini B, Boccia L, De Rosa A, Attanasio L, Zicarelli L, Killian G. 2009.** Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology* 71(3):450-457.
- Mondéjar I, Jiménez-Movilla M, Castell M, Avilés M, Ballesta J, Fernández-Colom P, Romeu. A. 2007.** Estudio ultraestructural y citoquímico del retículo endoplasmático de ovocitos humanos; Bilbao. *Revista ASEBIR*. p 164-174.
- Monné M, Jovine L. 2011.** A Structural View of Egg-Coat Architecture and Function in Fertilization. *Biol Reprod*.

- Moor RM, Cragle RG. 1971.** The sheep egg: enzymatic removal of the zona pellucida and culture of eggs in vitro. *J Reprod Fertil* 27(3):401-409.
- Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T. 1990.** Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil Suppl* 40:197-210.
- Moor RM, Warnes GM. 1979.** Regulation of meiosis in mammalian oocytes. *Br Med Bull* 35(2):99-103.
- Moros C, Izquierdo-Rico MJ, Stetson I, Ballesta J, García-García RM, Rebollar PG, Lorenzo PL, Avilés M. 2010.** Molecular evidences of the presence of ZP1 glycoprotein in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).
- Mugnier S, Dell'Aquila ME, Pelaez J, Douet C, Ambruosi B, De Santis T, Lacalandra GM, Lebos C, Sizaret PY, Delaleu B, Monget P, Mermillod P, Magistrini M, Meyers SA, Goudet G. 2009.** New Insights into the Mechanisms of Fertilization: Comparison of the Fertilization Steps, Composition, and Structure of the Zona Pellucida Between Horses and Pigs. *Biol Reprod* 81(5):856-870.
- Mugnier S, Kervella M, Douet C, Canepa S, Pascal G, Deleuze S, Duchamp G, Monget P, Goudet G. 2009.** The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reprod Biol Endocrinol* 7:129.
- Muñoz-Gotera R, Hernández-González E, Mendoza-Hernández G, Contreras R, Mújica A. 2001.** Exocytosis of a 60 kDa protein (calreticulin) from activated hamster oocytes. *Mol Reprod Dev* 60(3):405-413.
- Murdoch RN, White IG. 1971.** Studies of the stimulating effect of bicarbonate on the metabolism of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 25(2):231-242.
- Murdoch WJ. 1996.** Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 71(4):529-543.
- Murdoch WJ, McDonnel AC. 2002.** Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction* 123(6):743-750.
- Murray MK. 1995.** Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height. *Biol Reprod* 53(3):653-663.
- Murray SC, Smith TT. 1997.** Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil Steril* 68(2):351-357.
- Mwanza M, Razdan P, Hultén F, Einarsson S. 2002.** Transport of fertilised and unfertilized ova in sows. *Anim Reprod Sci* 74(1-2):69-74.

- Myles DG, Primakoff P. 1997.** Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod* 56(2):320-327.
- Nakano M, Yonezawa N. 2001.** Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells Tissues Organs* 168(1-2):65-75.
- Nancarrow CD, Hill JL. 1995.** Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. *J Reprod Fertil Supplement* 49(Journal Article):3-13.
- Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. 2000.** The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update* 6(2):149-159.
- Nichol R, Hunter RH, Gardner DK, Leese HJ, Cooke GM. 1992.** Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil* 96(2):699-707.
- Nichol R, Hunter RH, Gardner DK, Partridge R, Leese HJ, Cooke GM. 1998.** Concentrations of energy substrates in oviduct fluid in unilaterally ovariectomised pigs. *Res Vet Sci* 65(3):263-264.
- Nicosia S, Wolf D, Inoue M. 1977.** Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Dev Biol* 57(1):56-74.
- Noguchi S, Nakano M. 1993.** Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains from mouse zona pellucida glycoproteins ZP2 and ZP3. *Biochim Biophys Acta* 1158(3):217-226.
- Norwood JT, Hein CE, Halbert SA, Anderson RG. 1978.** Polycationic macromolecules inhibit cilia-mediated ovum transport in the rabbit oviduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(9):4413-4416.
- Nuttinck F, Mermillod P, Massip A, Dessy F. 1993.** Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: A preliminary study. *Theriogenology* 39(4):811-821.
- Nutu M, Weijdegård B, Thomas P, Thurin-Kjellberg A, Billig H, Larsson DG. 2009.** Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors beta and gamma in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. *Reprod Biol Endocrinol* 7:89.
- O'Day-Bowman MB, Mavrogianis PA, Fazleabas AT, Verhage HG. 1995.** A human oviduct-specific glycoprotein: synthesis, secretion, and localization during the menstrual cycle. *Microsc Res Tech* 32(1):57-69.
- O'Day-Bowman M, Mavrogianis P, Minshall R, Verhage H. 2002.** In vivo versus in vitro oviductal glycoprotein (OGP) association with the zona pellucida (ZP) in the hamster and baboon. *Mol Reprod Dev* 62(2):248-256.

- O'Day-Bowman MB, Mavrogianis PA, Reuter LM, Johnson DE, Fazleabas AT, Verhage HG. 1996.** Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizona following in vitro incubation. *Biol Reprod* 54(1):60-69.
- Odor D, Blandau R. 1949.** The frequency of occurrence of supernumerary sperm in rat ova. *Anat Rec* 104(1):1-9.
- Odor DL, Gaddum-Rosse P, Rumery RE, Blandau RJ. 1980.** Cyclic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual cycle and after estrogen treatment in the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*. *Anat Rec* 198(1):35-57.
- Odor DL, Gaddum-Rosse P, Rumery RE. 1983.** Secretory cells of the oviduct of the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*, during the menstrual cycle and after estrogen treatment. *Am J Anat* 166(2):149-172.
- Oehninger S, Veeck L, Franken D, Kruger TF, Acosta AA, Hodgen GD. 1991.** Human preovulatory oocytes have a higher sperm-binding ability than immature oocytes under hemizona assay conditions: evidence supporting the concept of "zona maturation". *Fertil Steril* 55(6):1165-1170.
- Oikawa T, Sendai Y, Kurata S, Yanagimachi R. 1988.** A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete research* 19(2):113-122.
- Oliphant G, Bowling A, Eng LA, Keen S, Randall PA. 1978.** The permeability of rabbit oviduct to proteins present in the serum. *Biol Reprod* 18(3):516-520.
- Oliphant G, Ross P. 1982.** Demonstration of production and isolation of three sulfated glycoproteins from the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 26(3):537-544.
- O'Rand MG, Welch JE, Fisher SJ. 1986.** Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. *Adv Exp Med Biol* 205:131-144.
- Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. 1990.** TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol* 10(8):4007-4015.
- Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. 2009.** Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res* 2(1):9.
- Ortiz ME, Bedregal P, Carvajal MI, Croxatto HB. 1986.** Fertilized and unfertilized ova are transported at different rates by the hamster oviduct. *Biol Reprod* 34(4):777-781.
- Ouhibi N, Ménéz Y, Benet G, Nicollet B. 1989.** Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Hum Reprod* 4(3):229-235.

- Overstreet J, Lin Y, Yudin A, Meyers S, Primakoff P, Myles D, Katz D, Vandervoort C. 1995.** Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biol Reprod* 52(1):105-114.
- Pacey AA, Davies N, Warren MA, Barratt CL, Cooke ID. 1995.** Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Human reproduction (Oxford, England)* 10(10):2603-2609.
- Papi M, Brunelli R, Sylla L, Parasassi T, Monaci M, Maulucci G, Missori M, Arcovito G, Ursini F, De Spirito M. 2010.** Mechanical properties of zona pellucida hardening. *Eur Biophys J* 39(6):987-992.
- 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. *MolReprodDev* 42(4):388-396.
- Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. 2003.** Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology* 59(1):73-86.
- Parr EL, Parr MB. 1986.** Uptake of immunoglobulins and other proteins from serum into epithelial cells of the mouse uterus and oviduct. *J Reprod Immunol* 9(4):339-354.
- Parrish J, Susko-Parrish J, Winer M, First N. 1988.** Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38(5):1171-1180.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. 1989.** Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 40(5):1020-1025.
- Pérez-Vilar J, Hill RL. 1999.** The structure and assembly of secreted mucins. *J Biol Chem* 274(45):31751-31754.
- Perkins JL. 1974.** Fluid flow of the oviduct. In honson AD, Foley CW (Eds). *The oviduct and its fuctions*. New York: Academic Press. Pp.119-132
- Perkins JL, Goode L, Wilder WA, Henson DB. 1965.** Collection of secretions from the oviduct and uterus of the ewe. *J Anim Sci* 24:383-387.
- Perkins JL, Goode L. 1967.** Free amino acids in the oviduct fluid of the ewe. *J Reprod Fertil* 14(2):309-311.
- Pesch S, Bergmann M. 2006.** Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* 37(7):597-612.
- Phillips DM, Shalgi RM. 1980.** Surface properties of the zona pellucida. *J Exp Zool* 213(1):1-8.

- Picton HM. 2001.** Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55(6):1193-1210.
- Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Piloni A, Bernard GW. 1999.** Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *J Periodontol* 70(4):370-374.
- Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS. 1991.** Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 44(1):102-107.
- Pradeep MA, Jagadeesh J, De AK, Kaushik JK, Malakar D, Kumar S, Dang AK, Das SK, Mohanty AK. 2011.** Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on in vitro embryo development. *Theriogenology* 75(6):1005-1015.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. 1985.** Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44(4):493-498.
- Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J. 2003.** Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell* 5(1):33-43.
- Rankin TL, Talbot P, Lee E, Dean J. 1999.** Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 126(17):3847-3855.
- Rankin TL, Tong ZB, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM, Dean J. 1998.** Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* 125(13):2415-2424.
- Rao VH, Sarmah BC, Bhattacharyya NK. 1984.** Xenogenous fertilization of goat ova in the rabbit oviduct. *J Reprod Fertil* 71(2):377-379.
- Rapisarda JJ, Mavrogianis PA, O'Day-Bowman MB, Fazleabas AT, Verhage HG. 1993.** Immunological characterization and immunocytochemical localization of an oviduct-specific glycoprotein in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 76(6):1483-1488.
- Rekkas CA, Besenfelder U, Havlicek V, Vainas E, Brem G. 2002.** Plasminogen activator activity in cortical granules of bovine oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 57(7):1897-1905.
- Reuter LM, O'Day-Bowman MB, Mavrogianis PA, Fazleabas AT, Verhage HG. 1994.** In vitro incubation of golden (Syrian) hamster ovarian oocytes and human sperm with a human oviduct specific glycoprotein. *Mol Reprod Dev* 38(2):160-169.
- Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT. 1998.** Mice lacking osteopontin show normal

- development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 13(7):1101-1111.
- Rizos D, Lonergan P, Boland M, Arroyo-García R, Pintado B, de la Fuente J, Gutiérrez-Adán A. 2002.** Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod* 66(3):589-595.
- Rizos D, Ramirez M, Pintado B, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. 2010.** Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology* 73(6):777-785.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland M, Lonergan P. 2002.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 61(2):234-248.
- Roberts G, Parker J, Symonds H. 1975.** Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. *J Reprod Fertil* 45(2):301-313.
- Robitaille G, St-Jacques S, Potier M, Bleau G. 1988.** Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biol Reprod* 38(3):687-694.
- Roblero L, Biggers JD, Lechene CP. 1976.** Electron probe analysis of the elemental microenvironment of oviducal mouse embryos. *J Reprod Fertil* 46(2):431-434.
- Roblero LS, Riffo MD. 1986.** High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos in vitro. *Fertil Steril* 45(3):412-416.
- Rodriguez-Martinez H, Einarsson S, Larsson B. 1982.** Spontaneous motility of the oviduct in the anaesthetized pig. *J Reprod Fertil* 66(2):615-624.
- Rodriguez-Martinez H, Ekstedt E, Einarsson S. 1990.** Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int J Androl* 13(3):238-243.
- Rodriguez-Martinez H, Nicander L, Viring S, Einarsson S, Larsson K. 1990.** Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 19(1):16-36.
- Roldan-Olarte M, Jiménez-Díaz M, Miceli DC. 2005.** Plasminogen detection in oocytes and plasminogen activator activities in the porcine oviduct during the estrous cycle. *Zygote* 13(2):115-123.
- Romar R, Coy P, Campos I, Gadea J, Matás C, Ruiz S. 2001.** Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on in vitro fertilization. *Anim Reprod Sci* 68(1-2):85-98.

- Romar R, Coy P, Gadea J, Rath D. 2005.** Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized in vitro with epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 85(3-4):287-300.
- Roosen-Runge EC. 1969.** Comparative aspects of spermatogenesis. *Biol Reprod* 1:Suppl 1:24-31.
- Rottmayer R, Ulbrich S, Kölle S, Prella K, Neumueller C, Sinowatz F, Meyer H, Wolf E, Hiendleder S. 2006.** A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction* 132(4):637-648.
- Saavedra Leos MD. 2009.** Estudio de la composición de los gránulos corticales y del oolema de ovocitos porcinos y bovinos madurados y fecundados *in vitro*. Tesis. Universidad de Murcia. Murcia.
- Sakai Y, Araki Y, Yamashita T, Kurata S, Oikawa T, Hiroi M, Sendo F. 1988.** Inhibition of in vitro fertilization 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. *J Reprod Immunol* 14(2):177-189.
- Saling PM, Storey BT, Wolf DP. 1978.** Calcium-dependent binding of mouse epididymal spermatozoa to the zona pellucida. *Dev Biol* 65(2):515-525.
- Salustri A, Yanagishita M, Underhill CB, Laurent TC, Hascall VC. 1992.** Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle. *Dev Biol* 151(2):541-551.
- Sathananthan AH. 1994.** Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: unique aspects of the human oocyte. *Microsc Res Tech* 27(2):145-164.
- 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. *Biochim Biophys Acta* 1266(2):117-123.
- Schatten H. 2008.** The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochem Cell Biol* 129(6):667-686.
- Schiewe MC, Araujo E, Jr., Asch RH, Balmaceda JP. 1995.** Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. *J Assist Reprod Genet* 12(1):2-7.
- Schmidt A, Mavrogianis PA, O'Day-Bowman MB, Jaffe RC, Verhage HG. 1997a.** 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. *Am J Reprod Immunol* 38(6):377-383.

- Schmidt A, Mavrogianis PA, O'Day-Bowman MB, Verhage HG. 1997b.** Species-specific effect of oviductal glycoproteins on hamster sperm binding to hamster oocytes. *Mol Reprod Dev* 46(2):201-207.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. 2006.** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3.
- Schuetz AW, Anisowicz A. 1974.** Cation and protein composition of ovarian follicular fluid of the pig: relation to follicle size. *Biol Reprod* 11(1):64-72.
- Scobie GA, Kerr LE, MacDuff P, Aitken RJ. 1999.** Cloning, sequencing and site of origin of the rat sperm receptor protein, ZP3. *Zygote* 7(1):27-35.
- Scott JE. 1992.** Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J* 6(9):2639-2645.
- Seigneuret M, Delaguillaumie A, Lagaudrière-Gesbert C, Conjeaud H. 2001.** Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem* 276(43):40055-40064.
- Senbon S, Hirao Y, Miyano T. 2003.** Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. *J Reprod Dev* 49(4):259-269.
- Sendai Y, Abe H, Kikuchi M, Satoh T, Hoshi H. 1994.** Purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 50(4):927-934.
- 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. *Biol Reprod* 53(2):285-294.
- Sengoku K, Tamate K, Horikawa M, Takaoka Y, Ishikawa M, Dukelow W. 1995.** Plasma membrane block to polyspermy in human oocytes and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 105(1):85-90.
- Seytanoglu A, Georgiou AS, Sostaric E, Watson PF, Holt WV, Fazeli A. 2008.** Oviductal cell proteome alterations during the reproductive cycle in pigs. *J Prot Res* 7(7):2825-2833.
- Shalgi R, Raz T. 1997.** The role of carbohydrate residues in mammalian fertilization. *Histol Histopathol* 12(3):813-822.
- Shi D, Komatsu K, Uemura T, Fujimori T. 2011.** Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct. *Genes Cells* 16(3):282-290.
- Shirley B, Reeder RL. 1996.** Cyclic changes in the ampulla of the rat oviduct. *J Exp Zool* 276(2):164-173.

- Skinner SM, Dunbar BS. 1992.** Localization of a carbohydrate antigen associated with growing oocytes and ovarian surface epithelium. *J Histochem Cytochem* 40(7):1031-1036.
- Slavik T, Fulka J. 1999.** Oviduct secretion contributes to the establishment of species specific barrier preventing penetration of oocytes with foreign spermatozoa. *Folia Biol* 45(2):53-58.
- Smith TT, Yanagimachi R. 1991.** Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* 91(2):567-573.
- Smorag Z, Katska L. 1988.** Reversible changes in dissolution of the zona pellucida of immature bovine oocytes. *Theriogenology* 30(1):13-22.
- Song CY, Gao B, Wu H, Wang XY, Chen GH, Mao J. 2010.** Spatial and temporal expression of spermadhesin genes in reproductive tracts of male and female pigs and ejaculated sperm. *Theriogenology* 73(5):551-559.
- Sostaric E, Dieleman SJ, van de Lest CH, Colenbrander B, Vos PL, Garcia-Gil N, Gadella BM. 2008.** Sperm binding properties and secretory activity of the bovine oviduct immediately before and after ovulation. *Mol Reprod Dev* 75(1):60-74.
- Souza CE, Moura AA, Monaco E, Killian GJ. 2008.** Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci* 105(1-2):72-89.
- Srivastava MD, Lippes J, Srivastava BI. 1996.** Cytokines of the human reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 36(3):157-166.
- Stambaugh R, Noriega C, Mastroianni L. 1969.** Bicarbonate ion; the corona cell dispersing factor of rabbit tubal fluid. *J Reprod Fertil* 18(1):51-58.
- Stanke DF, DeYoung DW, Sikes JD, Mather EC. 1973.** Collection of bovine oviduct secretions. *J Reprod Fertil* 32(3):535-537.
- Staros AL, Killian GJ. 1998.** In vitro association of six oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida. *J Reprod Fertil* 112(1):131-137.
- Steffl M, Schweiger M, Amselgruber WM. 2005.** Estrous cycle specific immunolocalization of different domains of the epidermal growth factor receptor in the porcine oviduct. *Endocrine* 27(3):289-294.
- Steffl M, Schweiger M, Wessler I, Kunz L, Mayerhofer A, Amselgruber WM. 2006.** Non-neuronal acetylcholine and choline acetyltransferase in oviductal epithelial cells of cyclic and pregnant pigs. *Anat Embryol (Berl)* 211(6):685-690.

- Stewart-Savage J, Bavister B. 1991.** Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster eggs after sperm fusion. *Mol Reprod Dev* 30(4):390-395.
- Stojkovic M, Kollé S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F, Wolf E. 2002.** Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen-thawed bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* 124(1):141-153.
- Suarez SS. 1987.** Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod* 36(1):203-210.
- Suarez SS. 2002.** Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* 37(3):140-143.
- Suarez SS. 2008.** Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *IntJDevBiol* 52(5-6):455-462.
- Suarez SS, Dai X. 1992.** Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* 46(4):686-691.
- Suarez SS, Revah I, Lo M, Kollé S. 1998.** Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca²⁺-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide. *Biol Reprod* 59(1):39-44.
- Sun QY. 2003.** Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech* 61(4):342-348.
- Sun TT, Chung CM, Chan HC. 2011.** Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8. *Protein Cell* 2(2):92-98.
- Sun XS, Yue KZ, Zhou JB, Chen QX, Tan JH. 2002.** In vitro spontaneous parthenogenetic activation of golden hamster oocytes. *Theriogenology* 57(2):845-851.
- Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, Carson DD. 1995.** Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology* 136(8):3639-3647.
- Sutton R, Nancarrow C, Wallace A, Rigby N. 1984.** Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of the sheep. *J Reprod Fertil* 72(2):415-422.
- Suzuki K, Sendai Y, Onuma T, Hoshi H, Hiroi M, Araki Y. 1995.** Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 53(2):345-354.

- Swanchara KW, Henricks DM, Birrenkott GP, Bodine AB, Richardson ME. 1995.** Expression of epidermal growth factor (EGF) and the EGF receptor in the porcine oviduct. *Biol Reprod* 53(4):911-922.
- Swanson W, Yang Z, Wolfner M, Aquadro C. 2001.** Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2509-2514.
- Swanson WJ, Vacquier VD. 2002.** The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet* 3(2):137-144.
- Szulańczyk K. 2009.** Histological changes within ovarian cortex, oviductal and uterine mucosa in case of ovarian cysts presence in sows. *Folia Histochem Cytobiol* 47(1):99-103.
- Tahara M, Tasaka K, Masumoto N, Mammoto A, Ikebuchi Y, Miyake A. 1996.** Dynamics of cortical granule exocytosis at fertilization in living mouse eggs. *Am J Physiol* 270(5 Pt 1):C1354-1361.
- Talbot P. 1985.** Sperm penetration through oocyte investments in mammals. *Am J Anat* 174(3):331-346.
- Talbot P, Geiske C, Knoll M. 1999.** Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Mol Biol Cell* 10(1):5-8.
- Talevi R, Gualtieri R. 2001.** Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro. *Biol Reprod* 64(2):491-498.
- Talevi R, Gualtieri R. 2010.** Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* 73(6):796-801.
- Talevi R, Zagami M, Castaldo M, Gualtieri R. 2007.** Redox regulation of sperm surface thiols modulates adhesion to the fallopian tube epithelium. *Biol Reprod* 76(4):728-735.
- Tardif S, Dubé C, Bailey JL. 2003.** Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* 68(1):207-213.
- Tarín JJ, Pérez-Albalá S, Cano A. 2000.** Consequences on offspring of abnormal function in ageing gametes. *Hum Reprod Update* 6(6):532-549.
- Tay JI, Rutherford AJ, Killick SR, Maguiness SD, Partridge RJ, Leese HJ. 1997.** Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents. *Hum Reprod* 12(11):2451-2456.
- Tesarík J, Pilka L, Trávník P. 1988.** Zona pellucida resistance to sperm penetration before the completion of human oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 83(1):487-495.

- Thibault C, Gerard M, Ménézo Y. 1975.** Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. *J Reprod Fertil* 45(3):605-610.
- Thibault C, Szöllösi D, Gérard M. 1987.** Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* 27(5):865-896.
- Tian X, Pascal G, Fouhecourt S, Pontarotti P, Monget P. 2009.** Gene Birth, Death, and Divergence: The Different Scenarios of Reproduction-Related Gene Evolution. *Biol Reprod*(Journal Article).
- Tiemann U, Viergutz T, Jonas L, Wollenhaupt K, Pohland R, Kanitz W. 2001.** Fluorometric detection of platelet activating factor receptor in cultured oviductal epithelial and stromal cells and endometrial stromal cells from bovine at different stages of the oestrous cycle and early pregnancy. *Domest Anim Endocrinol* 20(3):149-164.
- Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2004.** Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci* 80(1-2):131-146.
- Tienthai P, Kjellén L, Pertoft H, Suzuki K, Rodriguez-Martinez H. 2000.** Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reprod Fertil Dev* 12(3-4):173-182.
- Tienthai P, Sajjarengpong K, Techakumphu M. 2009.** Light and scanning electron microscopic studies of oviductal epithelium in Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) at the follicular and luteal phases. *Reprod Domest Anim* 44(3):450-455
- Tisdall DJ, Watanabe K, Hudson NL, Smith P, McNatty KP. 1995.** FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J Mol Endocrinol* 15(3):273-281.
- Tone A, Begley H, Sharma M, Murphy J, Rosen B, Brown T, Shaw P. 2008.** Gene expression profiles of luteal phase fallopian tube epithelium from BRCA mutation carriers resemble high-grade serous carcinoma. *Clin Cancer Res* 14(13):4067-4078.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Tsoлова M. 2008.** Glycobiology of fertilization in the pig. *Int J Dev Biol* 52(5-6):717-736.
- Topfer-Petersen E, Petrounkina AM, Ekhlesi-Hundrieser M. 2000.** Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* 60-61:653-662.
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela P, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostálovà Z, Sanz L, Calvete J. 1998.** Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30(4-5):217-224.

- Topper E, Kruijt L, Calvete J, Mann K, Töpfer-Petersen E, Woelders H. 1997.** Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 46(3):344-350.
- Topper EK, Killian GJ, Way A, Engel B, Woelders H. 1999.** Influence of capacitation and fluids from the male and female genital tract on the zona binding ability of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil* 115(1):175-183.
- Trounson AO, Moore NW. 1974.** The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *J Reprod Fertil* 41(1):97-105.
- Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LE. 1977.** Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows. *J Reprod Fertil* 51(2):321-327.
- Tsaadon A, Eliyahu E, Shtraizent N, Shalgi R. 2006.** When a sperm meets an egg: block to polyspermy. *Mol Cell Endocrinol* 252(1-2):107-114.
- Tsafiriri A, Reich R. 1999.** Molecular aspects of mammalian ovulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107(1):1-11.
- Tsantarliotou MP, Zervos IA, Vatzias G, Billinis C, Taitzoglou IA, Kokolis NA. 2005.** Plasminogen activator activity in the porcine oviduct during the oestrous cycle. *Theriogenology* 64(4):1007-1015.
- Tulsiani DR, Abou-Haila A, Loeser C, Pereira B. 1998.** The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 240(2):151-164.
- Tulsiani DR, Abou-Haila A. 2001.** Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments. *Zygote* 9(1):51-69.
- Turner LM, Hoekstra HE. 2008.** Causes and consequences of the evolution of reproductive proteins. *Int J Dev Biol* 52(5-6):769-780.
- Umezu T, Tomooka Y. 2004.** An evidence of stromal cell populations functionally linked with epithelial cell populations in the mouse oviduct. *Zoolog Sci* 21(3):319-326.
- Vadnais ML, Foster DN, Roberts KP. 2008.** Molecular cloning and expression of the CRISP family of proteins in the boar. *Biol Reprod* 79(6):1129-1134.
- Van Langendonck A, Vansteenbrugge A, Dessy-Doizé C, Flechon J, Charpigny G, Mermillod P, Massip A, Dessy F. 1995.** Characterization of bovine oviduct epithelial cell monolayers cultured under serum-free conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31(9):664-670.

- Van Winkle LJ, Campione AL, Kester SE. 1985.** A possible effect of the Na⁺ concentration in oviductal fluid on amino acid uptake by cleavage-stage mouse embryos. *J Exp Zool* 235(1):141-145.
- Varki A. 2011.** Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(6).
- Velásquez J, Cánovas S, Barajas P, Marcos J, Jiménez-Movilla M, Gallego R, Ballesta J, Avilés M, Coy P. 2007.** Role of sialic acid in bovine sperm-zona pellucida binding. *Mol Reprod Dev* 74(5):617-628.
- Velásquez LA, Maisey K, Fernandez R, Valdes D, Cardenas H, Imarai M, Delgado J, Aguilera J, Croxatto HB. 2001.** PAF receptor and PAF acetylhydrolase expression in the endosalpinx of the human Fallopian tube: possible role of embryo-derived PAF in the control of embryo transport to the uterus. *Hum Reprod* 16(8):1583-1587.
- Velazquez MA, Parrilla I, Van Soom A, Verberckmoes S, Kues W, Niemann H. 2010.** Sampling techniques for oviductal and uterine luminal fluid in cattle. *Theriogenology* 73(6):758-767.
- Verco CJ, Gannon BJ, Jones WR. 1984.** Variations in rabbit oviduct microvascular architecture after ovulation induced by hCG. *J Reprod Fertil* 72(1):15-19.
- Verhage HG, Fazleabas AT. 1988.** The in vitro synthesis of estrogen-dependent proteins by the baboon (*Papio anubis*) oviduct. *Endocrinology* 123(1):552-558.
- Verhage H, Fazleabas A, Donnelly K. 1988.** The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology* 122(4):1639-1645.
- Verhage HG, Fazleabas AT, Mavrogianis PA, O'Day-Bowman MB, Donnelly KM, Arias EB, Jaffe RC. 1997a.** The baboon oviduct: characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Hum Reprod Update* 3(6):541-552.
- Verhage HG, Fazleabas AT, Mavrogianis PA, O'Day-Bowman MB, Schmidt A, Arias EB, Jaffe RC. 1997b.** Characteristics of an oviductal glycoprotein and its potential role in fertility control. *J Reprod Fertil Suppl* 51:217-226.
- Verhage H, Mavrogianis P, Boomsma R, Schmidt A, Brenner R, Slayden O, Jaffe R. 1997.** Immunologic and molecular characterization of an estrogen-dependent glycoprotein in the rhesus (*Macaca mulatta*) oviduct. *Biol Reprod* 57(3):525-531.
- Villalón M, Ortiz ME, Aguayo C, Muñoz J, Croxatto HB. 1982.** Differential transport of fertilized and unfertilized ova in the rat. *Biol Reprod* 26(2):337-341.

- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995.** Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121(4):1129-1137.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995.** Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121(4):1139-1150.
- Vishwakarma P. 1962.** The pH and bicarbonate-ion content of the oviduct and uterine fluids. *Fertil Steril* 13:481-485.
- Von Witzendorff D, Maass K, Pich A, Ebeling S, Kölle S, Kochel C, Ekhlasi-Hundrieser M, Geyer H, Geyer R, Töpfer-Petersen E. 2009.** Characterization of the acidic N-linked glycans of the zona pellucida of prepuberal pigs by a mass spectrometric approach. *Carbohydr Res* 344(12):1541-1549.
- Wagner A, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel C, Petrunkina A, Waberski D, Nimtz M, Töpfer-Petersen E. 2002.** Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation-studies in the pig. *Mol Reprod Dev* 61(2):249-257.
- Wang H, Guo Y, Wang D, Kingsley PJ, Marnett LJ, Das SK, DuBois RN, Dey SK. 2004.** Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *NatMed* 10(10):1074-1080.
- Wang WH, Day BN, Wu GM. 2003.** How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microsc Res Tech* 61(4):335-341.
- Wang WH, Sun QY. 2006.** Meiotic spindle, spindle checkpoint and embryonic aneuploidy. *Front Biosci* 11:620-636.
- Wassarman P. 1988.** Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* 57:415-442.
- Wassarman PM. 1990.** Profile of a Mammalian sperm receptor. *Development* 108(1):1-17.
- Wassarman PM. 2009.** Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56. *Bioessays* 31(2):153-158.
- Wassarman PM, Bleil JD, Florman HM, Greve JM, Roller RJ, Salzmann GS. 1986.** Nature of the mouse egg's receptor for sperm. *Adv Exp Med Biol* 207:55-77.
- Wassarman PM, Litscher E. 2008.** Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int J Dev Biol* 52(5-6):665-676.
- Way AL, Schuler AM, Killian GJ. 1997.** Influence of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on sperm-egg binding and fertilization in vitro. *J Reprod Fertil* 109(1):95-101.

- Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. 1999.** Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil Suppl* 54:33-48.
- Wegner CC, Killian GJ. 1992.** Origin of oestrus-associated glycoproteins in bovine oviductal fluid. *J Reprod Fertil* 95(3):841-854.
- Wertheimer EV, Salicioni AM, Liu W, Trevino CL, Chavez J, Hernández-González EO, Darszon A, Visconti PE. 2008.** Chloride Is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 283(51):35539-35550.
- Wessel G, Brooks J, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, Zaydfudim V, Conner S. 2001.** The biology of cortical granules. *Int Rev Cytol* 209:117-206.
- White KL, Pate BJ, Sessions BR. 2010.** Oolemma receptors and oocyte activation. *Syst Biol Reprod Med* 56(5):365-375.
- Wijayagunawardane MP, Miyamoto A, Taquahashi Y, Gabler C, Acosta TJ, 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. *J Endocrinol* 168(1):117-130.
- Wilkinson TS, Roghanian A, Simpson AJ, Sallenave JM. 2011.** WAP domain proteins as modulators of mucosal immunity. *Biochem Soc Trans* 39(5):1409-1415.
- Willis P, Sekhar KN, Brooks P, Fayrer-Hosken RA. 1994.** Electrophoretic characterization of equine oviductal fluid. *J Exp Zool* 268(6):477-485.
- Wolf D. 1978.** The block to sperm penetration in zonal-free mouse eggs. *Dev Biol* 64(1):1-10.
- Wolf D, Hamada M. 1977.** Induction of zonal and egg plasma membrane blocks to sperm penetration in mouse eggs with cortical granule exudate. *Biol Reprod* 17(3):350-354.
- Wolf D, Hamada M. 1979.** Sperm binding to the mouse egg plasmalemma. *Biol Reprod* 21(1):205-211.
- Wolf JP, Ducot B, Aymar C, Rodrigues D, Desjardin S, Jardin A, Jouannet P. 1997.** Absence of block to polyspermy at the human oolemma. *Fertil Steril* 67(6):1095-1102.
- Wrobel KH, Kujat R, Fehle G. 1993.** The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res* 271(2):227-239.

- Yamagata K, Nakanishi T, Ikawa M, Yamaguchi R, Moss SB, Okabe M. 2002.** Sperm from the calmegin-deficient mouse have normal abilities for binding and fusion to the egg plasma membrane. *Dev Biol* 250(2):348-357.
- Yamaguchi R, Yamagata K, Ikawa M, Moss SB, Okabe M. 2006.** Aberrant distribution of ADAM3 in sperm from both angiotensin-converting enzyme (Ace)- and calmegin (Clgn)-deficient mice. *Biol Reprod* 75(5):760-766.
- Yamanouchi H, Umezu T, Tomooka Y. 2010.** Reconstruction of oviduct and demonstration of epithelial fate determination in mice. *Biol Reprod* 82(3):528-533.
- Yamaoka S. 1987.** Cilium movement of human oviduct. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 39(5):777-784.
- Yanagimachi R. 1966.** Time and process of sperm penetration into hamster ova in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 11(3):359-370.
- Yanagimachi R. 1984.** Fertilization in mammals. *Tokai J Exp Clin Med* 9(2):81-85.
- Yanagimachi R. 1994a.** Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2(4):371-372.
- Yanagimachi R. 1994b.** Mammalian fertilization. In: Press NYR, editor. In: Knobil E, Neil JD *The Physiology of Reproduction*. New York. p 135-185.
- Yanagimachi R. 2011.** Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization? *Biol Reprod*.
- Yanagimachi R, Chang MC. 1961.** Fertilizable life of golden hamster ova and their morphological changes at the time of losing fertilizability. *J of Exp Zool* 148(Journal Article):185-203.
- Yang CH, Yanagimachi R. 1989.** Differences between mature ovarian and oviductal oocytes: a study using the golden hamster. *Hum Reprod* 4(1):63-71.
- Yániz JL, Lopez-Gatius F, Hunter RH. 2006.** Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Anat Histol Embryol* 35(1):28-34.
- Yániz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins KJ. 2000.** Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* 260(3):268-278.
- Yeung WS, Lee KF, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Ho PC, Chiu PC. 2006.** Roles of glycodefin in modulating sperm function. *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2):149-156.
- Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, Nakano M. 2001.** Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and

analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem* 268(12):3587-3594.

Yong P, Gu Z, Luo JP, Wang JR, Tso JK. 2002. Antibodies against the C-terminal peptide of rabbit oviductin inhibit mouse early embryo development to pass 2-cell stage. *Cell Res* 12(1):69-78.

Yoshinaga K, Mahoney WA, Pincus G. 1971. Collection of oviduct fluid from unrestricted monkeys. *J Reprod Fertil* 25(1):117-120.

Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA. 1998. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem* 273(13):7488-7494.

Zanetti SR, Monclus MeL, Rensetti DE, Fornés MW, Aveldaño MI. 2010. Differential involvement of rat sperm choline glycerophospholipids and sphingomyelin in capacitation and the acrosomal reaction. *Biochimie* 92(12):1886-1894.

Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT. 1991. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured in vitro in a serum-free medium. *Mol Reprod Dev* 28(3):292-296.

Zhang X, Rutledge J, Khamsi F, Armstrong D. 1992. Release of tissue-type plasminogen activator by activated rat eggs and its possible role in the zona reaction. *Mol Reprod Dev* 32(1):28-32.

Zhao Y, Chegini N, Flanders KC. 1994. Human fallopian tube expresses transforming growth factor (TGF beta) isoforms, TGF beta type I-III receptor messenger ribonucleic acid and protein, and contains [¹²⁵I]TGF beta-binding sites. *J Clin Endocrinol Metab* 79(4):1177-1184.

Zhuo L, Kimata K. 2001. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct Funct* 26(4):189-196.

Zuccotti M, Yanagimachi R, Yanagimachi H. 1991. The ability of hamster oolemma to fuse with spermatozoa: its acquisition during oogenesis and loss after fertilization. *Development* 112(1):143-152.