



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Estudio Molecular de la Glicoproteína Oviductal
OVGP1 y su Efecto en la Fecundación y el
Desarrollo Embrionario *in vitro* en la Especie
Porcina (*Sus scrofa*) y Bovina (*Bos taurus*)

Dña. Blanca Algarra Oñate
2016



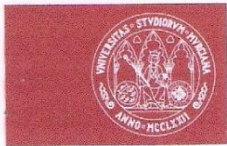
UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Estudio molecular de la glicoproteína oviductal
OVGP1 y su efecto en la fecundación y el desarrollo
embrionario *in vitro* en la especie porcina (*Sus scrofa*) y
bovina (*Bos taurus*)**

D^a. Blanca Algarra Oñate

2016



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Dña. **Maria Jiménez Movilla**, Profesor Contratado Doctor de Universidad del Área de Ciencias experimentales en el Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio molecular de la glicoproteína oviductal OVGPI y su efecto en la fecundación y el desarrollo embrionario *in vitro* en la especie porcina (*Sus scrofa*) y bovina (*Bos taurus*)**”, realizada por D^a. **Blanca Algarra Oñate**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia con Mención Internacional.

En Murcia, a 17 de Junio de 2016



Dra. María Jiménez Movilla



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. **Manuel Avilés Sánchez**, Profesor Titular de Universidad del Área de Ciencias experimentales en el Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio molecular de la glicoproteína oviductal OVGP1 y su efecto en la fecundación y el desarrollo embrionario *in vitro* en la especie porcina (*Sus scrofa*) y bovina (*Bos taurus*)**”, realizada por D^a. **Blanca Algarra Oñate**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia con Mención Internacional.

En Murcia, a 17 de Junio de 2016

Dr. Manuel Avilés Sánchez



UCD School of Agriculture & Food
Science

Scoil na Talamhaíochta & na
hEolaíochta Bia UCD

UCD Agriculture & Food Science Centre,

University College Dublin,
Belfield, Dublin 4, Ireland

T + 353 1 716 7781
F + 353 1 716 1103

Lárionad na Talamhaíochta & na
hEolaíochta Bia UCD

An Coláiste Ollscoile, Baile Átha Cliath,
Belfield, Baile Átha Cliath 4, Eire

pat.lonergan@ucd.ie
www.ucd.ie

20 de Junio 2016

A quien le pueda interesar

He revisado la tesis doctoral de Blanca Algarra Oñate titulada “Estudio molecular de la glicoproteína oviductal OVGPI y su efecto en la fecundación y el desarrollo embrionario *in vitro* en la especie porcina (*Sus scrofa*) y bovina (*Bos taurus*)” presentada en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

En vista del creciente número de parejas sometidas a técnicas de reproducción asistida en la actualidad, así como la baja fertilidad existente en ciertos grupos de especies de ganado, en particular la vaca lechera, el tema de la tesis es de gran interés y relevancia para la comunidad científica.

Los objetivos de la tesis fueron:

- (i) Diseñar, clonar y expresar diferentes proteínas recombinantes OVGPI en dos líneas celulares de mamíferos.
- (ii) Determinar el posible patrón de unión a la zona pelúcida del ovocito.
- (iii) Detectar la posible endocitosis de la proteína por parte del ovocito.
- (iv) Examinar el efecto fisiológico de OVGPI en la resistencia de la zona pelúcida a la digestión por pronasa.
- (v) Analizar el efecto fisiológico de OVGPI durante la fecundación y el cultivo embrionario temprano.

Ha sido un proyecto ambicioso en el que, hasta el momento, se han escrito dos artículos basados en el trabajo realizado en la presente tesis, para su publicación en revistas internacionales revisadas por pares. El primer artículo está bajo revisión en *Scientific Reports*, una revista on-line de acceso abierto de los editores de *Nature* con un impresionante índice de impacto de 5.228. El segundo artículo está todavía en preparación. Además, la candidata ha presentado su trabajo en varios congresos tanto nacionales como internacionales (Francia, Turquía, Escocia, Grecia, EEUU), lo que es una excelente producción para una tesis doctoral.

Basándome en todo lo anterior, recomiendo la tesis como apta para su presentación como Doctorado con mención internacional.

Sinceramente



UASLP
Universidad Autónoma
de San Luis Potosí



COORDINACIÓN
ACADÉMICA
**REGIÓN
HUASTECA SUR**

Tamazunchale, San Luis Potosí, México
18 Junio 2016

A quien corresponda

Informe del trabajo de tesis realizado por **D^a. Blanca Algarra Oñate**

El trabajo de tesis denominado Estudio molecular de la glicoproteína oviductal OVGP1 y su efecto en la fecundación y el desarrollo embrionario *in vitro* en la especie porcina (*Sus scrofa*) y bovina (*Bos taurus*) que **D^a. Blanca Algarra Oñate** presenta como tesis doctoral, desde mi punto de vista es aceptable para su defensa. Los resultados obtenidos en este trabajo ayudaran de forma importante a dilucidar los complejos procesos biológicos que rodean la fecundación y desarrollo embrionario. El hecho de que algunos de los resultados de esta tesis han sido incluidos en publicaciones y presentados en congresos especializados confirma la pertinencia de este trabajo.

El documento que **D^a. Blanca Algarra Oñate**, presenta una introducción clara, materiales y métodos descritos de tal forma que cada una de las técnicas puede ser reproducida. A pesar de que la introducción es muy amplia puede ser muy informativo para los estudiantes que inician en al área de reproducción. Las conclusiones son claras y concuerdan con los resultados.

Considero que no existe razón alguna que impida que este trabajo pueda ser defendido.

Saludos cordiales

Dra. María Dolores Saavedra Leos
Profesora Investigadora de Tiempo Completo
Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México
Campus Huasteca Sur
maria.saavedra@uaslp.mx
Teléfono: +52 4833624500



**Karolinska
Institutet**

200
1810 - 2010 *Years*

Luca Jovine, Ph.D.
Professor of Structural Biology

Telephone: +46.8.524-81136
Fax: +46.8.6081-501
E-mail: luca.jovine@ki.se
Web: <http://jovinelab.org>

Stockholm, 17 June 2016

A quien le pueda interesar:

Por la presente carta confirmo que Blanca Algarra Oñate ha realizado dos estancias predoctorales en nuestro laboratorio, del 18/09/2013 al 22/12/2013 y del 15/01/2014 al 31/03/2014. Concretamente, durante su estancia ha expresado y purificado proteínas OVGP1 recombinantes para ser utilizadas en el contexto de la realización de su Tesis Doctoral con mención internacional.

Blanca ha adquirido diferentes habilidades y técnicas durante su estancia en el Departamento de Biociencia y Nutrición y Centro de Biociencia en la universidad Karolinska Institutet (Estocolmo). Fue un placer tenerla como un miembro de nuestro grupo y espero contribuir a su desarrollo como joven investigadora.

Por favor, no dude en ponerse en contacto conmigo si tiene alguna pregunta.

Muy atentamente,

Luca Jovine, Ph.D.

Profesor de Biología Estructural y EMBO Young Investigator

El presente trabajo ha sido desarrollado para optar al grado de doctor en el Programa de Doctorado con Mención hacia la Excelencia "Biología y Tecnología de la Reproducción en Mamíferos" (Ref. MEE2011-0019). Asimismo, ha sido propuesto para Mención de Doctorado Internacional en virtud a las estancias predoctorales realizada en el Departamento de Biociencia y Nutrición y Centro de Biociencia de Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia) con una duración de seis meses.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada durante el periodo de disfrute de una beca-contrato predoctoral de la Universidad de Murcia y de dos ayudas para estancias en el extranjero para beneficiarios del programa de contratos predoctorales FPU de la Universidad de Murcia (R.- 632/2013). Esta tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2012-40180-C03-02). Así mismo, se ha desarrollado en el marco del Programa de Ayudas a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia de la Fundación Séneca, 04542/GERM/06.

Algunos de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

ARTÍCULOS

Algarra B, Han L, Soriano-Úbeda C, Avilés M, Coy P, Jovine L, Jiménez-Movilla M. **C-terminal of OVGP1 modulates remodeling of the zona pellucida and modifies fertility parameters among species.** (En revisión en **Scientific Reports**).

Algarra B, Maillo V, Aviles M, Rizos D, Jimenez-Movilla M. **Effect of recombinant porcine OVGP1 protein in bovine embryo development *in vitro*.** (En preparación).

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Blanca Algarra , Carla Moros , Irene Mondéjar , María José Izquierdo Rico, Pilar Coy , Manuel Avilés, María Jimenez Movilla. **Recombinant porcine OVGP1 binds to zona pellucida from matured oocytes**. Comunicación oral: **Premio a la mejor comunicación oral**. XI Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal. Córdoba (España), 2012.

Blanca Algarra, Manuel Avilés, Pilar Coy, María Jiménez-Movilla. **Recombinant porcine OVGP1 is endocytosed by matured oocytes**. Póster. 1st General Meeting of EPICONCEPT. COST 2013. International meeting. Antalya (Turquía), 2013.

Blanca Algarra, Laura Ballester, Manuel Avilés, Pilar Coy, María Jiménez-Movilla. **C-terminal regions from porcine OVGP1 modify its affinity for the ZP matrix and allow protein endocytosis**. Comunicación oral. EMBO Workshop : Oocyte maturation and fertilization. International meeting. Banyuls Sur-mer (Francia), 2013.

Blanca Algarra, Manuel Avilés, María Jiménez-Movilla. **Cloning and expression of recombinant OVGP1 proteins in mammalian CHO cells to assess role played by different protein domains**. Póster. VII Congreso Internacional de la Federación Española de Biotecnólogos (BAC 2013). Sevilla (España), 2013.

Blanca Algarra, Manuel Avilés, María Jiménez-Movilla. **Cloning and expression of recombinant Rabbit OVGP1 in mammalian CHO cells**. Póster. MED-SOUK: I Congreso Internacional de Jóvenes Investigadores del Mediterráneo. Murcia (España), 2013.

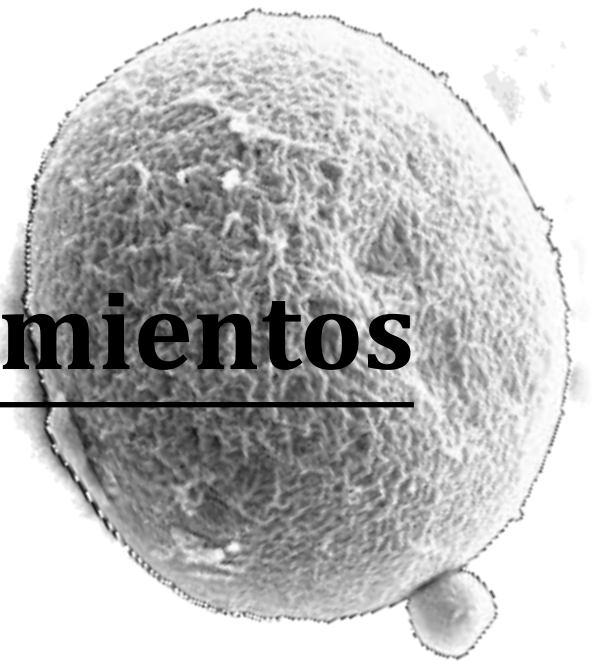
Blanca Algarra, Ling Han, Cristina Soriano-Úbeda, Manuel Avilés, Pilar Coy, Luca Jovine, María Jiménez-Movilla. **Deletion of the C terminal region of OVGPI affects porcine fertilization *in vitro***. Póster. 3rd World Congress in Reproductive Biology. Edimburgo (Escocia), 2014.

Blanca Algarra, Manuel Avilés, Pilar Coy, María Jiménez-Movilla. **Production of recombinant OVGPI protein from rabbit to improve IVF technology in pig**. Póster. The 12th International Congress of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA). Alicante (España), 2014.

Blanca Algarra, Cristina Soriano-Úbeda, Manuel Avilés, Pilar Coy, María Jiménez-Movilla. **C-terminal of OVGPI modulates binding to the zona pellucida and modifies fertility parameters**. Póster. Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Development. Holderness (Estados Unidos), 2015.

Verónica Maillo, Blanca Algarra, Manuel Avilés, Dimitrios Rizos, María Jiménez-Movilla. **Effect of recombinant porcine OVGPI protein in bovine embryo development *in vitro***. Póster. Epiconcept Conference 2015. Epigenetics and periconception environment. Hersonissos, Crete (Grecia), 2015.

Agradecimientos



En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis **Manuel Avilés Sánchez** y **María Jiménez Movilla** todo lo que se han implicado en la realización de esta Tesis Doctoral, ya que sin su ayuda, sus conocimientos y su afán investigador, nada habría sido posible. **Manolo**, gracias por mostrarme el asombroso mundo de la reproducción, por enseñarme tanto, por inculcarme que las cosas hay que hacerlas bien hechas, por tratarme como a una hija y por contagiarme a todo el mundo con tu entusiasmo cuando hablas de ciencia y de todo en general. **María**, gracias por confiar en mí, por estar a mi lado en el día a día, por enseñarme todo desde el principio, por transmitirme la pasión por este alucinante mundo, por tu gran optimismo que me hizo remontar en los momentos bajos, por tu esperada visita a Estocolmo y por ser una amiga.

Gracias a **Luca Jovine** por abrirme las puertas de su laboratorio y tratarme como a una más, ofreciéndome todo lo que estaba en su mano para que me sintiera como en casa. Gracias a **Ling Han** por dedicarme su tiempo, enseñarme con paciencia y preocuparse de que no me fuera de Estocolmo sin conocer cada rincón. Gracias a todos los compañeros que tuve durante mi estancia en Karolinska Institutet (Estocolmo), **Isha, Takako, Kathy, Elisa, Marcel, Kaoru y Hamed** por ayudarme en todo lo que necesité y ofrecerme su amistad. Gracias a todos los compañeros de la residencia y en especial a **Lorena**, por ser mi compañera de aventuras.

Gracias a **Dimitrios Rizos** por involucrarse en este proyecto haciendo posible el desarrollo de parte de esta Tesis. Muchas gracias a **Verónica Maillo** por su importante implicación. Gracias por acogerme en el INIA y por vuestra hospitalidad.

Gracias a **Jorge de Costa** y **Pilar Mendiola**, mis padres científicos. Muchas gracias por sembrar en mí la semilla de la inquietud científica, por enseñarme tantas cosas y por ser tan buenos científicos, docentes y mejores personas.

Gracias a **El Pozo Alimentación S.A.** por proporcionarnos las muestras biológicas sin las cuales no se hubiera podido realizar esta Tesis Doctoral.

Gracias a todos los profesores del Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina, a **Concha Ferrer, Emilio Gómez, Esther Beltrán, Francisco Hernández, José Ballesta, José Ángel Martínez, Juan Francisco Madrid, Luis Miguel Pastor y María Teresa Castells**. Gracias a **Emma Martínez** por su disposición siempre a ayudar y por su simpatía. Un gracias especial a **M^a José**

Izquierdo por sus buenos consejos, su ayuda siempre que la he necesitado y por ser tan buena compi de congresos. Muchas gracias por todo a **Mari Carmen, Ángel y Maite**.

Gracias a mis compañeros del Departamento de Biología Celular e Histología que han sido los responsables de que ésta haya sido una muy grata experiencia. Gracias a **Tere, Luis Miguel, Irene, Wilson, Lili, Sara, Jesús, Laura, Analuce, Leo y Nuria**. Una mención especial a **Carla, Narci, Ascen, Lourdes, Salva y Vicente** por vuestra generosidad y amistad. Sin vosotros ahí todo hubiera sido mucho más difícil.

Gracias a las chicas de Bioquímica, **Ana, Ceci, María, Marta y Julia** quienes han sido un soplo de aire fresco a disfrutar durante la hora de comer, así como nuestro proveedor particular cuando algo nos faltaba. Gracias a **Conchi** por ser tan buena persona y por estar siempre dispuesta a ayudar con una enorme sonrisa.

Gracias a los profesores del Departamento de Fisiología por permitirme trabajar allí y por su ayuda, a **Pilar Coy, Rakel Romar, Carmen Matás, Joaquín Gadea y Salvador Ruiz**. Gracias a **Fran García** por toda su ayuda con el papeleo y los buenos momentos en Edimburgo y a **Irene Mondéjar** por sus interesantes recomendaciones. Muchas gracias a **Soledad Rodríguez y Juan Antonio Carvajal** por estar siempre disponibles para todo.

Gracias a todos los compañeros del Departamento de Fisiología, en especial a **Jon, Luis, Rebeca, Sole y Silvia** por vuestra buena disposición a ayudar. Gracias a **Cristina** por implicarse de buena gana en el desarrollo de algún experimento de la tesis.

Gracias al Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia por su aportación a este trabajo.

Muchas gracias a mis “**Biofriends**” por haber sido mucho más que compañeros de carrera, gracias por ser verdaderos AMIGOS. Gracias a **Vero, Maripi, Juanjo, Pablo, Pedro, Rafa, Santi, Ana, Débora, Edu, Jesús...** y a los “postizos” **Antonio, Miriam, Gloria, Javi...** por haber vivido tantas aventuras juntos y porque siempre formaréis parte de mi vida.

Gracias a mis chicas, **Carmen, Irene de C., Irene M. y Marta** por ser tan especiales para mi, por ser únicas y extraordinarias y porque estoy segura de que siempre podré contar con vosotras.

Gracias al “**Ekipo**” por todo, por acogerme como a una más y dejarme formar parte de vuestro gran grupo.

Gracias a toda mi familia porque todos habéis contribuido a que llegue a ser lo que soy. Gracias a mis padres, **Magdalena** y **Jesús**, por ser comprensivos, cariñosos, educarnos en unos grandes valores, mostrarnos que con esfuerzo y trabajo podríamos conseguir lo que nos propusiésemos, por querernos tanto y en definitiva, por ser los mejores padres del mundo. Gracias por dejarme en herencia ese gen científico y encargaos de recrear las condiciones óptimas en las cuales expresara su fenotipo. Gracias a mis hermanas, **Marina** y **Paula**, mis mejores amigas, con las que he disfrutado más que con nadie, quienes han sido mi mayor apoyo y siempre serán un pedacito de mi corazón. **Paula** gracias por los preciosos dibujos. Gracias a mi “**Tita**” **Fuen**, quien ha sido una segunda madre para mí, por contagiarnos su espíritu aventurero y darnoslo todo. Gracias a mis cuñados **Kini** y **Marcelo**, por los buenos momentos que hemos pasado y los que nos quedan. Gracias a ese pequeñín que viene en camino, a mi sobrino, porque sus inicios llenaron de alegría la etapa más dura de la tesis.

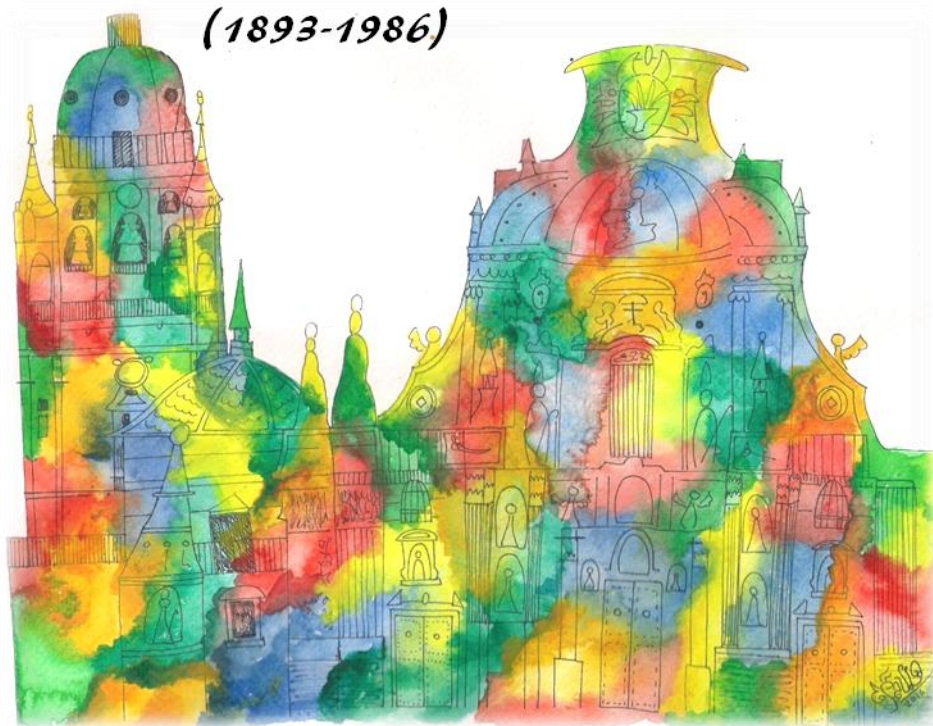
Gracias a mi familia política **Tere**, **Santiago**, **Indira** y **Santi**, por hacerme sentir como parte de la familia desde el primer momento. Gracias a **Sofía**, por hacerme sonreír sólo con pensar en ella.

Por último, quiero agradecer a la persona que más me ha aportado en la realización de esta Tesis, quien me ha aconsejado y ayudado en todo momento, quien me ha apoyado en los momentos difíciles y se ha alegrado más que yo con mis logros, quien es mi amigo y compañero de vida. **Jonatan**, gracias por creer en mí, por estar siempre a mi lado y darme lo mejor de ti, por cuidarme, por quererme y por ser la persona más buena y noble que conozco. Gracias.



*"Descubrir algo significa mirar lo mismo
que está viendo todo el mundo y percibirlo
de manera diferente."*

*Albert Szent-Györgyi
(1893-1986)*



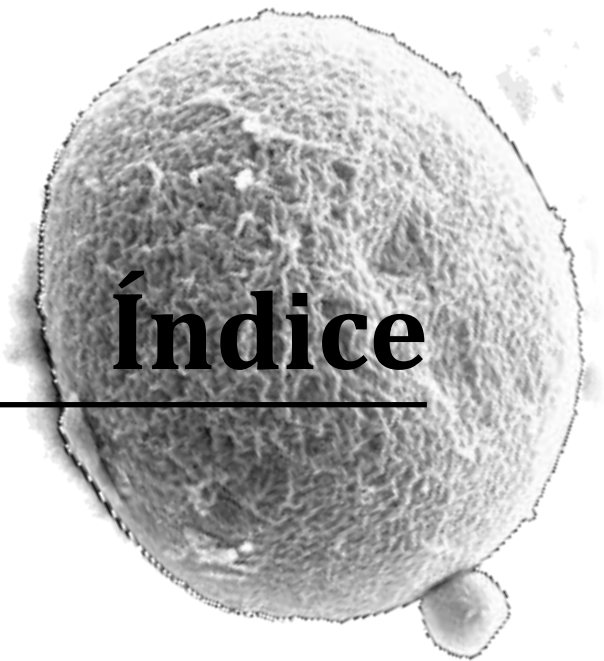
A mis abuelos Angelines, Jesús, Magdalena y Elías

Un pedacito de cada uno de vosotros vive en mí

A Jonatan

“Te puedo ver”

Índice



I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	5
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
3.1. Fecundación	11
3.2. El oviducto	12
3.2.1. Anatomía	12
3.2.2. Histología	13
3.2.2.1. Capa serosa	13
3.2.2.2. Capa muscular	13
3.2.2.3. Capa mucosa	14
3.2.2.4. Células del epitelio oviductal.....	14
3.3. El fluido oviductal (FO)	17
3.3.1. Formación del FO	18
3.3.2. Propiedades físicas del FO	19
3.3.3. Propiedades químicas del FO.....	20
3.3.4. Composición del FO	21
3.3.4.1. Agua y electrolitos	21
3.3.4.2. Componentes energéticos	22
3.3.4.3. Lípidos	23
3.3.4.4. Aminoácidos	24
3.3.4.5. Proteínas	25
3.4. Funciones del oviducto	36
3.4.1. ¿Es indispensable el oviducto para que se produzca la fecundación?	36
3.4.2. Función inmunológica.....	37
3.4.3. Función de barrera en la superficie oviductal	37
3.4.4. Funciones en relación al ovocito	38
3.4.4.1. La zona pelúcida	38
3.4.4.2. El ovocito en el oviducto: Maduración oviductal	41
3.4.5. Funciones en relación al gameto masculino	44
3.4.5.1. El espermatozoide en el oviducto	44
3.4.5.2. Funciones del oviducto sobre el espermatozoide	48
3.4.6. Funciones en relación al embrión.....	49
3.5. OVGP1	51
3.5.1. Caracterización bioquímica de OVGP1	54
3.5.2. Secuencia de OVGP1.....	55
3.5.3. Regiones de OVGP1	57
3.5.4. Secreción de OVGP1	62
3.5.5. El papel de OVGP1 en la fecundación	65
3.5.5.1. Gameto masculino	65
3.5.5.2. Gameto femenino	67
3.5.5.3. Embriones.....	73
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	77
4.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	79
4.1.1. Ovarios.....	79

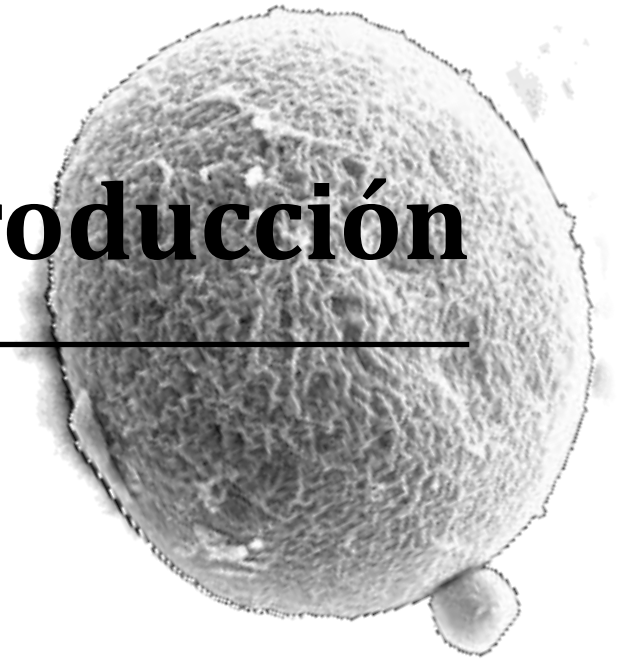
4.1.1.1. Obtención	79
4.1.1.2. Transporte	79
4.1.1.3. Lavado	80
4.1.2. Ovocitos	80
4.1.2.1. Especie murina (<i>Mus musculus</i>)	80
4.1.2.2. Especie porcina (<i>Sus scrofa domestica</i>)	81
4.1.2.3. Especie bovina (<i>Bos taurus</i>)	81
4.1.2.5. Maduración <i>in vitro</i> (MIV)	82
4.1.3. Oviductos y fluido oviductal (FO)	83
4.1.3.1. Especie porcina (<i>Sus scrofa domestica</i>)	83
4.1.3.2. Coneja (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	84
4.1.3.3. Obtención de fluido oviductal (FO)	84
4.2. Obtención de ARN total de oviducto porcino y de coneja	85
4.3. Síntesis <i>in vitro</i> de ADNc de oviducto porcino y de coneja	85
4.4. Clonación de las diferentes proteínas OVGP1 y fragmentos	86
4.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	86
4.4.1.1. OVGP1 porcina	86
4.4.1.2. OVGP1 porcina truncada	86
4.4.1.3. OVGP1 de coneja	86
4.4.1.4. Fragmentos de OVGP1 porcina	86
4.4.1.5. Condiciones de amplificación de PCR	87
4.4.2. Electroforesis en gel de agarosa	87
4.4.3. Digestión	88
4.4.4. Ligación	88
4.4.5. Transformación de células competentes	90
4.4.6. Selección de recombinantes	90
4.4.7. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados o clonados	91
4.5. Análisis de la expresión de las proteínas y los fragmentos de OVGP1	91
4.5.1. Cultivo de células	91
4.5.1.1. Cultivo de células CHO (Ovario de Hámster Chino)	91
4.5.1.2. Cultivo de células HEK 293T (Embrionarias de Riñón Humano)	91
4.5.2. Expresión de proteínas recombinantes	92
4.5.2.1. Expresión de las proteínas pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 en células HEK 293T	92
4.5.2.2. Expresión de proteínas y fragmentos de OVGP1 en células CHO	95
4.6. Caracterización bioquímica de las glicoproteínas recombinantes: pOVGP1, rOVGP1, pOVGP1AB, pOVGP1A y los fragmentos mMBP-pOVGP1D y mMBP-pOVGP1BD de pOVGP1	96
4.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	97
4.6.2. Tinción con azul de coomasie	97
4.6.3. Western-blot	97
4.6.3.1. Transferencia a membrana	97
4.6.3.2. Inmunodetección en membrana	98
4.7. Cálculo de la concentración de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1	99
4.8. Análisis de la glicosilación: tratamiento con N-GLICOSIDASA F	99

4.9. Incubación de ovocitos con proteínas recombinantes	100
4.9.1. Incubación.....	100
4.9.2. Lisado de ovocitos porcinos MIV previamente incubados con proteínas OVGP1 recombinantes.....	101
4.10. Digestión de la zona pelúcida	101
4.11. Sistema porcino	102
4.11.1. Procesado del semen porcino.....	102
4.11.2. Fecundación <i>in vitro</i> (FIV) porcina.....	103
4.11.2.1. FIV en presencia de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1.....	103
4.11.2.2. Evaluación de la FIV.....	104
4.11.2.3. Análisis estadísticos.....	105
4.12. Sistema bovino	105
4.12.1. Procesado del semen bovino.....	105
4.12.2. FIV bovina.....	106
4.12.3. Cultivo embrionario <i>in vitro</i> (CIV) bovino.....	106
4.12.4. Evaluación del desarrollo embrionario bovino.....	106
4.12.5. Evaluación de la calidad embrionaria utilizando análisis de expresión génica.....	106
4.12.6. Diseño experimental.....	108
4.12.6.1. Efecto de la suplementación durante FIV con 10 o 50 µg/mL de pOVGP1 en el desarrollo embrionario (día 0).....	109
4.12.6.2. Efecto de la suplementación durante CIV con 10 o 50 µg/mL de pOVGP1 en el desarrollo embrionario (día 1- día 3.5).....	109
4.12.6.3. Efecto de la suplementación durante FIV y CIV con 10 o 50 µg/mL de pOVGP1 en el desarrollo embrionario (día 0- día 3.5).....	110
4.12.7. Análisis estadísticos.....	110
4.13. Análisis inmunocitoquímicos	110
4.13.1. Microscopía Confocal.....	110
4.13.1.1. Fijación.....	110
4.13.1.2. Tinción inmunocitoquímica.....	111
4.13.1.3. Adquisición de Imágenes.....	111
4.13.1.4. Análisis de fluorescencia de la ZP.....	112
4.13.2. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	112
4.13.2.1. Fijación.....	112
4.13.2.2. Inclusión de ovocitos en LR-White.....	112
4.13.2.3. Tinción inmunocitoquímica en rejillas.....	113
V. RESULTADOS	115
5.1. Clonación de las proteínas OVGP1 y sus regiones	117
5.1.1. Clonación de pOVGP1, rOVGP1, pOVGP1AB y pOVGP1A en los vectores de expresión pcDNA 3.1 (+) y pcDNA 3 (+).....	117
5.1.2. Clonación de mMBP-pOVGP1BD y mMBP-pOVGP1D en el vector de expresión pHLSEC 3 ..	118
5.2. Expresión de las proteínas recombinantes en cultivos celulares	120
5.2.1. Expresión transitoria de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 recombinante por las células HEK 293T.....	120
5.2.1.1. Cálculo de la concentración de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1.....	122
5.2.2. Expresión recombinante transitoria y estable de pOVGP1, pOVGP1AB, pOVGP1A y rOVGP1 en la línea celular CHO.....	123

5.2.3. Expresión recombinante transitoria de los péptidos mMBP-pOVGP1BD y mMBP-pOVGP1D en la línea celular CHO	125
5.3. Análisis de las proteínas recombinantes deglicosiladas.....	126
5.3.1. Potenciales sitios de N-glicosilación y O-glicosilación de OVGP1 porcina y de coneja.....	127
5.4. Unión de OVGP1 a la ZP	130
5.4.1. OVGP1 se une a la ZP por su región N-terminal	130
5.4.2. La región C-terminal de OVGP1 modula la unión a la ZP.....	133
5.5. La delección de la región D de pOVGP1 previene la endocitosis por el ovocito.....	137
5.6. Efecto de las proteínas OVGP1 recombinantes sobre la resistencia de la ZP frente a la digestión proteolítica	141
5.7. Efecto de la proteína OVGP1 sobre la fecundación	144
5.8. Análisis homólogo y heterólogo entre proteínas OVGP1 recombinantes y ZP de diferentes especies	147
5.8.1. Unión homóloga y heteróloga de proteínas OVGP1 recombinantes a la ZP	147
5.8.2. Efecto de las proteínas OVGP1 sobre la resistencia a la digestión proteolítica de la ZP de ovocitos de varias especies.....	148
5.9. Efecto de la proteína pOVGP1 sobre el desarrollo embrionario bovino	149
5.9.1. Efecto de la suplementación con pOVGP1 en la FIV.....	149
5.9.2. Efecto de la suplementación con pOVGP1 en el CIV	151
5.9.3. Efecto de la suplementación con pOVGP1 en FIV+CIV	152
5.9.4. Detección de pOVGP1 en el interior de las bástómeras de blastocistos suplementados con pOVGP1 durante la FIV y el CIV	153
5.9.5. Análisis de la expresión génica de blastocistos bovinos tras el tratamiento con pOVGP1....	154
5.9.5.1. Efecto de la suplementación en la FIV	154
5.9.5.2. Efecto de la suplementación en CIV	155
5.9.5.3. Efecto de la suplementación en FIV y CIV	156
VI. DISCUSIÓN	159
6.1. Implicación de las regiones de la secuencia de OVGP1 en su función.....	162
6.2. Efecto de la glicosilación en las proteínas recombinantes expresadas	163
6.3. La región A es la responsable de la interacción de OVGP1 con la ZP en la especie porcina	164
6.4. El extremo C-terminal de OVGP1 influye en la maduración de la ZP en el oviducto y en su endocitosis por el ovocito	165
6.5. La región D de pOVGP1 es necesaria para que se produzca la endocitosis de la proteína por el ovocito porcino MIV	167
6.6. La región C-terminal de OVGP1 modifica los parámetros de fertilidad entre especies	167
6.7. Influencia de OVGP1 porcina en el desarrollo embrionario y en la expresión génica de embriones bovinos	171
VII. CONCLUSIONES.....	179

VIII. SUMMARY AND CONCLUSIONS	183
8.1. Introduction	185
8.2. Methods	187
8.3. Results and discussion	188
8.3.1. OVGP1 binds to ZP through the N-terminal region	188
8.3.2. C-terminal region of OVGP1 modulates the binding to the ZP	189
8.3.3. Deletion of region D prevents OVGP1 endocytosis by the oocyte	190
8.3.4. Effect of recombinant OVGP1 proteins on ZP resistance to proteolysis	191
8.3.5. Only full porcine OVGP1 increases fertilization efficiency.....	192
8.3.6. Influence of OVGP1 on in vitro embryo development	193
8.3.7. OVGP1 affects relative mRNA abundance	194
8.4. Conclusions	196
IX. ABREVIATURAS	199
X. ANEXOS	205
XI. BIBLIOGRAFÍA	217

I. Introducción



La fecundación *in vitro* es una herramienta básica para el desarrollo de la tecnología de la reproducción, tanto en las especies de interés veterinario como en la especie humana. También se utilizan estas técnicas para la conservación de especies en peligro de extinción (Cseh *et al.*, 2000, Clulow *et al.*, 2014, Comizzoli *et al.*, 2014, Holt *et al.*, 2014, Comizzoli, 2015).

Sin embargo, la eficiencia actual de las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) no es óptima y en la mayoría de las especies la eficiencia en fecundación es menor *in vitro* que *in vivo* (Mondejar *et al.*, 2012). A pesar de que las diferentes técnicas de reproducción asistida no dejan de estar en continua evolución y de ser objeto de investigación para mejorarlas en todos los niveles, todavía hoy no conocemos los aspectos moleculares y fisiológicos responsable de estas diferencias. Se barajan como posibles responsables fallos en la maduración final de los gametos, una deficiente interacción entre el ovocito y el espermatozoide y la pobre habilidad del cigoto recién formado de desarrollarse. Todos estos procesos, que probablemente afectan la eficiencia de las técnicas reproductivas *in vitro*, tienen lugar en el oviducto bajo condiciones fisiológicas.

Se considera que el oviducto y en particular sus secreciones, juegan un papel clave en diferentes aspectos de la fecundación. Aunque el oviducto ha sido considerado durante mucho tiempo como un mero conducto para los gametos y embriones, numerosos estudios realizados durante las pasadas décadas han demostrado que el oviducto está involucrado en diferentes e importantes procesos como son la maduración de gametos, capacitación, selección espermática y desarrollo embrionario. Todos estos procesos son de gran relevancia para la correcta fisiología del gameto y del embrión (Hunter, 1991; Avilés *et al.*, 2010, Coy *et al.*, 2012a, Hunter, 2012).

Los resultados obtenidos a partir de numerosos estudios sugieren que las condiciones de cultivo durante la producción de embriones *in vitro* podría influenciar el potencial de desarrollo y la calidad de los embriones tempranos (Lonergan *et al.*, 2007). Las estrategias desarrolladas para la mejora del desarrollo embrionario incluye el cocultivo con células epiteliales, el uso de medio de cultivo suplementado con diferentes proteínas y factores de crecimiento y el uso de oviductos ajenos al animal, ya que la transferencia de embriones a oviductos de otras especies se ha utilizado para

optimizar el desarrollo embrionario temprano en diferentes especies, reconociendo el oviducto como el mejor microambiente para ello (Gandolfi *et al.*, 1987, Lonergan *et al.*, 2003, Gutierrez-Adan *et al.*, 2004, Rizos *et al.*, 2007, Rizos *et al.*, 2010).

La generación de nuevos conocimientos relacionados con el proceso fisiológico de la fecundación puede tener una aplicación directa en la mejora de los sistemas de fecundación *in vitro* en las diferentes especies de mamíferos de interés zootécnico. Estas mejoras se podrían traducir en el aumento en la calidad y cantidad de embriones producidos *in vitro* a través de la utilización de nuevos medios de cultivo. Los embriones podrían a su vez utilizarse en los distintos campos de aplicación como la conservación de razas en peligro de extinción, la mejora genética o el incremento de la productividad de los animales, la producción de animales transgénicos con diferentes fines biomédicos o productivos y la generación de conocimiento en biología reproductiva con futuras nuevas aplicaciones (Holt *et al.*, 2014, Keefer, 2015, White *et al.*, 2015).

El interés científico del desarrollo de esta Tesis Doctoral es el estudio de proteínas oviductales que participan activamente en el momento de la fecundación y en las primeras etapas de desarrollo embrionario, como es la glicoproteína oviductina (OVGP1), proteína específica y más abundante del fluido oviductal (FO) secretada por el oviducto. Se utilizará la tecnología de producción de proteínas recombinantes con el objetivo de obtener las proteínas recombinantes correspondientes a OVGP1 porcina y de coneja, puesto que como es conocido, tienen un efecto en distintos mecanismos relacionados con la fecundación y el bloqueo de la polispermia (McCauley *et al.*, 2003, Coy *et al.*, 2008a, Yang *et al.*, 2015). Además, también se obtendrán otras variantes de OVGP1 porcina truncadas en parte de su secuencia aminoacídica. Todo esto nos permitirá estudiar la función concreta que tiene OVGP1 en los procesos reproductivos tempranos, así como el papel desempeñado por cada una de las regiones de esta proteína. Como aplicación al estudio de la función de OVGP1 podríamos producir e incorporar OVGP1 a medios de cultivo utilizados en técnicas de reproducción asistida (TRAs) para la mejora de los resultados obtenidos tras el uso de dichas técnicas.

II. Objetivos



Por lo expuesto anteriormente y con el propósito de ampliar los conocimientos actuales sobre la glicoproteína OVGP1, la función de las regiones que componen su secuencia y su efecto fisiológico en la reproducción como componente del fluido oviductal, los **objetivos** planteados en la presente tesis doctoral son los siguientes:

- I. Diseñar, clonar y expresar diferentes proteínas OVGP1 recombinantes en dos líneas celulares de mamífero.
- II. Determinar el posible patrón de unión de OVGP1 a la ZP de ovocitos de diferentes especies.
- III. Detectar la posible endocitosis de OVGP1 por los ovocitos de diferentes especies.
- IV. Examinar el efecto fisiológico de OVGP1 en la modificación estructural de la ZP reflejada en la resistencia frente a la digestión enzimática de la ZP.
- V. Analizar el efecto fisiológico de OVGP1 durante la fecundación y el cultivo embrionario temprano, así como su implicación en la mejora de los medios utilizados en técnicas de reproducción asistida *in vitro*.

III. Revisión Bibliográfica



3.1. Fecundación

El proceso por el cual dos células germinales haploides se fusionan formando un cigoto diploide totipotente, que dará lugar a un organismo de características únicas, se denomina fecundación (Yanagimachi, 1984, Yanagimachi, 1994). Es un proceso complejo en el que intervienen numerosos fenómenos y factores, siendo algunos de ellos clave. Su estudio es necesario para conocer de manera minuciosa y global los entresijos de la formación de una nueva vida. También servirá para asentar la base del conocimiento a partir de la cual podremos desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento de problemas de infertilidad, además de técnicas novedosas y más efectivas de reproducción asistida.

En cuanto a las estrategias de fecundación utilizadas en el reino animal, podemos encontrar dos fundamentales (Dale *et al.*, 2011). Una de ellas es la fecundación externa, que consiste en la liberación de los gametos tanto femeninos como masculinos al medio acuoso, donde se encuentran entre sí. El otro tipo de fecundación es la interna, común en mamíferos, en la que durante el apareamiento el macho deposita los gametos en el interior del aparato genital de la hembra, utilizando un órgano específico para ello. El semen es depositado en la vagina en rumiantes, primates y conejo, o en el útero en cerdo, perro, caballo y algunos roedores (Hunter, 1991a, Hunter *et al.*, 2011).

En mamíferos, la fecundación se produce en la trompa de Falopio en primates o en el oviducto en no primates (Menezo *et al.*, 1997), en una región del mismo denominada ampolla oviductal. Aquí se produce el reconocimiento entre un ovocito ovulado y un espermatozoide capacitado (Hunter, 2005).

La fusión del óvulo y el espermatozoide es un proceso complejo que consta de una secuencia de eventos seriados, la cual comienza con la capacitación del espermatozoide en el istmo del oviducto. Una vez capacitado, el espermatozoide puede llegar a la ampolla oviductal, donde le espera el óvulo rodeado por el cúmulo ovígeno (CO) o *cumulus oophorus*. El espermatozoide tiene que atravesarlo para unirse a la zona pelúcida del óvulo (ZP). Una vez unido, sufrirá la reacción acrosómica (RA) y será entonces apto para atravesar la ZP ovocitaria. Se ha visto que en ratón no es exactamente así, ya que utilizando espermatozoides de ratones transgénicos, se ha

descrito que la mayoría de espermatozoides no sufren la RA cerca o en contacto con la ZP, sino que una gran proporción la sufren en el segmento superior del istmo oviductal (La Spina *et al.*, 2016). A continuación, deben fusionarse las membranas de los dos gametos, a lo que el ovocito responde activándose y desencadenando la reacción cortical, la cual evita la entrada de espermatozoides adicionales, mientras se inicia la formación del cigoto (Visconti *et al.*, 2010).

El oviducto y sus secreciones, que forman parte del fluido oviductal (FO), son un elemento clave en el proceso de la fecundación. Crean un microambiente que acompaña a los gametos y al embrión hasta su descenso al útero, por lo que los componentes del FO deben de estar implicados en muchas funciones importantes de todo el proceso (Aviles *et al.*, 2010, Coy *et al.*, 2012a, Mondejar *et al.*, 2012).

3.2. El oviducto

Los oviductos, denominados en la mujer trompas de Falopio, son dos órganos tubulares intraperitoneales que por un extremo se abren hacia la cavidad abdominal a través de un orificio infundibular y por el otro extremo se comunican con la luz uterina mediante un segmento estrecho. El extremo infundibular abierto se encuentra en conexión estrecha con el ovario (Welsch *et al.*, 2008).

Durante décadas se les ha atribuido como única función ser el conducto a través del cual se produce el transporte de los gametos, óvulos y espermatozoides, en direcciones opuestas para encontrarse y transportar al embrión formado hasta el útero, donde se producirá la implantación y el desarrollo embrionario. Más tarde se demostró que la función del oviducto y sus secreciones, es mucho más compleja, siendo fundamentales en el transporte de los gametos, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Coy *et al.*, 2012a, Hunter, 2012).

3.2.1. Anatomía

El oviducto es un conducto músculo-membranoso de longitud variable en las diferentes especies de mamíferos (es de 16-18 centímetros en la mujer y 28-30 centímetros en la cerda). En su anatomía se diferencian cuatro regiones funcionales (Leese, 1988, Menezo *et al.*, 1997), que son el infundíbulo, la ampolla, el istmo y la

unión utero-tubárica (**Fig. 1**). El infundíbulo es la región más cercana al ovario. Tiene forma de embudo. En su extremo posee prolongaciones, las fimbrias, gracias a las cuales existe una estrecha aproximación entre ellas y el ovario. La ampolla oviductal se corresponde con casi dos tercios del oviducto, es una región más dilatada y menos muscular y se considera la verdadera porción secretora. El istmo ocupa un tercio del oviducto y termina en unión útero-tubárica (o porción intramural en la mujer) la cual es morfológicamente diferente entre especies y se abre en la cavidad uterina.



Figura 1. Oviducto porcino disecado. Podemos observar las regiones anatómicas en las que se divide el oviducto: Infundíbulo, ampolla, unión ampular-ístmica, istmo y la unión utero-tubárica (Aviles *et al.*, 2010) (Barra: 1 cm).

3.2.2. Histología

A nivel histológico podemos decir que son tres las capas que forman el oviducto, siendo la capa serosa la más externa, la muscular la capa media y la mucosa la que está en contacto con la luz del tubo.

3.2.2.1. Capa serosa

La capa serosa es la más externa de todas ellas y está representada por el peritoneo que se continúa con el ligamento ancho. Está formada por mesotelio y una delgada capa de tejido conjuntivo.

3.2.2.2. Capa muscular

La capa muscular posee un espesor que aumenta desde el extremo ovárico del oviducto hasta el extremo uterino y está compuesta por dos capas musculares: una capa circular interna más gruesa y una capa longitudinal externa más delgada.

3.2.2.3. Capa mucosa

La capa mucosa posee un revestimiento formado por un epitelio cilíndrico simple. Esta mucosa presenta pliegues ramificados, largos y numerosos en la ampolla y van disminuyendo progresivamente hacia el istmo, donde la luz es estrecha con pequeñas elevaciones no ramificadas. Intercalados entre estas proyecciones hay un sistema complejo de criptas, bolsillos y surcos (Hunter *et al.*, 1991, Yaniz *et al.*, 2000). La luz de la ampolla es muy pequeña, lo que permite que el óvulo, con su cúmulo ovífero, se encuentre en contacto íntimo con el epitelio ciliado (Yaniz *et al.*, 2006, Desantis *et al.*, 2011).

Esta compleja estructura anatómica contribuye a la selección espermática y participa probablemente en la regulación del número de espermatozoides que alcanzan el sitio de la fecundación, controlando la polispermia y promoviendo diferentes microambientes oviductales (Hunter, 2012). La composición del microambiente oviductal, determinado por la composición de la mucosa oviductal, es decisivo para la fertilidad, debido a su importancia en la migración de gametos, desplazamiento y desarrollo embrionario (Szulanczyk, 2009, Katarzyna *et al.*, 2010, Winuthayanon *et al.*, 2015).

3.2.2.4. Células del epitelio oviductal

El epitelio oviductal está formado por dos tipos celulares principalmente, las células ciliadas y las células secretoras no ciliadas (**Fig. 2**), además de alguna célula linfocítica dispersa (Umezu *et al.*, 2004, Yamanouchi *et al.*, 2010).

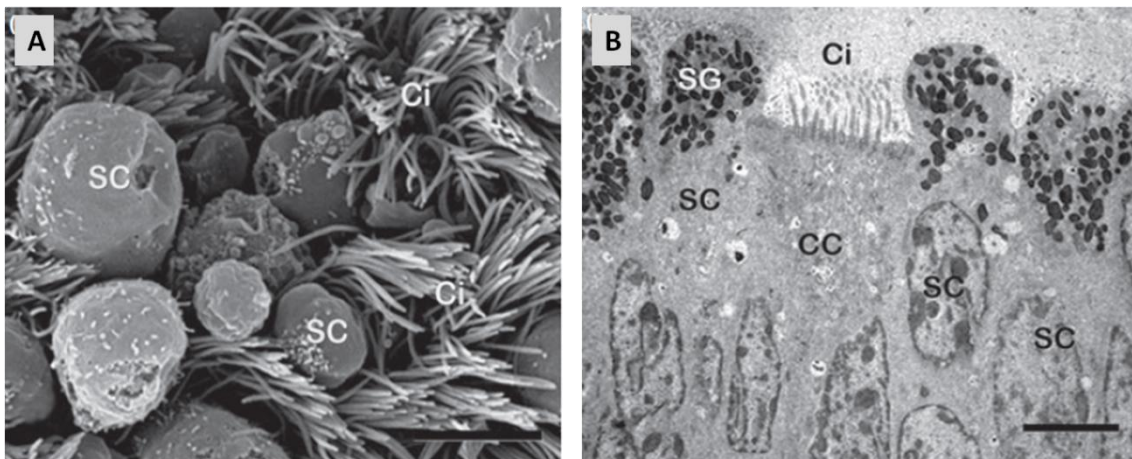


Figura 2. Células epiteliales de la unión ampular-ístmica (AIJ) del oviducto bovino. A: Micrografía electrónica de barrido de la superficie epitelial de la ampolla de oviducto bovino en fase folicular tardía. B: Micrografía electrónica de transmisión de AIJ. Células ciliadas (CC), células secretoras (SC), gránulos secretores (SG) y cilios (Ci). Barra: 5 μ m. (Modificado de Mondéjar et al., 2012)

Las células ciliadas poseen unos cilios delgados móviles, los cinocilios, que están extendidos hacia la luz y podrían jugar un papel importante en el transporte de óvulos y embriones, además de su participación en la progresión espermática (Hunter, 1994, Abe *et al.*, 2008).

Durante la fase folicular del ciclo estral o menstrual, en especial en el momento cercano a la ovulación, ocurren cambios en la porción ciliada del oviducto, donde los cilios se ponen erectos, asumiendo progresivamente movimientos de batido sincronizado. Este batido es direccional, sobre todo en las zonas del infundíbulo fimbriado y la ampolla. Los extremos curvados de los cilios recogen el complejo cúmulo-ovocito de la superficie del folículo ovárico y lo desplaza hacia el lugar de fecundación (Hafez *et al.*, 1969, Blandau, 1973, Lyons *et al.*, 2006, Shi *et al.*, 2011). Contracciones del miosalpix contribuyen en esta progresión (Halbert *et al.*, 1976, Martinez *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2004, Rios *et al.*, 2007).

La concentración de hormonas ováricas modula la rapidez con la que se mueven los cilios, siendo mayor en la fase ovulatoria que en la luteal (Bylander *et al.*, 2010). La frecuencia del movimiento de los cilios es mayor en el infundíbulo y va disminuyendo conforme nos desplazamos hacia el istmo en la mujer (Yamaoka, 1987). Los cilios de las fimbrias se mueven sincronizadamente hacia el infundíbulo desplazando el ovocito recién ovulado hacia la región inicial del oviducto (Nutu *et al.*, 2009). Las contracciones del oviducto, junto con este movimiento ciliar, permiten el desplazamiento de los ovocitos hasta la zona de fecundación y el de los cigotos al útero (Shi *et al.*, 2011).

La distribución de los dos tipos celulares presentes en el oviducto y sus características dependen de la región oviductal, siendo las células ciliadas más abundantes en la zona de las fimbrias e infundíbulo y disminuyendo en dirección al istmo, a la vez que se hacen más abundantes las células secretoras no ciliadas. La distribución espacial tiene un papel funcional ya que las células ciliadas son abundantes donde el ovocito ha de ser captado por la superficie oviductal y las secretoras donde su

secreción es necesaria en la interacción ovocito-espermatozoide (Abe *et al.*, 2008, Yamanouchi *et al.*, 2010).

Las células secretoras poseen la superficie apical cubierta de numerosas microvellosidades. Estas células sintetizan proteína de manera activa. Poseen gránulos de secreción de naturaleza, tamaño y número diferente según el segmento del oviducto, la zona basal o apical de los pliegues, la especie y la fase del ciclo estral (Abe, 1996, Yaniz *et al.*, 2000, Yaniz *et al.*, 2006, Abe *et al.*, 2007, Desantis *et al.*, 2011). La secreción está regulada por hormonas ováricas, importantes en la preparación de los gametos para la fecundación y la posterior protección y nutrición del embrión (Hunter, 1994, Abe *et al.*, 1995b, Gandolfi, 1995, Hunter, 2012, Suarez, 2015).

El epitelio de las fimbrias y la ampolla es muy cambiante durante el ciclo estral, mientras que en el istmo y unión utero-tubárica estos cambios son escasos o nulos (Abe, Onodera *et al.*, 1999; Tienthai, Sajjarengpong *et al.*, 2009). En la fase folicular temprana se produce la formación de cilios y aumento de la altura de las células ciliadas, lo que disminuye en la fase folicular tardía o post-ovulatoria temprana (Abe *et al.*, 2008, Tienthai *et al.*, 2009). En la fase luteal tardía se produce deciliación y atrofia de los mismos, disminuyendo el porcentaje de células ciliadas en el infundíbulo y ampolla (Odor *et al.*, 1980, Abe *et al.*, 2008, Konar *et al.*, 2014). En la fase peri-ovulatoria aumenta la cantidad de gránulos de secreción en las células secretoras, siendo esta fase el punto de máxima secreción (Shirley *et al.*, 1996, Abe *et al.*, 2007). En la fase luteal, las células del infundíbulo no poseen gránulos de secreción y en las de la ampolla disminuye su contenido (Odor *et al.*, 1983).

Las diferencias que aparecen no son sólo temporales, ya que aparecen diferentes tipos de células ciliadas y secretoras en las diferentes zonas del oviducto, lo que sugiere que el epitelio de cada segmento está implicado en la creación de un microambiente distinto con una composición bioquímica única relacionada con su función en cada una de las etapas del ciclo estral (Abe, 1996, Desantis *et al.*, 2011). Se ha observado que la regulación de la expresión génica de las células epiteliales además de ser diferente durante las distintas etapas del ciclo estral (Bauersachs *et al.*, 2004), también lo es entre la región ipsilateral y la contralateral del oviducto bovino (Bauersachs *et al.*, 2003). Además, el FO bovino que ha sido obtenido en diferentes fases del ciclo estral y en diferentes porciones oviductales afecta de diferente manera a las tasas de unión y

fecundación (Way *et al.*, 1997). La gran variabilidad existente en la composición de las secreciones oviductales, tanto a nivel espacial como temporal, nos sugiere que faltan muchos elementos a tener en cuenta al intentar reproducir *in vitro* las condiciones de cultivo a las que embriones y gametos están sometidos *in vivo*.

Además hay que tener muy en cuenta que la composición del FO puede ser modificada por la presencia de los gametos (Georgiou *et al.*, 2007, Lopez-Ubeda *et al.*, 2015).

3.3. El fluido oviductal (FO)

La secreción oviductal es un fluido complejo formado por componentes secretados a partir de las células epiteliales que tapizan el oviducto así como componentes procedentes del plasma sanguíneo.

Varios estudios han demostrado que las secreciones oviductales son capaces de regular la fecundación y en particular procesos como la unión del espermatozoide a la ZP y el desarrollo embrionario temprano (Hunter, 1991a, Kim *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1998, Slavik *et al.*, 1999, Buhi, 2002, McCauley *et al.*, 2003, Lloyd *et al.*, 2009b, Winuthayanon *et al.*, 2015). Sin embargo, los mecanismos moleculares en los que participan las secreciones oviductales no han sido esclarecidos en su totalidad.

El FO también está compuesto por el contenido de los folículos ováricos que se libera durante la ovulación, el fluido del peritoneo en especies carentes de bolsa ovárica y por fluido uterino si hay reflujo a través de la unión útero-tubárica (Roberts *et al.*, 1975, Leese, 1988, Malayer *et al.*, 1988, Aviles *et al.*, 2010). Este FO contiene muchos componentes metabólicos (Tay *et al.*, 1997, Harris *et al.*, 2005, Hugentobler *et al.*, 2008, Leese *et al.*, 2008, Hugentobler *et al.*, 2010) y un gran número de proteínas (Buhi *et al.*, 2000, Killian, 2004, Georgiou *et al.*, 2007, Aviles *et al.*, 2010).

La proporción de los componentes del fluido oviductal dependerá del estadio del ciclo en el que se encuentra el animal (Leese *et al.*, 2008) y de la presencia o no de gametos y embriones. Además, la composición del FO puede verse afectada por la dieta materna (Harding, 2001, Leese *et al.*, 2008).

3.3.1. Formación del FO

Las hormonas son las reguladoras de la formación del FO (Bishop, 1956, Mastroianni *et al.*, 1961, Hunter, 2012). Hunter (2012) revisó la procedencia de las hormonas que están en contacto con el tejido oviductal. Algunas como esteroides (oestradiol, progesterona) y prostaglandinas proceden del ovario. Otras hormonas proceden del fluido peritoneal, como las hormonas ováricas, las hormonas procedentes del intestino y mesenterios y las asociadas a depósitos de tejido graso, como las leptinas (Hunter *et al.*, 2007). También las células foliculares y el fluido folicular son otra fuente de hormonas que podría influir sobre el tejido oviductal. Un trabajo reciente muestra que el CCO secreta β -N-acetyloglucosaminidasa (NAGASA) durante la maduración a la vez que consume β -galactosidasa (β -GAL), pudiendo probablemente tener el ovocito un comportamiento distinto si madura de manera individual o en grupo (Dovolou *et al.*, 2016). Una alta actividad de α -manosidasa (α -MAN) en el medio de maduración podría ser un indicador de una apropiada maduración del ovocito, que resulta en un incremento en la tasa de división y el número de células del embrión resultante. Podría ser que la actividad de estas tres enzimas durante la maduración esté relacionada principalmente con la calidad del CCO y no demasiado con el tamaño folicular (Dovolou *et al.*, 2016). Se ha descrito que estas tres glicosidasas (NAGASA, α -MAN y β -GAL) presentan actividad en el FO durante la fase folicular y luteal (Carrasco *et al.*, 2008a).

Los patrones de secreción de hormonas esteroideas en el momento cercano a la ovulación prepara al oviducto para la recepción y maduración de los gametos masculinos y femeninos, además de para la fecundación y desarrollo embrionario temprano. Si se utilizan hormonas esteroideas para tratar pacientes o animales se produce la perturbación de la función fisiológica del oviducto, comprometiéndose la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Harper, 1977, Hunter, 1980). Además, podemos afirmar que las células del epitelio oviductal son muy sensibles a las variaciones de concentración de esteroides en sangre (Murray, 1995), produciendo cambios en la morfología celular así como en la producción del FO. Comer y colaboradores comprobaron que los estrógenos producían hipertrofia, maduración e incremento de la altura de las células epiteliales secretoras y reestablecían el fenotipo de las células ciliadas *in vitro* (Comer *et al.*, 1998).

En la mujer, la principal fuerza motriz implicada en la formación del FO es la secreción transepitelial de iones cloro (Cl^-) al oviducto, siendo el adenosín trifosfato (ATP) extracelular el regulador de la formación del mismo (Dickens *et al.*, 1995, Dickens *et al.*, 1996). Además, utilizando cultivos celulares crecidos en monocapa, se ha demostrado que el transporte de iones Cl^- desde la zona basal a la apical es favorecido por la adrenalina, mientras que el AMPc favorece el transporte en sentido contrario, produciéndose absorción (Dickens *et al.*, 1993).

Por otro lado, los neurotransmisores del sistema nervioso simpático, adrenalina y noradrenalina, producen vasoconstricción que disminuye el aporte sanguíneo al oviducto, lo que inhibe la formación de FO (Jankovic *et al.*, 2004). Estos neurotransmisores también actúan directamente en el oviducto siendo responsables de absorción, en presencia de noradrenalina, y secreción bajo la acción de acetilcolina.

3.3.2. Propiedades físicas del FO

Las propiedades físicas del FO (volumen, temperatura, viscosidad y concentración de componentes) varían a lo largo del ciclo, creando las condiciones óptimas en el momento de la fecundación.

El **volumen de FO** presente en el oviducto cambia cíclicamente, produciéndose una acumulación del mismo en la fase folicular (Hunter, 2012) debido a que el volumen y la **tasa de secreción de FO** son dependientes de estrógenos. Se produce una secreción activa en la fase estral del ciclo, con un máximo en el momento de la ovulación y disminuye en la fase luteal, donde predomina la progesterona (Perkins *et al.*, 1965, Carrasco *et al.*, 2008b). Se ha descrito una tasa de secreción diferente para cada especie, que va desde los 16 a los 90 $\mu\text{L}/\text{h}$ en fase folicular (Perkins *et al.*, 1965, Iritani *et al.*, 1969, Roberts *et al.*, 1975, Leese *et al.*, 1985, Dickens *et al.*, 1995). En cuanto al volumen de FO, en cerda (Iritani *et al.*, 1974), en vaca (Carlson *et al.*, 1970), en oveja (Black *et al.*, 1963) y en yegua (Engle *et al.*, 1975) los volúmenes oscilan entre 0,5 y 0,7 mL y en conejas entre 0,2 y 2,6 mL, dependiendo del momento del ciclo. Hay que tener en cuenta que en la misma fase del ciclo estral, el volumen de FO varía dependiendo de la porción oviductal, obteniéndose mayores cantidades en la ampolla que en el istmo (Belve *et al.*, 1968, Kavanaugh *et al.*, 1988, Killian, 2011).

En cuanto a la **temperatura** debemos señalar que durante mucho tiempo se ha aceptado como cierto el dogma de que la temperatura interna del cuerpo se mantiene uniforme, pero se han descrito pequeños gradientes de temperatura presentes en tejidos reproductivos en oveja, conejo y cerdo, que podrían haber asumido importancias funcionales durante la evolución de animales euterios (Hunter, 2002, Hunter, 2009). La temperatura del oviducto, y por tanto a la que está sometido el FO varía a lo largo del ciclo y en las diferentes regiones oviductales. Se han medido valores que muestran que la región caudal del istmo presenta una temperatura 1-2 °C más fría que la región craneal de la ampolla (Hunter y Nichol, 1986). El gradiente de temperatura se muestra más pronunciado durante el estro y mínimo en la fase luteal, por lo que podría existir una influencia regulatoria de las hormonas esteroideas ováricas (Hunter, 2012).

Las variaciones cíclicas de temperatura que aparecen en el oviducto en el momento cercano a la ovulación influyen en la **viscosidad**, otra de las propiedades físicas del FO. Se crea un gradiente de viscosidad, debido al gradiente de temperatura preovulatorio, 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 *et al.*, 2011). Se ha descrito la viscosidad con un valor de 1´8 mPa/sec., similar a la del suero (Menezo *et al.*, 1997). La viscosidad del contenido oviductal se debe a la secreción glicoproteica del epitelio oviductal, distinta según la región del oviducto, que es controlada a nivel hormonal, además de a la temperatura. En respuesta a los niveles de progesterona, el FO disminuye mucho en viscosidad y cantidad en el intervalo post-ovulatorio. Aplicando progesterona de forma local, se disminuye el contenido y viscosidad del FO en el istmo de cerdas, lo que obtuvo como resultado una alta incidencia en fecundación polispérmica (Hunter, 1972b), lo que indica una posible selección espermática debida a la viscosidad del medio, además de a otros factores.

3.3.3. Propiedades químicas del FO

Las propiedades químicas (pH, osmolaridad y tensión de oxígeno) del FO se van a comentar a continuación.

El valor de **pH** depende de las fluctuaciones de bicarbonato que se dan en el oviducto, que están influenciadas por las hormonas esteroideas. El pH es prácticamente neutro en fase folicular y se alcaliniza en la ovulación y en fase luteal, siendo similar en

las diferentes especies en las que se ha medido (Menezo *et al.*, 1997). De manera general, el pH del moco cervical es básico, con un valor de 8,4 y el del FO es de 7,1 a 7,3 en fase folicular y de 7,5 a 7,8 en fase luteal (Hafez *et al.*, 2000).

La **osmolaridad** es otra de las propiedades químicas del FO. Es similar a la del suero, con un valor aproximado de 290 mOsm/litro, sin estar modificado por variaciones hormonales ni interespecíficas (Menezo *et al.*, 1997).

Existe un poco de controversia en cuanto a la **tensión de oxígeno** presente en el FO, ya que se describió en el mono rhesus, hámster y coneja de 35mmHg (Fischer *et al.*, 1993), mientras que Menezo y Guerin afirmaron que es de 60 mmHg independientemente de la especie (Menezo *et al.*, 1997).

3.3.4. Composición del FO

La composición del FO es un dato importante a tener en cuenta a la hora de diseñar medios de cultivo que imiten, de la manera más fiel posible, las condiciones a las que están sometidos los gametos y embriones *in vivo*. También podremos comprender mejor los procesos reproductivos al conocer los componentes implicados en ellos.

Aparte de existir una variación cuantitativa del FO durante el ciclo estral, también se produce una variación cualitativa. Además, se ha detectado una composición elemental diferente del FO presente en el istmo y en la ampolla de ratón (Roblero *et al.*, 1976). Esta diferencia regional, también observada en el tipo de gránulos secretores a lo largo del oviducto, podría representar un mecanismo para crear diferentes microambientes (Desantis *et al.*, 2011).

3.3.4.1. Agua y electrolitos

El agua es el componente mayoritario del FO. Fluye dependiendo de los gradientes osmóticos, no de un transporte activo del epitelio oviductal.

Los electrolitos presentes en el FO proceden de la sangre y son los responsables primarios del pH y de la osmolaridad del mismo, además de influir algunos de ellos de

manera importante en la capacitación y movilidad espermática, reacción acrosómica (RA) y fecundación (Leese *et al.*, 1985, Gott *et al.*, 1988, Grippo *et al.*, 1992).

De manera general podemos afirmar que los niveles de potasio (K^+) son significativamente mayores en el FO que en el plasma, el sodio (Na^+), magnesio (Mg^{2+}) y cloro (Cl^-) son similares en ambos. El calcio (Ca^{2+}) puede estar en concentración similar o menor en FO que en plasma y la concentración de ión bicarbonato (HCO_3^-) en FO es superior a la del plasma aunque puede haber diferencias entre especies en algún ión en concreto (Borland *et al.*, 1980, Menezo *et al.*, 1997).

Se han descrito algunas funciones que cumplen los electrolitos presentes en el FO. La elevada concentración de K^+ presente en el FO (aprox. 50 mM) mejora la división embrionaria e implantación en ratón (Roblero *et al.*, 1986) y en la especie humana (Quinn *et al.*, 1985). La alta concentración de K^+ podría estar implicada en la inhibición del movimiento de los espermatozoides en el reservorio espermático del istmo en la coneja, que se puede revertir con piruvato (Burkman *et al.*, 1984). Los niveles de Na^+ influyen en la captación de aminoácidos por los embriones tempranos de ratona (Vanwinkle *et al.*, 1985), por lo que es un ión importante en la nutrición del embrión. También se ha descrito este ión como necesario en la unión del espermatozoide de ratón a la ZP (Saling *et al.*, 1978) y que está implicado en la interacción de proteínas oviductales a la superficie del espermatozoide, además de en la movilidad del mismo (Grippo *et al.*, 1992, Lapointe *et al.*, 1996). La concentración a la que está presente HCO_3^- en el FO promueve la dispersión de las células de la corona radiada y proporciona un entorno favorable para el desarrollo del embrión (Stambaugh *et al.*, 1969, Maas *et al.*, 1977), estimula la respiración (Hamner *et al.*, 1964), el movimiento de hiperactivación y RA en espermatozoides (Boatman *et al.*, 1991).

3.3.4.2. Componentes energéticos

Se ha descrito la presencia de glucosa, lactato, piruvato, glutamato, glucógeno y aminoácidos (AA) en el FO, estando posiblemente involucrados en el soporte metabólico de gametos y/o embriones (Leese *et al.*, 1985), considerando la glucosa y el piruvato los principales sustratos energéticos (Brewis *et al.*, 1992).

El contenido de glucosa en FO (1-3 mM) es inferior al del suero (5-6 mM) (Menezo *et al.*, 1997). En fase post-ovulatoria, en la región de la ampolla es de 0,5 mM, mientras que en la región ampular-ístmica es de 1,3 mM (Leese *et al.*, 2008). Por otro lado, la concentración de lactato es mayor en FO que en suero, debido al metabolismo de la glucosa del propio oviducto, donde aproximadamente el 75 % del lactato del FO es producido por las células epiteliales a partir de glucosa vascular y el 25 % procede del lactato vascular (Leese, 1988, Menezo *et al.*, 1997, Nichol *et al.*, 1998). Los valores de piruvato son similares en todas las regiones del oviducto durante todas las fases del ciclo estral, siendo además similares a los del plasma. El contenido de lactato de la ampolla en fase preovulatoria tampoco muestra diferencias con respecto a después de la ovulación (Nichol *et al.*, 1992).

En las trompas de Falopio de la mujer en fase folicular, el fluido contiene en 3,11 mM de glucosa, 4,87 mM de lactato y 0,25 mM de piruvato, mientras que tras la ovulación los valores son de 0,5 mM de glucosa (luego vuelve a incrementarse hasta 2.32 mM en la fase luteal), 10,5 mM de lactato y 0,32 mM de piruvato (Dickens *et al.*, 1995, Gardner *et al.*, 1996, Leese, 1998). Esta bajada de glucosa después de la ovulación también ocurre en cerda y coneja (Nichol *et al.*, 1992, Edwards *et al.*, 1993, Leese *et al.*, 2008).

La concentración de estos componentes energéticos en el FO está regulada por mecanismos sistémicos, debido al hecho de que son independientes de la presencia o no de embriones o de la realización de ovariectomías (Nichol *et al.*, 1998).

3.3.4.3. Lípidos

El contenido de lípidos del FO es bajo, aunque están presentes fosfolípidos, triglicéridos, colesterol libre y colesterol esterificado. La concentración de colesterol es generalmente menor durante la fase no luteal, cuando la concentración de fosfolípidos es generalmente mayor. Aproximadamente el 40% de los fosfolípidos del FO son fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina, mientras que fosfatidilinositol y lisofosfatidilinositol componen el 20% del total (Killian *et al.*, 1989).

Las proteínas que actúan como transportadores de lípidos en el FO son principalmente lipoproteínas de alta densidad (LDH), que además podrían participar en

la capacitación espermática en el istmo en la fase folicular (Ehrenwald *et al.*, 1990) y la albúmina, que podría contener esteroides (Menezo *et al.*, 1997).

3.3.4.4. Aminoácidos

Los aminoácidos (aa) son parte indispensable para el crecimiento y el desarrollo del embrión ya que actúan como precursores de proteínas y ácidos nucleicos. También actúan como sustratos energéticos, reguladores de pH, señalización de moléculas y quelantes de metales pesados (Gardner, 2008).

La concentración de aa en el FO es menor que en el suero (Perkins *et al.*, 1967), lo que sugiere que su transporte al oviducto se produce por difusión facilitada, exceptuando el ratón y la yegua, especies donde la concentración de aa es mayor en FO que en plasma (Leese *et al.*, 1985, Harris *et al.*, 2005). Los aa mayoritarios en FO son alanina, aspartato, glicina, glutamato, serina y taurina (Gardner, 2008), habiendo un claro predominio de la glicina en todas las especies examinadas como son coneja (Perkins *et al.*, 1967, Leese *et al.*, 1985, Miller *et al.*, 1987), ratona (Gardner *et al.*, 1990, Harris *et al.*, 2005), mujer (Tay *et al.*, 1997), cerda (Iritani *et al.*, 1974, Li *et al.*, 2007), vaca (Hill *et al.*, 1997, Elhassan *et al.*, 2001, Hugentobler *et al.*, 2007) y oveja (Perkins *et al.*, 1967), aunque existen pequeñas variaciones entre especies en la composición de AA.

Vamos a especificar la función que pueden tener estos aa mayoritarios. Glicina y alanina están implicados en la regulación del pH intracelular y en la protección del embrión frente al estrés osmótico (Fischer *et al.*, 1993). Taurina e hipotaurina son importantes para mantener la viabilidad de los gametos, en la capacitación espermática, en el proceso de fecundación y en el desarrollo e implantación embrionario (Leese *et al.*, 2001). La hipotaurina está encargada de captar radicales libres, dando lugar a la formación de taurina, con lo que tiene efecto antioxidante y de protección de membranas celulares. Además, taurina, hipotaurina, glicina y alanina son considerados aa con efecto beneficioso en el desarrollo de embriones de diferentes especies *in vitro* (Menezo *et al.*, 1997).

3.3.4.5. Proteínas

En la mayoría de estudios de FO se han identificado una o pocas proteínas utilizando métodos analíticos convencionales (Aviles *et al.*, 2010), mientras que se ha intentado identificar más componentes utilizando tecnologías más complejas, como el uso de la electroforesis bidimensional (Verhage *et al.*, 1988b, Gandolfi *et al.*, 1989, Buhi *et al.*, 2000). Actualmente, es posible identificar un gran número de proteínas que contienen los complejos fluidos corporales y estudiar los patrones de expresión génica en diferentes tejidos gracias al desarrollo de la técnica de espectrometría de masas (Soleilhavoup *et al.*, 2016), y al descifrado del genoma de múltiples especies. Se han detectado 624 proteínas diferentes presentes en el FO, (Soleilhavoup *et al.*, 2016), cuyo origen será el trasudado selectivo del plasma sanguíneo, el producto de secreción de las células secretoras del epitelio oviductal, el contenido de los folículos ováricos que se libera con la ovulación, el fluido del peritoneo en especies carentes de bolsa ovárica y el fluido uterino si hay reflujo a través de la unión útero-tubárica (Soleilhavoup *et al.*, 2016).

Soleilhavoup y colaboradores realizaron un estudio comparativo del proteoma de fluidos luminales de tres regiones del tracto genital femenino de oveja: el cérvix, el útero y el oviducto. Estos autores identificaron un total de 749, 827 y 624 proteínas en el fluido procedente del cérvix, del útero y del oviducto respectivamente. El 41% eran proteínas citoplasmáticas, el 14% proteínas secretadas y el 11% proteínas de la membrana plasmática. De las 940 proteínas identificadas, 570 estaban presentes en el fluido de las tres regiones. Las regiones anatómicamente unidas a las otras comparten un mayor número de proteínas, probablemente debido al intercambio de fluidos entre unas y otras. Se detectaron algunas proteínas que estaban presentes únicamente en una de las tres regiones: 74 en el moco cervical, 114 en el fluido uterino y 9 en el fluido oviductal. Estas proteínas específicas de cada región tendrían una gran influencia en la función que desempeña cada uno de estos fluidos (Soleilhavoup *et al.*, 2016).

En cuanto a las proteínas cuyo origen es el trasudado del plasma sanguíneo, sólo del 5 al 10 % de las proteínas encontradas en el plasma están presentes en el FO (Roberts *et al.*, 1975, Leese, 1988). Las más abundantes en el FO son la albúmina (representa del 60-80 % del total de proteínas) (Menezo *et al.*, 1997) y la inmunoglobulina G, que componen juntas casi el 95 % de las proteínas séricas del FO

(Lippes *et al.*, 1972, Oliphant *et al.*, 1978). La concentración de proteínas séricas se mantiene constante en conejas pseudopreñadas (Oliphant *et al.*, 1978) aunque se produzcan cambios en el volumen del FO. En ratona, el FO de la ampolla con CCOs tiene una concentración de proteínas de $10\text{'}90 \pm 1\text{'}90$ mg/ml en estro (Gardner *et al.*, 1990), apareciendo también en ese momento del ciclo la mayor concentración total de proteínas en vacas (Roberts *et al.*, 1975). Carrasco y colaboradores no encontraron diferencias significativas entre la concentración de proteínas en FO bovino entre la fase folicular (54.28 ± 3.71 $\mu\text{g/mL}$) y la luteal (55.89 ± 2.93 $\mu\text{g/mL}$) (Carrasco *et al.*, 2008a), mientras que si describieron diferencias significativas en la cantidad de proteína total por oviducto entre la fase folicular tardía (momento cercano a la ovulación) (2118.6 ± 200.7 $\mu\text{g/oviducto}$) y la fase luteal temprana (tras la ovulación) (1680.5 ± 122.8 $\mu\text{g/oviducto}$) en porcino (Carrasco *et al.*, 2008b).

Otra porción de proteínas del FO son las secretadas por las células secretoras no ciliadas del epitelio oviductal. Se han detectado más de 150 proteínas expresadas o secretadas por el oviducto de diferentes especies (Aviles *et al.*, 2010) y al menos 32 proteínas presentes en FO están afectadas por la presencia de gametos, la mayoría afectadas por el gameto masculino (Georgiou *et al.*, 2005, Georgiou *et al.*, 2007). Las proteínas cuyo origen es el epitelio oviductal pueden clasificarse en: factores de crecimiento, citoquinas y sus receptores, hormonas y sus receptores, proteasas y sus inhibidores, agentes de protección antioxidante, agentes de protección o defensa, glicosidasas y glicosil-transferasas, otros enzimas, chaperonas y proteínas de choque térmico, otras proteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos y otros componentes (Aviles *et al.*, 2010). La síntesis y secreción de estas proteínas se produce como respuesta a la estimulación por estrógenos, siendo en general su concentración en FO mayor durante el periodo preovulatorio y descendiendo después. La progesterona parece que tiene poca influencia en esta síntesis y secreción de proteínas (Abe *et al.*, 1998).

Coy y Yanagimachi realizaron recientemente una revisión acerca del papel, común o especie-específico, que juegan ciertas proteínas oviductales en la fecundación y desarrollo embrionario (Coy *et al.*, 2015). De las más de 150 proteínas detectadas en el oviducto (Aviles *et al.*, 2010), algunas se han demostrado beneficiosas en FIV: osteopontina (ONP o SPP1) (Hao *et al.*, 2006, Goncalves *et al.*, 2008a), glicodelina (PAEP) (Yeung *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2011), Plasmina (Carmeliet *et al.*, 1994, Ebisch *et al.*, 2008), proteínas de la familia de proteínas de choque térmico (HSPs) (Dix *et al.*,

1996, Elliott *et al.*, 2009), proteína suprimida en tumores cerebrales malignos 1 (DMBT1) (Teijeiro *et al.*, 2012, Ambruosi *et al.*, 2013), lactoferrina (Ward *et al.*, 2003, Zumoffen *et al.*, 2013), fetuina B (Schroeder *et al.*, 1990, Dietzel *et al.*, 2013), haptoglobina (Lavery *et al.*, 2003, Herrler *et al.*, 2004, Georgiou *et al.*, 2005), Spam1 (Griffiths *et al.*, 2008), factor de estimulación de colonias granulocito-macrófago (GMC.SF) (Sjoblom *et al.*, 1999) y oviductina (OVGP1) (Buhi, 2002). Haremos una revisión minuciosa acerca de esta última proteína más adelante, ya que el objetivo de esta tesis doctoral es investigar la posible función fisiológica de OVGP1 como componente mayoritario del FO y el papel de cada una de las regiones de su secuencia. A continuación iremos revisando las características de cada una de las proteínas enumeradas y de algunas más.

Proteínas de choque térmico (HSPs) son proteínas consideradas intracelulares. Sin embargo se han detectado en suero y plasma humano, además se ha descrito una secreción a través de una ruta lisosomal no convencional de un miembro de esta familia (HSP70) (Marnbula *et al.*, 2007). También se han detectado algunas de las proteínas de esta familia en el fluido y epitelio oviductal de cerdo (Georgiou *et al.*, 2005), vaca (Boilard *et al.*, 2004), carnero (Lloyd *et al.*, 2012), ratón (Lin *et al.*, 2012) y especie humana (Lachance *et al.*, 2007). Las HSPs se unen al espermatozoide durante su tránsito por el oviducto. Se ha descrito que HSPA8 mantiene la viabilidad espermática en el jabalí, el carnero y el toro (King *et al.*, 1994b, Desouza *et al.*, 1995, Goncalves *et al.*, 2008b, Elliott *et al.*, 2009, Lloyd *et al.*, 2009a). Además, los niveles de HSPA8 en el oviducto de cerda en presencia de espermatozoides son cinco veces más altos que en ausencia de los mismos (Georgiou *et al.*, 2005). El incremento de HSP8 detectado en el FO en estro estaría relacionado con esta función de supervivencia espermática en el periodo de tiempo alrededor de la ovulación (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Otros miembros de la familia también poseen efectos en la fecundación, como HSPA5 (GRP78), que es esencial para el crecimiento celular embrionario, siendo los embriones knockout para esta proteína incapaces de eclosionar de la ZP (Luo *et al.*, 2006). El macho knockout para HSP70 también es infértil, ya que no produce espermatozoides maduros (Dix *et al.*, 1996). Otra de las proteínas de la familia es GRP94 con un papel fundamental en el desarrollo embrionario (Wanderling *et al.*, 2007).

DMBT1 (proteína deletada en tumores malignos de cerebro 1) es una glicoproteína multifuncional dependiente de estrógenos detectada en el epitelio

endometrial del mono y la rata (Tynan *et al.*, 2005). En cuanto al oviducto, se ha detectado la presencia del ARNm de esta proteína en oviducto porcino, bovino y humano (Mondejar *et al.*, 2012) estando presente la proteína en el epitelio y fluido oviductal porcino y equino (Mondejar *et al.*, 2012, Ambruosi *et al.*, 2013) y en la superficie apical del epitelio oviductal bovino, dónde se une a espermatozoides capacitados produciendo un mecanismo de selección espermática negativa (Teijeiro *et al.*, 2012). Además, la preincubación de ovocitos porcinos y equinos con DMBT1 antes de la FIV incrementa el porcentaje de fecundación monospermica (Ambruosi *et al.*, 2013).

Otra proteína secretada por el oviducto sugerida como moduladora de la función espermática, interacción entre gametos y migración en el oviducto es **osteopontina (OPN)** (Killian, 2011). Es una fosfoproteína descubierta por primera vez en los osteoblastos formadores de hueso. Es sintetizada en variedad de tejidos y secretada a los fluidos corporales. 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 *et al.*, 2003, Killian, 2004, Killian, 2011). La transcripción del gen de la osteopontina no varía a lo largo del ciclo estral en el oviducto de vaca (Gabler *et al.*, 2003) pero si está sobreexpresada en estro en oviducto de ratón (Liu *et al.*, 2015) y de oveja (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Está relacionada con la regulación inmune, transducción de la señal y adhesión celular (Wang *et al.*, 2008). Se une a integrinas a través de la secuencia de AA arginina-glicina-aspartico (RGD) que posee, por lo que puede estar implicada en procesos de adhesión celular (Denhardt *et al.*, 1993). También posee un sitio de unión a iones Ca^{2+} y dos dominios de unión a heparina. En cuanto a su función en reproducción, se ha visto que está relacionada con la fertilidad del macho en la especie bovina al estar o no presente en el plasma seminal del toro (Cancel *et al.*, 1997). Se ha detectado su secreción por la mucosa oviductal en la especie bovina (Gabler *et al.*, 2003) y la oveja (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Dependiendo de la dosis utilizada en FIV, osteopontina reduce la RA espermática y la incidencia de polispermia, dando como resultado un incremento de fecundación normal *in vitro* en cerdo (Hao *et al.*, 2006), mientras que no se ha observado efecto en la FIV de caballo (Mugnier *et al.*, 2009). La adición de anticuerpos frente a esta proteína desciende la unión espermatozoide-ovocito en la especie bovina *in vitro* (Goncalves *et al.*, 2008a). Diferentes estudios han evidenciado que el mecanismo por el cual osteopontina influencia la unión espermatozoide-ovocito y

la fecundación depende de la unión a integrinas mediante la secuencia RGD presente en osteopontina. En vista de estos resultados, parece que el papel de osteopontina en fecundación es dependiente de la especie. Por otro lado, el ratón knockout para osteopontina es fértil, presenta una talla normal y su descendencia se desarrolla con normalidad (Rittling *et al.*, 1998), lo que sugiere que es una proteína que modula la fecundación en el oviducto, pero que no es esencial, al menos en ratón.

La proteína **glicodelina** (PAEP, proteína placentaria 14 o proteína endometrial asociada a progesterona) es una glicoproteína que presenta al menos 4 glicofomas. Están presentes en fluido amniótico (glicodelina A), plasma seminal (glicodelina S), fluido folicular (glicodelina F) y en las células del cúmulo (glicodelina C) (Yeung *et al.*, 2009). Se ha observado que el oviducto humano produce glicodelinas y que las células oviductales cultivadas *in vitro* producen glicodelina A y F (Chiu *et al.*, 2007a). La función principal descrita de las glicodelinas está relacionada con el desarrollo embrionario post-implantacional, ya que son secretadas por el endometrio durante las primeras etapas de la preñez (Lee *et al.*, 2011). Las diferentes glicofomas de glicodelina se unen a la cabeza espermática utilizando diferentes receptores: glicodelina F se une por dos receptores diferentes presentes en la zona de la membrana espermática que recubre el acrosoma, uno de ellos es compartido con glicodelina A; glicodelina S también posee dos receptores distribuidos por toda la cabeza espermática; glicodelina C posee un tipo de receptor distribuido por toda la cabeza espermática pero con una mayor presencia en la región ecuatorial (Yeung *et al.*, 2009). La deglicosilación de glicodelina inhibe la unión al espermatozoide. Las diferentes glicofomas presentan diferentes funciones. La glicodelina S del plasma seminal suprime el flujo del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide para prevenir la capacitación espermática precoz. Las glicodelinas A y F presentes en el fluido folicular y oviductal inhiben la RA prematura y la unión espermática a la ZP, glicodelina C presente en el cúmulo reemplaza a las dos anteriores para mejorar la RA y la unión espermática a la ZP (Chiu *et al.*, 2007b). Por esto último, no debemos utilizar ovocitos libres del cúmulo en FIV, ya que las células de la granulosa son importantes al modular la unión espermatozoide-ovocito.

Se ha descrito la presencia de varios componentes del **sistema plasminógeno-plasmina** en el tracto reproductivo de mamíferos (plasma seminal, útero, oviducto y ovario) con múltiples funciones (Ebisch *et al.*, 2008). La proteína plasmina presenta una

función crucial en ovulación e implantación. Se propuso que el plasminógeno del fluido oviductal porcino se unía a la ZP y membrana plasmática del ovocito, siendo activado por un activador cuando el primer espermatozoide contacta con el oolema. Esta activación produce plasmina, que previene el avance de otros espermatozoides unidos debilitando la unión al ovocito (Coy *et al.*, 2012b). Además, se ha visto que el ratón knockout para los dos activadores del plasminógeno es significativamente menos fértil que el tipo salvaje (Carmeliet *et al.*, 1994).

Lactoferrina (LTF) es una glicoproteína multifuncional relacionada con la respuesta inmune e inflamatoria, regulación del crecimiento y diferenciación celular y protección frente al desarrollo de cáncer y metástasis (Ward *et al.*, 2005). La proteína está presente en el epitelio y secreciones oviductales en la mujer, siendo abundante en el fluido oviductal durante la fase periovulatoria del ciclo menstrual (Zumoffen *et al.*, 2013). Sin embargo, la expresión de la proteína en el oviducto de rata y ratón es mucho menor que en la especie humana. Este hecho podría explicarse por una mezcla de fluido uterino y oviductal en la mujer debido a que en la mujer el útero y la unión utero-tubárica conforman una única entidad morfofuncional (Hunter, 2002). Sería posible porque lactoferrina también está presente en el endometrio de hámster, rata y ratón (Teng *et al.*, 2002). En cuanto a su función, es una proteína que se une a espermatozoides capacitados y a la zona pelúcida de ovocitos (Zumoffen *et al.*, 2013), inhibiendo la unión entre ambos gametos, lo que reduce la fecundación polispermica. El ratón knockout para lactoferrina es fértil y su descendencia es normal (Ward *et al.*, 2003).

AWN es un miembro de la familia de las espermadhesinas con propiedades de unión al espermatozoide (Topfer-Petersen *et al.*, 1998) que podría estar involucrado en la unión primaria entre el espermatozoide y el ovocito (Topfer-Petersen *et al.*, 1996). Se identificó por inmunocitoquímica en el oviducto de cerda (Ekhlesi-Hundrieser *et al.*, 2002) y posteriormente se identificó en el FO, sugiriendo su secreción (Soleilhavoup *et al.*, 2016).

El complemento **C3** ha sido detectado en altas cantidades en los fluidos del cérvix, el oviducto y el útero, incrementando su abundancia en el moco uterino y el fluido uterino en estro (Soleilhavoup *et al.*, 2016), lo que sugiere una regulación positiva por estrógenos. De hecho, la secreción de C3 está sometida a regulación por

estrógenos en el oviducto de ratón y humano (Lee *et al.*, 2009) y la región que flanquea el extremo 5' del gen C5 (otro componente de la cascada del complemento) contiene secuencias homólogas a elementos de respuesta a estrógenos (Carney *et al.*, 1991). En humanos, el complemento C3 juega un papel embriotrófico después de ser convertido en iC3b por las células oviductales (Lee *et al.*, 2009) y también se ha propuesto como ligando puente entre el espermatozoide y el receptor del ovocito (Anderson *et al.*, 1993, Fabryova *et al.*, 2009).

Además de proteínas relacionadas directamente con el proceso reproductivo se han detectado otros grupos de proteínas más abundantes en el FO en estro, como las enzimas antioxidantes (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Una de ellas es la **glutación peroxidasa 1**, cuyo ARNm es más abundante en estro en el oviducto bovino (Lapointe *et al.*, 2003).

Existen otras proteínas de las que se conoce poco sobre su función. Se ha detectado la proteína **haptoglobina** en tejido y fluido oviductal de vaca, cerda y coneja (Lavery *et al.*, 2003, Herrler *et al.*, 2004, Georgiou *et al.*, 2005), pero no se conoce su efecto en la interacción espermatozoide-ovocito. La proteína **Spam1** (PH-20) ha sido detectada en el epitelio oviductal de ratón (Zhang *et al.*, 2003). Se ha propuesto que esta proteína se une al espermatozoide en el oviducto para asistirlo, con la actividad hialuronidasa que posee, en su paso a través de las células de cúmulo (Griffiths *et al.*, 2008).

Las **glicosidasas** y **glicosil-transferasas** son proteínas presentes en el FO 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. Se ha descrito que su secreción puede variar a lo largo del ciclo estral en la cerda y la vaca (Carrasco *et al.*, 2008a, Carrasco *et al.*, 2008b).

La proteína **miosina 9** incrementa su abundancia en el FO en el estro, coincidiendo con un aumento de la proteína OVGP1, ya que se ha sugerido que podría interactuar con OVGP1 y estar involucrada en la unión de OVGP1 al espermatozoide (Kadam *et al.*, 2006). También se ha detectado una expresión de la proteína aumentada en estro en el cérvix, por lo que la posible interacción con espermatozoides se produciría cuando entran por el canal cervical (Soleilhavoup *et al.*, 2016).

La proteína **prostaglandina D sintasa tipo lipocalina (L-PGDS)** se encuentra también presente en el FO bovino y es capaz de unirse a la ZP de los ovocitos. No se sabe si L-PGDS procede del plasma sanguíneo o es sintetizada y secretada por el epitelio oviductal (Goncalves *et al.*, 2008b). Su función es desconocida actualmente pese a ser identificada como una proteína asociada a la fertilidad en el plasma seminal de toro (Gerena *et al.*, 1998).

Una proteína no detectada en el oviducto pero con un papel importante en el endurecimiento de la ZP es **Fetuina B**, una proteína derivada del hígado y pertenece a una familia de inhibidores de proteasas. Inhibe el endurecimiento de la ZP durante la maduración *in vitro* de ovocitos de rata y ratón (Schroeder *et al.*, 1990). Se piensa que su presencia en el fluido folicular contribuye a inhibir las proteasas de los gránulos corticales en ovocitos inmaduros antes de ovular (Schroeder *et al.*, 1990, Dell'Aquila *et al.*, 1999). Se ha utilizado fetuina B para prevenir el endurecimiento de la ZP de ovocitos de yegua durante la maduración *in vitro*, aunque no se observó mejoría en los resultados de la FIV (Dell'Aquila *et al.*, 1999). El ratón knockout para fetuina es infértil porque presenta una ZP muy endurecida, pudiéndose restaurar su fertilidad solamente con perforar la ZP con un láser (Dietzel *et al.*, 2013). Por el contrario, en las especies bovina, porcina, caprina y ovina, el endurecimiento de la ZP ocurre de manera normal antes de la fecundación mediado por el FO (Coy *et al.*, 2008a, Mondejar *et al.*, 2013a).

3.3.5 Expresión génica del oviducto durante el ciclo estral o menstrual

Es interesante tener en cuenta la expresión génica del oviducto a lo largo del ciclo estral, ya que será en gran medida la responsable del microambiente creado por la diferente composición del FO en cada una de las fases del ciclo.

Se ha estudiado la regulación de la expresión génica en el oviducto en estro y fase luteal utilizando células oviductales cultivadas *in vitro* de la especie porcina (Seytanoglu *et al.*, 2008) y raspado de la mucosa de la especie bovina (Bauersachs *et al.*, 2004). El análisis de la expresión génica en estro y en diestro mostró que se expresaban de manera diferencial 77 genes en las dos fases del ciclo, siendo 37 genes sobreexpresados en estro y 40 genes en diestro (Bauersachs *et al.*, 2004). Estos genes estaban relacionados con la respuesta inmune, secreción y modificación de proteínas, endocitosis, señalización y regulación de la transcripción. En la especie porcina, se

detectó un total de 330 proteínas en fase folicular y 510 en la luteal, de las cuales 51 proteínas presentaron una sobreexpresión en estro y 27 en fase luteal (Seytanoglu *et al.*, 2008).

En mujeres, realizó un estudio comparando el perfil de expresión génica de células epiteliales de las trompas de Falopio en fase folicular y luteal, identificando cinco genes sobreexpresados y quince con expresión disminuida (George *et al.*, 2011). Algunos de estos genes están relacionados con la fecundación y el desarrollo embrionario.

En el estudio comparativo que realizaron Soleilhavoup y colaboradores sobre el proteoma de fluidos luminales del cérvix, útero y oviducto de oveja en dos etapas del ciclo estral (estro y fase luteal), se detectó que el 28, 12 y 23 % del total de proteínas presentes en el moco cervical, el fluido uterino y el fluido oviductal, respectivamente, eran más abundantes en la fase de estro. Las proteínas con mayor presencia durante la fase luteal se correspondían con el 12, 17 y 6% del total de proteínas del moco cervical, el fluido uterino y el fluido oviductal, respectivamente. De las proteínas específicas de cada región, el 70% del cérvix y 79% del oviducto presentan una marcada expresión durante el estro, mientras que en el útero la expresión de proteínas específicas de esta región es más equilibrada entre la fase estral y luteal, siendo del 51% en fase luteal. Centrándonos más en la composición proteica oviductal, se observó que 81 proteínas de las 280 cuantificadas (el 28,9 %) tenían una expresión diferente entre el estro y la fase luteal. Se detectaron 64 proteínas con una mayor abundancia durante el estro y 17 en la fase luteal. Algunas de las proteínas del FO cuya abundancia estaba sobreexpresada durante el estro son oviductina, miosina 9, isocitrato dehidrogenasa, factor de elongación 1- α 1, HSPA8, proteína 14-3-3 ϵ y anexina A8 y en la fase luteal α -2-macroglobulina, ceruloplasmina, gelsolina, transtiretina y factor del complemento B (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Por lo tanto, se podría afirmar que existe una regulación diferencial en las diferentes regiones del tracto genital femenino que dependen del estadio del ciclo estral, estando caracterizado el estro por un incremento concomitante en la abundancia de las proteínas del moco cervical y el fluido del oviducto, mientras que la fase luteal por un incremento en las proteínas del fluido uterino. El significado biológico asociado a este hecho sería que las proteínas que aumentan su abundancia en estro en el moco del cérvix y en el FO están orientadas a la interacción con los gametos, teniendo un importante papel en la fecundación, mientras que el incremento en la

abundancia de proteínas del fluido uterino durante la fase luteal, lo estaría para interactuar con el embrión. Además, OVGPI, osteopontina y HSPA8, cuya abundancia aumenta en el estro, han sido descritas como agentes que interactúan con los gametos (Lloyd *et al.*, 2009a, Aviles *et al.*, 2010, Killian, 2011).

La expresión génica del oviducto también está modificada por otros factores además de por la fase del ciclo estral. Uno de estos factores es la presencia de gametos, tanto femeninos como masculinos, células de la granulosa con su fluido asociado y embriones. Una de las observaciones que nos hace afirmar este hecho es que la unión de espermatozoides a las células del epitelio oviductal *in vitro* produce cambios en la síntesis de proteínas (Ellington *et al.*, 1993). Además, se produjo la caracterización de varias proteínas en tejido oviductal bovino sólo en presencia de ovocitos y células del cúmulo (Einspanier *et al.*, 1997, Gabler *et al.*, 2008). Por otro lado, el resultado del perfil de expresión génica en ratón mostró que hay una variación del transcriptoma oviductal en presencia de espermatozoides, mostrándose una sobreexpresión de adrenomedulina y prostaglandina peroxidasa sintasa tras la cópula con machos fértiles (Fazeli *et al.*, 2004). En un estudio reciente se puso de manifiesto que, al estar presentes en el oviducto espermatozoides o embriones en desarrollo, se producía una sobreexpresión de 17 genes y una expresión reducida de 9 genes, estando estos genes modificados involucrados en respuesta inflamatoria y sistema inmune, transporte molecular, tráfico de proteínas, desórdenes del desarrollo y señalización e interacción celular (Lopez-Ubeda *et al.*, 2015). Por tanto podemos afirmar que gametos y embriones son capaces de influenciar su propio microambiente oviductal (Georgiou *et al.*, 2005, Georgiou *et al.*, 2007, Alminana *et al.*, 2012).

Existen evidencias que muestran que en la expresión génica del oviducto de diferentes especies hay factores comunes y otros diferentes. Se ha demostrado que en un oviducto de ratón se produce con éxito el desarrollo embrionario bovino (Rizos *et al.*, 2007). También se ha observado endurecimiento prefecundación de la ZP en ovocitos incubados en FO de diferentes especies, aunque produciéndose este proceso en diferentes escalas y no en todas las especies (Mondéjar Corbalán, 2012).

Un gran número de evidencias apoyan la idea del complejo e importante papel que juega el oviducto en diferentes aspectos de maduración de gametos, fecundación y desarrollo embrionario temprano. El oviducto sufre importantes cambios en muchos

aspectos, incluyendo su anatomía en las diferentes regiones, cambios en la histología y fisiología de la mucosa durante el ciclo ovárico y patrones de expresión génica complejos que varían dependiendo del estado del ciclo ovárico y con la presencia de gametos y embriones. Se necesita información más precisa acerca de los genes expresados y las proteínas sintetizadas y secretadas por el oviducto en sus diferentes regiones, en distintos estados hormonales y otras condiciones fisiológicas para poder clarificar el papel del oviducto. La información obtenida en diferentes especies contribuirá a entender los mecanismos conservados entre ellas y también los responsables de la especie-especificidad.

Se considera que no es correcto buscar el componente clave del oviducto responsable del éxito del proceso de fecundación y desarrollo embrionario, sino más bien, debe ser la interacción entre diversos factores oviductales que juntos son beneficiosos. Hay que prestar especial atención a las macromoléculas presentes en el oviducto, y la interacción de las mismas con los gradientes de temperatura propios de este órgano, ya que pequeños cambios de temperatura influyen en la naturaleza y el grado de expresión génica del oviducto así como en el grado de plegamiento y conformación de las proteínas expresadas (Hunter, 2009).

3.3.6. Las proteínas en la formulación de medios de cultivo in vitro.

Los medios de cultivo utilizados en FIV en mamíferos y cultivo embrionario poseen una composición parecida a los fluidos biológicos en cuanto a sales minerales, carbohidratos y aminoácidos, siendo medios químicamente semidefinidos. Sin embargo, estos medios requieren una fuente proteica. Durante muchos años se ha utilizado como fuente de proteínas el suero sanguíneo, pero se detectaron muchos problemas probablemente derivados en parte de su uso, como el “síndrome del ternero gigante” en bovino y oveja (Young *et al.*, 1998, McEvoy *et al.*, 2000) y anomalías locomotoras en ratón (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2004). Actualmente se utilizan medios químicamente semidefinidos libres de proteínas. Sin embargo, no debemos olvidar que la composición del suero sanguíneo y el FO es diferente y podrían ser justo esos componentes presentes en suero y no en FO, o presentes a menor concentración, los causantes del problema. Por otro lado, las proteínas producidas por el epitelio oviductal podrían tener la clave de una correcta fecundación y desarrollo embrionario temprano, además de establecer de manera correcta los marcadores epigenéticos en el embrión.

Por esta razón, es importante el estudio de las proteínas presentes en el FO, para en un futuro, utilizarlas como aditivos en la formulación de los medios de maduración de gametos, de fecundación y de cultivo embrionario *in vitro*.

3.4. Funciones del oviducto

Los gametos van a completar su proceso de maduración en el oviducto, tras el cual se producirá la fecundación, siempre y cuando todo ello ocurra en el momento adecuado. Tras la fecundación, el embrión permanece en el oviducto antes de llegar al útero y producirse la implantación. Por todo ello, las funciones del oviducto son diversas, desde crear el microambiente óptimo para la maduración de los gametos, crear un reservorio espermático y facilitar el proceso de fecundación, hasta nutrir y proteger al embrión en los primeros estadios de su desarrollo. El FO también modifica los gametos favoreciendo la fecundación especie-específica (Slavik *et al.*, 1999). El oviducto es capaz de desempeñar todas estas funciones gracias a la gran complejidad de componentes que presenta su FO. La importancia fisiológica del oviducto ha sido enfatizada, entre otros por Yanagimachi (Yanagimachi, 2009).

3.4.1. ¿Es indispensable el oviducto para que se produzca la fecundación?

Hunter publicó una revisión sobre la comprensión actual del papel del oviducto desde un nuevo punto de vista, propuesto en relación a la capacidad de los embriones de primate en estudios clínicos de desarrollarse en el útero, sin una exposición previa al oviducto (Hunter, 2012).

El tránsito de los gametos y embriones por el oviducto y el contacto con el FO podría no ser determinante para que se produzca la fecundación de manera adecuada. Hay diferencias en los resultados obtenidos en primates en contraste a los animales de granja y laboratorio. En los tratamientos de infertilidad humana, la transferencia de embriones se suele hacer en el útero, llevando el embarazo a término, sin que éstos tengan contacto con el oviducto. Como en un caso publicado de un transplante de ovario en útero en una paciente con las trompas de Falopio bloqueadas (Estes Jr, 1924, Estes *et al.*, 1934). También se observó en monos rhesus, *Macaca mulatta*, que un embrión de

una sola célula transferido al útero daba como resultado un descendiente vivo (Marston *et al.*, 1977) . Estos hechos podrían ocurrir porque el microambiente uterino reciba un aporte de FO (Hunter, 1998). Sería debido a que la unión útero-tubárica no supone una buena barrera en primates, permitiendo una mezcla de fluidos en ambas direcciones: fluido uterino presente en oviducto y FO en útero. La presencia de pequeñas cantidades de FO en útero podría ser suficiente para un correcto desarrollo de embriones que no hayan estado en contacto con el oviducto (Hunter, 2012), a la vez que la presencia de fluido uterino en el oviducto podría estar detrás de los casos de embarazo ectópico que ocurren en primates (Hunter, 2002, Shao, 2010).

3.4.2. Función inmunológica

Inmunológicamente hablando, el oviducto es un órgano muy característico, ya que debe respetar la presencia de agentes extraños como los espermatozoides y embriones tempranos, mientras realiza su función defensiva ante agentes patógenos (Bergqvist *et al.*, 2005). En la especie bovina, se ha detectado la presencia del sistema Fas-FasL en el oviducto, cuya actividad parece estar relacionada con la eliminación de linfocitos T citotóxicos y células natural killer (NK), previniendo que ataquen a espermatozoides y embriones tempranos (Bergqvist *et al.*, 2005).

También se ha detectado la proteína HSP8, perteneciente a la familia de HSP (Neuer *et al.*, 2000, Boilard *et al.*, 2004), como importante en la supervivencia de espermatozoides en el oviducto (Elliott *et al.*, 2009) y el ácido hialurónico, también presente en FO, posee efecto bacteriostático (Pirnazar *et al.*, 1999).

3.4.3. Función de barrera en la superficie oviductal

Además de OVGP1, en el oviducto se expresan otras proteínas de las familias de las mucinas, como MUC-1, que forma una barrera de moléculas mucosas en la superficie apical del epitelio oviductal al no ser secretada. La función de estas mucinas ha sido revisada por Lagow y colaboradores (Lagow *et al.*, 1999) y podría ser la de evitar la deshidratación de las células epiteliales lubricándolas, evitar proteólisis, proteger contra ataques microbianos, modular la unión celular e inhibir la respuesta inmune de las células. La proteína OVGP1 ha sido implicada en la prevención de la

implantación embrionaria ectópica, en lo que MUC-1 también podría estar implicada, ya que se ha descrito regulada a la baja en útero en el momento de la implantación (Surveyor *et al.*, 1995, Lapensee *et al.*, 1997, Hoffman *et al.*, 1998).

3.4.4. Funciones en relación al ovocito

Antes de desarrollar la función que tiene el oviducto actuando sobre el gameto femenino, es necesaria una breve introducción acerca de la estructura que recubre el ovocito, encargada de estar en contacto con el oviducto y sus secreciones: La zona pelúcida (ZP).

3.4.4.1. La zona pelúcida

La ZP es una matriz glicoproteica acelular (**Fig 3**), de aspecto translúcido, que rodea el ovocito de mamíferos. En otros vertebrados existe un sistema parecido en estructura y función: la membrana vitelina en anfibios, la envoltura perivitelina en aves y el corion en peces. En mamíferos, esta matriz está involucrada en la formación del ovocito, en la fecundación y en el desarrollo embrionario temprano (Wassarman, 1988, Tian *et al.*, 1997, Hyllner *et al.*, 2001, Sasanami *et al.*, 2002, Spargo *et al.*, 2003, Monne *et al.*, 2011), además interviene en la foliculogénesis, la organización y diferenciación de las células de la granulosa, en el reconocimiento y en la unión del espermatozoide, en la inducción de la reacción acrosómica (RA), en el bloqueo de la polispermia y en la protección del embrión preimplantado (Berger *et al.*, 1989, Liu *et al.*, 1996, Rankin *et al.*, 1996, Benoff, 1997, Fazeli *et al.*, 1997, Kolle *et al.*, 1998, Rankin *et al.*, 1999, Rankin *et al.*, 2001, Dean, 2004, Gupta *et al.*, 2011, Gupta *et al.*, 2012).

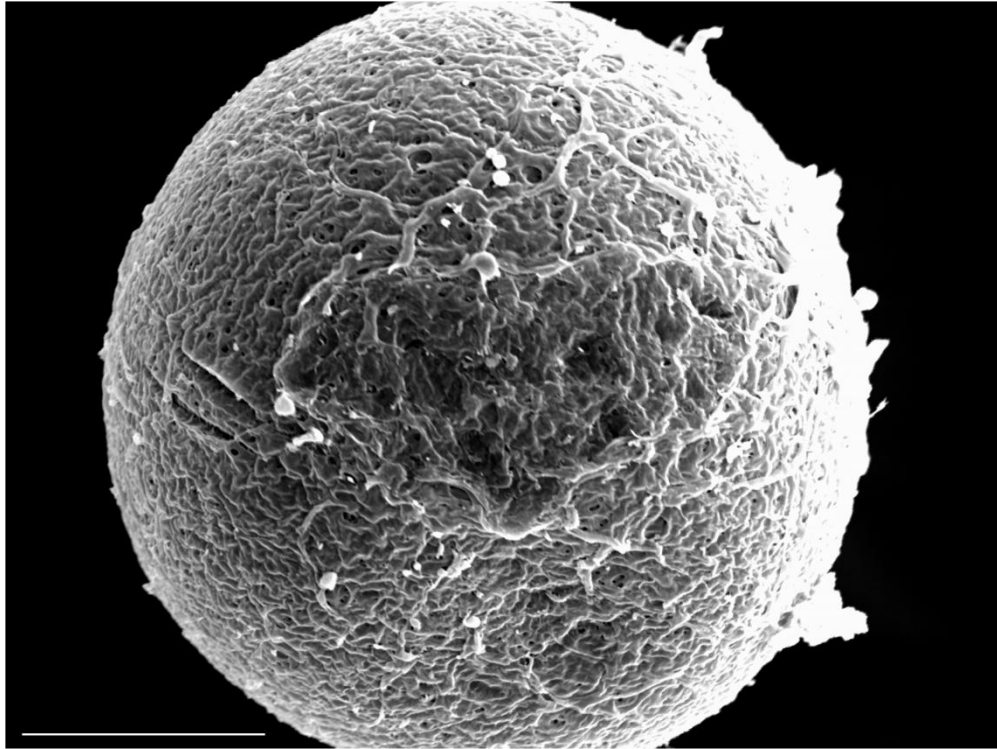


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de la zona pelúcida de óvulo de cerda. Se observa la estructura tridimensional porosa. Barra: 30 μ m.

La ZP de mamíferos es sintetizada durante el crecimiento folicular en el ovario y en su formación puede intervenir sólo el ovocito o el ovocito junto con las células de la granulosa (Wassarman, 1988, Maresh *et al.*, 1990, Sinowatz *et al.*, 2001, Wassarman, 2008, Wassarman *et al.*, 2012a).

La ZP está compuesta por tres o cuatro glicoproteínas, según la especie. La ratona posee las glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3 (Bleil *et al.*, 1980, Lefievre *et al.*, 2004, Evsikov *et al.*, 2006, Goudet *et al.*, 2008). La cerda, la perra, la vaca, el delfín, el tarsero y el tití poseen ZP2, ZP3 y ZP4 (Hedrick *et al.*, 1987a, Noguchi *et al.*, 1994, Goudet *et al.*, 2008, Stetson *et al.*, 2012). La mujer, la rata, la coneja, la gata, el hámster y el macaco coronado poseen las cuatro glicoproteínas en su ZP: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Lefievre *et al.*, 2004, Hoodbhoy *et al.*, 2005, Ganguly *et al.*, 2008, Izquierdo-Rico *et al.*, 2009, Jimenez-Movilla *et al.*, 2009, Stetson *et al.*, 2012, Stetson *et al.*, 2015).

Las glicoproteínas que constituyen la ZP comparten estructura, formada por distintos dominios, que incluyen el péptido señal, el dominio ZP, el dominio trefoil

(solamente presente en ZP1 y ZP4), un sitio consenso para corte de furina, un dominio transmembrana y un tallo citoplasmático (Conner *et al.*, 2005).

Existe controversia en cuanto a la estructura de la ZP. Greve y Wassarman describieron un entramado tridimensional de fibras constituidos por filamentos de ZP2-ZP3 que estarían unidos entre sí por ZP1 (Greve *et al.*, 1985). En 2004, el grupo del Dr. Dean propuso una nueva estructura, la cual estaría formada por repeticiones de heterodímeros ZP3-ZP2 y ZP3-ZP1 formando la estructura fibrilar principal y unidos entre sí por las glicoproteínas ZP1 y ZP2 (Dean, 2004). En 2011 se propuso un nuevo modelo basado en el modelo de Greeve y Wassarman de 1985, en el que ZP1 se incorpora a los largos filamentos a través de su dominio ZP1, quedando la ZP constituida por polímeros de ZP1-ZP2-ZP3 unidos entre sí mediante homodímeros de ZP1 a través de enlaces disulfuro, creando una estructura tridimensional (Monne *et al.*, 2011). En el caso de especies de mamíferos que posean una composición glicoproteica distinta a ZP1, ZP2 y ZP3, como aquellas que presentan las glicoproteínas ZP2, ZP3 y ZP4 o una ZP formada por 4 glicoproteínas, posiblemente también posean sea una estructura similar a la descrita anteriormente. Se ha propuesto que el modelo de cuatro proteínas estaría constituido por filamentos largos compuestos por las glicoproteínas ZP2 y ZP3, entrelazados por otros tipos diferentes de filamentos que podrían ser homodímeros de ZP1, homodímeros de ZP4 y heterodímeros de ZP1-ZP4 (Florman *et al.*, 2006).

La estructura tridimensional de ZP es porosa, lo que la hace permeable a macromoléculas relativamente grandes y a pequeños virus (Van Soom *et al.*, 2009, Wassarman *et al.*, 2012b). Se observan diferencias en cuanto a su disposición tridimensional entre la superficie externa e interna al observarla mediante microscopía electrónica de barrido (**Fig. 4**). En ratona, se observan fenestraciones en la superficie externa que dan una apariencia esponjosa, siendo la superficie interna más regular y compacta (Phillips *et al.*, 1980, Familiari *et al.*, 1992, Familiari *et al.*, 2006, Familiari *et al.*, 2008).

Además, al observar la ZP con PolScope se visualizan tres capas diferenciadas. La capa interna es la más birrefringente, brillante y gruesa. La capa media es poco birrefringente, oscura y la más delgada. La capa externa presenta una birrefringencia y grosor mayor que la anterior. Se utiliza el aspecto de estas capas como marcador de la

calidad de los ovocitos y del desarrollo embrionario (Pelletier *et al.*, 2004, Shen *et al.*, 2005, Rama Raju *et al.*, 2007). Se ha descrito que existe correlación entre la estructura de ZP y el grado de madurez del ovocito en la mujer (Familiari *et al.*, 1988) y la ratona (Calafell *et al.*, 1992), siendo en la mujer la ZP homogénea y compacta en ovocitos Metafase I y más porosa en metafase II (Tesarik *et al.*, 1988).

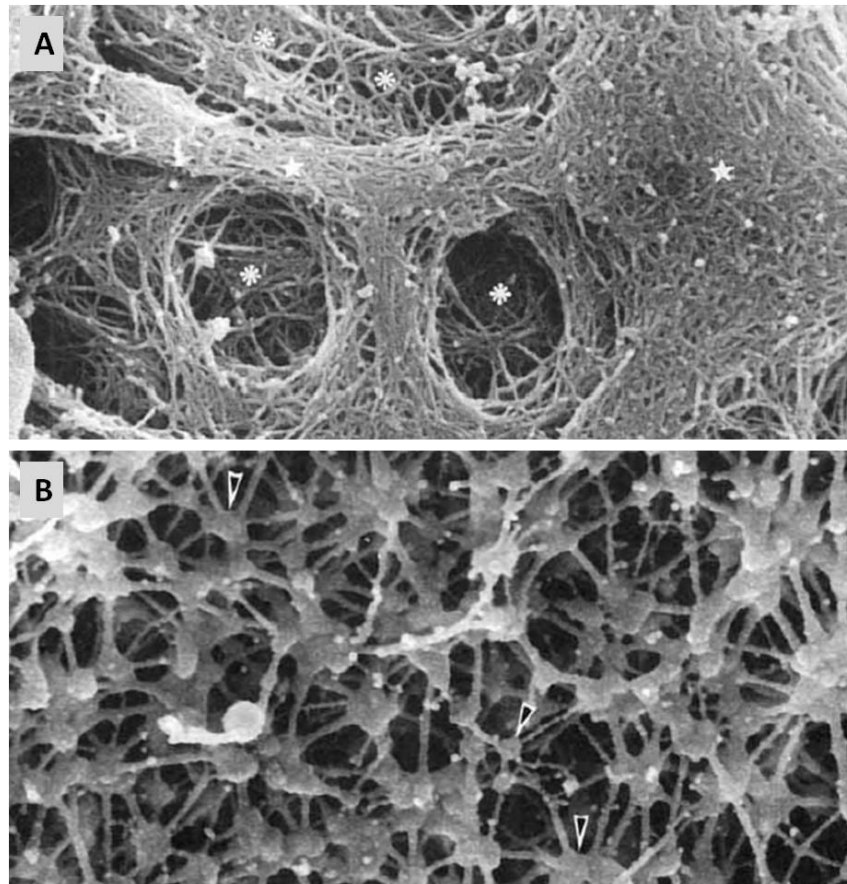


Figura 4. Micrografía electrónica de barrido de la zona pelúcida de óvulo de mujer. A. Superficie externa de ZP. B. Superficie interna de ZP. (Familiari *et al.*, 1992)

3.4.4.2. El ovocito en el oviducto: Maduración oviductal

El ovocito está flotando en el fluido folicular del interior del folículo ovárico junto con el cúmulo ovígero (CO) que lo acompaña (Thibault *et al.*, 1987) hasta que se produce la rotura de la pared del folículo en de la ovulación y el complejo COC se expide a la cavidad abdominal. Las hormonas esteroideas ováricas estimulan los cilios del infundíbulo a moverse de manera sincronizada y dirigida hacia el orificio tubárico. De esa manera el complejo cúmulo-ovocito (CCO) es recogido, junto con una pequeña

parte de fluido folicular denso y viscoso (Leese, 1988), e introducido en el oviducto, donde se transportará hacia el lugar de fecundación (Suarez, 2015).

Gracias a la combinación del batido de los cilios y a las fuertes ondas de contracción del miosalpinx, el paso del complejo cúmulo-ovocito del sitio de fecundación a la unión ampular-ístmica es relativamente rápido: 9-15 min en conejos y 30-45 en cerdos (Hunter, 1988). Este transporte es acelerado por estrógenos y decelerado por progesterona (P₄) administradas en dosis y tiempos adecuados (Chang, 1966). Otro elemento a tener en cuenta sobre el transporte ovocitario son las óxido nítrico sintasas (ONS) (Lapointe *et al.*, 2006). El óxido nítrico (ON) juega un papel como agente relajante en el oviducto de mamíferos, acelerando su inhibición el transporte del ovocito (Martinez *et al.*, 2000).

El ovocito desnudo se mantiene un tiempo en la región ampular-ístmica (Hunter, 1972a), donde se adhiere al epitelio de la ampolla oviductal (Croxatto *et al.*, 1975, Norwood *et al.*, 1978, Kolle *et al.*, 2009), hasta producirse la fecundación. Utilizando filmaciones microscópicas en oviducto de vaca, se ha sugerido que tan pronto como el CCO maduro llega a la ampolla, éste es firmemente unido al epitelio oviductal (Kolle *et al.*, 2009).

Mientras se desarrolla el recién formado cigoto, viaja de manera lenta y controlada por el istmo oviductal hasta llegar al útero (Kolle *et al.*, 2009), normalmente de 2 a 7 días después, dependiendo de la especie. Se observa un gran contraste entre una rápida progresión en la ampolla y lenta en el istmo. A pesar del rápido transporte por la ampolla, el cambio drástico de las condiciones del folículo Graafiano al oviducto es el responsable de modificaciones moleculares en la superficie del ovocito (Yang *et al.*, 1989, Hunter, 1994, Hunter, 2003, Coy *et al.*, 2008a, Coy *et al.*, 2010).

Los ovocitos se desarrollan en el interior del folículo ovárico, en un proceso llamado foliculogénesis o crecimiento folicular, que implica cambios en la ZP (Tesarik *et al.*, 1988, Oehninger *et al.*, 1991, Aviles *et al.*, 1999, Aviles *et al.*, 2000a, Aviles *et al.*, 2000b). Pero la maduración final del ovocito se realizará durante su tránsito por el oviducto. Se producirán modificaciones en el citoplasma, la ZP y el CO (Yang *et al.*, 1989). Las modificaciones producidas en la ZP se conocen con el nombre de maduración zonal y son fundamentales para que se produzca, de manera correcta, la unión con el espermatozoide y el bloqueo de la polispermia (Oikawa *et al.*, 1988,

Robitaille *et al.*, 1988, Sakai *et al.*, 1988, Schmidt *et al.*, 1997a, Schmidt *et al.*, 1997b, Kolbe *et al.*, 2005, Lyng *et al.*, 2007). Se han descrito diferencias, algunas a nivel ultraestructural, entre la ZP de ovocitos foliculares y oviductales (Funahashi *et al.*, 2001).

En algunas especies, como la vaca o la oveja, las células de la granulosa son raramente detectadas alrededor de los ovocitos recién ovulados, mientras que en porcino y primates acompañan al ovocito (Hunter, 1989). Las tasas de fecundación se mejoran en la mayoría de especies de mamíferos cuando están presentes las células del cúmulo (Campos *et al.*, 2001, Zhuo *et al.*, 2001, Van Soom *et al.*, 2002). Durante el proceso de expansión del cúmulo, la ZP del ovocito se hace más accesible al FO, permitiendo ser modificada por diferentes moléculas.

Utilizando anticuerpos frente a la ZP de ovocitos oviductales, se detectó un componente oviductal que se unía a la ZP de los ovocitos en su tránsito por el oviducto que no estaba presente en los ovocitos foliculares (Araki *et al.*, 1987, Leveille *et al.*, 1987, Kan *et al.*, 1988, Oikawa *et al.*, 1988, Stjacques *et al.*, 1988, Kan *et al.*, 1989, Abe *et al.*, 1990). Este componente detectado podría corresponderse con la glicoproteína específica del oviducto (OVGP1), osteopontina y prostaglandina D sintasa tipo lipocalina, detectadas posteriormente unidas a ZP bovina de ovocitos oviductales (Goncalves *et al.*, 2008b). Además, se ha detectado OVGP1 unida a ZP de diferentes especies (**tabla 3**) (Brown *et al.*, 1986, Hedrick *et al.*, 1987b, Robitaille *et al.*, 1988, Gandolfi, 1995). Habría que tener en cuenta que la secreción de estas proteínas varía con la fase del ciclo estral, con la región oviductal y entre especies (Buhi *et al.*, 1989, Buhi *et al.*, 1993, Buhi *et al.*, 2000). Por el contrario, se describió que no se observan diferencias en la expresión de ARNm de OVGP1 durante el ciclo estral en hámster y coneja (Paquette *et al.*, 1995, Merchan *et al.*, 2007). Por otro lado, Komiya y colaboradores si observaron una variación en la cantidad de ARNm correspondiente a OVGP1 entre las etapas de estro y diestro, pero sólo en la ampolla oviductal, no en el istmo. También observaron que existía un nivel basal del transcrito tanto en la ampolla como en el istmo (Komiya *et al.*, 1996). Además, de acuerdo a estos resultados, Roux y Kan mostraron por medio de un análisis cuantitativo que existía un máximo de OVGP1 en los gránulos secretorios de las células secretoras epiteliales en estro, siendo la señal mínima en diestro en hámster (Roux *et al.*, 1995).

En relación a esto, se ha descrito la proteína oviductal OVGP1 y glicosaminoglicanos como heparina procedentes del FO unidos a la ZP, haciéndola más resistente a la digestión enzimática, a la penetración y disminuyendo la unión espermática (Coy *et al.*, 2008a). Hasta entonces, el término endurecimiento de la ZP había sido considerado únicamente como resultado de la secreción de los gránulos corticales ovocitarios (llamado reacción cortical) post fecundación. A partir de entonces, se sabe que la ZP sufre estos cambios en la maduración oviductal previa a la fecundación, conociéndose el endurecimiento producto de ellos como “endurecimiento pre-fecundación de la ZP”. Los niveles de polispermia en el cerdo y en la vaca están significativamente afectados por el contacto de la ZP con el FO, modificando el resultado de fecundación (Coy *et al.*, 2008a). Se han encontrado resultados similares en la oveja y la cabra (Mondéjar Corbalán, 2012). Otro hecho que sugiere que el oviducto participa en la maduración zonal del ovocito es que se han descrito diferencias significativas en el tamaño y estructura de la ZP de ovocitos que han sido madurados *in vivo* e *in vitro* (Funahashi *et al.*, 2000).

Por otro lado, se ha propuesto que algunas proteínas oviductales serían las responsables de regular la exocitosis de los gránulos corticales y/o incrementarían la sensibilidad de la ZP al contenido de los mismos (Hunter, 1991b, Kim *et al.*, 1996). Además, el tratamiento de ovocitos con FO previo a la FIV en sistema porcino, incrementa la tasa de monospermia sin un descenso en la penetración espermática (Kim *et al.*, 1996, Coy *et al.*, 2008a).

El paso por el oviducto modifica también los residuos glucídicos de las proteínas, ya que se ha detectado un cambio significativo en los residuos de carbohidratos de las glicoproteínas unidas a ZP después de la ovulación (Aviles *et al.*, 1996b, Aviles *et al.*, 1997, El-Mestrah *et al.*, 2001).

3.4.5. Funciones en relación al gameto masculino

3.4.5.1. El espermatozoide en el oviducto

Una vez que se produce la eyaculación en el interior del sistema reproductor femenino, la mayoría de espermatozoides son eliminados por diferentes mecanismos (Yanagimachi, 1994). Solamente un pequeño porcentaje de la población espermática es

capaz de alcanzar la ampolla oviductal o la unión ampular-ístmica. Las contracciones del miosalpinx juegan un papel importante en la formación del reservorio espermático en el istmo de ratón y en el transporte de los espermatozoides desde allí hacia la región media del oviducto, desde donde es esencial la propia motilidad espermática para alcanzar la ampolla oviductal (Ishikawa *et al.*, 2016). Un trabajo realizado con un modelo de ratón genéticamente modificado muestra que el paso crítico en el transporte espermático es su migración a través de la unión útero-tubárica (Tokuhiro *et al.*, 2012).

Se ha descrito el papel del oviducto en la capacitación del gameto masculino mediada por la unión de la cabeza del mismo a células epiteliales oviductales (Suarez, 1998, Goudet, 2011, Hunter, 2012, Suarez, 2015). En la zona caudal del istmo oviductal se localiza una población de espermatozoides viables unidos al epitelio constituyendo el reservorio funcional espermático (Hunter *et al.*, 1980, Hunter, 1995), donde los espermatozoides, inmersos en una secreción glicoproteica viscosa, son estabilizados durante el intervalo pre-ovulatorio con una supresión de motilidad y la superficie de sus membranas intactas, protegidos de la influencia estimuladora del fluido uterino y de la ampolla oviductal (Hunter, 2012). Ahí el espermatozoide prolonga su supervivencia al retrasar el proceso de capacitación (Fazeli *et al.*, 2003, Suarez, 2008, Suarez 2015).

Las moléculas responsables de la unión de los espermatozoides a las células del epitelio del oviducto son distintas en cada especie (Talevi *et al.*, 2010b). Los espermatozoides que poseen en su superficie determinados receptores, son capaces de unirse a las células epiteliales durante más de treinta horas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005, Hunter, 2012). Hung y Suárez consideran en su revisión la proteína del plasma seminal BSP1 (o PDC 109) y la proteína anexina de la membrana apical de las células epiteliales como claves en este proceso (Hung *et al.*, 2010). Los carbohidratos especie-específicos expresados en el epitelio oviductal también intervienen en esta unión (Suarez, 2015).

Por otro lado, la liberación de los espermatozoides del reservorio está modulado por el ciclo estral femenino, incrementándose en el periodo peri-ovulatorio (Suarez, 2008) y es probable la existencia de una señalización desconocida entre el reciente unido CCO con las células oviductales (Kolle *et al.*, 2009) y con los niveles de P₄ (Bureau *et al.*, 2002). Aunque los mecanismos responsables de la liberación de los espermatozoides no están claros, se ha realizado una identificación parcial de diferentes

proteínas y carbohidratos involucrados en la unión y el desprendimiento del espermatozoide al oviducto (Suarez, 2001, Gualtieri *et al.*, 2010, Talevi *et al.*, 2010a, Talevi *et al.*, 2010b) y la relación entre la ovulación y el desprendimiento del espermatozoide capacitado (Smith *et al.*, 1991, Lefebvre *et al.*, 1996, Gualtieri *et al.*, 2005, Suarez, 2007). Además, se ha visto que la actividad de diferentes glicosidasas varía en el FO a lo largo del ciclo estral (Carrasco *et al.*, 2008a, Carrasco *et al.*, 2008b). Estas enzimas podrían actuar sobre carbohidratos (o residuos glucídicos) específicos presentes en las células epiteliales, necesarios para la unión espermática, contribuyendo así al despegue de los espermatozoides del reservorio. El despegue de los espermatozoides también podría deberse a la pérdida de proteínas involucradas en la unión. La presencia de anexina en el FO es otro factor que podría participar en esta regulación (Mondejar *et al.*, 2012).

Como hemos mencionado anteriormente, en el oviducto se produce la capacitación espermática. El proceso de capacitación fue descubierto independientemente por Austin (Austin, 1951) y Chang (Chang, 1951) y se define como los eventos fisiológicos que hacen al espermatozoide capaz de fecundar. En la mayoría de mamíferos, la capacitación *in vitro* se lleva a cabo incubando los espermatozoides en un medio que imita el medio oviductal, que lleva como componentes bicarbonato, calcio, fuente de energía y albúmina.

Podemos afirmar entonces que el oviducto interviene en las modificaciones que sufre el espermatozoide y lo hace capaz de fecundar. Una de estas modificaciones es la variación en el patrón de motilidad espermática. Los espermatozoides en el epidídimo son inmóviles o poco móviles (están inactivados). Cuando salen del epidídimo y se mezclan con el plasma seminal se activan. El término motilidad activada fue descrito por Yanagimachi como el proceso por el cual el espermatozoide comienza a nadar recta y vigorosamente con un batido flagelar simétrico (Yanagimachi, 1994). Una vez que llega al oviducto forma el reservorio espermático, se estabiliza durante el intervalo preovulatorio con la motilidad suprimida y la superficie de sus membranas intactas (Hunter, 2012). Al dejar el reservorio, adquieren otro patrón de motilidad llamado “motilidad hiperactivada”, que significa una motilidad vigorosa con batidos flagelares amplios y asimétricos (Yanagima.R, 1970), necesario para fecundar. Este estado superactivado es debido a la entrada de Ca^{2+} , que produce un aumento de Ca^{2+} citosólico, caracterizado por un latigazo del flagelo y el despegue del epitelio,

progresando a través de la secreción viscosa de la unión ampular-ístmica (Hunter, 2001).

El espermatozoide está expuesto a diferentes microambientes (viscosidad, agentes químicos, temperatura, etc) en su viaje a través del oviducto, lo que implica una readaptación continua de su patrón de motilidad a esas características (Coy *et al.*, 2012^a, Suarez, 2015). Durante la etapa pre-ovulatoria, el moco presente en el oviducto es extremadamente viscoso, lo que contribuye a la supresión de la motilidad espermática (Hunter *et al.*, 2011) mientras que después de la ovulación, se hace menos viscoso, lo que facilita el batido flagelar y la progresión espermática adecuada hacia la ampolla oviductal (Suarez *et al.*, 1992, Hunter *et al.*, 2011). Ishikawa y colaboradores han observado recientemente *in vivo* en ratón que la propia motilidad del espermatozoide es esencial para alcanzar la ampolla oviductal desde la región media del oviducto (Ishikawa *et al.*, 2016). Una vez que el espermatozoide alcanza el óvulo, debe atravesar las células del cúmulo y atravesar la ZP. Se piensa que es capaz de hacerlo gracias a la motilidad hiperactivada y a la presencia de hialuronidasas GPI ancladas a la superficie espermática (Yin *et al.*, 2009). Es necesario que el espermatozoide sufra la RA para que la fecundación tenga lugar. Existe controversia sobre el lugar en que ocurre la RA espermática. Algunos investigadores creen que tiene lugar mientras el espermatozoide avanza entre el cúmulo, mientras que otros opinan que ocurre en la superficie de la ZP (Szöllösi *et al.*, 1978, Yanagimachi, 1994). Combinando ambas informaciones, diríamos que la ZP no es el único lugar donde ocurre la RA, jugando las células del cúmulo un importante papel en este proceso (Yanagimachi, 2011).

Todas las modificaciones que sufre el espermatozoide durante su tránsito por el oviducto están enfocadas a hacerlo capaz de unirse y atravesar la ZP, que sería la última barrera antes de producirse la fusión entre gametos (Gadella, 2011).

Se ha descrito que la interacción entre dos proteínas que son Izumo1, presente en la superficie del espermatozoide (Satouh *et al.*, 2012) y Juno, una proteína de membrana anclada a glicosilfosfatidilinoxitol (GPI) anteriormente conocida como receptor de folato 4 (Folr4), es esencial para que se produzca la fecundación en ratón y que esta interacción está conservada en diferencias especies de mamíferos (Bianchi *et al.*, 2014). Se ha observado que se produce un desprendimiento de Juno del oolema tras la fecundación, sugiriéndose que este proceso compone un mecanismo de membrana para

el bloqueo de la polispermia (Bianchi *et al.*, 2014). Además, Juno e Izumo son dos proteínas esenciales en la fecundación, ya que la hembra de la especie murina knockout para Juno es infértil y los óvulos que no presentan esta proteína en superficie no se fusionan con espermatozoides normales (Bianchi *et al.*, 2014). Los machos knockout para Izumo son también infértiles (Inoue *et al.*, 2005).

Los espermatozoides que son capaces de penetrar el ovocito son funcionalmente superiores y poseen una calidad de ADN superior (Holt *et al.*, 2010).

3.4.5.2. Funciones del oviducto sobre el espermatozoide

El oviducto está involucrado en la selección de espermatozoides (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005) y la guía de los mismos hacia el óvulo (Holt *et al.*, 2010). Después de la cópula, se deposita un gran número de espermatozoides en la vagina o en el útero, pero sólo unos pocos son capaces de llegar al lugar de la fecundación. Los espermatozoides con una deformación severa en su morfología no son capaces de entrar en el oviducto (Styrna *et al.*, 2002), sin embargo, aquellos que poseen una morfología normal o con pequeñas anomalías y movimiento linear progresivo pueden penetrar en la unión útero-tubárica y entrar en el istmo (Shalgi *et al.*, 1992, Holt *et al.*, 2004, Nakanishi *et al.*, 2004).

Los espermatozoides son guiados en el interior del sistema reproductor femenino. Se ha descrito la termotaxis y quimiotaxis como los procesos por los cuales los espermatozoides son guiados por un gradiente de temperatura de frío a calor (Eisenbach *et al.*, 2006) o por un gradiente químico (Chang *et al.*, 2010) para alcanzar el óvulo. Como potenciales quimioatrayentes se han descrito la P₄ (Chang *et al.*, 2010) y el precursor del péptido natriurético (Bian *et al.*, 2012). Hay otros factores además de la termotaxis y quimiotaxis implicados en el transporte y guía de los espermatozoides: el movimiento del FO, las contracciones oviductales, el epitelio oviductal y la estructura interna del oviducto (Burkitt *et al.*, 2012). Las contracciones del miosalpinx son muy importantes en la formación del reservorio espermático y en el transporte de los espermatozoides desde este reservorio hacia la región media del oviducto, a partir de la cual la motilidad espermática es esencial para que el espermatozoide alcance la ampolla (Ishikawa *et al.*, 2016).

El tracto genital femenino posee un efecto positivo en el potencial de fecundación de espermatozoides genéticamente alterados (Kawano *et al.*, 2010, Turunen *et al.*, 2012). Mondéjar y colaboradores (2012) revisaron estos aspectos proponiendo un nuevo punto de vista acerca de la contribución oviductal y uterina en la maduración espermática en el tracto genital femenino, lo que contribuiría a desarrollar tratamientos espermáticos con secreciones uterinas y oviductales. El objetivo sería mejorar la calidad seminal, también en espermatozoides dañados tras criopreservación. Además, en un trabajo reciente se ha mostrado que una gran proporción de espermatozoides sufren la RA en el segmento superior del istmo oviductal (La Spina *et al.*, 2016).

Algunas sustancias presentes en el FO como glicosaminoglicanos, carbohidratos, norepinefrina, catecolaminas, HSP y osteopontina modulan y modifican la función espermática (Killian, 2011). Además, la adición de proteínas procedentes de FO previamente a la congelación espermática produce efectos beneficiosos en la movilidad y viabilidad espermática y en la integridad acrosomal (Kumaresan *et al.*, 2006).

Podemos afirmar que existe una influencia en la viabilidad, movilidad, RA y capacidad fecundante de los espermatozoides según la porción oviductal y la fase del ciclo de la que proceda el FO (McNutt *et al.*, 1991, Pollard *et al.*, 1991, Grippo *et al.*, 1995). Además, se ha observado *in vitro* que los fluidos viscosos, como es el FO, mejoran la capacidad de movimiento espermático, la unión y penetración al ovocito (Coy *et al.*, 2009). El uso de FO como aditivo en medio de FIV descende la penetración espermática y el número medio de espermatozoides por ovocito penetrado (Kim *et al.*, 1996).

3.4.6. Funciones en relación al embrión

El FO también debe tener efectos sobre el embrión, ya que éste permanece en el oviducto por un periodo variable según la especie, pero no inferior a 48 h. Se han descrito factores embriotróficos presentes en el oviducto (Liu *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2006a, Lee *et al.*, 2006b, Aviles *et al.*, 2010) que pueden actuar en las distintas etapas de desarrollo del embrión produciendo: aumento del desarrollo del blastocisto, aumento de la tasa de blastocistos, de eclosión y del número de células de la masa celular interna del blastocisto, protección del embrión contra efectos adversos de la transcripción/replicación del ADN mitocondrial y apoptosis (Lee *et al.*, 2006b, Lloyd *et*

al., 2009b), ya que se han detectado en el embrión receptores para ciertos factores presentes en el FO (Kane *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 2006b). Por ello, el mejor microambiente para que se produzca el desarrollo embrionario temprano es el creado por el oviducto (Freeman *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta que las necesidades metabólicas del embrión preimplantacional cambian durante su desarrollo (Leese, 1995), el FO modifica su actividad para proporcionar el ambiente óptimo en cada momento (McGee *et al.*, 1998, Bui, 2002, Aviles *et al.*, 2010).

Numerosos autores han utilizado el ambiente oviductal para cultivar embriones de alta calidad tanto de manera homóloga como heteróloga, por lo que los factores embriotróficos no parecen ser especie-específicos (Trounson *et al.*, 1977, Rao *et al.*, 1984, Rizos *et al.*, 2002a, Rizos *et al.*, 2002b, Gutierrez-Adan *et al.*, 2004, Lazzari *et al.*, 2010, Rizos *et al.*, 2010).

Las sustancias presentes en el oviducto modifican al embrión inmerso en su microambiente, pudiendo afectar a la expresión génica de los embriones preimplantacionales (Lee *et al.*, 2001). Por otro lado, también ocurre la relación inversa, ya que la presencia del embrión altera la fisiología y la expresión génica del oviducto (Lee *et al.*, 2006b). Hace años se sugirió que el propio embrión es el que regula su propio tránsito por el oviducto (Ortiz *et al.*, 1986). Se ha publicado que la secreción de canabinoides podría ser la responsable de este proceso al coordinar la contracción y relajación del músculo liso oviductal (Wang *et al.*, 2004).

Con todos los estudios realizados, queda evidente que el oviducto juega un papel crítico en el desarrollo del cigoto y durante las primeras etapas de división embrionaria, etapa en que se produce el paso de la regulación genómica materna a la embrionaria. Se ha descrito perturbaciones de expresión génica cuando se generan y cultivan embriones *in vitro* antes de transferirlos al útero materno (Wrenzycki *et al.*, 1999, Lonergan *et al.*, 2003, Wrenzycki *et al.*, 2005, Lonergan *et al.*, 2006). Un ejemplo de ello es el llamado “Síndrome del Ternero Gigante” (McEvoy *et al.*, 2000, Farin *et al.*, 2006, Thompson *et al.*, 2007, Duranthon *et al.*, 2008). Intentos de fecundación en el útero, en lugar de en el oviducto han dado como resultado un fallo en el proceso, o un índice de éxito relativamente bajo (Chang, 1955, Hunter, 1968).

3.5. OVGP1

La proteína oviductina (OVGP1) es la glicoproteína no-sérica más abundante específica del fluido oviductal (Malette *et al.*, 1995), aunque se han detectado cantidades traza de OVGP1 en el tapón mucoso del cérvix y en el fluido uterino (Soleilhavoup *et al.*, 2016), probablemente debido a la transferencia de FO a estos dos compartimentos contiguos al oviducto.

OVGP1, también conocida como MUC9 (Lapensee *et al.*, 1997), es una mucina secretada codificada por el gen *MUC9* u *OVGP1* (designado como *Ovgp1* en ratón). A las mucinas se les ha atribuido diversas funciones: actúan como lubricantes y previenen la deshidratación de superficies celulares de epitelios mucosos (Jentoft, 1990, Devine *et al.*, 1992). La aglomeración de oligosacáridos que poseen protege esa región de la proteína frente al ataque proteolítico (Jentoft, 1990), protegen frente a infección o colonización bacteriana (Lamblin *et al.*, 1993), limitan el acceso a receptores de la superficie celular y la adhesión a matrices extracelulares (Hilkens *et al.*, 1992), aunque también son capaces de promover adhesión celular, seleccionar ligandos y ser transportadoras de estos ligandos selectivos (Hey *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 1996).

El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de OVGP1 muestra similaridad con un grupo de proteínas de mamífero que incluyen la glicoproteína de cartílago humana 39 (Hakala *et al.*, 1993), chitotriosidasa humana de macrófagos (Boot *et al.*, 1995) y enzimas quitinasas. Todas estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas glicosil-hidrolasas 18, que incluye proteínas con actividad quitín-hidrolasa, aunque, en el caso de OVGP1, no se le ha descrito actividad enzimática o catalítica (Desouza *et al.*, 1995, DeSouza *et al.*, 1995, Jaffe *et al.*, 1996), debido a la falta de un residuo de ácido glutámico esencial (Buhi, 2002). En OVGP1 porcina, los aminoácidos 386-525 corresponden con el dominio C-terminal encontrado en algunas celulasas y quitinasas (Buhi *et al.*, 1996).

La proteína OVGP1 ha sido detectada en el genoma de diferentes mamíferos que incluyen monotremas (Warren *et al.*, 2008), marsupiales (Mikkelsen *et al.*, 2007) y placentarios, incluyendo el hombre (Sutton *et al.*, 1984, Donnelly *et al.*, 1991, Arias *et al.*, 1994, Desouza *et al.*, 1995, Sendai *et al.*, 1995, Suzuki *et al.*, 1995, Buhi *et al.*, 1996, Buhi, 2002, Killian, 2004) (**tabla 1**). Fueron Oliphant y colaboradores en 1984 en conejo y Oikawa y colaboradores en 1988 en hámster los primeros en detectar una

sustancia de alto peso molecular producida por las células no ciliadas del epitelio oviductal (localizada en los gránulos secretores apicales) y secretada al FO que se había unido a la ZP de ovocitos tras su paso por el oviducto (Oliphant *et al.*, 1984, Oikawa *et al.*, 1988).

Conforme se han ido conociendo características de la proteína, se ha ido nombrando de diferentes maneras: oviduct secretory glycoproteins (pOSP) (Buhi *et al.*, 1996), oestrus-associated glycoprotein (EAP) (Sutton *et al.*, 1984, Buhi *et al.*, 1990, King *et al.*, 1994b), oviduct-specific oestrus-associated glycoprotein (EGP) (Hill *et al.*, 1996b), oviduct glycoprotein (sOP92) (Gandolfi *et al.*, 1991), glycoprotein GP 215 (Kapur *et al.*, 1985), oviductin (Robitaille *et al.*, 1988), oviductal secretory proteins (OSP) (Buhi *et al.*, 1989), sheep oviduct glycoprotein (SOP) (Gandolfi *et al.*, 1989), hamster oviductin 1 (Hm OV-1) (Kan *et al.*, 1990), estrogen dependent oviductal secretory glycoproteins (OSP) (Buhi *et al.*, 1993), oviduct-specific glycoprotein (OGP) (Sendai *et al.*, 1995, OdayBowman *et al.*, 1996), Mucin-9 (MUC-9) (Lapensee *et al.*, 1997, Lagow *et al.*, 1999) y oviduct-specific oestrogen-dependent glycoproteins (Buhi, 2002).

Tabla 1. Especies de mamíferos en las que ha sido detectada la proteína OVGP1.

Especie	Referencias
Babuina (<i>Papio anubis</i>)	(Fazleabas <i>et al.</i> , 1986, Verhage <i>et al.</i> , 1988a, Donnelly <i>et al.</i> , 1991, OdayBowman <i>et al.</i> , 1996, Verhage <i>et al.</i> , 1997a)
Cabra (<i>Capra ibex</i>)	(Abe <i>et al.</i> , 1995a, Pradeep <i>et al.</i> , 2011)
Cerda (<i>Sus scrofa</i>)	(Buhi <i>et al.</i> , 1989, Buhi <i>et al.</i> , 1990, Buhi <i>et al.</i> , 1996, Kouba <i>et al.</i> , 2000, Merchan <i>et al.</i> , 2006)
Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>)	(Kim <i>et al.</i> , 2011) (Kim <i>et al.</i> , 2011)
Coneja (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	(Oliphant <i>et al.</i> , 1982, Merchan <i>et al.</i> , 2009, Garcia <i>et al.</i> , 2010)
Gata (<i>Felis catus</i>)	(Hachen <i>et al.</i> , 2012, Hribal <i>et al.</i> , 2014a, Hribal <i>et al.</i> , 2014b)
Hámster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	(Leveille <i>et al.</i> , 1987, Oikawa <i>et al.</i> , 1988, Robitaille <i>et al.</i> , 1988, Kan <i>et al.</i> , 1990, Suzuki <i>et al.</i> , 1995, Schmidt <i>et al.</i> , 1997a, Abe <i>et al.</i> , 1998, O'Day-Bowman <i>et al.</i> , 2002, McBride <i>et al.</i> , 2004b)
Macaca (<i>Macaca mulatta</i>)	(Verhage <i>et al.</i> , 1997c, Yan <i>et al.</i> , 2011)
Mujer (<i>Homo sapiens</i>)	(Rapisarda <i>et al.</i> , 1993, Arias <i>et al.</i> , 1994, Odaybowman <i>et al.</i> , 1995, Briton-Jones <i>et al.</i> , 2001, Briton-Jones <i>et al.</i> , 2004)
Oveja (<i>Ovis aries</i>)	(Sutton <i>et al.</i> , 1984, Gandolfi <i>et al.</i> , 1989, Gandolfi <i>et al.</i> , 1991, Desouza <i>et al.</i> , 1995, Hill <i>et al.</i> , 1997)
Perra (<i>Canis lupus familiaris</i>)	(Saint-Dizier <i>et al.</i> , 2014)
Ratona (<i>Mus musculus</i>)	(Kapur <i>et al.</i> , 1985, Sendai <i>et al.</i> , 1995, Araki <i>et al.</i> , 2003)
Vaca (<i>Bos taurus</i>)	(Malayer <i>et al.</i> , 1988, Boice <i>et al.</i> , 1990a, King <i>et al.</i> , 1994a, Abe <i>et al.</i> , 1995b, Martus <i>et al.</i> , 1998)

Por otro lado, es importante destacar que se ha descrito que la rata (Arias *et al.*, 1994) y la yegua (Buhi *et al.*, 1996) no sintetizan OVGP1, debido a que su secuencia nucleotídica aparece como un pseudogen, secuencia de ADN alterada que conlleva a la no expresión de la proteína (Mugnier *et al.*, 2009, Tian *et al.*, 2009). Los análisis *in silico* realizados recientemente con el genoma de yegua actualizado, muestran que el gen que codifica OVGP1 si sería funcional.

3.5.1. Caracterización bioquímica de OVGP1

Las mucinas, como OVGP1, se definen como proteínas cuyos residuos de serina o treonina están altamente modificados por la incorporación de oligosacáridos del tipo O-unidos. Por tanto, OVGP1 es una glicoproteína. Además de O-glicosilaciones, también posee carbohidratos unidos a aminoácidos asparagina situados en secuencias específicas en forma de N-glicosilaciones. Los carbohidratos unidos a esta proteína suponen aproximadamente un 50% o más, dependiendo de la especie, de la masa molecular de la misma. Utilizando programas de predicción de secuencias, aparecen de 1 a 7 posibles sitios de N-glicosilación y de 10 a 20 de O-glicosilación en la secuencia de OVGP1 de las diferentes especies, excepto en el ratón, que aparecen 67 sitios posibles para estar O-glicosilados (Buhi, 2002). Satoh y colaboradores realizaron un estudio *in vitro* en el que se investigó el papel biológico de OVGP1 desprovista de azúcares. Al eliminar el ácido siálico y los azúcares de tipo N-unidos se observó una reducción significativa en la habilidad de OVGP1 bovina de mantener la viabilidad espermática (Satoh *et al.*, 1995). También se observó que OVGP1 completamente deglicosilada es insoluble. Podemos afirmar entonces que las glicosilaciones en esta proteína son importantes para la actividad biológica y mantener la solubilidad extracelular. Además, se han detectado diferencias en la glicosilación de OVGP1 a lo largo del ciclo estral, lo que podría ser responsable de las diferentes acciones biológicas de OVGP1 (McBride *et al.*, 2004c, McBride *et al.*, 2005).

Las proteínas OVGP1 desnaturalizadas y reducidas de las diferentes especies de mamíferos poseen un peso molecular que va desde 66 a 350 kDa. Debido a los diferentes grados de glicosilación de OVGP1, aparecen diferentes glicofomas dentro de la misma especie. En vaca, cerdo, oveja, especie humana, babuino y hámster aparecen como mínimo dos isoformas de la proteína, una ácida y otra básica (Buhi, 2002). En el hámster, el peso molecular aparente de OVGP1 va desde 160 a 350 kDa (Malette *et al.*, 1993), lo que apunta a los carbohidratos como un componente muy abundante, siendo los más abundantes los de tipo O-unidos (Malette *et al.*, 1993). Existen tres glicofomas de OVGP1 porcina: dos de ellas de 100 kDa, con puntos isoeléctricos (pI) de 5-6 y 8.5 y una de 75-85 kDa con pI de 4 (Buhi *et al.*, 1990, Kouba *et al.*, 2000). En la especie bovina aparecen siete isoformas diferentes (Vieira *et al.*, 1999). La proteína OVGP1 detectada en oviducto de coneja tiene un peso molecular de aproximadamente 66 kDa

(Pan *et al.*, 2002), aunque también se han descrito diferentes glicoformas en la OVGP1 de esta especie (Merchan *et al.*, 2007 y en el hámster (McBride *et al.*, 2004c, McBride *et al.*, 2005), además de la existencia de polimorfismos (Paquette *et al.*, 1995, Merchan *et al.*, 2007).

3.5.2. Secuencia de OVGP1

La secuencia de aminoácidos de OVGP1 muestra una diferente longitud cuando se estudia en las diferentes especies (Aviles *et al.*, 2010) siendo de menor longitud en el ornitorrinco y de mayor longitud en la ratona. El marco abierto de lectura del ADN del gen *MUC9* codifica para una pre-proteína con un péptido señal de unos 11-21 aminoácidos y una proteína de entre 527 y 721 aminoácidos, según la especie. La secuencia codificante de OVGP1 está contenida en 11 exones, con la secuencia señal localizada en los exones 2 y 3 y el péptido maduro entre los exones 3 y 11 (Buhi, 2002).

La predicción del peso molecular para OVGP1 es de entre 58.5 y 76.5 kDa, que es considerablemente menor al calculado con las proteínas glicosiladas reducidas y desnaturalizadas (Buhi, 2002). Todavía no se ha esclarecido el significado biológico de estas diferencias en la secuencia de OVGP1 entre especies. Cuando se realiza un estudio comparativo de las secuencias se observa que es una proteína altamente conservada, mostrando un 70-78 % de identidad y un 76-87 % de similitud entre especies (Buhi, 2002). No toda la secuencia de la proteína ha sido conservada durante la evolución de igual manera, ya que existe un alto grado de conservación en la región amino terminal de la proteína, siendo muy variable el extremo carboxilo terminal (Verhage *et al.*, 1997a, Aviles *et al.*, 2010). La región N-terminal del polipéptido maduro OVGP1 presenta un alto grado de identidad (77-84 %) y similitud (86-90 %) entre especies. Sin embargo, la región C-terminal de OVGP1 presenta una baja identidad (37-63 %) y similitud (50-75 %) (Buhi, 2002), poseyendo numerosas inserciones/delecciones en su secuencia. Las principales diferencias en la secuencia se encuentran localizadas en la región carboxilo terminal de la proteína, en el exón 11 del gen *muc9* (Verhage *et al.*, 1997a). Además, las posibles O-glicosilaciones están principalmente localizadas en esta región carboxilo terminal.

OVGP1 contiene secuencias repetidas en tándem del tipo mucina. La proteína humana contiene en las últimas 510 pares de bases de la región C-terminal tres

repeticiones en tándem de 45 pares de bases cada una seguidas de dos repeticiones parciales, que codifican una unidad peptídica de repetición de 15 aa compuesto aproximadamente por un 20% treonina, un 7% de serina y un 11% de prolina (Arias *et al.*, 1994). OVGP1 de hámster también posee seis repeticiones de quince aminoácidos cada una, que contienen numerosas serinas o treoninas y que poseen una secuencia consenso de N-glicosilación en cinco de ellas (Paquette *et al.*, 1995). En OVGP1 de ratón aparecen 21 repeticiones de siete aminoácidos (Sendai *et al.*, 1995). En babuino y en las especies bovina, ovina y porcina contienen repeticiones incompletas o no en tándem (Donnelly *et al.*, 1991, Malette *et al.*, 1995). Las repeticiones en tándem son una característica de las mucinas y es en esa región de repeticiones donde suelen estar presentes todas las O-glicosilaciones de estas proteínas, normalmente organizadas en un único exón. Teniendo en cuenta esta información, podríamos decir que las proteínas OVGP1 de ratón y hámster están más relacionadas con otras mucinas que las OVGP1 de otras especies (Buhi, 2002).

La secuencia de OVGP1 muestra la presencia de un péptido señal, un sitio de corte por nardilisina y distintas modificaciones post-traduccionales involucradas en la ruta secretora (Buhi, 2002), que cuadran con lo descrito en estudios de microscopía electrónica en hámster (Abe *et al.*, 1991), en cerdo (Buhi *et al.*, 1993), babuino (Verhage *et al.*, 1990), humano (Rapisarda *et al.*, 1993), macaco (Kadam *et al.*, 2007) y otras especies (Bhatt *et al.*, 2004), que muestran la proteína presente en gránulos de secreción.

También podría estar esta proteína involucrada en endocitosis, ya que posee una caja de clatrina (Kadam *et al.*, 2007). Se ha demostrado que OVGP1 es endocitada por blastocistos en desarrollo y se ha hipotetizado con la posibilidad de que sufra degradación a través de la vía de la ubiquitina (Kan *et al.*, 1993).

Además, el análisis *in silico* de la secuencia ha revelado la presencia de un dominio Class III de unión a PDZ en OVGP1 humana, de babuino, macaco y porcina, sugiriendo que OVGP1 es un componente de un complejo multiproteico o de estructuras de adhesión focal como las uniones estrechas presentes en las células epiteliales (Kadam *et al.*, 2007). Se ha inmunolocalizado OVGP1 en las uniones estrechas y en los gránulos secretores de las células epiteliales oviductales en el macaco (Kadam *et al.*, 2007). La presencia de esta secuencia, junto con modificaciones post-

traduccionales, sugieren que OVGP1 puede tener una función en comunicación celular, morfogénesis y desarrollo (Kadam *et al.*, 2007).

En la secuencia nucleotídica de OVGP1 humana se ha identificado una caja TATA en la región que flanquea el extremo 5', mientras que las proteínas de hámster y ratón perdieron las típicas cajas TATA, CAAT y CG y se han identificado secuencias nucleotídicas atípicas en ambas especies. También se ha identificado un elemento de respuesta a estrógenos imperfecto (ERE) en hámster y ratón. Mediante experimentos de transfección en células MCF-7 utilizando varias secciones de la región que flanquea el extremo 5', demostraron que la actividad promotora de sensibilidad a estrógenos reside en esta región (Buhi, 2002).

Algunos estudios han demostrado que OVGP1 de coneja (Oliphant *et al.*, 1984), de cerda (Buhi *et al.*, 1990) y de hámster (Malette *et al.*, 1993) son modificadas por la adición de sulfato inorgánico. Aunque se ha sugerido la existencia de sitios de fosforilación en todas las especies, sólo OVGP1 de cerda se ha mostrado fosforilada (Buhi *et al.*, 1991).

Las modificaciones post-traduccionales que sufre OVGP1 podrían proporcionar propiedades biológicas específicas (Sato *et al.*, 1995) y esas modificaciones podrían influenciar las interacciones proteína-proteína o célula-proteína con la membrana de espermatozoides, ZP y membrana plasmática de los ovocitos o de las blastómeras de embriones tempranos. Estas modificaciones post-traduccionales (adición heterogénea de residuos de ácido siálico, otros carbohidratos, sulfataciones o fosforilaciones) también podrían ser responsables de las diferentes isoformas de OVGP1 que aparecen en la mayoría de especies (Buhi, 2002).

3.5.3. Regiones de OVGP1

La comparación de la secuencia aminoacídica de OVGP1 de varios mamíferos revela cinco regiones diferentes (Aviles *et al.*, 2010) (**Fig. 5**).

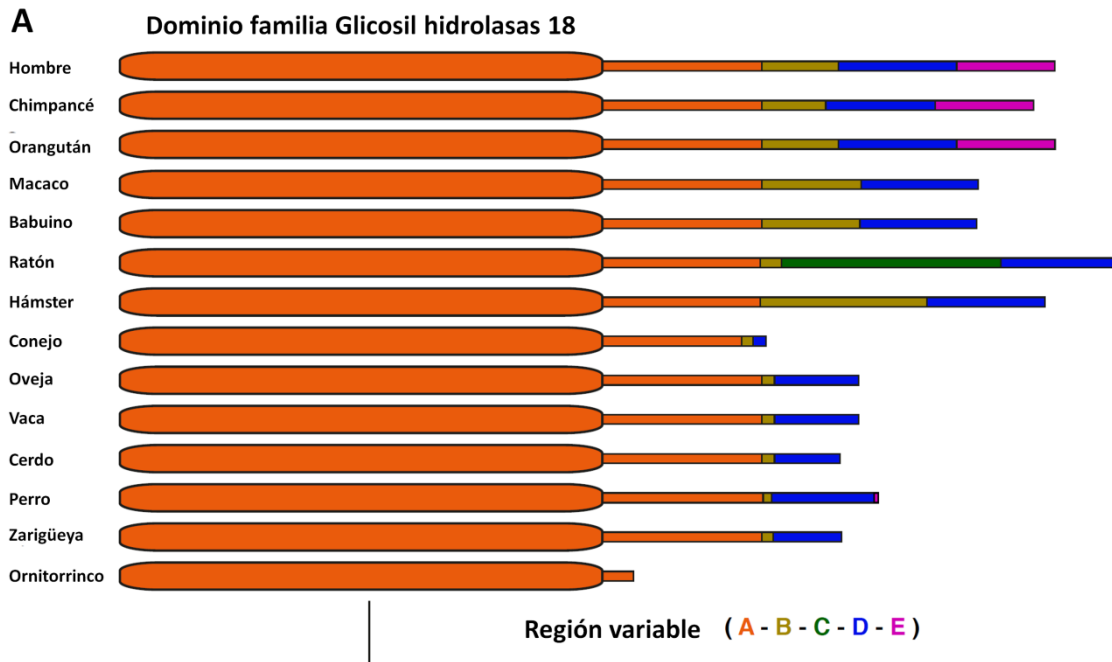


Figura 5. Representación esquemática de las regiones de OVGP1 en diferentes especies de mamíferos. A: Regiones (A, B, C, D y E) presentes en la proteína OVGP1 de diferentes especies. **B:** Se muestra la secuencia aminoacídica correspondiente a cada una de estas regiones en las diferentes especies (Aviles *et al.*, 2010).

La región **A** y **D** están conservadas en los diferentes mamíferos. La región **A**, que se corresponde con la región N-terminal, posee un alto grado de identidad en monotremas, marsupiales y placentarios. En esta región está presente una secuencia con alta similitud a quitinasa, aunque no presenta actividad catalítica (DeSouza *et al.*, 1995, Desouza *et al.*, 1995, Jaffe *et al.*, 1996). La región **B** muestra una baja identidad entre las especies y contiene múltiples inserciones/delecciones. La región **C** es una inserción presente sólo en el género *Mus* y la región **E** es típica de humano, chimpancé y orangután (Aviles *et al.*, 2010). Todas las proteínas OVGP1 de mamíferos poseen la región A arquetípica del dominio quitinasa en la región N-terminal, pero difieren en la longitud del core y en la presencia/ausencia de las otras regiones del extremo C-terminal de OVGP1. La divergencia de OVGP1 entre las diferentes especies de mamíferos podría haber estado promovida por una selección Darwiniana positiva (Swanson *et al.*, 2001).

OVGP1 bovina, ovina y porcina son bastante similares en cuanto a la secuencia y longitud aminoacídica, mientras que OVGP1 humana, de babuino y mono rhesus también son muy similares entre ellas (**tabla 2**).

Tabla 2. Porcentaje de identidades comunes existente entre la proteína OVGP1 de diferentes especies de mamíferos. Secuencias comparadas en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Mondéjar Corbalán, 2012).

OVGP1	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

Diferencias en las repeticiones en tándem, la presencia y distribución de modificaciones post-traduccionales y la longitud de la región carboxilo terminal podrían conferir la especie-especificidad a OVGP1, mediada por eventos de reconocimiento específico y regulando la actividad biológica de la proteína (Buhi, 2002).

Los análisis *in silico* no evidencian la contribución de cada región en la actividad de la proteína, e incluso más importante, la relación entre la presencia/ausencia de las regiones del extremo C-terminal y su papel especie-específico. Existe un único trabajo donde se indica que la región carboxilo terminal de la proteína parece ser la responsable de la superación del bloqueo que se produce en el embrión en estadio de 2 células en el ratón (Yong *et al.*, 2002). Debido a la falta de información en este aspecto, en el desarrollo de esta tesis doctoral se ha explorado molecular y fisiológicamente el papel de proteínas OVGP1s de diferentes especies y el de la región C-terminal de OVGP1 en fecundación.

3.5.4. Secreción de OVGP1

OVGP1 es una proteína sintetizada y secretada por las células secretoras no ciliadas del epitelio oviductal (**Fig.6**). Se ha detectado el ARNm de OVGP1 en compartimentos perinucleares basales y en el citoplasma apical de las células secretoras del epitelio oviductal (Murray *et al.*, 1995) mientras que la proteína ha sido detectada en el retículo endoplasmático rugoso, en el aparato de Golgi y en los gránulos de secreción de dichas células (Boice *et al.*, 1990a, Bhatt *et al.*, 2004, McBride *et al.*, 2004b), estando presente a lo largo de todo el oviducto. También se ha detectado OVGP1 en los gránulos de secreción en hámster (Kan *et al.*, 1988, Abe *et al.*, 1991), cerdo (Buhi *et al.*, 1993), babuino (Verhage *et al.*, 1990), especie humana (Rapisarda *et al.*, 1993), ratón (Kapur *et al.*, 1988), conejo (Oliphant *et al.*, 1984) y vaca (Boice *et al.*, 1990a).

Aunque de manera general se produzca la secreción de esta proteína a lo largo de todo el oviducto, existen ciertas excepciones. En ratón y la oveja no se ha encontrado OVGP1 en la zona del istmo (Kapur *et al.*, 1988, Gandolfi *et al.*, 1991, Desouza *et al.*, 1995, Sendai *et al.*, 1995), mientras que en vaca, oveja, cerda y ratona se ha inmunolocalizado en el infundíbulo (Buhi, 2002). En cerda, la producción de OVGP1 es mayor en la ampolla oviductal, luego en el infundíbulo y por último en el istmo (Buhi

et al., 1990). De manera similar, en oveja la biosíntesis de OVGP1 por la ampolla es significativamente mayor que por el istmo (Buhi *et al.*, 1991).

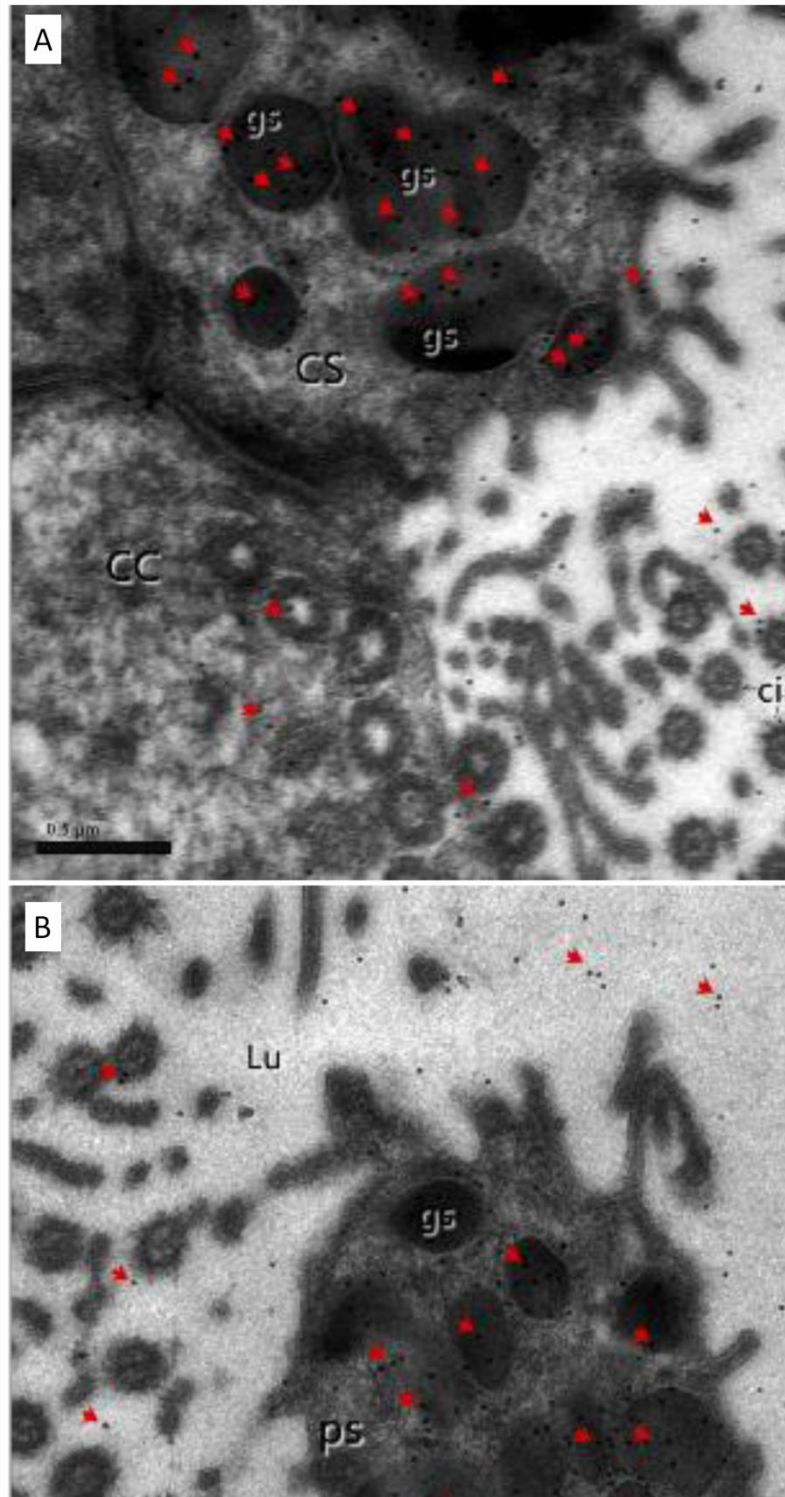


Figura 6. Microscopía electrónica de transmisión de inmunocitoquímica de oviducto bovino realizada con anti-OVGP1. Se observan células epiteliales de la región ampular del oviducto (40000x). Aparecen células ciliadas (CC), células secretoras (CS), el lumen (Lu) y cilios (Ci). A. Se observa marcaje (fechas rojas) en los gránulos de secreción (gr) y en el lumen del oviducto. B. Se observa el polo secretor (ps) de un CS en corte transversal. También aparece marcaje localizado en gs y Lu. (Acuña Meléndez, 2015).

OVGP1 es una proteína estrógeno dependiente en la mayoría de las especies. La expresión de ARNm y secreción de OVGP1 dependen del momento del ciclo estral o menstrual, es decir, del nivel de estrógenos en sangre en la mujer, babuina, cerda, vaca, oveja y perra (Gandolfi *et al.*, 1989, Arias *et al.*, 1994, Desouza *et al.*, 1995, Nancarrow *et al.*, 1995, Buhi *et al.*, 1996, Verhage *et al.*, 1997b, Buhi *et al.*, 2000, Lok *et al.*, 2002, Saint-Dizier *et al.*, 2014). El ARNm de OVGP1 en tejido oviductal se incrementa hasta un valor máximo durante la fase folicular tardía en la mujer (Arias *et al.*, 1994), en los días 0-2 del estro en cerda (Buhi *et al.*, 1996) y en estro y día 1 después de la fecundación en oveja (Desouza *et al.*, 1995). También se ha detectado una sobreexpresión del gen en oveja y vaca durante la fase estral (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Durante este periodo de máxima transcripción del gen *OVGP1* en tejido oviductal, también aumenta el número de gránulos secretores apicales que contienen OVGP1 en el epitelio oviductal y la cantidad de OVGP1 en el FO (Buhi, 2002). Durante el diestro o la fase luteal en la mujer, la oveja y la cerda (Verhage *et al.*, 1988b, Buhi *et al.*, 1991, Arias *et al.*, 1994, Desouza *et al.*, 1995, Buhi *et al.*, 1996) y después de una ovariectomía más tratamiento o no con progesterona en babuino (Verhage *et al.*, 1990), los niveles de ARNm y de OVGP1 poseen una expresión muy débil siendo prácticamente indetectables. Por el contrario, no se observan diferencias en la expresión de ARNm durante el ciclo estral en hámster y coneja (Paquette *et al.*, 1995, Merchan *et al.*, 2007). En contraposición a lo descrito por Paquette y colaboradores, Komiya y colaboradores si observaron que el ARNm correspondiente a OVGP1 se alteraba entre las etapas del estro y diestro pero sólo en la ampolla oviductal, no en el istmo, además de que siempre existía un nivel basal del transcrito tanto en la ampolla como en el istmo (Komiya *et al.*, 1996). De acuerdo a estos resultados, Roux y Kan mostraron por medio de un análisis cuantitativo que existía un máximo de OVGP1 en los gránulos secretores de las células secretoras epiteliales en el estro, mostrándose un mínimo de señal en

diestro en hámster (Roux *et al.*, 1995). Estas evidencias nos hacen pensar que la regulación de la expresión de OVGP1 parece mostrar una respuesta diferente en especies con un ciclo estral largo de las que poseen un ciclo estral corto, como los roedores. Los tratamientos con análogos de GnRH descendieron el nivel de estrógenos y el de ARNm de OVGP1, mientras que la administración posterior de estrógenos estimuló la expresión del mismo (Komiya *et al.*, 1996). Estos investigadores sugirieron que un aumento en los niveles de estradiol/progesterona en sangre podría afectar la expresión génica de OVGP1 en la ampolla, sin embargo, un nivel alto de estrógenos no induciría una expresión rápida del gen, pero un nivel adecuado durante un periodo largo de tiempo sería importante para su expresión (Komiya *et al.*, 1996). Por otro lado, se observó que la administración de estrógenos a hembras de hámster prepúberes indujo la expresión de OVGP1 (Abe *et al.*, 1998).

Aunque estos estudios apoyan la hipótesis de que la inducción y regulación de OVGP1 es dependiente de estrógenos, varios laboratorios han demostrado que existen receptores de LH funcionales en el oviducto humano, porcino y bovino. La presencia y abundancia de estos receptores depende del estado hormonal y podría afectar a la función oviductal (Shemesh, 2001). Se sugirió que LH podría tener un efecto directo sobre la expresión de OVGP1, ya que el tratamiento de epitelio oviductal bovino *in vitro* con hCG incrementaba la vida media del ARNm de OVGP1 (Sun *et al.*, 1997).

3.5.5. El papel de OVGP1 en la fecundación

Algunos de los procesos reproductivos más importantes tienen lugar en el oviducto, en contacto con el FO. OVGP1 ha sido detectada como la proteína específica mayoritaria de dicho fluido, por lo que su función será clave para alcanzar las condiciones óptimas en dicho proceso. A continuación nos centraremos en las funciones descritas de esta proteína específica del oviducto en relación al gameto femenino, al gameto masculino y al embrión.

3.5.5.1. Gameto masculino

OVGP1 está implicada en la movilidad, viabilidad, capacitación y RA del espermatozoide. OVGP1 ha sido detectada unida a la membrana de espermatozoides

(McNutt *et al.*, 1992, King *et al.*, 1994a, King *et al.*, 1994b, Kan *et al.*, 2006, Lyng *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2015) y a la región acrosomal antes y después de la capacitación (Boatman *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios con espermatozoides humanos, no mostraron que se produzca esta unión homóloga (OdayBowman *et al.*, 1996). El hecho de que OVGP1 se una a espermatozoides podría indicar un posible efecto de la proteína sobre la actividad espermática. Además, tanto en las especies en las que se ha detectado esta unión como en las que no, se ha visto efecto en el tratamiento con OVGP1. OVGP1 incrementa la unión espermatozoide-ovocito (Yang *et al.*, 2015) y las tasas de penetración en hámster (Boatman *et al.*, 1995), además de incrementar la unión de espermatozoides a hemizonas en la especie humana y gato (OdayBowman *et al.*, 1996, Hribal *et al.*, 2014a).

También produce mejoras, dependientes de la dosis, en la viabilidad y en la motilidad espermática en la especie bovina y porcina (Abe *et al.*, 1995c, Satoh *et al.*, 1995, McCauley *et al.*, 2001) y estimula la capacitación en hámster y cerdo (McCauley *et al.*, 2003, Killian, 2004, Kan *et al.*, 2006), la RA en hámster (Yang *et al.*, 2015) y la capacidad fecundante en toro (King *et al.*, 1994a).

Asimismo, se observaron diferencias en estudios realizados en la especie bovina en los que se realizó un tratamiento previo de los espermatozoides con OVGP1 antes de la FIV, observándose un incremento en las tasas de capacitación y fecundación en un estudio (King *et al.*, 1994a), mientras que en otro no se encontró diferencias en las tasas de fecundación comparando con el control (Martus *et al.*, 1998). En espermatozoides porcinos tratados con concentraciones de OVGP1 menores que en los trabajos anteriores, se observó un descenso en la unión de espermatozoides a la ZP y en la tasa de penetración polispermica *in vitro* (McCauley *et al.*, 2001, McCauley *et al.*, 2003). Todas estas diferencias podrían deberse a los distintos diseños experimentales, pureza y concentración de OVGP1 y concentración espermática utilizada.

Además, se ha descrito que la proteína OVGP1 produce un efecto sobre la fosforilación de tirosina en el espermatozoide. La adición de OVGP1 de hámster en el medio de capacitación espermática incrementa la fosforilación de tirosina de dos proteínas espermáticas de aproximadamente 75 y 83 kDa y este aumento era dependiente del tiempo en que los espermatozoides estaban en el medio de capacitación (Yang *et al.*, 2015).

3.5.5.2. Gameto femenino

Existe una asociación de OVGP1 con el gameto femenino que se ve reflejada en la unión de la proteína a la ZP de ovocitos y embriones, tanto de manera homóloga (OVGP1 de una especie se une a la ZP de ovocitos de la misma especie) como heteróloga (OVGP1 de una especie se une a la ZP de ovocitos de otra especie distinta), como mostramos en la **tabla 3**. Se ha detectado OVGP1 en partículas filamentosas de la ZP y la membrana de blastómeras en cerdo y oveja (Gandolfi *et al.*, 1991, Buhi *et al.*, 1993) y en endosomas, cuerpos multivesiculares y lisosomas secundarios, probablemente destinados a su degradación, en hámster (Kan *et al.*, 1993). También se ha detectado la presencia de OVGP1 en el espacio perivitelino de oveja y ratón (Kapur *et al.*, 1986, Gandolfi *et al.*, 1991). Se ha descrito la endocitosis de OVGP1 por las blastómeras de embriones de babuino (Boice *et al.*, 1990b) y hámster (Kan *et al.*, 1993), lo que es contradictorio con lo descrito en otras especies como el cerdo y la oveja (Gandolfi *et al.*, 1991, Buhi *et al.*, 1993).

Sin embargo, en el ratón sólo se había detectado OVGP1 por medio de microscopía óptica de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión en el espacio perivitelino de ovocitos y embriones y no en la ZP (Kapur *et al.*, 1986, Kapur *et al.*, 1988), hasta que Lyng y Shur detectaron una glicofoma de OVGP1 que se unía a la lectina PNA en el espacio perivitelino y en todo el espesor de la ZP de ovocitos y embriones de ratón utilizando microscopía confocal y un procesamiento de la muestra diferente (Lyng *et al.*, 2009).

Se ha descrito que la asociación de OVGP1 a la ZP de los óvulos es estable y uniforme en todo el espesor de la misma, manteniéndose en embriones hasta el día 7 de desarrollo en la especie bovina (Wegner *et al.*, 1991) y hasta que el blastocisto eclosiona en la especie porcina (Buhi *et al.*, 1993). La asociación entre OVGP1 y ovocitos y embriones es común en todas las especies de mamíferos examinadas y hace pensar que OVGP1 posee una importante función como regulador de la fecundación y desarrollo embrionario. Como OVGP1 en las diferentes especies posee un distinto peso molecular, diferentes isoformas y potencialmente diferentes modificaciones post-traduccionales, es posible que sean diferentes isoformas de la proteína las que se unen a la ZP (Lyng *et al.*, 2009), al espacio perivitelino y a la membrana plásmica del ovocito y las blastómeras. Las diferentes isoformas podrían diferenciarse en la afinidad con las diferentes

estructuras del ovocito y del embrión y por tanto diferenciarse también en su habilidad por regular las funciones biológicas (Buhi, 2002).

Tabla 3. Proteína OVGP1 detectada unida a ZP, ovocitos y embriones de diferentes especies. OVGP1 proviene de ovocitos oviductales (*in vivo*), de ovocitos ováricos incubados con FO o con proteína recombinante o proteína purificada de cultivo de explante de tejido oviductal (*in vitro*).

Especie	OVGP1 origen	Método	Técnica	ZP	Ovocito	Embrión	Referencia
Babuino (<i>Papio anubis</i>)	Babuino	<i>in vivo/in vitro</i>	MO	+	+ (EPV)	2-4cél. + (ZP, EPV)	(Boice <i>et al.</i> , 1990b)
			ME	+	+ (EPV, MP, O)	+ (ZP, EPV, B)	(O'Day-Bowman <i>et al.</i> , 1996) (O'Day-Bowman <i>et al.</i> , 2002)
	Humana	<i>in vitro</i>	MO	+	/	/	(O'DayBowman <i>et al.</i> , 1996)
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	Humana	<i>in vitro</i>	MO	+	/	/	(O'DayBowman <i>et al.</i> , 1996)
	Babuino	<i>in vitro</i> (<i>Hemizonas</i>)	MO	+	/	/	(O'DayBowman <i>et al.</i> , 1996)
	Humana	<i>In vitro</i>	MO	+	+ (EPV)	/	(Reuter <i>et al.</i> , 1994)
Hámster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	Hámster	<i>in vivo/in vitro</i>	MO	+	-	/	(Leveille <i>et al.</i> , 1987)
			ME	+	+ (EPV, MP, VO)	2-8 cél. + (ZP, E, L, CMV)	(Robitaille <i>et al.</i> , 1988) (Malette <i>et al.</i> , 1993)
			WB	+	/	/	(Schmidt <i>et al.</i> , 1997a) (O'Day-Bowman <i>et al.</i> , 2002)

Porcino (<i>Sus scrofa</i>)	Porcina	<i>in vivo/in vitro</i>	MO	+	/	/	(Buhi <i>et al.</i> , 1993)
			ME	+	(EPV,MP,MB)	Día 2-7 + (ZP, EPV, MP)	(Coy <i>et al.</i> , 2008a)
			HPLC	+	/	/	
	Bovina	<i>in vitro</i>	MO	+	/	/	(Lloyd <i>et al.</i> , 2009b)
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Bovina	<i>in vivo/in vitro</i>	MO	+	-	Día 7 + (ZP)	(Wegner <i>et al.</i> , 1991) (Goncalves <i>et al.</i> , 2008b)
Ovino (<i>Ovis aries</i>)	Ovina	<i>In vivo/in vitro</i>	MO/ME/WB	+	+ (EPV)	+ (ZP, EPV, B)	(Gandolfi <i>et al.</i> , 1989, Gandolfi <i>et al.</i> , 1991)
Ratón (<i>Mus musculus</i>)	Ratón	<i>in vivo/in vitro</i>	MO	+/-	+ (EPV)	2 células + (ZP, EPV)	(Lyng <i>et al.</i> , 2009)
			ME	-	+ (EPV)	/	(Kapur <i>et al.</i> , 1985)
			WB	+/-	+/-	/	(Kapur <i>et al.</i> , 1986) (Kapur <i>et al.</i> , 1988)

MO: microscopía óptica, ME: microscopía electrónica, WB: Western-blot, HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, ZP: zona pelúcida, EPV: espacio perivitelino, MP: membrana plasmática, O: ooplasma, VO vesículas del ooplasma, MB: membrana de blastómera, B: blastómera, E: endosomas, L: lisosomas secundarios, CMV: cuerpos multivesiculares.

Coy y colaboradores describieron que la proteína OVGP1 está implicada en el endurecimiento de la ZP, que se vuelve más resistente frente a la digestión de enzimas proteolíticas, previo a la fecundación. Este endurecimiento pre-fecundación parece que mejora los niveles de monospermia obtenidos mediante FIV. Utilizando glicosaminoglicanos como heparina junto con OVGP1 en técnicas de FIV, observaron un relevante incremento de la monospermia en el sistema porcino y bovino, ya que parece que los glicosaminoglicanos estabilizan la unión de OVGP1 a la ZP (Coy *et al.*, 2008a). Un descenso en la concentración de glicosaminoglicanos del FO podría ser el responsable de despegar la proteína OVGP1 unida a la ZP, haciendo que el blastocisto que está bien desarrollado, sea capaz de eclosionar en el momento adecuado gracias a la

falta de resistencia de su ZP a la proteólisis (Kolbe *et al.*, 2005). Además, la secuencia de OVGP1 posee secuencias consenso de unión a heparina (Buhi *et al.*, 1996, Kouba *et al.*, 2000), lo que podría justificar una posible interacción entre ellas. Por el contrario, Tavares y colaboradores observaron que el tratamiento con OVGP1 durante la FIV producía un efecto beneficioso reduciendo la incidencia de polispermia sin descender la tasa de penetración espermática, pero al incorporar heparina al sistema, se reducía la eficiencia de la producción de cigotos monospermicos, ya que se producía un descenso de la tasa de penetración sin tener efecto en la tasa de mosospermia (Batista *et al.*, 2016).

Con frecuencia se ha atribuido el control de la polispermia a un hecho ligado a la reacción cortical del ovocito producida tras la fecundación, al bloqueo a nivel del oolema descrito en invertebrados, pero no muy claro en mamíferos, o a un bloqueo a nivel de membrana mediado por el desprendimiento de Juno del oolema tras la fecundación (Bianchi *et al.*, 2014). Por ello, este efecto de endurecimiento prefecundación de ZP sería el primero atribuido al oviducto (Tienthai *et al.*, 2000, Coy *et al.*, 2008a, Coy *et al.*, 2008b). Mondéjar y colaboradores testaron el efecto homólogo y heterólogo del FO de diferentes especies en el endurecimiento prefecundación de la ZP de ovocitos. Observaron que en cerda, oveja, cabra, vaca, hámster y coneja el FO es responsable del endurecimiento prefecundación de la ZP. La ZP de ovocito de ratón si se endurecía al ser tratado con FO de coneja y cabra. En la especie humana no se producía endurecimiento al tratar ovocitos con sus FO homólogos ni de ninguna de las especies testadas (Mondejar *et al.*, 2013a).

Se ha observado este efecto de endurecimiento prefecundación de la ZP en ovocitos y embriones tratados con FO, con OVGP1 purificada de FO o de cultivo de explantes de tejido oviductal y con la utilización de oviductina recombinante en múltiples trabajos, aunque este efecto endurecedor no se da en todas las especies, como observamos en la **tabla 4**. El FO de coneja es capaz de endurecer la ZP de ovocitos de todas las especies testadas, excepto de la humana (Mondejar *et al.*, 2013a). El FO de cerda endurece todas las ZPs excepto las de ratón, rata, cabra y humana (Broermann *et al.*, 1989, Kim *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1998, Kolbe *et al.*, 2005, Mondejar *et al.*, 2013a, Mondejar *et al.*, 2013b), aunque en un trabajo no se vio efecto de endurecimiento al tratar ovocitos de cerdo con OVGP1 porcina purificada de FO (Kouba *et al.*, 2000). Se observan los mismos resultados con el FO de oveja, excepto

que éste si endurece ZPs de cabra (Wright *et al.*, 1977, Mondejar *et al.*, 2013a, Davachi *et al.*, 2015). El FO de vaca y cabra endurecen las ZPs de todas las especies excepto rata, hámster y humano (Wright *et al.*, 1977, Pradeep *et al.*, 2011, Mondejar *et al.*, 2013a, Mondejar *et al.*, 2013b), aunque Mondéjar no observó diferencias significativas en el endurecimiento de la ZP de ovocitos de cabra al ser tratados con su FO homólogo, comparándolos con el control (Mondejar *et al.*, 2013a). El FO humano fue testado en ovocito humano y de cerda, no obteniéndose en ninguno de los dos un efecto de endurecimiento de ZP (Mondejar *et al.*, 2013a). Por otro lado, el FO de ratón sólo fue testado en su sistema homólogo, obteniendo en el tratamiento una resistencia de la ZP frente a la proteólisis (Wright *et al.*, 1977), lo que entraría en discordancia con lo descrito acerca de que en el ratón la resistencia de ZP a proteasas no se adquiere en el oviducto (Inoue *et al.*, 1974, Coy *et al.*, 2008a), sino que se produce tras la fecundación debido a la reacción cortical (Barros *et al.*, 1971, Ducibella *et al.*, 1990, Vincent *et al.*, 1990).

Tabla 4. Endurecimiento de ZP frente a digestión por proteasas tras incubar ovocitos ováricos con FO, OVGPI recombinante, OVGPI purificada de FO o de cultivo de explante oviductal o tras su paso por el oviducto.

		Fluido oviductal/ OVGPI						
		Coneja	Cerda	Vaca	Oveja	Cabra	Ratón	Humano
Ovocitos	Coneja	+	+	+	+	+		
	Ratón	+	-	+	-	+	+	
	Rata	+	-	-	-	-		
	Hamster	+	+	-	+	-		
	Cerda	+	+/-	+	+	+		-
	Vaca	+	+	+	+	+		
	Oveja	+	+	+	+	+		
	Cabra	+	-	+	+	+/-		
	Humana			-				-
	Humana ZPs	-	-	-	-	-		
		6	1, 3, 4, 5, 6, 7, 9	6, 7, 10	2, 6, 10	6, 8	10	6

1: (Broermann *et al.*, 1989); 2: (Davachi *et al.*, 2015); 3: (Kim *et al.*, 1996); 4: (Kolbe and Holtz, 2005); 5: (Kouba *et al.*, 2000); 6: (Mondejar *et al.*, 2013a); 7: (Mondejar *et al.*, 2013b); 8: (Pradeep *et al.*, 2011); 9: (Wang *et al.*, 1998); 10: (Wright *et al.*, 1977).

En el sistema porcino, el FO recogido unas horas antes o después de la ovulación no endurece la ZP, por lo que es necesario el contacto del ovocito con FO de la etapa

ovulatoria (Coy *et al.*, 2008a). Esto explicaría los altos niveles de polispermia encontrados cuando se produce una inseminación retardada en cerdo (Hunter, 1967).

En otros trabajos también se ha descrito que OVGP mejora la eficiencia de FIV al realizar un tratamiento previo de los gametos con la proteína, reduciendo las tasas de polispermia y mejorando el desarrollo embrionario (King *et al.*, 1994a, Boatman *et al.*, 1995, Hill *et al.*, 1997, Martus *et al.*, 1998, Buhi *et al.*, 2000, Kouba *et al.*, 2000, McCauley *et al.*, 2001, McCauley *et al.*, 2003). Se demostró que la responsable de estos efectos era OVGP1 al introducir en el tratamiento anticuerpos específicos contra OVGP1 y observar que se bloqueaba el efecto biológico observado anteriormente (Martus *et al.*, 1998, Kouba *et al.*, 2000).

Sin embargo, algunos de estos datos muestran también discrepancia entre la actividad de la proteína entre especies. Por ejemplo, el tratamiento previo de ovocitos con OVGP1 en hámster y humano incrementa el número de espermatozoides unidos a ZP (Boatman *et al.*, 1995, OdayBowman *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 2015), pero se observó el efecto contrario en el sistema porcino y bovino (Kouba *et al.*, 2000, Coy *et al.*, 2008a). A pesar de la alta similaridad entre OVGP1 humana y de babuino, OVGP1 de babuino produce descenso de número de espermatozoides humanos unidos a ZP humana (OdayBowman *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha descrito una forma celular de OVGP1 en tejido oviductal, que se encargaría del remodelamiento tisular cíclico (Kadam *et al.*, 2007). Ha sido localizada en tonofilamentos de uniones estrechas en células secretoras y ciliadas en diferenciación del epitelio oviductal, lo que sugiere la existencia de una interacción entre la forma celular de OVGP1 y el citoesqueleto de acto-miosina epitelial (Kadam *et al.*, 2007). OVGP1 ha sido detectada en las uniones estrechas entre blastómeras de embriones en desarrollo (Buhi *et al.*, 1993) y entre células del epitelio oviductal (McBride *et al.*, 2004a) pudiendo tener una función similar la proteína endocitada por los gametos y la forma celular de la misma (Kadam *et al.*, 2007). Además, Kadam y colaboradores sugirieron que OVGP1 se une a ambos gametos a través de la interacción de su extremo conservado N-terminal con la proteína MYH9, una subunidad de la proteína miosina no muscular IIA que está involucrada en morfología celular, polaridad y morfogénesis (Kadam *et al.*, 2006, Kadam *et al.*, 2007).

3.5.5.3. Embriones

OVGP1 también es responsable de mejorar la formación y desarrollo de embriones (McCauley *et al.*, 2003, Aviles *et al.*, 2010). La incubación de ovocitos, espermatozoides y el enriquecimiento del medio de FIV con OVGP1 en el sistema ovino mostró un incremento significativo en la tasa de división y el número de blastocistos obtenidos (Hill *et al.*, 1996a), sin embargo, la adición de OVGP1 durante el cultivo *in vitro* después de la FIV, no mostró efecto en la tasa de división (Hill *et al.*, 1996b). En la especie porcina, el tratamiento pre-FIV y durante la FIV, incrementa el número de ovocitos fecundados que alcanzan el estadio de blastocisto, pero no la tasa de división (Kouba *et al.*, 2000).

En cabra y oveja, aumenta la tasa de división en embriones y la formación de blastocistos al utilizarse OVGP1 durante la maduración, fecundación y cultivo *in vitro* a baja concentración (10 µg/mL), presentando efecto inhibitorio a concentraciones mayores (50 y 100 µg/mL) (Pradeep *et al.*, 2011), por lo que es importante el uso de la dosis óptima de esta proteína para la mejora de los procesos reproductivos realizados *in vitro*. Por otro lado, Hribal y colaboradores observaron que el uso de OVGP1 felina recombinante en FIV en gata, no varía las tasas de división embrionaria ni el número de mórulas y blastocistos obtenidos. Este hecho puede deberse a que la proteína recombinante utilizada por los investigadores no estaba glicosilada, ya que fue producida en un sistema bacteriano. Por el contrario, si se observó efecto de OVGP1 al analizar la expresión de ARNm del gen GJA1, marcador de calidad embrionaria, observándose un incremento significativo de su expresión al utilizar la proteína felina en FIV. Sin embargo no se vio diferencias de expresión en los siguientes genes *OCT4*, *HSP70*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *BAX*, *IGF1R* y *GAPDH* (Hribal *et al.*, 2014a).

También se ha observado efecto en la expresión génica en embriones porcinos. El FO bovino utilizado para incubar ovocitos porcinos antes de la FIV mejora las tasas de división embrionaria y desarrollo de blastocistos. También reduce el ratio de expresión génica del gen pro apoptótico *BAX* aumentando el del gen antiapoptótico *BCL2L1* y aumenta la abundancia de *TFAM*, que interviene en la transcripción/replicación del ADN mitocondrial (Lloyd *et al.*, 2009b).

Un descubrimiento importante fue el realizado por Yong y colaboradores, que describieron la proteína OVGP1 como la responsable de que el embrión de ratón supere

el bloqueo en el desarrollo que se produce en el estadio de dos células (Yong *et al.*, 2002).

Araki y colaboradores mostraron en 2003 que el ratón knock out para OVGP1, es decir, el ratón que no posee el gen *MUC9* y por tanto no expresa la proteína OVGP1, es fértil (Araki *et al.*, 2003). Este hecho no significa que esta proteína sea innecesaria. Se ha descrito que el ratón knockout para la proteína acrosina es fértil (Baba *et al.*, 1994), posiblemente debido a la existencia de otras proteasas que suplen su falta. El oviducto podría expresar otras proteínas de la familia de las quitinasas con una función homóloga a la de OVGP1, compensando la falta de ésta. En la rata (Tian *et al.*, 2009), el oviducto no sintetiza OVGP1, ya que es un pseudogen y posee una fertilidad normal, que podría deberse a la existencia de estas otras proteínas con una función similar a la de OVGP1. En la actualidad nuestro laboratorio está investigando esta hipótesis con el estudio de la proteína Chia.

Todos esos estudios han destacado el importante papel que juega OVGP1 durante los eventos tempranos del proceso reproductivo necesarios para desencadenar una fecundación y desarrollo embrionario temprano normal. Dicha proteína está implicada en el aumento de la penetración espermática, incremento de las tasas de fecundación, disminución de la tasa de polispermia, aumento de la tasa de división embrionaria y del número de embriones que llegan hasta blastocisto, así como en la expresión génica de los mismos. En consecuencia, OVGP1 es un componente idóneo para mejorar la TRA incorporándola en los medios sintéticos utilizados. A pesar de los datos robustos obtenidos sobre la contribución de OVGP1 en la fisiología reproductiva en diferentes especies, todavía no se ha descrito el mecanismo molecular responsable de estas funciones.

Quedan numerosas cuestiones por resolver acerca de esta proteína OVGP1 que ha sido conservada a lo largo de la evolución. Así, se desconoce el modo de actuación de la proteína OVGP1, como se produce su unión a la ZP, qué papel tiene el extremo amino y carboxilo terminal y si la variabilidad en el extremo carboxilo terminal tiene que ver con la especie especificidad. El uso de la tecnología de proteínas recombinantes utilizada durante el desarrollo de esta tesis doctoral nos permitirá obtener cantidades suficientes de estas proteínas expresadas en diferentes líneas celulares, así como, la

posibilidad de truncar la proteína para facilitar el estudio del papel funcional de las diferentes regiones de OVGPI y analizar además el efecto que posee la glicosilación.

IV. Materiales y Métodos



4.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Todos los componentes necesarios para la preparación 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 MilliQ 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 de poro (Millipore corporation, Bedford, Massachussets, EEUU).

4.1.1. Ovarios

4.1.1.1. Obtención

Los ovarios de la especie porcina (*Sus scrofa domestica*) se obtuvieron de hembras prepúberes, híbridas Landrace 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).

4.1.1.2. Transporte

Tras el sacrificio de los animales en matadero, se recogieron los ovarios y se trasladaron al laboratorio de la Universidad de Murcia en 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.

4.1.1.3. Lavado

Una vez en el laboratorio, los ovarios porcinos y bovinos procedentes de matadero se lavaron una vez con una solución al 0´04 % (p/v) de cetrimida (CETAB, H-5882) y dos veces en SSF al 0´9 % de NaCl (p/v) con 100 unidades internacionales (UI) de penicilina (P-3032) y 100 µg/ml de estreptomina (S-9137).

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 (Edelstahl rost Frei, Alemania).

Los ovarios porcinos y bovinos se utilizaron para la obtención de ovocitos.

4.1.2. 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).

4.1.2.1. Especie murina (*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.

Los ovarios de los ratones se obtuvieron tras el sacrificio de los animales en los propios laboratorios del Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, como se describe posteriormente.

Las ratonas se encontraban alojadas en cubetas de metacrilato con rejilla metálica compartidas y mantenidas en una sala con las condiciones ambientales controladas: ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (12 horas de luz-12 horas de oscuridad), a una temperatura de entre 21-23 °C y una humedad relativa de 50-80 %.

Estas hembras fueron sometidas a estimulación folicular para la obtención de ovocitos mediante una primera inyección intraperitoneal de 5 UI de PMSG y 48 horas

más tarde se les suministró una segunda inyección, en este caso de 5 UI de hCG para la inducción de la ovulación.

Los animales se sacrificaron mediante sobredosis de CO₂ 17 horas después de la inyección de hCG.

Se realizó una incisión abdominal procediéndose a la extracción de los ovarios y de los oviductos. Se realizó la disección del oviducto y se obtuvieron los ovocitos ovulados en la ampolla tras digestión con hialuronidasa (1 mg/mL).

4.1.2.2. Especie porcina (*Sus scrofa domestica*)

Los complejos cúmulo-ovocito (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 PBS suplementado con 1 mg/mL de polivinil alcohol (PVA) y 0.005 mg/mL de rojo fenol (RF) (PBS-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 PBS-PVA-RF.

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.

4.1.2.3. Especie bovina (*Bos taurus*)

Una vez lavados los ovarios, se procedió a la extracción de los CCOs de los folículos antrales de tamaños comprendidos entre 2 y 8 mm de diámetro, mediante aspiración con jeringa y aguja de 18 G. Los CCOs de las especies bovina 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 de anexos A1**.

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.

4.1.2.5. Maduración *in vitro* (MIV)

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 % 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 95 % de humedad.

4.1.2.5.1. Especie porcina (*Sus scrofa domestica*)

Los CCOs se lavaron una vez en PBS-PVA-RF y dos veces más en el medio de maduración de ovocitos porcinos o NCSU-37 (Carolina State University solution-37).

Los ovocitos se pusieron a madurar en el medio de maduración NCSU-37 suplementado (**tabla A2**), con 1mM de dibutilil AMP cíclico (dbAMPc, Fluka, 34988), 10 UI/mL de gonadotrofina coriónica equina (PMSG, Sincopart TM, Ceva Salud Animal S.A. Barcelona, España) y 10 UI/mL de gonadotrofina coriónica humana (hCG,

Laboratorios Intervet S.A., Salamanca, España) 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 *et al.*, 1993).

4.1.2.5.2. Especie bovina (*Bos taurus*)

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 A3**, donde los CCOs permanecieron durante 22-24 horas.

4.1.3. Oviductos y fluido oviductal (FO)

Se procedió a la obtención de oviductos de cerda (*Sus scrofa*) y coneja (*Oryctolagus cuniculus*) con el fin de aislar el ARN total del oviducto y poder obtener el ADNc correspondiente a OVGP1 porcina (pOVGP1) y OVGP1 de coneja (rOVGP1) y clonarlo en vectores de expresión para producir dichas proteínas de manera recombinante. Estos oviductos fueron congelados a -80 °C tras el lavado hasta su utilización para la extracción del ARN total.

También se obtuvo el FO de estas especies para poder comparar, utilizando la electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de Western-blot, las proteínas pOVGP1 y rOVGP1 producidas de manera recombinante con las proteínas nativas presentes en sendos FOs.

4.1.3.1. Especie porcina (*Sus scrofa domestica*)

Los oviductos de la especie porcina se obtuvieron de los mismos mataderos mencionados anteriormente para la obtención de los ovarios.

Tras el sacrificio de las cerdas, los oviductos se trasladaron al laboratorio mantenidos en frío. Los oviductos 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.

Una vez aislados los oviductos, algunos se utilizaron para la obtención de FO porcino (FOP) y otros fueron congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para obtener ARN total del oviducto.

4.1.3.2. Coneja (*Oryctolagus cuniculus*)

Los oviductos procedentes de conejas se recogieron tras el sacrificio de los animales en el laboratorio. Una vez aislados, algunos oviductos se utilizaron para la obtención de FO de coneja (FOC) y otros fueron congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para obtener ARN total del oviducto.

4.1.3.3. Obtención de fluido oviductal (FO)

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

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 (Roche®, Mannheim, Alemania) en cantidad que dependió del volumen obtenido (1 μL de solución 10X por cada 10 μL 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se recogió el sobrenadante libre de restos celulares que se distribuyó en cantidades alícuotas y congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de uso.

4.2. Obtención de ARN total de oviducto porcino y de coneja

A partir de 2 oviductos de cerda y 2 de coneja, utilizando RNAqueous[®] phenol free total RNA Isolation kit (Ambion[®], Huntigton, Reino Unido) y siguiendo las recomendaciones del fabricante, obtuvimos ARN total de oviducto porcino y de coneja.

El proceso de manera resumida se describe a continuación. En primer lugar, los tejidos fueron disgregados en una solución de tiocianato de guanidinio; este potente agente caotrópico lisa las células e inactiva las ribonucleasas endógenas. El lisado es después diluido en una solución de etanol y transferido a una columna con una membrana. Las proteínas, ADN y otros contaminantes son eliminados del lisado mediante tres lavados y el ARN unido a la membrana es obtenido en un último paso de eluido.

4.3. Síntesis *in vitro* de ADNc de oviducto porcino y de coneja

La síntesis *in vitro* de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total de oviducto de cerda y coneja se realizó con el kit SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU) según el protocolo descrito por el fabricante.

La cantidad de ARN total de partida osciló entre 1 pg-5 µg. Brevemente, el procedimiento consistió en la desnaturalización del ARN molde, durante 5 min a 65 °C y en presencia de oligonucleótido (dT) y dNTPs (desoxirribonucleótidostrifosfato). La muestra se enfrió durante un minuto en hielo y se añadió el volumen necesario de tampón, DTT (ditiotreitól), RNase OUT (inhibidor de las RNasas), MgCl₂ y enzima retrotranscriptasa (a las concentraciones recomendadas por el fabricante) hasta completar 20 µL. La síntesis de ADNc tuvo lugar a 50 °C durante 50 min, y se terminó incubando las muestras a 85 °C durante 5 min para desnaturalizar la enzima. Para hidrolizar el ARN molde se utilizó RNasa H y se incubó a 37 °C durante 20 min.

4.4. Clonación de las diferentes proteínas OVGP1 y fragmentos

4.4.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.4.1.1. OVGP1 porcina

El ADNc obtenido del oviducto porcino fue utilizado como molde para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el objetivo de amplificar la proteína OVGP1 porcina completa (pOVGP1) (nucleótidos 11-1594), incluyendo el péptido señal (aa 1-21) con dos cebadores diseñados para ello (pOVGP1F, pOVGP1R) (**tabla A4**) cada uno de ellos conteniendo lugares de reconocimiento para las enzimas de restricción *KpnI* y *MunI* respectivamente.

4.4.1.2. OVGP1 porcina truncada

A partir del ADNc obtenido de oviducto porcino también se amplificaron, por medio de PCR, dos extremos N-terminales de pOVGP1: pOVGP1AB (nucleótidos 752-1453) y pOVGP1A (nucleótidos 752-1426) con los cebadores que contenían un sitio de restricción *XhoI* (pOVGP1ABF, pOVGP1ABR, pOVGP1AF, pOVGP1AR). El objetivo era deleccionar el extremo C-terminal de la proteína para estudiar su implicación fisiológica.

4.4.1.3. OVGP1 de coneja

Se utilizó el ADNc obtenido a partir de oviducto de coneja para amplificar la proteína OVGP1 de coneja completa (rOVGP1) (nucleótidos 12-1439), incluyendo el péptido señal (aa 1-21), con los cebadores (rOVGP1F, rOVGP1R) que contenían secuencias reconocidas por las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI*.

4.4.1.4. Fragmentos de OVGP1 porcina

El ADNc obtenido a partir de oviducto porcino fue utilizado como molde para amplificar el extremo C-terminal de pOVGP1: las regiones D y BD. La región D

(mMBP-pOVGP1D) (nucleótidos 1454-1594) y la región BD (mMBP-pOVGP1BD) (nucleótidos 1427-1594) fueron amplificadas utilizando cebadores con sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI* (mMBP-pOVGP1DF, mMBP-pOVGP1DR, mMBP-pOVGP1BDF y mMBP-pOVGP1BDR).

4.4.1.5. Condiciones de amplificación de PCR

Las condiciones empleadas para las amplificaciones por PCR a partir de 2 μ L del ADNc obtenido se describen a continuación. La mezcla de PCR contenía Phusion HP buffer (Thermo Scientific, Rockford, EUA), 200 μ M de mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs), 0.02 U/ μ L Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific Rockford, EUA), 0.5 μ M de los cebadores diseñados en cada caso y H₂O estéril libre de ADNasas y ARNasas hasta completar un volumen final de 50 μ L.

Las amplificaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera. Comenzamos con una desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 segundos. Se repitió cada ciclo de PCR 32 veces y éste constaba de tres pasos: desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, 30 segundo a la TM óptima según el par de cebadores utilizados (**tabla A4**) y una extensión a 72 °C durante unos 20-35 segundos. Se realizó una extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en el termociclador Mastercycler® personal Thermal Cycler (Eppendorf®, Foster City).

4.4.2. Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar el tamaño y la abundancia de los amplicones en cada reacción de PCR, se tomaron 4 μ L de cada reacción, se les añadió tampón de carga 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU) y la mezcla se aplicó en geles de agarosa (Sigma, San Luis, MO, EEUU) de concentración comprendida entre el 1 y el 1.5 %. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de recorrido TAE (Tris Acetate-EDTA buffer, Sigma, Madrid, España) a 100 V, a temperatura ambiente y en soporte horizontal.

El resultado se visualizó mediante tinción del gel en un baño de bromuro de etidio (2 µg/mL).

El resto del volumen conteniendo el producto de la PCR, que se emplearía con fines preparativos, se purificó con el kit DNA Clean and concentrator-5 (Zymo Research, Irvine, CA, EEUU).

4.4.3. Digestión

Las digestiones preparativas con enzimas de restricción previas a la clonación del producto amplificado se realizaron durante 1h a 37 °C empleando el 90 % del volumen de la PCR, con el tampón suministrado por el proveedor y 1 unidad de cada enzima de restricción (endonucleasa) (Fermentas, San Leon-Rot, Alemania). Los vectores de expresión en los cuales se relazarían las clonaciones fueron también digeridos con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso siguiendo el mismo protocolo de digestión.

Los fragmentos de ADN digeridos se purificaron con el kit DNA Clean and concentrator-5 (Zymo Research, Irvine, EUA). Los vectores de expresión digeridos fueron corridos en un gel de agarosa 1 % y purificados del gel con el kit QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (Quiagen, Austin, EUA) según las instrucciones del proveedor.

4.4.4. Ligación

Los productos de PCR correspondientes a pOVGP1 y rOVGP1 fueron ligados en el vector de expresión pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen, Carlsbad, CA) (**Fig. 7**), previamente digerido con *KpnI* y *MunI* (pOVGP1) y *KpnI* y *XhoI* (rOVGP1).

Los productos de PCR correspondientes a las dos regiones C-terminales de pOVGP1 fueron ligados en pcDNA3 (+) (Invitrogen, Carlsbad, CA) (**Fig. 7**), previamente digerido con *HindIII* y *XhoI*. El vector pcDNA 3.1 (+), donde previamente fue clonada pOVGP1, fue digerido con *KpnI* y *HindIII* para escindir la primera región de pOVGP1 (nucleótidos 11-757). Esta primera región de pOVGP1 fue subclonada en pcDNA 3 (+), donde habían sido clonados los dos extremos C-terminales de la proteína.

Las regiones D y BD de pOVGP1 fueron digeridas con *NotI* y *XhoI* y ligadas en el vector de expresión de mamíferos pHLSEC 3 (derivado del vector pHLsec, (Aricescu *et al.*, 2006) aguas abajo y en el mismo marco de lectura que la proteína de unión a maltosa (MBP, maltose binding protein) que contenía el vector, con la finalidad de crear dos proteínas de fusión: D región+MBP (mMBP-pOVGP1D) y BD región+MBP (mMBP-pOVGP1BD). La proteína MBP contiene la secuencia señal que permite que las proteínas sean secretadas y además se ha descrito que estabiliza su estructura sin que afecte a su actividad (Bokhove *et al.*, 2016).

Las ligaciones se realizaron en un volumen final de 20 μ L, con 30 ng de vector y una proporción molar de inserto/vector de 5:1, con 4 μ L del tampón 5X suministrado con la ligasa T4 DNA ligase de Invitrogen (Carlsbad, CA) y 1 unidad de ésta durante 1h a 25 °C. Posteriormente se procedió a inactivar la ligasa a 65 °C durante 10 min.

Para cada ligación se realizó un control de recircularización del vector de expresión empleado, en las mismas condiciones pero sin añadir inserto. Los productos de la ligación fueron purificados con el kit DNA Clean and concentrator-5 (Zymo Research, Irvine, CA) antes de transformar bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa DH5 α F' (Invitrogen, Carlsbad, CA).

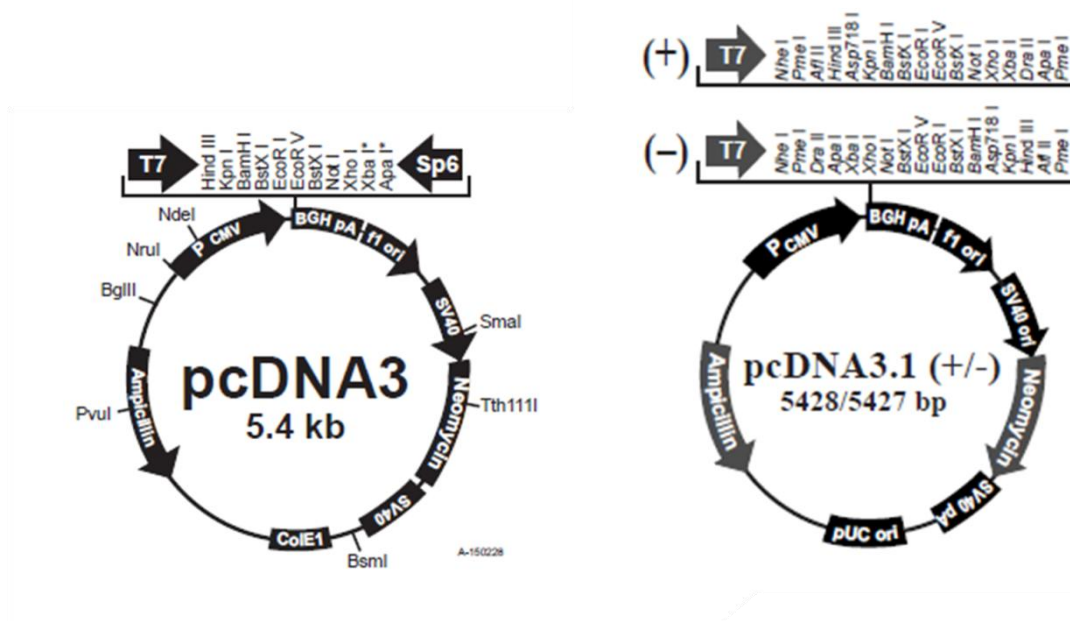


Figura 7. Esquema de los vectores de expresión pcDNA 3 y pcDNA 3.1de Invitrogen.

4.4.5. Transformación de células competentes

Para la transformación usamos las bacterias *E. coli* DH5 α F' (Library Efficiency DH5 α de Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) Para realizar la transformación, a 25 μ L de bacterias se le añadieron 2 μ L (10 ng) de las mezclas de ligación (incluyendo un control de transformación con 1 ng de vector circular). Los tubos se mantuvieron 30 min en hielo y a continuación los tubos se incubaron 45 segundos a 42 °C para provocar un choque térmico, y se enfriaron rápidamente en hielo durante 2 min. Para recuperar las bacterias, se les añadió 500 μ L de medio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y se incubaron 1 h a 37 °C con agitación muy suave.

Tras esta incubación, se sembraron distintas diluciones de las bacterias en placas Petri con LB-agar (Pronadisa, Madrid, España) y ampicilina (A0166 Sigma-Aldrich, Madrid, España) como marcador de selección. Las placas se dejaron crecer toda la noche en un incubador a 37 °C.

Los vectores de expresión utilizados contienen un gen de resistencia a ampicilina, de manera que al crecer las bacterias en un medio con este antibiótico seleccionamos las bacterias que han incorporado el plásmido con el gen de resistencia y el gen de interés.

4.4.6. Selección de recombinantes

Tras el experimento de clonación se seleccionaron varias colonias. Las colonias se inocularon en 4 ml de medio SOB (Pronadisa, Madrid, España) con ampicilina y se crecieron los minicultivos a 37 °C con agitación vigorosa (250-300 rpm) durante 16 horas. A continuación, se aislaron los plásmidos mediante el uso del kit "Gen Elute HP Plasmid Miniprep Kit" (Sigma-Aldrich, Madrid, España) que está basado en el método de lisis alcalina de las bacterias y una posterior purificación del plásmido.

Los plásmidos obtenidos fueron analizados por restricción para elegir los clones positivos y las colonias de interés se conservaron en criotubos a -80 °C en 20 % de glicerol.

4.4.7. Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados o clonados

La identidad de todos los productos clonados fue verificada por secuenciación automática completa de ambas cadenas realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) de la Universidad de Murcia.

4.5. Análisis de la expresión de las proteínas y los fragmentos de OVGPI

4.5.1. Cultivo de células

4.5.1.1. Cultivo de células CHO (Ovario de Hámster Chino)

La línea celular de ovario de hámster chino (CHO) (ECACC, The European Collection of Cell Culture) se cultivará en medio F-12 (Biowest, Nuaille, Francia) suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado al 10 % (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EEUU). 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL estreptomicina. Las células se sembraron en frascos de cultivo (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU) de 75 cm² y con una capacidad para una densidad celular de aproximadamente 16 x 10⁶ células/frasco.

Los frascos con la suspensión celular se cultivaron en un incubador ThermoQuest Inco 2 Memmert (Germany) a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad.

4.5.1.2. Cultivo de células HEK 293T (Embrionarias de Riñón Humano)

Otra de las líneas celulares empleada en este trabajo, fue la línea celular embrionaria de riñón humano, HEK 293T (ECACC, The European Collection of Cell Culture) (proporcionada por el Dr. Luca Jovine de Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia).

El medio de cultivo celular empleado fue DMEM enriquecido con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) y 4 mM de glutamina. El medio DMEM, el SBF, la glutamina y la tripsina fueron suministrados por Gibco BRL-Life Technologies (Gaithersburg, MD, EEUU).

El crecimiento de las células tuvo lugar en un incubador ThermoQuest Inco 2 Memmert (Germany) a 37 °C, en una atmósfera con 95 % de humedad y con un 5 % de CO₂. Los cultivos celulares se realizaron en distintos tipos de frascos o placas dependiendo del experimento.

4.5.2. Expresión de proteínas recombinantes

4.5.2.1. Expresión de las proteínas pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 en células HEK 293T

Se procedió a expresar las proteínas OVGP1 porcina completa (pOVGP1) y truncada en su región D (pOVGP1AB) y la proteína OVGP1 de coneja (rOVGP1) en la línea celular HEK 293T (derivadas de células embrionarias de riñón humano) en la cual se realizaron transfecciones transitorias con polietilenimina (PEI) (Polyethylenimine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

Las células fueron crecidas utilizando Corning® Roller Bottles (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), dónde las células crecen adheridas a las paredes del frasco, el cual se encuentra en constante movimiento, bañadas por medio de cultivo. Durante las primeras 24 h, las células son crecidas a una velocidad de rotación de 0.3 rpm y las siguientes 24-48 h a 0.5-0.6 rpm. Las células fueron crecidas durante 48-72 horas hasta alcanzar el 80-90 % de confluencia en medio DMEM suplementado a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad relativa. En ese momento se realizó la transfección transitoria de las células con los vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes para pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1.

Para ello, se diluyó 0,5 mg del vector de expresión en 50 mL de medio DMEM (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EEUU) libre de suero suplementado con 4 mM de glutamina. A la mezcla se le añade 1 mg de PEI. Se mezcla bien y se incuba 10 min a temperatura ambiente. Se cambia el medio a las células crecidas en los Corning® Roller Bottles y se les añade 200 mL de medio DMEM libre

de suero con 4 mM de glutamina y los 50 mL de la mezcla que contiene el vector de expresión y PEI. Se dejaron crecer las células con una velocidad de rotación de 0.9-1 rpm hasta las 72-94 h, cuando la concentración de glucosa del medio era limitante para el óptimo crecimiento celular (menor de 10 mM/L). Se procedió a recoger el medio donde las células habrían secretado las proteínas.

4.5.2.1.1 Purificación de las proteínas pOVGPI, pOVGPIAB y rOVGPI expresadas en células HEK 293T

72 horas después de la transfección se recogió el medio de crecimiento celular, se centrifugó a 5000 $\times g$ a 4 °C durante 20 min en una centrífuga Avanti-J25 (Beckman coulter, Brea, CA, EEUU) y se filtró utilizando filtros de 1.2, 0.8 y 0.2 μm de tamaño de poro (Supor® Membrane Disc Filters. Pall Life Sciences, Medicon Village AB, Suecia). Con el resultante de la filtración se procedió a realizar una cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) utilizando bolas de níquel, ya que las proteínas recombinantes llevan fusionado un “tag” o etiqueta de poli-histidina formado por seis residuos de histidinas, en el extremo carboxilo terminal.

El medio de crecimiento celular filtrado fue incubado durante toda la noche con las bolas de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden, Alemania) a 4 °C y 10 mM imidazol, 20 mM HEPES y 150 mM NaCl a pH 7,8.

Al día siguiente, las bolas de níquel fueron lavadas con tampón de lavado (10 mM imidazol, 20 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7,8 filtrado con filtro de 0.2 μm de tamaño de poro) tres veces y eluidas en 500 mM imidazol, 20 mM HEPES, 150 mM NaCl a pH 7,8. Se concentró el eluido utilizando filtros de centrífuga con membranas de corte de peso molecular de 30 kDa y volumen máximo de 5 mL (Millipore Corporation, Darmstadt, Alemania) centrifugando a 4000 $\times g$ y 4 °C en una centrífuga Labofuge 400R (Heraeus, Alemania). Mediante diálisis se realizó un intercambio de tampones, obteniendo la proteína en 150 mM Tris HCl, 200 mM NaCl y 10 % glicerol. Tras medir la concentración total de proteínas de las muestras, éstas fueron sometidas a una congelación rápida en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C a la espera de ser utilizadas en estudios fisiológicos para determinar la función y mecanismo de acción de las mismas.

4.5.2.1.2 Medida de la concentración de proteína

Para calcular la concentración de proteína total de las muestras purificadas nos basamos en la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el ultravioleta (UV). Las bandas de absorción de proteínas más significativas se encuentran en el intervalo de longitud de onda entre 230 y 300 nm. En este rango absorben las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos (el triptófano y la tirosina, y en menor grado la fenilalanina), la histidina y la cistina. Los aminoácidos aromáticos absorben en 260-290 nm. La tirosina presenta un máximo a 275 nm con un hombro a 285 nm. El triptófano agrupa al menos tres bandas diferentes bajo el espectro centrado a 280 nm. También presenta bandas en la zona del UV lejano.

La cistina está formada por la unión por medio de un puente disulfuro de dos cisteínas. Presenta una banda centrada a 250 nm, pero apenas se puede considerar, ya que es muy débil y el porcentaje relativo de puentes disulfuro es muy pequeño en una proteína.

Aplicamos la Ley de Lambert-Beer que relaciona la intensidad de luz entrante en un medio con la intensidad saliente después de que en dicho medio se produzca absorción. Esta ley establece que la absorbancia está directamente relacionada con las propiedades intrínsecas del analito, con su concentración y con la longitud de la trayectoria del haz de radiación al atravesar la muestra.

La expresión matemática simplificada de la ley de Lambert-Beer es:

$$A = C \cdot \epsilon \cdot L$$

donde:

A = Absorbancia de la muestra

C = Concentración del cromóforo

L = Longitud del paso óptico que contiene la muestra

ϵ = Coeficiente de extinción molar. Es una medida de la cantidad de luz absorbida por unidad de concentración. Depende del cromóforo en sí mismo, de la λ y de las condiciones de medida (pH, T...). La unidad de medida es $\text{concentración}^{-1} \text{ longitud}^{-1}$.

Para determinar la absorbancia de la muestra a 280 nm se utilizó un lector de microplata y software Tecan i-control (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)

El coeficiente de extinción molar (ϵ) de cada proteína se calculó utilizando el recurso informático “EXPASy ProtParam tool” (<http://web.expasy.org/protparam/>).

4.5.2.2. Expresión de proteínas y fragmentos de OVGP1 en células CHO

pOVGP1, rOVGP1, pOVGP1AB, pOVGP1A y los fragmentos mMBP-pOVGP1D y mMBP-pOVGP1BD de pOVGP1 fueron expresados en la línea celular CHO. Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo usando el reactivo X-tremeGene HP (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EEUU) siguiendo el protocolo del fabricante.

Las células CHO fueron crecidas en placas de seis pocillos durante 24 horas (37 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad) hasta alcanzar una confluencia de 70-80 % en medio F-12 suplementado. Para realizar la transfección se utilizó medio Opti-MEM reduced-serum medium (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EEUU).

El ADN (2 µg/pocillo) y el producto de transfección (4 µL/pocillo) se diluyen en un volumen final de 200 µL de medio Opti-MEM sin suero y se incuban durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se añaden los 200 µL de la mezcla anterior a cada pocillo que contiene 1800 µL de medio Opti-MEM. No se añaden antibióticos durante la transfección, ya que pueden provocar la muerte de las células. Transcurridas 6 horas, el medio de las células es sustituido por Opti-MEM sin suero ni antibióticos. El medio secretado por las células fue recogido a las 48-72 horas, fue centrifugado a 280 *xg* durante 10 min a 4 °C en una centrífuga Labofuge 400R (Heraeus, Alemania), para retirar los restos celulares y las células muertas. Posteriormente, se concentró 100X utilizando filtros de centrífuga con membranas de corte de peso molecular de 10 y 30 kDa y volumen máximo de 5 mL (Millipore Corporation, Millipore, Darmstadt, Alemania) centrifugando a 4000 *xg* y 4 °C. Al sobrenadante del cultivo celular concentrado se le hizo un intercambio de buffers, obteniendo las proteínas en 150 mM Tris HCl, 200 mM NaCl y 10 % glicerol. La muestra se alicuotó y congeló a -20 °C hasta su utilización.

4.5.2.2.1. Creación de líneas celulares CHO transfectadas de manera estable

Las células CHO transfectadas de manera transitoria con pOVGP1, rOVGP1, pOVGP1AB y pOVGP1A utilizando el reactivo X-tremeGene HP, fueron levantadas de la placa de 6 pocillos y traspasadas a placas Biolite 100 mm tissue culture dish (Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU) donde se crecieron en medio F-12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado al 10 % (Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD, EEUU), 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL estreptomycin. Al medio de cultivo se le añadió geneticina (Geneticin®, G-418 Sulfate, Gibco BRL-Life Technologies, Gaithersburg, MD) a una concentración final de 200 µg/mL como agente de selección. Los vectores pcDNA 3 y pcDNA 3.1 poseen un gen de resistencia a geneticina responsable de que las células transfectadas que hayan incorporado el vector transfectado en su ADN genómico sean inmunes a la acción de la geneticina y sobrevivan. Las demás células morirán.

Las células fueron crecidas en las placas cambiándoles el medio, siempre conteniendo geneticina, cada 48 horas hasta que se apreciaron colonias individualizadas. 10 colonias de cada transfección fueron picadas y crecidas de manera independiente, en pocillos de placas de 24 pocillos.

El medio de crecimiento de cada uno de los pocillos fue analizado por medio de electroforesis en SDS-PAGE y Western-blot para seleccionar las colonias que, teniendo un crecimiento adecuado, secretaban más cantidad de proteína. Estas colonias seleccionadas fueron congeladas en SBF y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% hasta su uso para expresar las proteínas pOVGP1, rOVGP1, pOVGP1AB y pOVGP1A.

4.6. Caracterización bioquímica de las glicoproteínas recombinantes: pOVGP1, rOVGP1, pOVGP1AB, pOVGP1A y los fragmentos mMBP-pOVGP1D y mMBP-pOVGP1BD de pOVGP1.

Para determinar la presencia y el peso molecular de las proteínas recombinantes expresadas tanto en células CHO como en HEK, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), transferencia a membrana e inmunodetección de las mismas mediante anticuerpos (Western-blot).

4.6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Las electroforesis se realizaron con el sistema XCell SureLock® Mini-cell (Invitrogen™. Carlsbad, CA, EEUU). Los geles utilizados eran del 4-12 % de poliacrilamida NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris de 1mm (Novex®. Carlsbad, CA, EEUU). Las muestras fueron preparadas en el tampón de carga para electroforesis SDS Sample Buffer (4X) (Novagen®. Madison, EUA). Posteriormente fueron incubadas en un termobloque a 95 °C durante 10 min para su desnaturalización. En la cubeta de electroforesis se colocaron los geles y el tampón de recorrido (**tabla A5**). Las muestras fueron cargadas en los geles junto al marcador de proteínas estándar Precision Plus Protein™ (Bio-rad. Hercules, CA, EEUU). Las condiciones de la electroforesis fueron 150 V durante 60-90 min.

En este punto, algunos geles fueron utilizados para transferir las proteínas a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P (Millipore. Billerica, EUA) y continuar con un Western-blot y otros fueron teñidos con azul coomasie.

4.6.2. Tinción con azul de coomasie

Tras el SDS-PAGE, los geles fueron sumergidos en una tinción que contenía azul de coomasie (PageBlue Protein Stainig, Thermo Scientific. Rockford, IL, EEUU) durante 1h a temperatura ambiente y agitación. Tras la incubación, se procedió a lavar los geles en agua ultrapura durante 2h a temperatura ambiente y agitación, cambiando el agua siempre que fuera necesario, para la identificación no específica de proteínas totales de la muestra.

4.6.3. Western-blot

4.6.3.1. Transferencia a membrana

La transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida a membrana de PVDF (Millipore, Billerica, EUA) se realizó en un sistema de transferencia húmedo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron activadas con metanol

durante 30 segundos y lavadas en tampón de transferencia (**tabla A6**). Las condiciones de transferencia fueron 30 V durante 60 minutos.

Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con una solución tamponada de Tris con 0.05 % de Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (TBST) (**tabla A7**) conteniendo 1 % de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 60 min a temperatura ambiente.

4.6.3.2. Inmunodetección en membrana

Se incubó la membrana bloqueada, con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso (**tabla A8**), a una dilución 1:1000 en TBST 1 % BSA durante toda la noche a 4 °C en agitación. Se utilizaron dos anticuerpos primarios: un anticuerpo monoclonal hecho en ratón que reconocía la cola de histidinas de las proteínas recombinantes (Qiagen, Hilden, Alemania) a una dilución 1:2000 y un anticuerpo policlonal hecho en conejo específico contra OVGPI (Abcam, Cambridge, Gran Bretaña) a una dilución 1:10000.

Se procedió a realizar 3 lavados de 10 min cada uno de ellos con TBST antes de incubar con el anticuerpo secundario durante 60 min a temperatura ambiente y agitación. Los anticuerpos secundarios utilizados (**tabla A8**) fueron: un anticuerpo anti-conejo hecho en cabra HRP (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) a la dilución 1:40000 y un anticuerpo anti-ratón hecho en cabra HRP (Chemicon International, Billerica, MA, EEUU) a una dilución 1:5000.

Se utilizó un anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti- β -actina conjugado con HRP (Abcam, Cambridge, Gran Bretaña) a una dilución 1:5000, como control de carga para poder normalizar los resultados obtenidos.

La visualización de las bandas se realizó mediante incubación de la membrana con el reactivo Pierce ECL Western-blotting Substrate (Polysciences. Eppelheim, Alemania) y revelado en el equipo ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Buckinghamshire, Reino Unido) del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) de la Universidad de Murcia. Las imágenes fueron obtenidas con el software ImageQuant™ (GE Healthcare Buckinghamshire, Reino Unido).

4.7. Cálculo de la concentración de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1

Con el objetivo de confirmar los resultados de concentración obtenidos al medir la absorbancia a 280 nm de las muestras (de las proteínas pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 expresadas en células HEK), se utilizó el software Image Studio Digits (LI-COR Biotechnology, Cambridge, Reino Unido). Mediante este programa se calculó la concentración de proteína sobre la imagen obtenida del Western-blot de dichas proteínas, y otras de concentración conocida que se usaron como patrón.

4.8. Análisis de la glicosilación: tratamiento con N-GLICOSIDASA F.

Para analizar el patrón de N-glicosilación se realizó una deglicosilación enzimática utilizando N-glicosidasa F, enzima también conocida como PNGasa F (Roche, Mannheim, Alemania) de las proteínas purificadas pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1. Esta enzima es una amidasa que corta las cadenas N glicosiladas de las glicoproteínas entre el aminoácido asparagina y el residuo glucídico N-acetilglucosamina (N-acetil- β -D-glucosamina, GlcNAc), excepto cuando el residuo de GlcNAc está unido a un residuo de α 1-3 Fucosa (modificación que se encuentra comúnmente en glicoproteínas de plantas y algunos insectos).

Para este ensayo 8-10 μ g de proteína recombinante fue diluido en 5 μ L de tampón fosfato 150 mM pH 7,5 que contenía 30 mM EDTA y 0,3 % de SDS. Esta dilución fue incubada en un baño con agua hirviendo durante 5 minutos para desplegar la glicoproteína y favorecer la digestión por la enzima. Una vez enfriada la muestra fue incubada con 4 UI de N-glicosidasa F en un baño durante 16 h a 37 °C. Finalizado el proceso de incubación, se procedió a desactivar la enzima hirviendo las muestras durante 5 minutos.

Las muestras fueron caracterizadas mediante SDS-PAGE y Western-blot.

4.9. Incubación de ovocitos con proteínas recombinantes

4.9.1. Incubación

Los CCOs tubáricos de ratón fueron decumulados usando hialuronidasa (1 mg/mL) y lavados posteriormente varias veces en DPBS-PVA-RF.

Los ovocitos MIV de las especies bovina y porcina fueron decumulados mecánicamente con una pipeta automática y lavados varias veces en DPBS- PVA-RF.

Los ovocitos MIV porcinos y bovinos y los ovocitos de ratón fueron incubados con pOVGP1 y rOVGP1.

pOVGP1AB, pOVGP1A, mMBP-pOVGP1D y mMBP-pOVGP1BD fueron utilizadas para incubar ovocitos porcinos MIV.

Todos los ovocitos se incubaron en gotas de 25-50 μ L de la dilución de la proteína requerida en cada caso, en placas cubiertas con aceite mineral que se mantuvieron a 38,5 °C bajo 5 % de CO₂ y al 100 % de humedad durante 60 minutos. En el caso de estudio de la endocitosis de OVGP1p, los tiempos de incubación de los ovocitos MIV porcinos en esta proteína fueron de 15 min, 30 min y 60 min.

En cada experiencia se usó también un grupo control en el que los ovocitos se trataron con medio de crecimiento de células no transfectadas, o con mMBP en el caso de mMBP-pOVGP1D y mMBP-pOVGP1BD, en las mismas condiciones de incubación que los demás grupos experimentales.

Los ovocitos incubados se utilizaron para analizar la afinidad de las diferentes proteínas recombinantes producidas por la ZP y su efecto mediante análisis utilizando fecundación *in vitro* (FIV), resistencia a la degradación proteolítica de ZP, microscopía confocal, microscopía electrónica de transmisión y electroforesis en SDS-PAGE y Western-blot.

4.9.2. Lisado de ovocitos porcinos MIV previamente incubados con proteínas OVGP1 recombinantes

Ovocitos porcinos MIV previamente incubados con pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 a 125 µg/mL a 38,5 °C durante 60 min, fueron lisados sometiendo a 98 °C durante 10 min en tampón de carga para electroforesis SDS Sample Buffer (4X) (Novagen®, Madison, EUA) antes de ser cargados en el gel de poliacrilamida para llevar a cabo una separación de proteínas por electroforesis en SDS-PAGE y Western-blot.

4.10. 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 Sigma, Madrid, España) en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (Coy *et al.*, 2002) a 37 °C.

Para conocer el tiempo de digestión de la ZP de los ovocitos no tratados y los tratados con las diferentes proteínas recombinantes, los ovocitos se sacaron del correspondiente tratamiento, se lavaron rápidamente en DPBS-PVA-RF y se introdujeron en gotas de 50 µL 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, **Fig. 8**) al cual nos referiremos como tiempo de digestión de la ZP.

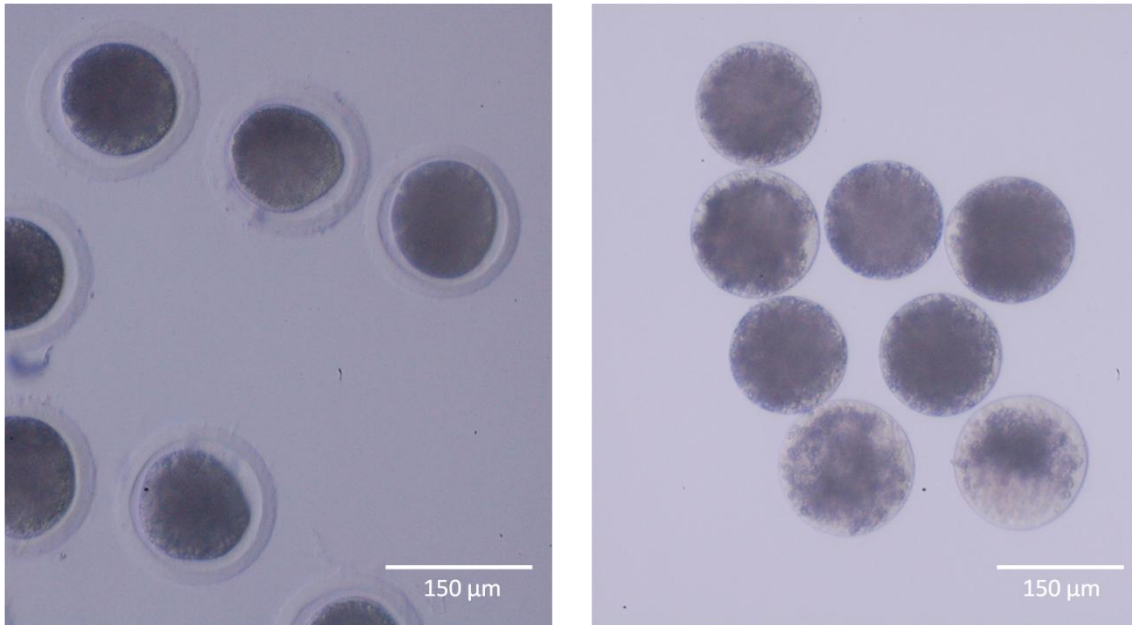


Figura 8. Ovocitos porcinos madurados *in vitro*. Ovocitos donde se aprecia la ZP (izquierda) y sin ZP (derecha)

4.11. Sistema porcino

4.11.1. Procesado del semen porcino

Los espermatozoides utilizados fueron obtenidos a partir de dosis de inseminación de cerdos de fertilidad probada provenientes del Centro de Inseminación La Esperanza - CEFUSA (Pliego, Murcia, España). El semen se centrifugó a 300 \times g en una centrífuga Heraeus® modelo Labofuge 400e (Heraeus Holding, Hanau, Alemania) durante 10 minutos a 25 °C para concentrarlo y así eliminar el plasma seminal y la fracción de bajo contenido en espermatozoides. Tras descartar la mayor parte del sobrenadante, se depositó 0,5 mL de muestra seminal en un tubo Falcon sobre un gradiente de densidad (Percoll®; GE Helthcare, Piscataway, EEUU) de 90 % y 45 % (Parrish *et al.*, 1995), obtenido éste a partir de la dilución 1:1 de la solución de 90 % y BTS (Beltsville Thawing Solution) precalentado a 37 °C. La composición de BTS y Percoll® aparece reflejada en las **tablas A9 y A10**, respectivamente. Después, se centrifugaron los tubos a 700 \times g durante 30 minutos en una centrífuga Heraeus® modelo Labofuge 400e y sin freno en la centrífuga. El sobrenadante se eliminó y como precipitado quedaron los espermatozoides seleccionados capaces de atravesar el gradiente de densidad.

Más tarde se procedió a la resuspensión de los espermatozoides en el medio TALP empleado para FIV (composición de medio TALP en la **tabla A11**. Se realizó otro ciclo de centrifugación, a 700 $\times g$ durante 10 minutos en la centrífuga Heraeus® modelo Labofuge 400e.

Una vez terminado el procesado de los espermatozoides, se calculó la concentración espermática final mediante un analizador automático Spermacue® (Minitüb-Ibérica, Tarragona, España). Finalmente, se ajustó la concentración a la deseada para su uso en FIV.

4.11.2. Fecundación *in vitro* (FIV) porcina

Los CCOs madurados *in vitro* fueron parcialmente decumulados (eliminación de las células del cúmulo) con una micropipeta automática en los pocillos que contenían NCSU-37. Tras dos lavados en medio de fecundación TALP, fueron pasados en grupos de 50 ovocitos a microgotas de 25 μL de medio TALP.

A la microgota de 25 μL que contenía los ovocitos MIV se le añadió 475 μL de la solución que contenía los espermatozoides, quedando un volumen final de 500 μL y una concentración final de inseminación de 10,000 espermatozoides/mL.

Tres horas más tarde los cigotos putativos fueron lavados en medio TALP y fueron transferidos a 500 μL de medio TALP fresco 15 horas más, momento en que fueron fijados y teñidos para evaluar los resultados de la FIV.

Todo ello se realizó en unas condiciones controladas de 38,5 °C bajo 5 % CO_2 y al 95 % de humedad.

4.11.2.1. FIV en presencia de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1

Antes de realizar la FIV, se procedió a incubar los ovocitos porcinos MIV presentes en grupos de 50 en las microgotas. Estas microgotas contenían 25 μL de la proteína recombinante correspondiente diluida en TALP (pOVGP1: 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pOVGP1AB: 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y rOVGP1: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en 25 μL de TALP sin presencia de

OVGP1 el grupo que actuaba como control. La incubación se realizó durante 60 min a 38.5 °C.

Tras la incubación, 475 µL de la solución que contenía los espermatozoides fueron añadidos a la gota de incubación de 25 µL que contenía los ovocitos MIV, quedando un volumen final de 500 µL, una concentración final de inseminación de 10,000 espermatozoides/mL y una concentración de proteínas recombinantes de pOVGP1: 12,5 µg/mL, pOVGP1AB: 12,5 µg/mL, rOVGP1: 2,5 µg/mL.

Después de tres horas, los cigotos putativos fueron lavados en medio TALP y transferidos a 500 µL de medio TALP fresco sin presencia de proteínas OVGP1, dónde se incubaron durante 15 horas más. Posteriormente fueron fijados y teñidos para evaluar los resultados de la FIV.

4.11.2.2. Evaluación de la FIV

Dieciocho horas después de la FIV, se evaluaron los resultados obtenidos. Para ello, se realizó la fijación y tinción de los ovocitos fecundados/zigotos y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Leica® modelo DMLS (Barcelona, España).

Los cigotos putativos se transfirieron a otra placa de pocillos que contenía una mezcla de glutaraldehído (Serva, Heidelberg, Alemania) al 0,5 % para fijarlos durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron en PBS, y se transfirieron a 500 µL de solución colorante 1% Hoechst® 33342 (Sigma, Madrid, España) en PBS incubándose a 4 °C durante 15 minutos en oscuridad.

Pasado este tiempo, los ovocitos se lavaron de nuevo en PBS durante 5 minutos para quitar el exceso de colorante. Se añadió una gotita de medio de montaje (PBS:glicerol (Sigma 5150, Madrid, España):Hoechst® stock en proporción 1:1:1) en un portaobjetos y se transfirieron los ovocitos dentro de la gota de medio de montaje. Se cubrió la gota cuidadosamente con un cubreobjetos y se selló la preparación con laca de uñas. Las muestras se guardaron en oscuridad y a 4 °C para que conservasen la fluorescencia hasta el momento de su evaluación bajo el microscopio de epifluorescencia.

Se determinó:

- Porcentaje de ovocitos penetrados (**Penetración**): número de ovocitos, por cada 100 ovocitos maduros en MII, que presenta al menos un espermatozoide en el interior del ooplasma.
- Porcentaje de monospermia (**Monospermia**): número de ovocitos, por cada 100 ovocitos penetrados, que presenta un único espermatozoide (en forma descondensada o de pronúcleo) en el citoplasma ovocitario.
- Número medio de espermatozoides adheridos a la ZP del ovocito (**Espermatozoides/ZP**) tras el lavado.

4.11.2.3. Análisis estadísticos

Las variables de los resultados de la FIV y del endurecimiento de la ZP frente a la digestión proteolítica se expresan como media \pm error estándar (SEM). Se analizaron los datos obtenidos con el programa SPSS versión 19.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, Illinois, EEUU). Se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía. Se consideró $P < 0.05$ como valor límite de corte para identificar las diferencias significativas. Cuando éstas fueron identificadas, se realizó un Test de Tukey para determinar las diferencias entre grupos.

4.12. Sistema bovino

4.12.1. Procesado del semen bovino

Se utilizaron pajuelas congeladas de semen bovino, que fueron descongeladas a 37 °C en un baño de agua durante 1 min y centrifugadas 5 min a 290 xg a través de un gradiente de Bovipure (Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Suecia) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El gradiente estaba formado por 1 mL al 40 % y 1 mL al 80 %.

Tras la centrifugación, el pellet fue aislado y lavado en 3 mL de medio de lavado Boviwash (Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Suecia) por centrifugación a 290 xg durante 5 min. El pellet fue resuspendido en 300 μ L de medio Boviwash y ajustado a una concentración adecuada para la realización de la FIV

4.12.2. FIV bovina

Los gametos fueron coincubados en gotas de 100 μ L de medio de fecundación en grupos de 50 CCO por gota y una concentración de espermatozoides de 1×10^6 espermatozoides/mL, en una atmósfera de 38,5 °C bajo 5 % CO₂ y al 95 % de humedad.

El medio de fecundación utilizado fue Tyrode's suplementado como se indica en la **tabla A12**.

Dependiendo del grupo experimental (**Fig. 9**), el medio de FIV utilizado fue suplementado con 10 o 50 μ g/mL de OVGP1 recombinante porcina (pOVGP1).

4.12.3. Cultivo embrionario *in vitro* (CIV) bovino

A las 20 horas después de la FIV, los cigotos putativos fueron decumulados utilizando el vortex durante 3 min. Una vez decumulados, fueron cultivados en grupos de 25 en gotas de 25 μ L de Fluido oviductal sintético (FOS) (Holm *et al.*, 1999) suplementado según se muestra en la **tabla A13**. El cultivo se realizó bajo aceite mineral a 38.5 °C, 5 % CO₂, 5 % O₂ and 90 % N₂.

Dependiendo del grupo experimental (**Fig. 9**), el FOS fue suplementado con 10 μ g/mL o 50 μ g/mL de pOVGP1 hasta día 3.5. A partir de ese momento y hasta día 9, todos los embriones fueron cultivados en SOF suplementado con 3 mg/mL de BSA.

4.12.4. Evaluación del desarrollo embrionario bovino

La tasa de división embrionaria fue observada a día 2 (48 h después de la FIV) y la producción de blastocistos fue evaluada a día 7, 8 y 9 después de la FIV.

4.12.5. Evaluación de la calidad embrionaria utilizando análisis de expresión génica

Se realizó un análisis de la calidad de embriones producidos estudiando los genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, con variaciones epigenéticas, comunicación celular, homeostasis del retículo endoplasmático y acuaporinas. La

expresión génica se analizó en tres grupos de 10 blastocistos expandidos para cada uno de los grupos experimentales. Estos blastocistos fueron recuperados del cultivo y analizados en el día 7 y día 9 del desarrollo embrionario.

Se extrajo el ARNm de los blastocistos (Poly (A) ARN) utilizando Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Ambion®, Thermo Fisher Scientific Inc., Oslo, Noruega) siguiendo las instrucciones del fabricante, con alguna pequeña modificación (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2008). Tras incubar la muestra 10 min en buffer de lisis con las Dynabeads, se extrajo el ARNm (poly (A) ARN) unido a las Dynabeads tras dos lavados eluyendo con Tris-HCl. Inmediatamente después de la extracción, se llevó a cabo la retrotranscripción siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Epicentre Technologies Corp., Madison, EEUU) utilizando cebadores poli-T, cebadores al azar y la transcriptasa MMLV High Performance Reverse Transcriptase enzyme (tebu-bio (sp), Barcelona, España) en un volumen total de 40 µl. Los tubos se calentaron 70 °C durante 5 min para desnaturalizar la estructura secundaria del ARN tras lo que se completó la mezcla de retrotranscripción adicionando 50 unidades de la transcriptasa reversa. Entonces se incubó 10 min a 25 °C para favorecer la unión de los primers diseñados al azar en la secuencia de ARN, seguido de 60 min a 37 °C para permitir la retrotranscripción del ARN en ADNc. Para finalizar, se utilizó una temperatura de 85 °C durante 5 min para desnaturalizar la enzima.

Los primers se diseñaron utilizando el software Primer-BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primersblast/) para abarcar límites exón-exón cuando fuera posible. Todas las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron por duplicado en el termociclador RotorGene 6000 Real Time Cycler™ (Corbett Research, Sydney, Australia) con la adición de 2 µl de cada muestra de ADNc obtenida en la retrotranscripción a la mezcla de PCR (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega Corporation, Madison, EEUU) que contenía el primer específico seleccionado para amplificar: el factor activador de la transcripción 4 (*ATF4*), transcrito 3 inducible por daño en el ADN (*DDIT3*), DNA (citosina-5-)-metiltransferasa 3 alfa (*DNMT3A*), demetilasa específica de lisina (K) 1A (*KDM1A*), desmocolina 2 (*DSC2*), proteína de uniones gap alfa 1 (*GJA1*) (antigua CX43), receptor del factor de crecimiento 2 similar a la insulina (*IGF2R*), acuaporina 3 (*AQP3*) y familia de transportadores de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado) miembro 1 (*SCL2A1*) (antiguo GLUT1).

La secuencia de los primers y el tamaño aproximado de los fragmentos amplificados de todos los transcritos se muestran en la **tabla A14**.

Las condiciones de las PCR llevadas a cabo fueron de 94 °C durante 3 min seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 56 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 10 segundos y 10 segundos de adquisición por fluorescencia. Se testó cada par de cebadores para alcanzar eficiencias cercanas a 1 y el método del ciclo umbral comparativo (CT) se utilizó para cuantificar los niveles de expresión como describió Schmittgen y colaboradores (Schmittgen *et al.*, 2008). Con el objetivo de evitar artefactos diméricos, la fluorescencia fue adquirida en cada ciclo a una mayor temperatura que la temperatura de fusión de los dímeros de los primers (específicos para cada producto, 80-86 °C). Para cada muestra se determinó el ciclo umbral o el ciclo durante la fase lineal logarítmica de la reacción en la que la fluorescencia aparece incrementada por encima del “ruido” de fondo. El valor de incremento de ΔCT se determine sustrayendo el valor de los valores de CT del control endógeno utilizado (una media de *H2AZ* y *ACTB*) para cada muestra con cada valor de CT del gen de la muestra. El cálculo de $\Delta\Delta CT$ involucrado utilizando el valor más alto de ΔCT de muestra utilizado (por ejemplo, la muestra con la menor expresión del blanco) como constante para sustraer de todos los demás los valores de ΔCT de las muestras. Los factores de cambio en la expresión génica relativa del blanco se determinaron usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.12.6. Diseño experimental

Se utilizaron dos concentraciones diferentes de OVGP1 recombinante porcina (pOVGP1: 10 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$) para estudiar el efecto de la misma en la capacidad de desarrollo y en la calidad de los blastocistos obtenidos. La suplementación con pOVGP1 se realizó a tres niveles: durante la FIV (día 0), durante el desarrollo embrionario (día 1-día 3.5) o durante ambos (día 0-día 3.5) (**Fig. 9**). Se realizaron tres replicados de cada experimento.

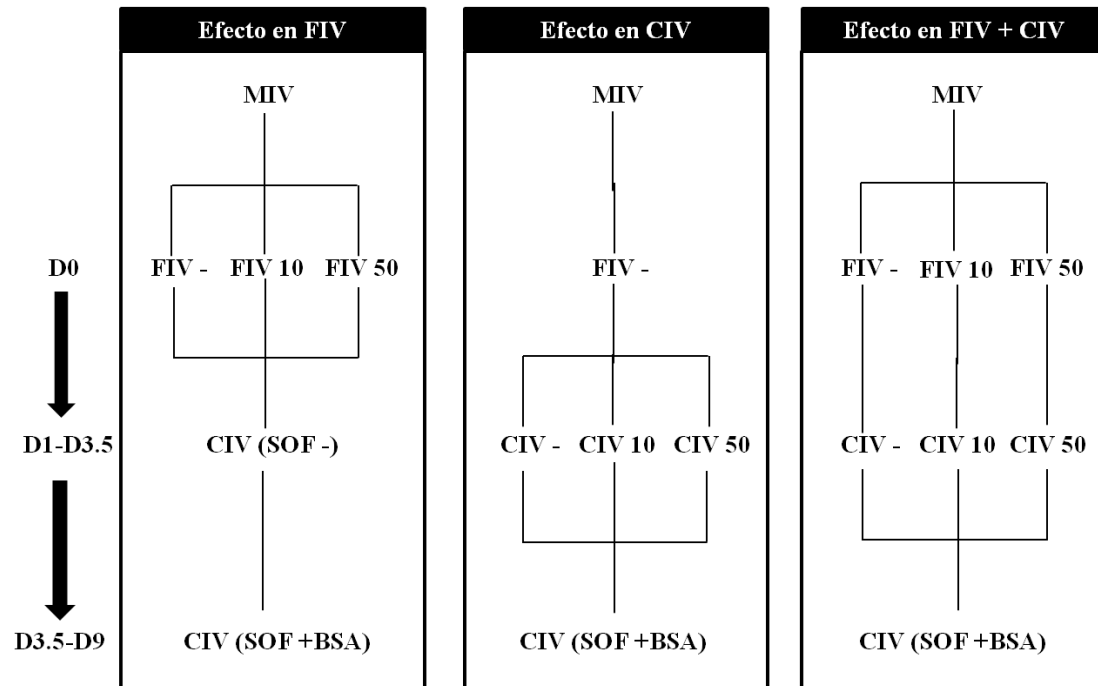


Figura 9. Diseño experimental. Se evaluó el efecto de la suplementación con pOVGP1 a tres niveles: durante la FIV (Día 0) (Control, n= 141; FIV 10, n= 189; FIV 50, n= 151), durante el cultivo de embriones *in vitro* (CIV) (día 1-día 3.5) (Control, n= 141, CIV 10, n= 147; CIV 50, n= 150) y durante FIV y CIV (día 0-día 3.5) (Control, n=141, FIV+CIV 10, n= 194; FIV+CIV 50, n= 201). Los valores 10 y 50 hacen referencia a la concentración de pOVGP1 utilizada (10 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$). SOF=Fluido oviductal sintético, medio utilizado en el cultivo de embriones bovinos, suplementado en algunos casos con BSA.

4.12.6.1. Efecto de la suplementación durante FIV con 10 o 50 $\mu\text{g/mL}$ de pOVGP1 en el desarrollo embrionario (día 0)

Después de la MIV de los CCO bovinos, se realizó la FIV en tres grupos experimentales: Sin suplementar (Control; n=141), suplementado con 10 $\mu\text{g/mL}$ de pOVGP1 (IVF 10; n=189) y suplementado con 50 $\mu\text{g/mL}$ de pOVGP1 (IVF 50; n=151). Entonces, los cigotos putativos resultados de la FIV fueron cultivados en FOS hasta día 3.5, cuando todos los grupos fueron cambiados a FOS suplementado con 3mg/ml de BSA.

4.12.6.2. Efecto de la suplementación durante CIV con 10 o 50 $\mu\text{g/mL}$ de pOVGP1 en el desarrollo embrionario (día 1- día 3.5)

Los cigotos putativos fueron cultivados en FOS sin suplementar (Control; n= 141), suplementados con 10 $\mu\text{g/mL}$ (IVC 10; n=147) o 50 $\mu\text{g/mL}$ de pOVGP1 (IVC 50; n=150)

hasta día 3.5, cuando todos los grupos fueron cambiados a FOS suplementado con 3mg/ml de BSA.

4.12.6.3. Efecto de la suplementación durante FIV y CIV con 10 o 50 µg/mL de pOVGP1 en el desarrollo embrionario (día 0- día 3.5)

Los CCO maduros fueron fecundados en tres grupos: No suplementado (Control; n=141), suplementado con 10 µg/mL de pOVGP1 durante FIV y CIV (FIV+CIV 10; n=194) o 50 µg/mL de pOVGP1 durante FIV y CIV (FIV+CIV 50; n=201) hasta día 3.5, cuando todos los grupos fueron cambiados a FOS suplementado con 3mg/ml de BSA.

4.12.7. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, California, EEUU). La tasa de división, el rendimiento de los blastocistos y la abundancia relativa de mRNA fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía. Los valores se consideraron significativamente diferentes cuando $p < 0.05$.

4.13. Análisis inmunocitoquímicos

4.13.1. Microscopía Confocal

4.13.1.1. Fijación

Los ovocitos, tras ser incubados con las proteínas correspondientes en cada caso, se lavaron con PBS. Posteriormente se realizó la fijación con paraformaldehído (Paraformaldehyde 16 % solution EM grade, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) al 2 % diluido en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Como control fueron utilizados los ovocitos incubados con medio de crecimiento de células sin transfectar y los ovocitos incubados con MBP en el caso de incubación con mMBP-pOVGP1D y mMBP-pOVGP1BD.

4.13.1.2. Tinción inmunocitoquímica

Después de la fijación, los ovocitos se incubaron 15 minutos con glicina 20 mM en PBS para bloquear los grupos amino libres del paraformaldehído. Para la observación posterior de proteínas endocitadas por el ovocito, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 (Triton TM X-100, Sigma Aldrich, San Luis, MO, EEUU) al 1 % en PBS a temperatura ambiente durante 5 min. Una vez realizada la permeabilización, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-Histidinas producido en ratón (Quiagen, Hilden, Germany) diluido 1:100 en PBS-BSA 1 % durante 60 minutos. Se lavaron los ovocitos con PBS 3 veces durante 10 minutos cada vez y se añadió el anticuerpo secundario anti ratón Alexa Fluor® 488 producido en cabra (Life technologies, Waltham, MA, EEUU) diluido 2,5:100 en PBS-BSA 1 %, durante otros 60 min. Tras la incubación, los ovocitos se lavaron 3 veces durante 10 min cada vez con PBS. A continuación, se montaron sobre un cubreobjetos utilizando el adhesivo 25 µL Frames and coverslips (Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU) para crear una cámara en la que depositar una gota de PBS con los ovocitos. Se procedió al sellado con el portaobjetos.

La conservación de las muestras se realizó a 4 °C y oscuridad hasta su observación utilizando la microscopía confocal.

4.13.1.3. Adquisición de Imágenes

Las imágenes fueron captadas mediante un microscopio de fluorescencia confocal DM IRE2 (True Confocal Scanner TCS-SP2 de Leica Microsystems, Barcelona, España).

Las imágenes representan múltiples series de cortes transversales en el eje Z, adquiridos a intervalos de entre 0,1 y 0,5 µm, desde el polo superior hasta el inferior de la célula, o bien imágenes de una sola sección en diferentes niveles del eje Z. Las secciones se obtuvieron usando un objetivo de 20X, 40X o 63X en aceite de inmersión, con una apertura numérica nunca inferior a 0.9 ni superior a 1.2. Otro de los requisitos importantes fue que la intensidad de fluorescencia del fondo fuera mínima y la intensidad de fluorescencia de la muestra no estuviera saturada. Para los estudios de colocalización, la toma de las imágenes de una misma sección marcada con diferentes

anticuerpos o marcadores se realizó de manera secuencial para cada fluorocromo y ambas imágenes fueron adquiridas en condiciones espaciales idénticas para evitar el fenómeno de cruce de señales.

4.13.1.4. Análisis de fluorescencia de la ZP

Se realizó un análisis de la fluorescencia detectada por medio de microscopía confocal en los ovocitos porcinos MIV incubados con pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1. Se realizaron medidas de fluorescencia media en ZP, espesor de ZP, y proporción de área reactiva respecto a área total de ZP.

El análisis de imágenes se realizó utilizando Leica QWin Image analysis software (Leica Microsystems, Barcelona, España) con una evaluación a ciegas del grupo experimental.

4.13.2. Microscopía Electrónica de Transmisión

4.13.2.1. Fijación

Los ovocitos de cerda incubados con pOVGP1 y pOVGP1AB durante 60 min fueron lavados en PBS y fijados con glutaraldehído (Serva, Heidelberg, Alemania) al 0,5 % en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,4 durante 2 h a 4 °C.

4.13.2.2. Inclusión de ovocitos en LR-White

Después de un lavado abundante, los ovocitos fueron embebidos en agarosa fundida a 37 °C. Las muestras se procesaron para su inclusión en la resina LR-White (L.R.Embedding Media, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Alemania) siguiendo el procedimiento descrito previamente (Newman, 1999). Las muestras fueron sometidas a una deshidratación con etanol al 50 % durante 15 minutos y a continuación dos tiempos más de 15 minutos con etanol al 70 %. Seguidamente, en ambiente oscuro se pasaron a una solución 2:1 (LR White: etanol 70 %) durante una hora. A continuación se pasaron las muestras en cuatro tiempos de 1, 1, 12 y 1 hora a solución LR White pura

respectivamente. Todos los pasos anteriores se hicieron en condiciones de agitación continua a temperatura ambiente y en oscuridad.

Tras este proceso, se depositaron en cápsulas completamente llenas de resina LR white pura. Se taparon con una laminilla y se dejaron polimerizar colocando los bloques en la estufa a 50 °C durante 24 horas.

Tras la obtención de los bloques de microscopía electrónica, se realizaron cortes semifinos de 1 µm aproximadamente en un ultramicrotomo LKB III. Estos cortes fueron teñidos con azul de toluidina al 0,3 % en solución acuosa. Tras la localización de los ovocitos se procedió a la obtención de secciones ultrafinas (aproximadamente 50 nm) en un ultramicrotomo (Microm) que fueron depositadas en rejillas de níquel de 100 y 150 mesh recubiertas con una película de formvar (Sigma, España).

4.13.2.3. Tinción inmunocitoquímica en rejillas

Las secciones ultrafinas fueron teñidas mediante una técnica de flotación. Este método consiste en depositar las rejillas sobre unas gotas de los distintos tampones y reactivos. Así, en primer lugar los cortes ultrafinos fueron lavados durante 5 minutos en PBS. Seguidamente, se pasó la rejilla en la misma posición a una nueva gota para realizar un bloqueo de la posible unión inespecífica en PBS+1 % BSA durante 10 minutos. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-OVGPI producido en conejo (Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluido en PBS+1% BSA durante 60 minutos. Se lavó tres veces durante 5 minutos en PBS y se incubó con proteína-A conjugada con oro coloidal de 15 nm (1:70 v/v) diluido en PBS+1 % BSA durante 60 minutos. Nuevamente se lavó tres veces 5 minutos con PBS y con agua bidestilada. Finalmente se dejaron las rejillas secar al aire.

Las secciones ultrafinas fueron contrastadas en gotas con acetato de uranilo durante 8 minutos, tras ello fueron lavados con agua a chorro y secadas para colocarlos en gotas de citrato de plomo durante 4 minutos. Para evitar la formación de precipitados de carbonato de plomo se realiza el contraste en un recipiente cerrado donde se colocaron pastillas de NaOH próximas a las rejillas para retener el CO₂. Finalmente, las rejillas fueron lavadas a chorro con agua ultrapura, secadas y guardadas hasta su

observación en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEL-1011 Transmission Electron Microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

V. Resultados



5.1. Clonación de las proteínas OVGP1 y sus regiones

5.1.1. Clonación de pOVGP1, rOVGP1, pOVGP1AB y pOVGP1A en los vectores de expresión pcDNA 3.1 (+) y pcDNA 3 (+)

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas codificantes para las proteínas OVGP1 porcina completa (Q28990) (pOVGP1) y OVGP1 de coneja (rOVGP1) (Q95LB3), además de para los dos extremos C-terminales de OVGP1 porcina truncada en su región D (pOVGP1AB) y BD (pOVGP1A) a partir de la extracción del ARN total del oviducto porcino y de coneja, su conversión a ADNc y el uso del mismo para realizar PCRs con los cebadores correspondientes (**tabla A4**). En el caso de pOVGP1AB y pOVGP1A, la primera parte de OVGP1 se obtuvo por medio de la digestión de la secuencia de pOVGP1 completa previamente clonada y que fue posteriormente ligada a la región C-terminal obtenida por PCR. Las secuencias codificantes para todas las proteínas recombinantes (pOVGP1, pOVGP1AB, pOVGP1A, rOVGP1) obtenidas por PCR presentaban en su extremo carboxilo terminal la secuencia codificante de una cola de seis histidinas. Una vez que los productos de PCR fueron ligados a los vectores de expresión pcDNA 3.1 (+) y pcDNA 3 (+), realizamos la digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* para comprobar que el proceso de clonación se había realizado con éxito. En una electroforesis en gel de agarosa pudimos observar la presencia de las bandas del tamaño molecular esperado para cada una de las secuencias codificantes de las proteínas recombinantes: pOVGP1 (1608 pb), rOVGP1 (1452 pb), pOVGP1AB (1467 pb) y pOVGP1A (1440 pb) (**Fig. 10**).

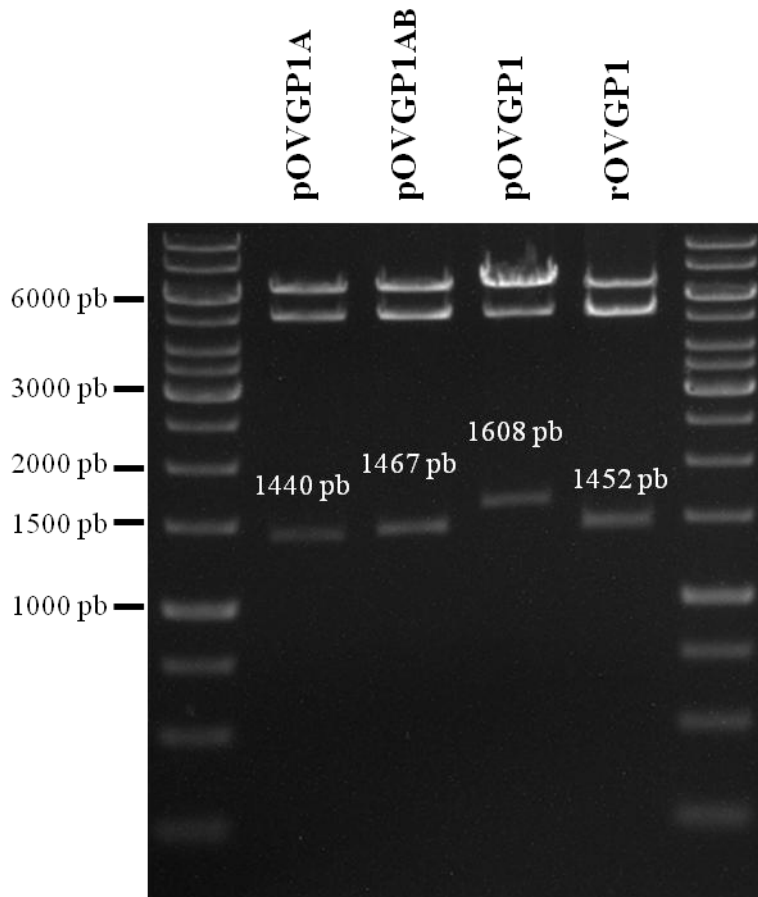


Figura 10. Digestión de los vectores de expresión con las proteínas OVGP1 clonadas. Digestión de los vectores de expresión pcDNA 3.1 (+) (con la secuencia nucleotídica codificante para pOVGP1 y rOVGP1) y pcDNA 3 (+) (con la secuencia nucleotídica codificante para pOVGP1A y pOVGP1AB) con *KpnI* y *XhoI*. Se muestran las bandas correspondientes a la secuencia de nucleótidos que codificará para las cuatro proteínas y las bandas correspondientes a los vectores linealizados con las secuencias de las proteínas OVGP1 escindidas (5400 pb) y sin escindir (alrededor de 6000 pb).

5.1.2. Clonación de mMBP-pOVGP1BD y mMBP-pOVGP1D en el vector de expresión pHLSEC 3

El ADNc obtenido a partir de oviducto porcino fue también utilizado como molde para amplificar las regiones D y BD de pOVGP1, que fueron posteriormente digeridas con las enzimas de restricción *NotI* y *XhoI* y ligadas en el vector de expresión para células de mamífero pHLsec 3, modificado del vector pHLsec (Aricescu *et al.*, 2006). Este vector contiene aguas abajo y en el mismo marco de lectura la proteína de unión a maltosa (MBP, Maltose Binding Protein). Esta proteína contiene la secuencia señal que permite que las proteínas sean secretadas y además se ha descrito que

estabiliza su estructura sin que afecte a su actividad (Bokhove *et al.*, 2016). De esta forma generamos dos proteínas de fusión: D región+MBP (mMBP-pOVGP1D) y BD región+MBP (mMBP-pOVGP1BD).

Una vez ligados los productos de PCR al vector de expresión, se procedió a la digestión del mismo con *NotI* y *XhoI* para comprobar que la clonación se había realizado con éxito. Obtuvimos una banda de 168 pb en el caso de pOVGP1BD y 141 pb en el caso de pOVGP1D (**Fig. 11**).

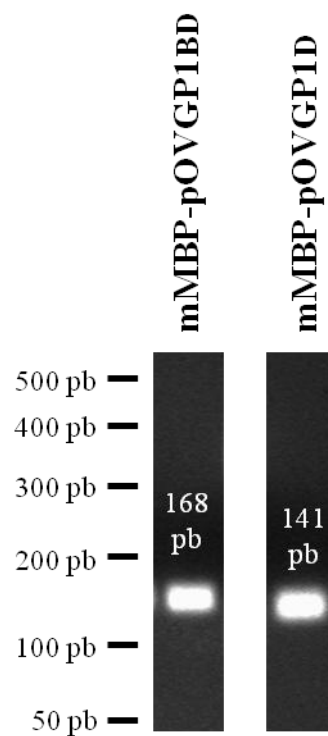


Figura 11. Digestión del vector de expresión pHLSEC 3 con las regiones de pOVGP1 clonadas. Digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* del vector de expresión pHLSEC 3 que posee la secuencia nucleotídica codificante para mMBP-pOVGP1D y mMBP-pOVGP1BD. Se muestran las bandas correspondientes a las secuencias de nucleótidos que codifican para pOVGP1BD y pOVGP1D.

La identidad de todos los productos clonados fue verificada por secuenciación automática completa de ambas cadenas realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) de la Universidad de Murcia.

5.2. Expresión de las proteínas recombinantes en cultivos celulares

5.2.1. Expresión transitoria de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 recombinante por las células HEK 293T

Para investigar el papel de la proteína OVGP1 en el momento de la fecundación se generaron las proteínas recombinantes OVGP1 porcina completa y OVGP1 de coneja completa.

La proteína OVGP1 nativa (wild type) porcina (Q28990) está formada por 527 aa (pOVGP1) e incluye las regiones A (1-472), B (473-481) y D (482-527) (Aviles *et al.*, 2010) (**Fig. 12**). La proteína OVGP1 nativa de coneja (Q95LB3) contiene 475 aa (rOVGP1) donde las regiones A (1-458) y B (459-467) están altamente conservadas comparándolas con las mismas regiones en la especie porcina, mientras que la región D es casi inexistente en OVGP1 de coneja, estando formada por 8 aa, mientras que son 46 aa en la especie porcina (Aviles *et al.*, 2010).

Para analizar la implicación molecular de la región D del extremo C-terminal de pOVGP1, se clonó la proteína OVGP1 porcina con esta región truncada (481aa, pOVGP1AB) (**Fig. 12**).

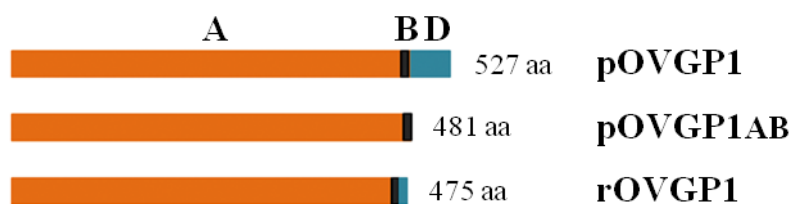


Figura 12. Representación esquemática de las proteínas recombinantes OVGP1. Se muestra OVGP1 nativa porcina (pOVGP1), OVGP1 porcina truncada en la región D (pOVGP1AB) y OVGP1 de coneja (rOVGP1) con las regiones y el número de aminoácidos (aa) que las componen.

Se realizó la transfección de las tres proteínas en la línea celular embrionaria de riñón humano HEK 293T (ECACC, The European Collection of Cell Culture). El medio de cultivo condicionado de las células transfectadas de manera transitoria fue

recogido y utilizado para purificar las proteínas por medio de una cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC).

Una vez obtenidas las proteínas purificadas, estas fueron detectadas por medio de SDS-PAGE y Western-blot utilizando un anticuerpo específico contra las colas de histidinas presentes en las proteínas y por medio de tinción con azul de coomassie. Se pudo observar la presencia de bandas con el peso molecular esperado para cada proteína: de ≈ 90 kDa para pOVGP1, de ≈ 80 kDa para pOVGP1AB y de ≈ 70 kDa para rOVGP1 (**Fig. 13**).

La purificación por medio de IMAC se había llevado a cabo con éxito, ya que el análisis mediante SDS-PAGE realizado con las proteínas purificadas y teñido con azul de coomassie no mostró apenas otras bandas aparte de las correspondientes a las proteínas OVGP1, siendo éstas las proteínas mayoritarias y casi exclusivas de las muestras (**Fig. 13**).

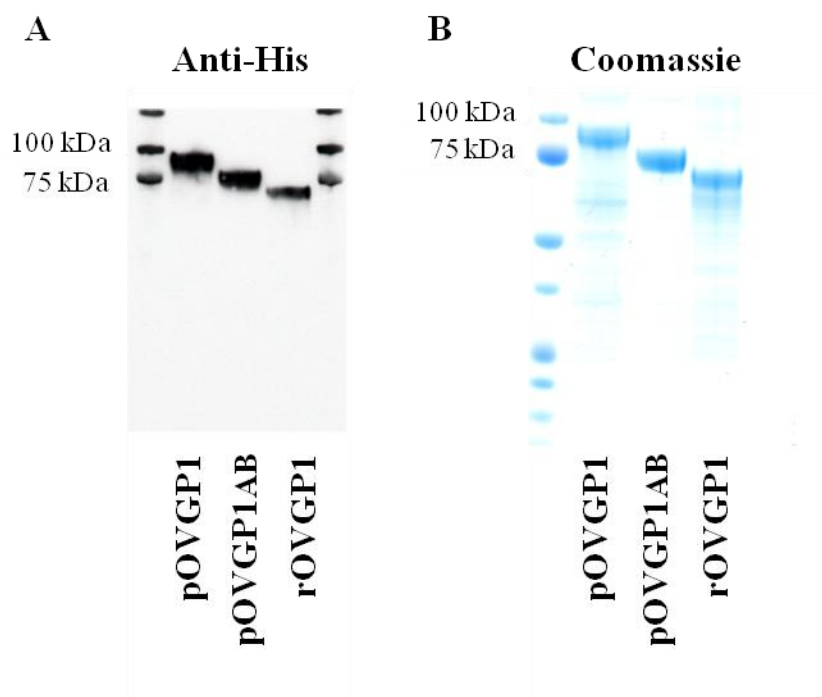


Figura 13. Proteínas OVGP1 expresadas en la línea celular HEK 293T. Proteínas recombinantes OVGP1 producidas en células HEK 293T, purificadas por IMAC y analizadas mediante SDS-PAGE y Western-blot (A) y mediante SDS-PAGE y tinción con azul Coomassie (B). Se detectan bandas de ≈ 90 kDa, ≈ 80 kDa y ≈ 70 kDa correspondientes a pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 respectivamente.

Se analizaron las proteínas recombinantes pOVGP1 y rOVGP1 comparándolas con las proteínas OVGP1 nativas presentes en el FO porcino (FOP) y de coneja (FOC). Utilizando un anticuerpo que reconoce OVGP1, pudimos observar la presencia de pOVGP1 recombinante con un peso molecular de ≈ 90 kDa, peso molecular ligeramente inferior al de la proteína OVGP1 porcina nativa presente en FOP (**Fig. 14**). La proteína rOVGP1 recombinante mostró el mismo peso molecular, ≈ 70 kDa, que OVGP1 de coneja nativa procedente de FOC (**Fig. 14**).

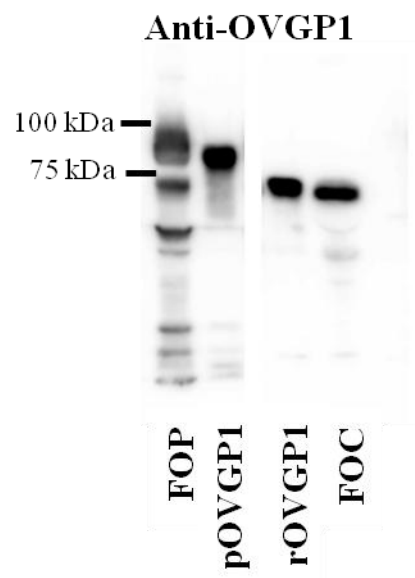


Figura 14. SDS-PAGE y Western-blot de las proteínas pOVGP1 y rOVGP1 expresadas en células HEK 293T y purificadas mediante IMAC. Se incluyó fluido oviductal porcino (FOP) y de coneja (FOC). La banda correspondiente a OVGP1 porcina presente en FOP posee un peso molecular ligeramente superior a la correspondiente a la proteína recombinante pOVGP1 (≈ 90 kDa). Se observan otras bandas minoritarias en el FOP que son reconocidas por el anticuerpo anti-OVGP1 utilizado. La banda correspondiente a la proteína OVGP1 de coneja presente en FOC muestra un peso molecular similar al de la proteína recombinante rOVGP1 (≈ 70 kDa).

5.2.1.1. Cálculo de la concentración de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1

El cálculo de la concentración de las proteínas recombinantes OVGP1 expresadas en células HEK 293T y purificadas por IMAC, se hizo utilizando la expresión matemática simplificada de la ley de Lambert-Beer:

$$A = C \cdot \epsilon \cdot L$$

Para ello medimos la absorbancia de la muestra a 280 nm y calculamos el coeficiente de extinción molar (ϵ) de cada proteína utilizando el recurso informático “EXPASy ProtParam tool” (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Los valores obtenidos de la concentración de proteínas aplicando la ley de Lambert-Beer (**tabla 5**) no se ajustaban al 100 % a la realidad, ya que aunque las proteínas purificadas eran las mayoritarias y casi exclusivas de la muestra, aparecía alguna banda débil correspondiente con alguna otra proteína que se había unido inespecíficamente durante la purificación. Por ello, para ajustar más la concentración, cargamos las proteínas en un gel para realizar un SDS-PAGE y teñimos con azul de coomassie, utilizando concentraciones conocidas de las proteínas albúmina de suero bovino (BSA) y endoglicosidasa H (endoH) como patrón. Se utilizó el software Image Studio Digits (LI-COR Biotechnology, Cambridge, Reino Unido) para calcular la concentración de proteína sobre la imagen obtenida del gel teñido con azul de coomassie.

Con el análisis de imagen obtuvimos una medida más fiable de la concentración proteica, que fue la que tomamos como correcta.

Tabla 5. Concentración estimada de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 por medio de espectrofotometría y análisis de imagen.

	Espectrofotometría	Análisis de imagen
pOVGP1	1.7 mg/mL	0.4 mg/mL
pOVGP1AB	1 mg/mL	0.4 mg/mL
rOVGP1	1.6 mg/mL	0.5 mg/mL

5.2.2. Expresión recombinante transitoria y estable de pOVGP1, pOVGP1AB, pOVGP1A y rOVGP1 en la línea celular CHO.

Se concentró y analizó mediante SDS-PAGE y Western-blot el medio de crecimiento de las células transfectadas de manera transitoria y de manera estable (tras crecer las células en presencia de geneticina) con los vectores que codifican para las diferentes proteínas OVGP1, con el objetivo de detectar la expresión y secreción de las

proteínas OVGP1 recombinantes en la línea celular CHO. Se utilizó un anticuerpo específico contra la cola de histidinas presentes en todas las proteínas para la detección de las mismas.

En la electroforesis y Western-blot realizado con la proteína porcina pOVGP1, el anticuerpo anti-His reconoció específicamente una banda de ≈ 90 kDa de peso molecular. En el caso de las proteínas porcinas truncadas se reconoció específicamente una banda de ≈ 80 kDa para pOVGP1AB y de ≈ 75 kDa para pOVGP1A. La banda correspondiente a rOVGP1 fue de ≈ 75 kDa. Sin embargo, no observamos reactividad en la muestra de sobrenadante del cultivo de células CHO sin transfectar que utilizamos como control negativo (**Fig. 15**).

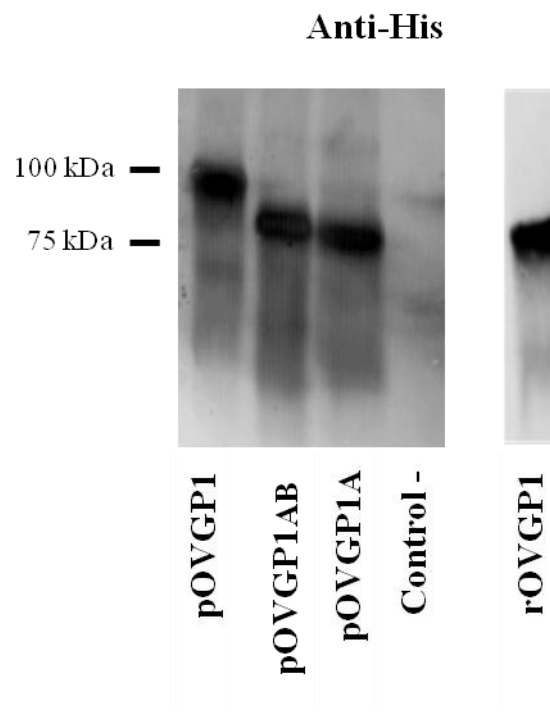


Figura 15. Proteínas OVGP1 recombinantes producidas en cultivo de células CHO. Se observan mediante SDS-PAGE y Western-blot utilizando un anticuerpo anti-histidina las proteínas pOVGP1 ≈ 90 kDa, pOVGP1AB ≈ 80 kDa, pOVGP1A ≈ 75 kDa y rOVGP1 ≈ 75 kDa. Control - se corresponde con sobrenadante de cultivo de células CHO no transfectadas.

El anticuerpo anti-His reconoció bandas específicas que se corresponden con los pesos moleculares esperados para las OVGP1 porcina nativa y truncadas y OVGP1 de

coneja, por lo que podemos afirmar que las células CHO expresan las diferentes proteínas OVGP1 y las secretan al medio de cultivo.

5.2.3. Expresión recombinante transitoria de los péptidos mMBP-pOVGP1BD y mMBP-pOVGP1D en la línea celular CHO

Se realizó la clonación de péptidos equivalentes a cada una de las regiones de pOVGP1 para estudiar la capacidad de cada una de ellas de unirse a la ZP de ovocitos. Se clonó el fragmento abierto de lectura correspondiente a la región A completa (472 aa, pOVGP1A). También se realizó la clonación de la región D (46 aa) y las regiones BD juntas (55 aa). Debido al pequeño tamaño de estas últimas, los fragmentos abiertos de lectura correspondientes a su secuencia fueron clonados aguas abajo y en el mismo marco de lectura que la versión de mamíferos de la proteína de unión a maltosa (mMBP), con el objetivo de aportar una mejor secreción y estabilidad (Bokhove *et al.*, 2016), generando una proteína de fusión entre la región D de OVGP1 porcina + mMBP (mMBP-pOVGP1D) y las regiones BD de OVGP1 porcina + mMBP (mMBP-pOVGP1BD) (**Fig. 16**).

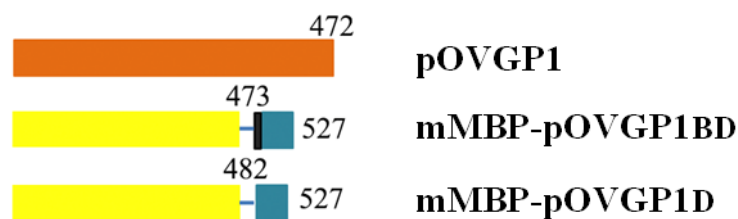


Figura 16. Representación esquemática de las regiones de OVGP1 porcina. Se muestra la región A (pOVGP1A), la región BD (mMBP-pOVGP1BD) y la región D (mMBP-pOVGP1D), las dos últimas clonadas como proteínas de fusión con mMBP.

Los vectores de expresión generados se utilizaron para transfectar células CHO de manera transitoria. El medio de cultivo de las células tras la transfección fue concentrado y testado con un anticuerpo que reconocía la cola de histidinas presente en los péptidos.

El anticuerpo mostró afinidad por las bandas de peso molecular ≈ 75 kDa para pOVGP1A, de ≈ 50 kDa para mMBP-pOVGP1BD y de ≈ 48 kDa para mMBP-pOVGP1D (**Fig. 17**). Se expresó también mMBP aislado en la misma línea celular con el objetivo de ser utilizado como control en los experimentos fisiológicos de unión a ZP (**Fig. 17**).

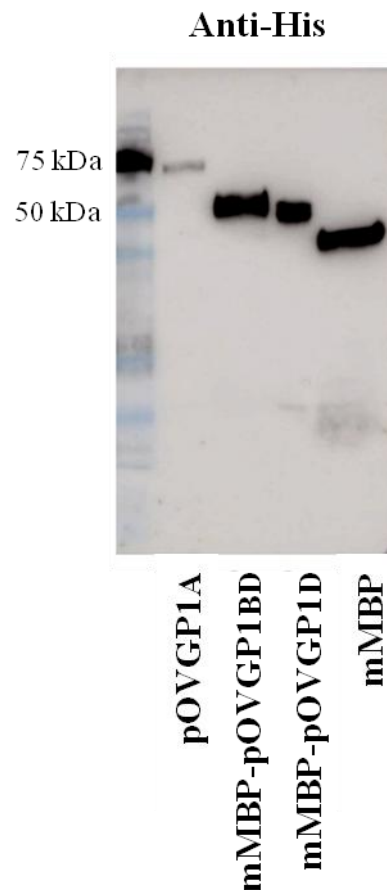


Figura 17. Las células CHO expresan las regiones A, D y DB de pOVGP1. Se detectaron bandas de ≈ 70 kDa para pOVGP1A, ≈ 50 kDa para mMBP-OVGP1BD, ≈ 48 kDa para mMBP-OVGP1D y ≈ 40 kDa para mMBP al utilizar un anticuerpo anti-histidinas.

5.3. Análisis de las proteínas recombinantes deglicosiladas

El tratamiento de pOVGP1, pOVGP1AB, y rOVGP1 con la enzima N-glicosidasa F (o PNGasa) mostró que las tres proteínas son N-glicosiladas por las células CHO y HEK 293T, debido al descenso en el peso molecular que sufrieron tras el tratamiento enzimático (**Fig. 18**), siendo este descenso inferior en el caso de rOVGP1. Sin embargo, la región D no presentaría azúcares N unidos ya que el descenso en unos \approx

5 kDa de peso molecular fue el mismo tanto para pOVGP1 que para la proteína truncada pOVGP1AB, después de ser tratadas con N-glicosidasa F (**Fig. 18**).

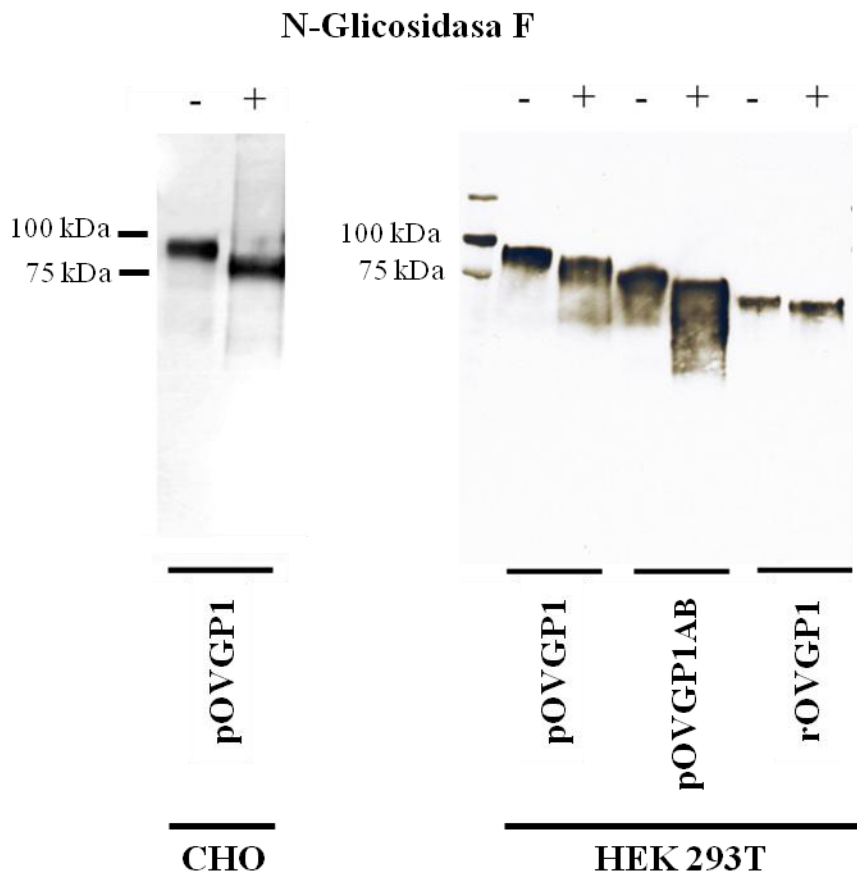


Figura 18. SDS-PAGE y Western-blot de las proteínas OVGP1 tratadas con N-glicosidasa F. Se analizaron las proteínas pOVGP1 (expresada en células CHO y HEK 293T), pOVGP1AB y rOVGP1 (expresadas en HEK 293T) tratadas (+) y no tratadas (-) con N-glicosidasa F. Se observó un descenso en el peso molecular de las tres proteínas tras el tratamiento.

5.3.1. Potenciales sitios de N-glicosilación y O-glicosilación de OVGP1 porcina y de coneja

Con la herramienta bioinformática “NetNGlyc 1.0 Server” se puso de manifiesto la existencia de tres sitios potenciales de N-glicosilación en la secuencia de la proteína OVGP1 porcina. Estos lugares potenciales de N-glicosilación se correspondían con la asparagina 62, 402 y 441, perteneciendo los tres a la región A de la proteína (**Fig. 19**).

En OVGP1 de coneja sólo se detectó un sitio potencial de N-glicosilación, la asparagina 402, estando presente también en la región A de la proteína (**Fig. 19**).

OVGP1 Porcina (Q28990)

MGKLLLVWGLVVLVLDKHHNGAAHKLVCYFANWAFSRPGPASILPRDLDPFLCTHLVFAFASMDNSQIVAKDARDESIFYPE 80
 FNQLKERNEKLTLLSIGGWNFGRFTTMLSTFTNREKFIKSAIGLLRTHGFDGLDLFFLYPGLRGSPPRRDRWNFLFL 160
 EELLAFRREAQLTMRPRLLSAAVVSADPHVIQKAYDVRLLGRLLDFINVLSYDLHGSWEKVTGHNSPLFSLSDDPKSSA 240
 YTMNYWRKLGAPPEKLLMGFPTYGRTFRLLKASKNELGAEAVGPASPGKYTKQAGFLAYEVCSEFVQRAKRWIDHQYVP 320
 YAYRGKEWVGYYDDISFSYKAFKIKKEHFGGAMVWTLDDVDRGTFCGTGPFPLVYMLNDLLKAEVSSLSLSPGFGLSTT 400
 VNSSRTPCESLAVTKDLTTDLGILPLGGEAVATETHGRSDNMTVTPGGGLVAPTRPTLSFGKLTVAPEGKTESPGEKAMT 480
 PVGHPVTPGDMSVPPVPIQTGDRITPPRRQAVAPEKMTLPNGKRS

OVGP1 Coneja (Q95LB3)

MGRLLLWLGLVVLVDCHDGAAYKLVCFYFTNWAHSRPGPAAIILPHDLDPFLCTHLIFAFASMDNDNEIVAKDVQDERIFYPE 80
 FNKLKERNRELKLTLLSIGGWNFGRFTTAMLSASFASREKFINSVISLLRTHNFDGLDLFFLYPGLRGSPPAHRWTFLEFLV 160
 EELLFAFQREALLIKRPRLLLSAAVSGVPHIQTSDYVRLGKLLDFINVLSYDLHGSWEKFTGHNSPLFSLPEDPKSSA 240
 YAMNYWRKLGAPSEKLIMGFPTYGRTFHLLKATNHGLQAQAIGPASPGKYTKQAGFLAYEVCSEFVRKAKRHWIDYQYVP 320
 YAYRGKEWVGYYDDISFSYKAMFVKREHFGGAMVWTLDMDDVDRGTFCGNGPFPVYTLNDLLVQDESTPTPLPQFWFSSA 400
 VNSRTHLAVTEPLTTDIKILPPGGEAMATESSGMSEAPRGAASVSLGKHTVAPAEKTEPPGVKPMTPGKMTMTSA

Figura 19. Potenciales sitios de N-glicosilación. Secuencia aminoacídica de las proteínas pOVGP1 (OVGP1 porcina) y rOVGP1 (OVGP1 coneja) donde se muestran los potenciales sitios de N-glicosilación. En rojo aparece la asparagina susceptible a ser N-glicosilada, presente dentro de la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr, que aparece en azul. (Asn :asparagina; Xaa: cualquier aminoácido; Ser: serina; THR: treonina).

El descenso del peso molecular de unos ≈ 5 kDa observado al tratar la proteína pOVGP1 con la enzima N-glicosidasa F podría coincidir con la escisión de tres N-glicanos. Se observó un menor descenso de peso molecular en la proteína rOVGP1 tratada con la enzima, lo que concuerda con el único sitio potencial a ser N-glicosilado de su secuencia.

Todo ello indica que las células CHO y HEK 293T estarían N-glicosilando las tres proteínas.

Se calculó el peso molecular esperado de OVGP1 porcina y de coneja, a partir de la secuencia del péptido maduro de OVGP1 con la cola de seis histidinas incluida, por medio de la aplicación bioinformática “ExPASy - ProtParam tool”. El peso molecular esperado para OVGP1 porcina es de 57 kDa. Se observó que el peso molecular de la proteína expresada y secretada por las líneas celulares de mamíferos utilizadas en este trabajo es de ≈ 90 kDa y el correspondiente a las N-glicosilaciones de ≈ 5 kDa, por lo que podríamos deducir que los 28 kDa sobrantes se corresponderían con las O-glicosilaciones presentes en la proteína. En el caso de rOVGP1, el peso molecular estimado del polipéptido maduro con la cola de histidinas incluida sería de 51.9 kDa. Si tenemos en cuenta que la proteína expresada por la línea celular HEK 293T tiene un peso molecular de ≈ 70 kDa y el correspondiente a N-glicosilaciones es de

aproximadamente ≈ 3 kDa, el peso molecular correspondiente a O-glicosilaciones sería de unos 15.1 kDa.

Utilizando “NetOGlyc 4.0 Server” se detectaron los sitios potenciales de O-glicosilación. OVGP1 porcina posee 29 en su secuencia (21 en la región A, 2 en la región B y 6 en la región D). OVGP1 de coneja posee 2 sitios potenciales a ser O-glicosilados en su secuencia (1 en la región A y 1 en la B).

Además, se observa que la proteína pOVGP1 producida en las líneas celulares CHO y HEK 293T presenta un peso molecular similar, por lo que podríamos afirmar que ambas líneas celulares glicosilan de manera similar esta proteína (**Fig. 20**).

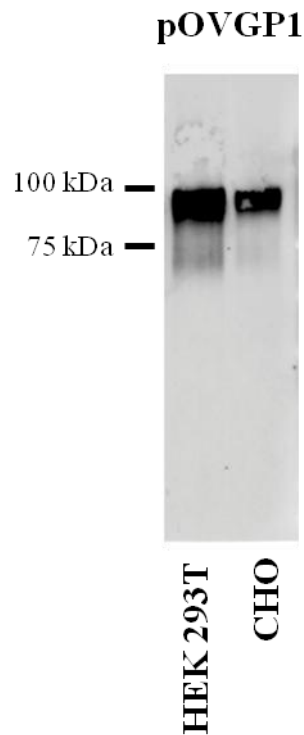


Figura 20. Expresión de pOVGP1 en la línea celular CHO y HEK 293T. La proteína recombinante porcina pOVGP1 muestra el mismo peso molecular al ser expresada en las líneas celulares CHO y HEK 293T y analizada por medio de un anticuerpo anti-His.

5.4. Unión de OVGP1 a la ZP

5.4.1. OVGP1 se une a la ZP por su región N-terminal

Las proteínas recombinantes pOVGP1 y rOVGP1 expresadas en células HEK 293T fueron capaces de unirse a la ZP de ovocitos porcinos MIV, al igual que las variantes porcinas truncadas en su región C-terminal pOVGP1AB y pOVGP1A. Sin embargo, no se detectó en la ZP de los ovocitos las proteínas generadas como proteínas de fusión de mMBP con las regiones C-terminales D y BD de pOVGP1 (mMBP-pOVGP1D y mMBP-pOVGP1BD) (**Fig. 21**).

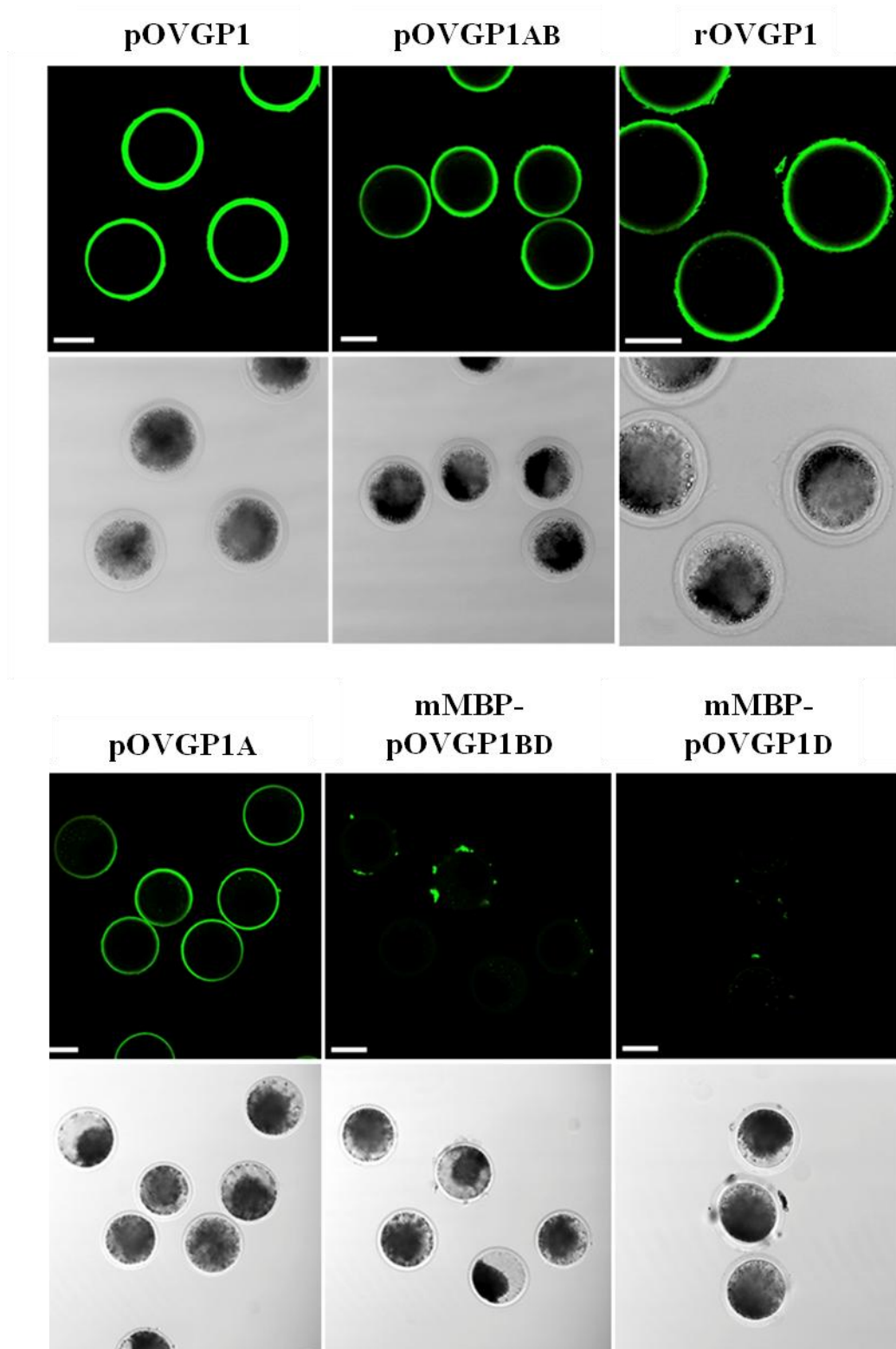


Figura 21. OVGP1 se une a la ZP por su región N-terminal. Ovocitos porcinos MIV incubados con 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 producidas en células HEK 293T. Los ovocitos también fueron incubados con medio de células CHO transfectadas que contenía pOVGPA, mMBP-pOVGP1BD y mMBP-pOVGP1D. Al analizar los ovocitos utilizando Microscopía confocal observamos una intensa fluorescencia en la ZP de aquellos

ovocitos incubados con pOVGP1, pOVGP1AB, rOVGP1 y pOVGP1A. Se observó ausencia de señal en los ovocitos incubados con las regiones C-terminales de OVGP1 porcina, mMBP-pOVGP1BD y mMBP-pOVGP1D. Barra: 75 μ m.

De la misma manera, las proteínas pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 expresadas en la línea celular CHO fueron capaces de unirse a la ZP de ovocitos porcinos MIV (Fig. 22).

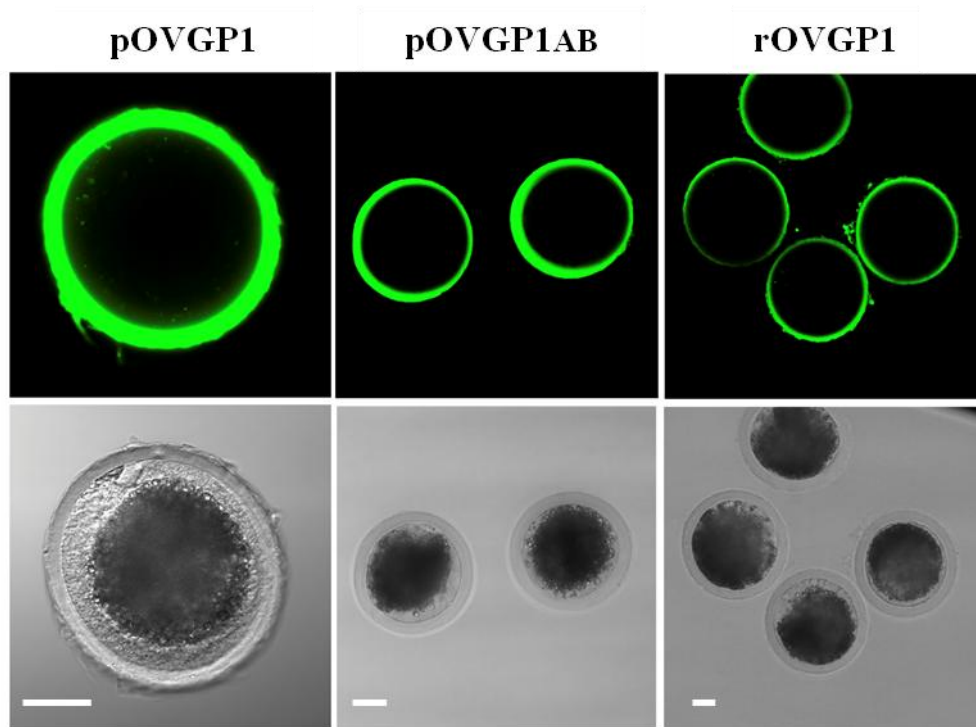


Figura 22. Proteína recombinantes OVGP1 expresadas en la línea celular CHO. Las proteínas recombinantes pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 muestran afinidad por la matriz de la ZP de ovocitos porcinos MIV. Barra: 50 μ m.

Estos resultados nos sugieren que la unión de la proteína OVGP1 a la ZP se produce por la región A del extremo N-terminal.

5.4.2. La región C-terminal de OVGP1 modula la unión a la ZP

El análisis cuantitativo de inmunofluorescencia de ovocitos porcinos MIV incubados con la misma cantidad (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de proteína recombinante pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 expresadas en células HEK 293T y purificada, mostró que pOVGP1 es capaz de penetrar más del 62 % del espesor de ZP, mientras que pOVGP1AB alcanza sólo el 50 % (**Fig. 23**). En el caso de rOVGP1, donde la región D está prácticamente ausente, la proteína se unió a la región externa de la ZP, abarcando solamente el 30 % del espesor de la matriz (**Fig. 23**). Las diferencias encontradas entre los tratamientos con las diferentes proteínas son estadísticamente significativas ($P < 0.01$).

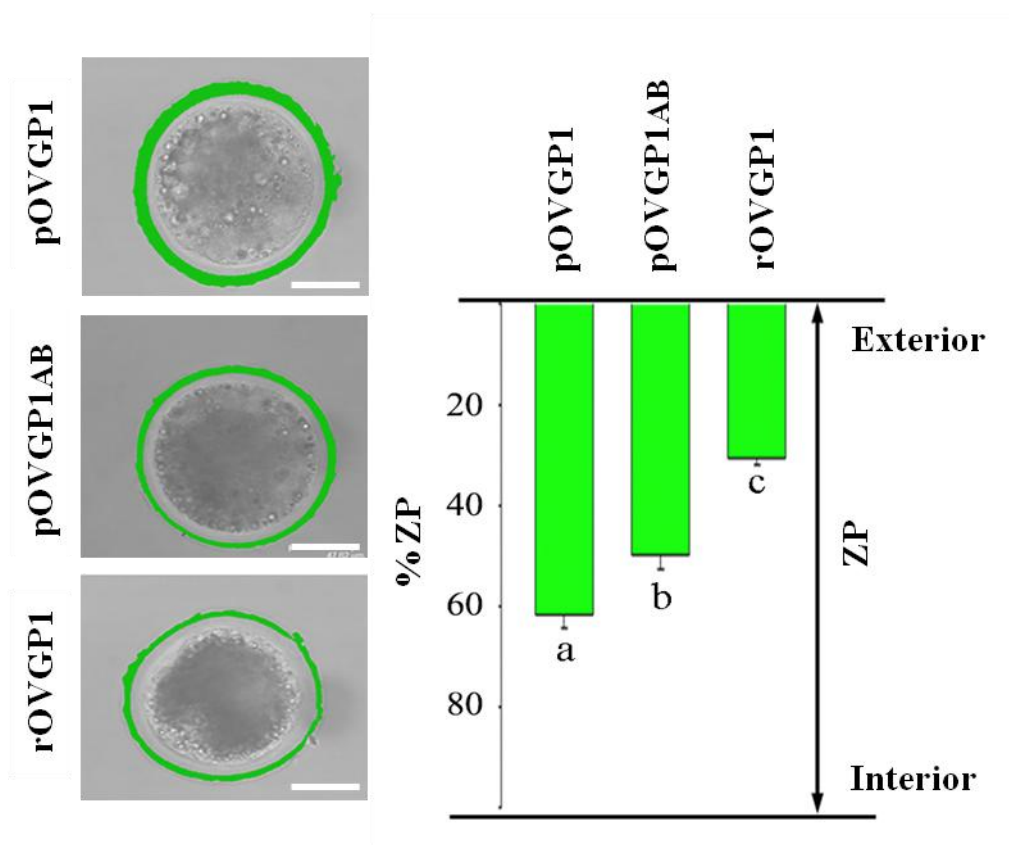


Figura 23. La región C-terminal de OVGP1 modula la unión a la ZP. Inmunofluorescencia confocal de ovocitos porcinos MIV. Gráfico y fotografías representativas de la sección media de ovocitos incubados *in vitro* con 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1. Los datos muestran el valor medio de 15 ovocitos cuantificados por análisis de imagen. Cada barra representa la media \pm Error estándar (SEM) del porcentaje de ZP reactiva. Las diferentes letras (a, b y c) muestran que existen diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos. Barra: 50 μm .

De acuerdo con estos datos, esperaríamos más cantidad de proteína retenida en la ZP de ovocitos incubados con pOVGP1 que con pOVGP1AB y rOVGP1. Para comprobarlo, realizamos tres replicados de 20 ovocitos porcinos MIV cada uno incubados con 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las tres proteínas. Posteriormente lisamos los ovocitos y los analizamos por medio de SDS-PAGE y Western-blot utilizando un anticuerpo que reconoce la secuencia de OVGP1. El análisis de imagen por densitometría de cada una de las bandas indica que las cantidades de proteínas son equivalentes en los ovocitos porcinos MIV incubados con pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 (**Fig. 24**).

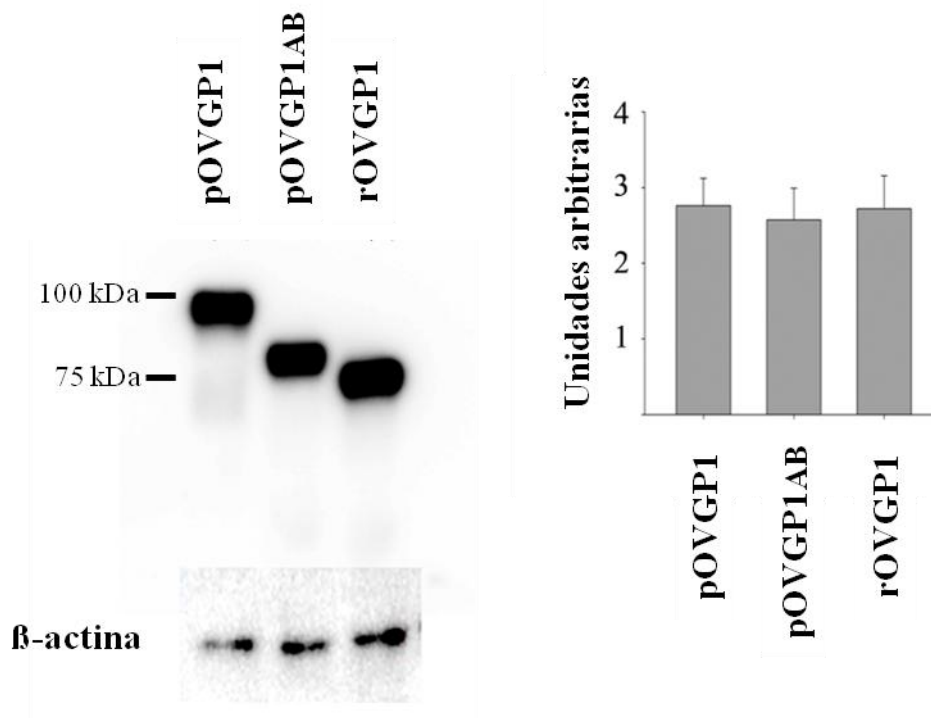
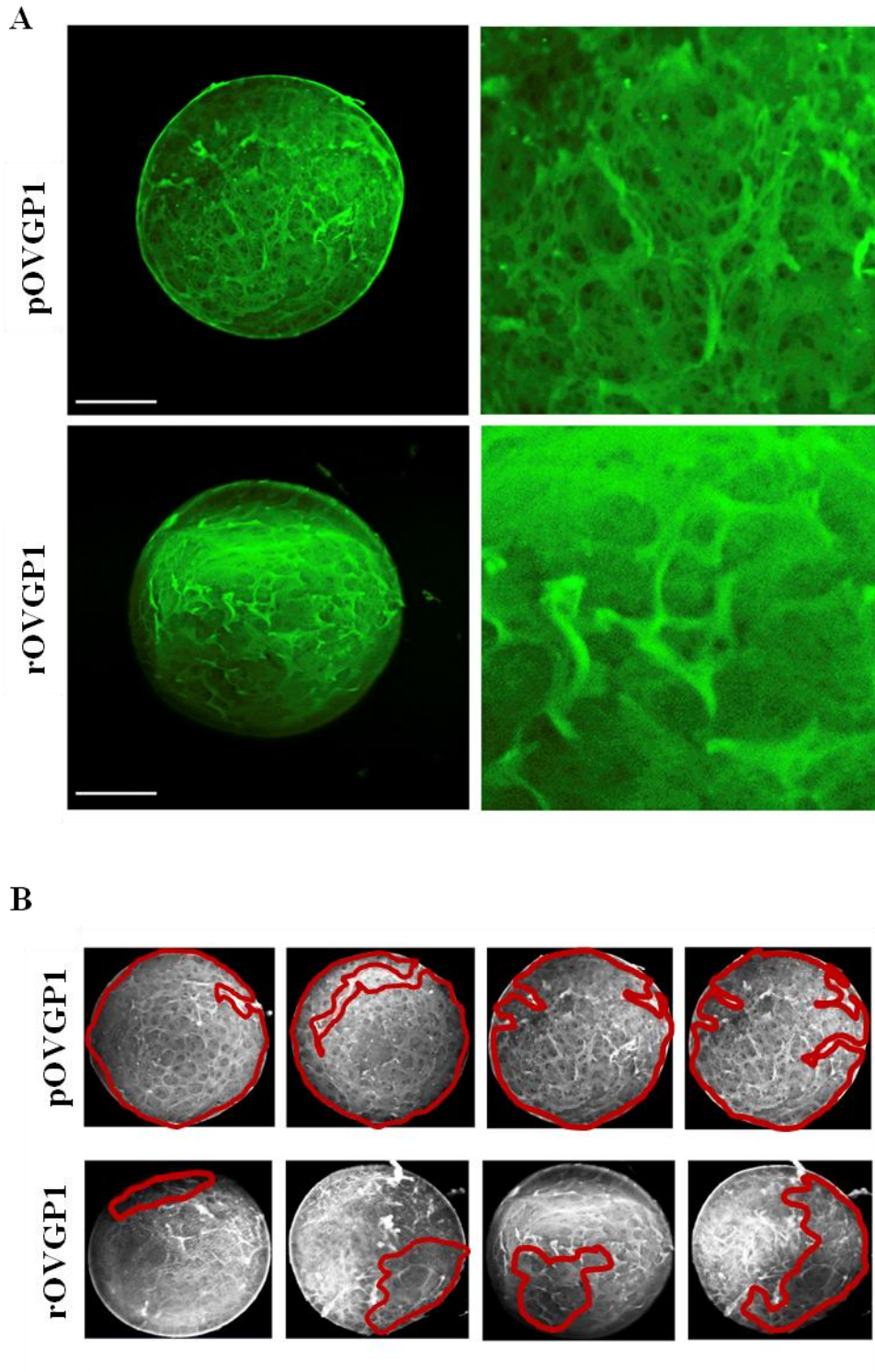


Figura 24. La ZP de ovocitos porcinos MIV retiene la misma cantidad de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1. 20 ovocitos porcinos MIV incubados con 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1, lisados y analizados por SDS-PAGE y Western-blot utilizando un anticuerpo anti-OVGP1. Se utilizó la detección de β -actina como control de carga ovocitaria. Los datos muestran la media de la cuantificación por análisis de imagen de tres replicados. Se observa que la ZP retiene la misma cantidad de proteína en los tres casos.

Estos datos sugieren que la ZP retiene la misma cantidad de proteína, incluso siendo la penetración en el espesor de la ZP diferente entre las proteínas recombinantes

testadas. Por lo tanto, los ovocitos incubados con rOVGP1 podrían presentar una capa densa de proteína en la superficie de la matriz ZP. Esta hipótesis fue confirmada al observar la superficie de la ZP utilizando microscopía confocal (**Fig. 25A**).



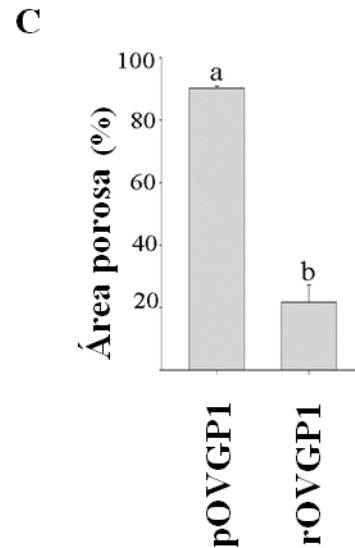


Figura 25. Superficie de la ZP de ovocitos porcinos incubados con pOVGP1 y rOVGP1. A. Análisis mediante inmunofluorescencia realizado por medio de microscopía confocal de la superficie de los ovocitos incubados con pOVGP1 y rOVGP1 a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$. Los ovocitos fueron comprimidos en el momento del montaje para poder observar la superficie de su ZP. **B.** El área enmarcada en rojo se definió como el área porosa debido a la presencia de poros oscuros en la superficie de la ZP. El análisis de imagen fue realizado utilizando el software de Leica QWin Image analysis (Leica Microsystems, Barcelona, Spain) con una evaluación a ciegas del grupo experimental. **C.** Se observa que el área porosa de la ZP de ovocitos incubados con rOVGP1 es significativamente menor que el área de los ovocitos incubados con pOVGP1 (a y b muestran diferencias significativas para $P < 0.001$). Cada barra representa la media \pm el error estándar (SEM) para el porcentaje de área porosa ($n=8$). Barra: 50 μm .

La señal fluorescente obtenida en los ovocitos MIV incubados con pOVGP1 mostró la superficie externa de ZP como una estructura similar a una malla fenestrada con numerosos poros y huecos dispuestos en la superficie, lo que era señal de que la proteína estaba integrada en la estructura tridimensional de la matriz. Por otro lado, la ZP de los ovocitos incubados con rOVGP1 mostró una superficie con muy pocas o ningún área porosa. rOVGP1 se mostró como estancada en la superficie de la matriz formando una capa de proteína que bloqueaba los poros propios de la ZP. El área porosa observada en los ovocitos incubados con pOVGP1 fue significativamente mayor que en los incubados con rOVGP1 (**Fig. 25C**).

5.5. La delección de la región D de pOVGP1 previene la endocitosis por el ovocito

Trabajos anteriores han inmunolocalizado la proteína OVGP1 asociada a microvellosidades y a la membrana plasmática de ovocitos oviductales no fecundados, además de a la membrana de las blastómeras de embriones en diferentes especies (Boice *et al.*, 1990b, Gandolfi *et al.*, 1991, Buhi *et al.*, 1993). Además, la presencia de OVGP1 en cuerpos multivesiculares de embriones preimplantacionales (Kan *et al.*, 1993) sugiere la existencia de una ruta endocítica de OVGP1.

Se observó un marcaje específico, mediante inmunofluorescencia (IF) con un anticuerpo anti-histidina y análisis mediante microscopía confocal, en la corteza del ooplasma de ovocitos porcinos MIV incubados con pOVGP1 y permeabilizados (**Fig. 26**). No se detectó marcaje semejante en los ovocitos incubados con pOVGP1AB. Los depósitos de grasa que contiene el citoplasma del ovocito porcino obstruyeron parcialmente la visualización.

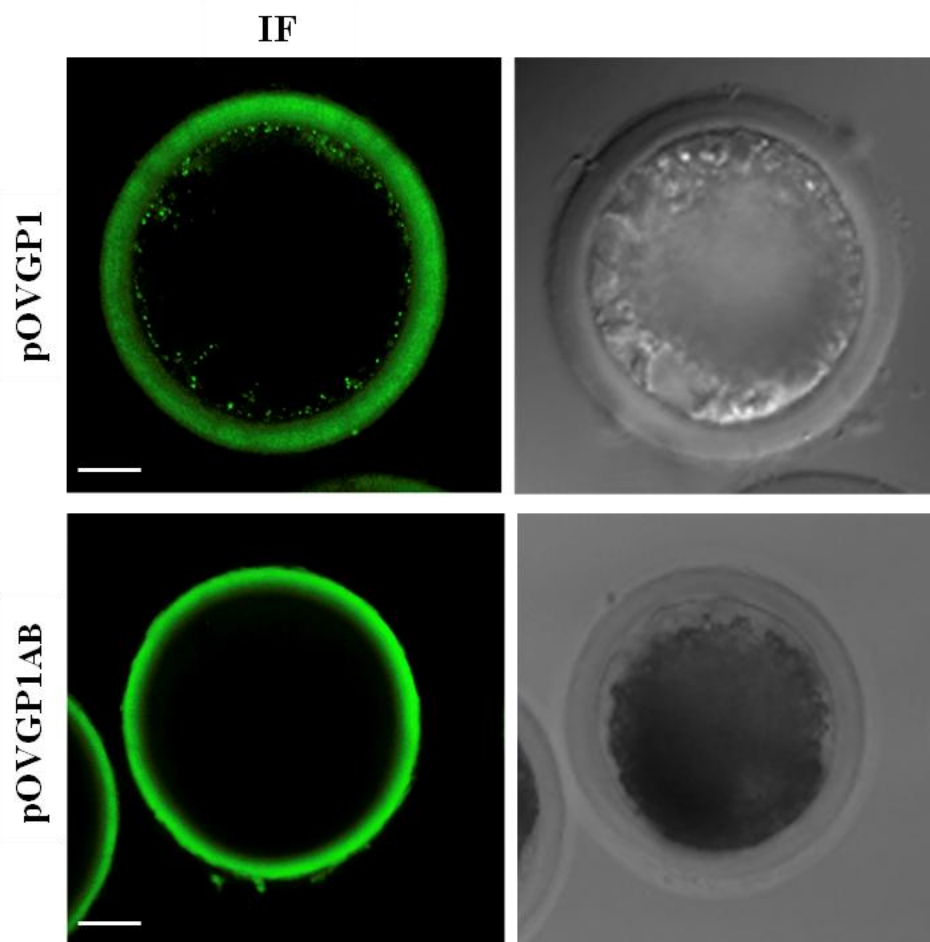
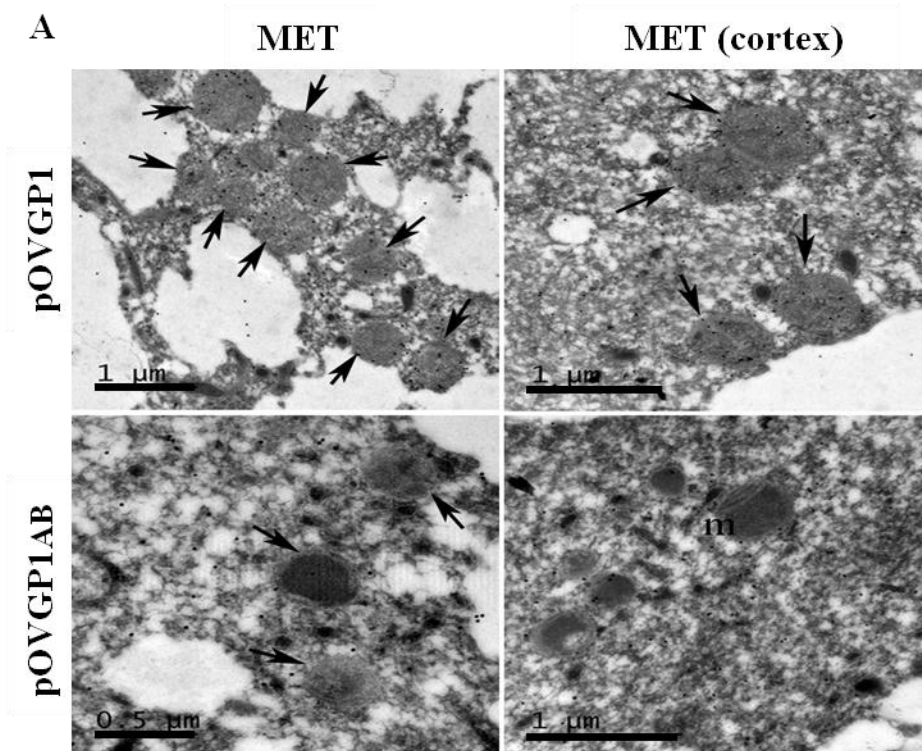


Figura 26. pOVGP1 es endocitada por ovocitos porcinos MIV. Ovocitos porcinos MIV incubados con pOVGP1 y pOVGP1AB fueron fijados y permeabilizados. Se detectó un marcaje específico en el cortex del citoplasma de los ovocitos incubados con pOVGP1 mediante inmunofluorescencia (IF) con un anticuerpo anti-histidina y análisis con microscopía confocal. Sin embargo, no se detectó señal en el citoplasma de los ovocitos incubados con pOVGP1AB. Barra: 30 μm .

Mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET) y utilizando un anticuerpo anti-OVGP1 se observó la proteína pOVGP1 en cuerpos multivesiculares localizados en el interior del ovocito y en el cortex del mismo (**Fig. 27A**). También se detectó pOVGP1 unida a la ZP ovocitaria (**Fig. 27B**). No hubo marcaje en los gránulos corticales del ovocito (**Fig. 27B**). En los ovocitos incubados con pOVGP1AB no se detectó la proteína en ninguna región del citoplasma.



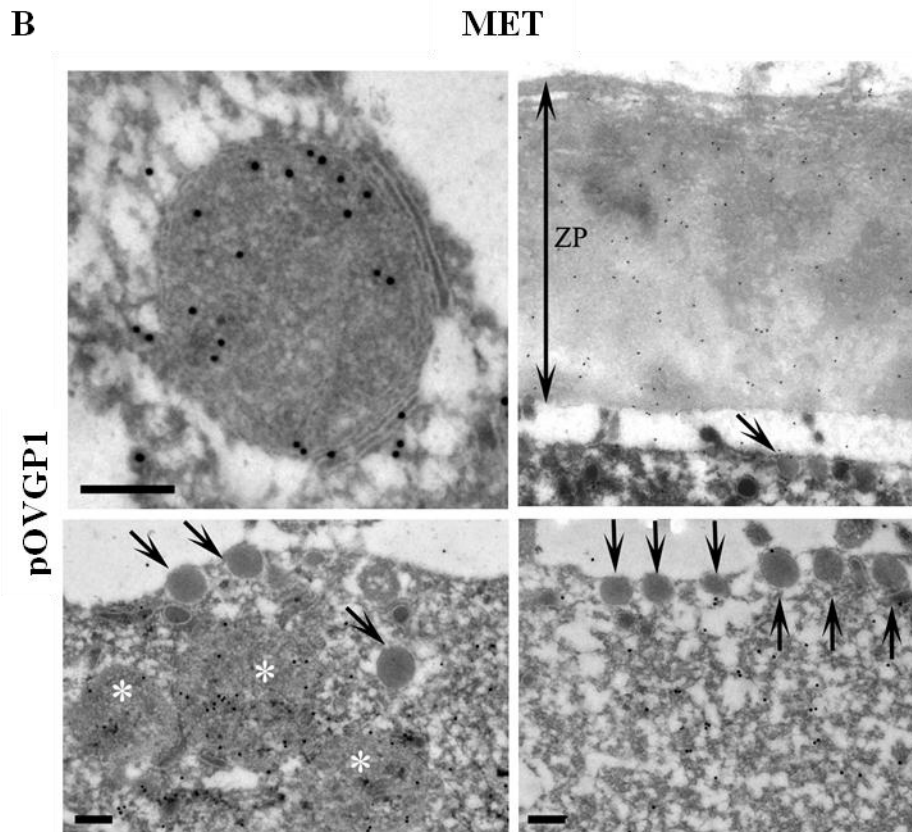


Figura 27. pOVGP1 es endocitada por ovocitos porcinos MIV. Ovocitos porcinos MIV incubados con pOVGP1 y pOVGP1AB fueron fijados y permeabilizados. **A.** Utilizando microscopía electrónica de transmisión (MET) y un anticuerpo anti-OVGP1, se detectó pOVGP1 en el interior de cuerpos multivesiculares (flechas) localizados en el interior del ovocito y en el cortex. No se detectó inmunoreactividad en otros orgánulos celulares. m = mitocondria. **B:** Detalle de MET de ovocitos incubados con pOVGP1. Arriba a la izquierda se muestra, con mayor aumento, un cuerpo multivesicular específicamente marcado. Arriba a la derecha se muestra que pOVGP1 también fue detectada en la ZP, siendo el marcaje de los gránulos corticales negativo (flecha). En las imágenes inferiores aparece un detalle de cuerpos multivesiculares específicamente marcados (*) y gránulos corticales con marcaje negativo (flechas) Barra: 0.25 μ m.

Los datos mostrados mediante IF y MET sugieren que pOVGP1 es endocitada por el ovocito. Además, incubaciones con pOVGP1 a tiempos crecientes (15 min, 30 min y 1 h) muestran una acumulación de la misma en el ovocito dependiente del tiempo. A los 15 y 30 min se observa proteína unida a la región externa de la ZP y a nivel de la membrana plasmática. Al cabo de 1 h, se localiza pOVGP1 en todo el espesor de ZP, en la membrana plasmática y acumulada en el citoplasma del ovocito (**Fig. 28**). Estos datos nos hacen pensar que la proteína por un lado es retenida en la ZP y por otro, difunde a través de la matriz para unirse con la membrana plasmática.

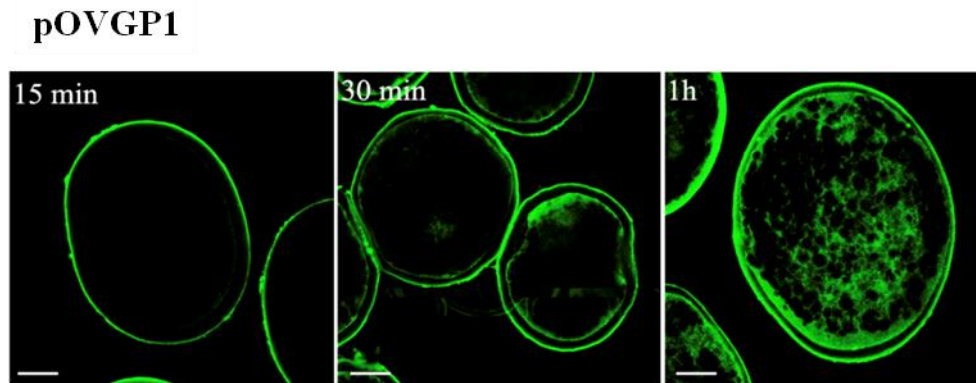


Figura 28. La endocitosis de pOVGP1 por ovocitos porcinos MIV es dependiente del tiempo. 15 ovocitos incubados con pOVGP1 durante 15 min, 30 min y 1h en medio con pOVGP1 fueron analizados mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-histidina. Los ovocitos fueron comprimidos con el cubreobjetos durante el montaje para mejorar la visualización del interior del ovocito utilizando el microscopio confocal, debido a la existencia de depósitos de grasa que dificultaban la visualización. Se observó una endocitosis de pOVGP1 dependiente del tiempo. Barra: 20 μ m.

Sin embargo, no se detecta señal en el interior del ovocito cuando estos son incubados con pOVGP1AB, donde el dominio D se ha eliminado (**Fig. 22**). Tampoco se observa señal fluorescente cuando los ovocitos se incuban con pOVGP1A, mMBP-pOVGP1BD y mMBP-pOVGP1D (**Fig. 29**).

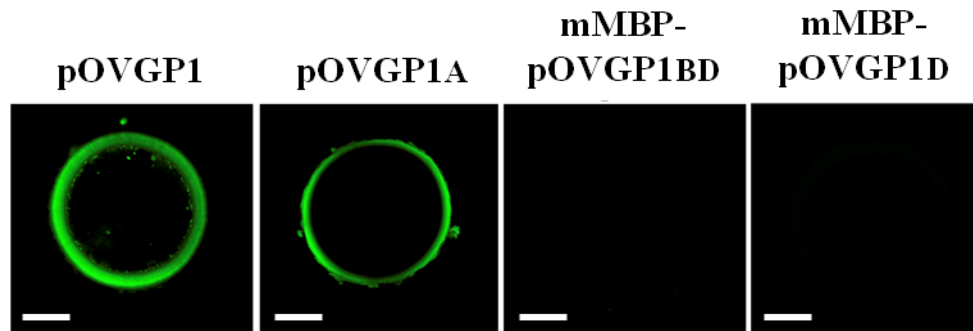


Figura 29. Las regiones recombinantes de OVGP1 aisladas no son endocitadas por ovocitos porcinos MIV. Ovocitos incubados con pOVGP1, pOVGP1A, mMBP-pOVGP1BD y mMBP-pOVGP1D fueron fijados y permeabilizados, tras lo cual se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-histidinas. Se observa marcaje únicamente en el citoplasma de los ovocitos incubados con pOVGP1 y en la ZP de los ovocitos incubados con pOVGP1 y pOVGP1A. Barra: 50 μ m.

5.6. Efecto de las proteínas OVGP1 recombinantes sobre la resistencia de la ZP frente a la digestión proteolítica

La ZP de ovocitos porcinos recogidos de oviductos, o después de ser tratados con FO, es más resistente a ser digerida por la enzima proteolítica pronasa que los ovocitos ováricos, siendo resistente a la digestión durante un periodo de tiempo de entre 1-8 horas (Kolbe *et al.*, 2005, Coy *et al.*, 2008a). Para determinar si este efecto se debe a OVGP1 y conocer las implicaciones que tiene el extremo C-terminal de la proteína en esta resistencia, se procedió a incubar ovocitos porcinos MIV durante 1 h con diferentes concentraciones de proteínas OVGP1 recombinantes.

La incubación se realizó a una concentración de 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ de pOVGP1 y pOVGP1AB. La ZP de los ovocitos expuestos a pOVGP1 a 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ fue digerida por la enzima pronasa en 24 (24.14 ± 3.32 min) y 102 min (102 ± 11.39 min) respectivamente (**Fig. 30**). Estos resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparándolo con el control (2.13 ± 0.14). Mientras que en el caso de ovocitos expuestos a pOVGP1AB, la resistencia de ZP frente a la proteólisis se incrementó hasta 112 (125 $\mu\text{g/ml}$, 112.52 ± 25.58 min) y 464 min (250 $\mu\text{g/ml}$, 464.90 ± 73.48 min) respectivamente (**Fig.30**), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparándolo con el control.

El FO de coneja es el que más incrementa la resistencia de la ZP en todas las especies testadas (Mondejar *et al.*, 2013a), por lo que las concentraciones elegidas de la proteína rOVGP1 (5, 50 y 125 $\mu\text{g/ml}$) son inferiores a las utilizadas para pOVGP1 y pOVGP1AB, además del hecho de que al utilizar concentraciones superiores de rOVGP1 se producía la lisis de los ovocitos. En nuestro caso, la ZP de ovocitos incubados con rOVGP1 mostró tiempos de digestión de 6.35 ± 0.81 min (5 $\mu\text{g/ml}$), 312.21 ± 63.14 min (50 $\mu\text{g/ml}$) y 989.50 ± 151.41 min (125 $\mu\text{g/ml}$) (**Fig. 30**), siendo los dos últimos valores diferentes significativamente ($p < 0.05$) con respecto al control.

Se observa que existen diferencias significativas al comparar entre si las diferentes concentraciones utilizadas con cada una de las proteínas recombinantes, sugiriendo un efecto dependiente de la concentración de OVGP1 sobre la resistencia de la ZP frente a la digestión proteolítica (**Fig. 30**).

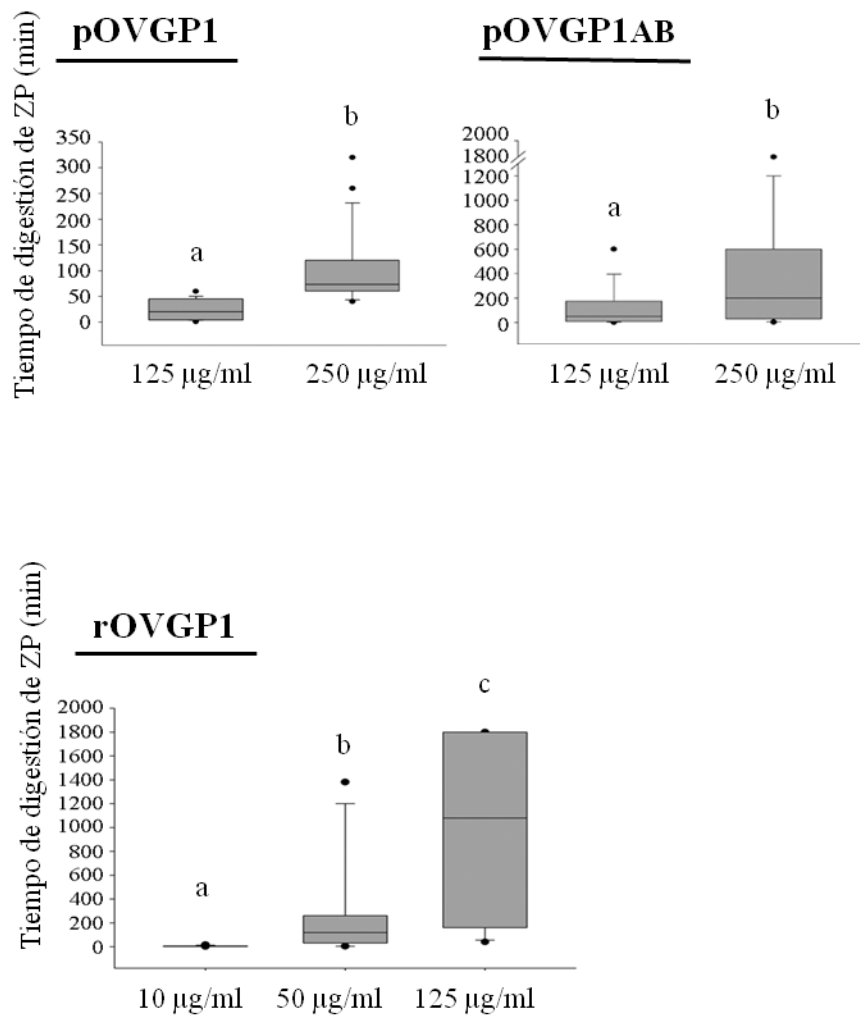


Figura 30. Efecto de la longitud del extremo C-terminal de OVGP1 sobre la resistencia de la ZP a la digestión por proteasa. Ovocitos porcinos MIV fueron incubados en 125 and 250 µg/mL (pOVGP1, pOVGP1AB) y 10, 50 and 125 µg/mL (rOVGP1) durante 1h antes de ser transferidos a una solución de pronasa 0.5 % en PBS. Los diagramas de caja representan la media (línea horizontal) y los datos que se encuentran entre el percentil 10 y 90 (barras de error) del tiempo de digestión de la ZP. Las cajas incluyen los dos cuartiles centrales. Los valores atípicos son representados por puntos. Cada experimento fue realizado por triplicado utilizando una n=20-30 ovocitos por grupo. ANOVA de una vía y test de Turkey de comparaciones múltiples. Diferentes letras (a, b y c) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Podemos afirmar que, a la misma concentración de proteína OVGP1, la pérdida de la región D en el extremo C-terminal (pOVGP1AB) produce una mayor resistencia a la digestión proteolítica de la ZP con pronasa que la que se observa con la secuencia completa (pOVGP1) (**Fig. 31**).

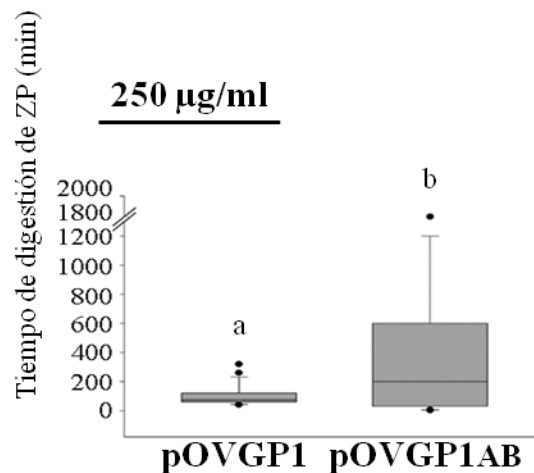


Figura 31. Efecto de pOVGP1 y pOVGP1AB sobre la resistencia de la ZP al tratamiento con pronasa. Las proteínas se incuban a una concentración de 250 µg/mL. Los diagramas de caja representan la media (línea horizontal) y los datos que se encuentran entre el percentil 10 y 90 (barras de error) del tiempo de digestión de la ZP. Las cajas incluyen los dos cuartiles centrales. Los valores atípicos son representados por puntos. Cada experimento fue realizado por triplicado utilizando una n=20-30 ovocitos por grupo. ANOVA de una vía y test de Turkey de comparaciones múltiples. Diferentes letras (a y b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el caso de ovocitos expuestos a rOVGP1, se observó el mismo efecto que el descrito para el FOC (Mondejar *et al.*, 2013a), siendo la proteína que más resistencia frente a pronasa produce en la ZP (**Fig. 32**). Algunas ZPs de ovocitos tratados con rOVGP1 alcanzaron más de 2 días de resistencia a la digestión proteolítica.

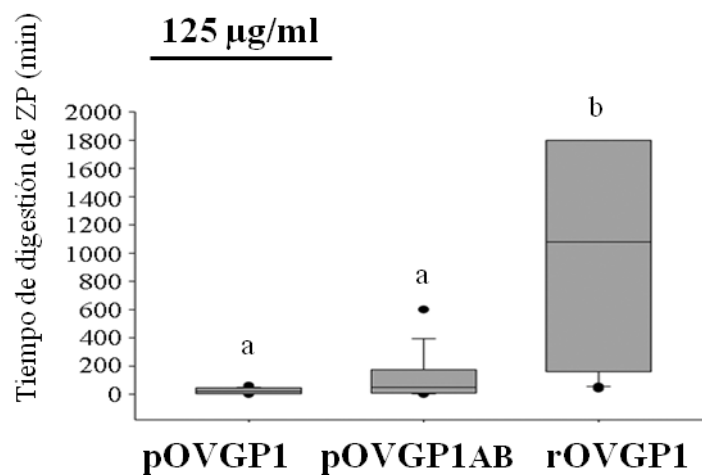


Figura 32. Comparación del efecto sobre la resistencia de la ZP a ser digerida por pronasa de diferentes proteínas OVGP1 a la misma concentración. Los ovocitos son incubados con las proteínas OVGP1 de coneja (rOVGP1), porcina completa (pOVGP1) y porcina truncada (pOVGP1AB) en su región C-terminal a 125 µg/mL. Los diagramas de caja representan la media (línea horizontal) y los datos que se encuentran entre el percentil 10 y 90 (barras de error) del tiempo de digestión de la ZP. Las cajas incluyen los dos cuartiles centrales. Los valores atípicos son representados por puntos. Cada experimento fue realizado por triplicado utilizando una n=20-30 ovocitos por grupo. ANOVA de una vía y test de Turkey de comparaciones múltiples. Diferentes letras (a y b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

5.7. Efecto de la proteína OVGP1 sobre la fecundación

Se realizó una comparación de los parámetros de fecundación *in vitro* (FIV) entre ovocitos porcinos MIV expuestos a las diferentes proteínas OVGP1 recombinantes (expresadas en células HEK 293T y purificadas) antes y durante el proceso de FIV. Estos datos se comparan con los obtenidos con ovocitos no expuestos a OVGP1, que se considera como grupo control.

El uso de pOVGP1 en FIV produce un incremento significativo del porcentaje de monospermia obtenido (21.82 ± 5.62) en comparación con rOVGP1 (8.60 ± 2.92) y pOVGP1AB (7.14 ± 2.61). El porcentaje de monospermia de los ovocitos expuestos a rOVGP1 y pOVGP1AB fue similar al grupo control (8.25 ± 2.80) (**Fig. 33**). Sin embargo, no se observan diferencias en el porcentaje de penetración y el número de espermatozoides unidos a la ZP de ovocitos expuestos a las diferentes proteínas recombinantes y al control (**Fig. 33**).

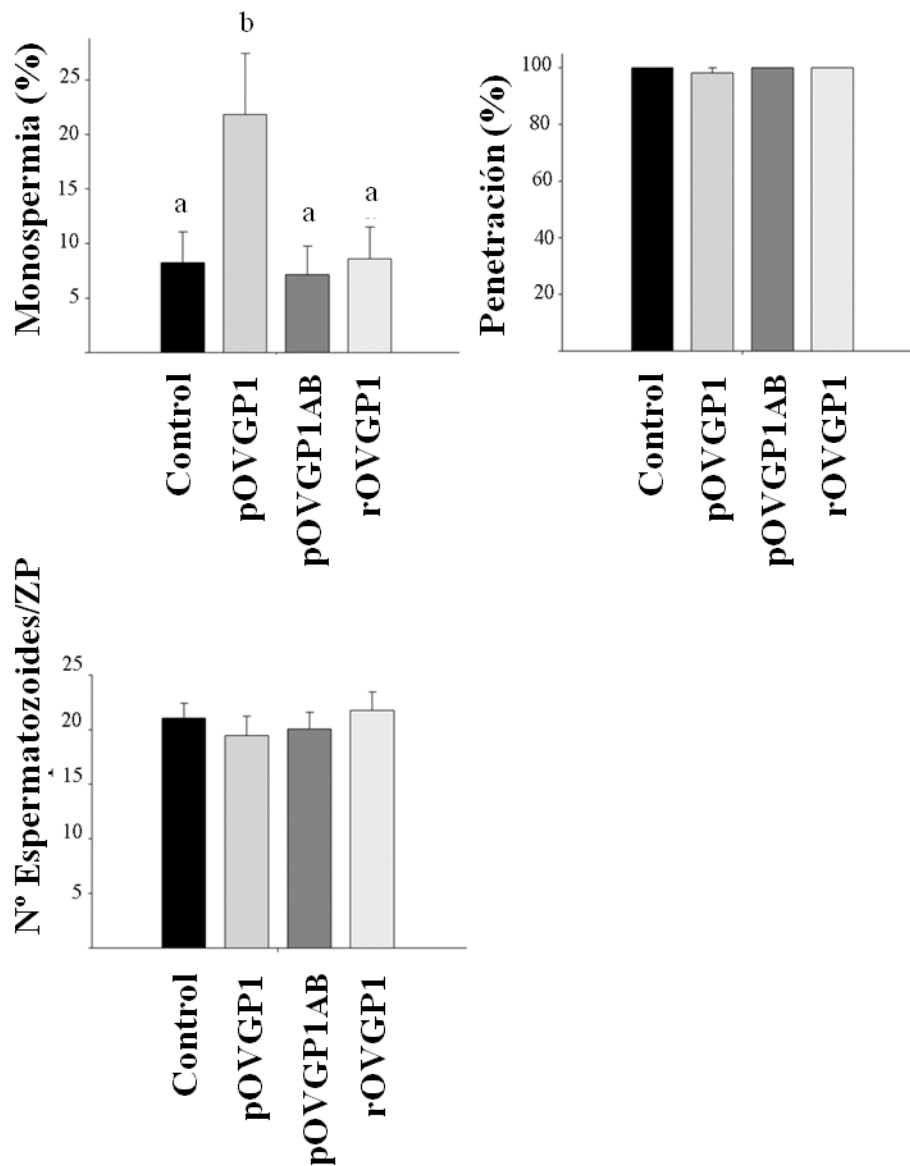


Figura 33. Efecto de la incubación de las proteínas OVGP1 recombinantes con ovocitos porcinos MIV en los parámetros de FIV. Se evalúa los parámetros penetración, monospermia y número de espermatozoides unidos a la ZP en el sistema de FIV porcino. Cada barra representa la media \pm el error estándar (SEM) para cada parámetro. Los experimentos se realizan por triplicado. En cada replicado se utilizan 20-30 ovocitos por grupo. Solamente se observa diferencia significativa en la tasa de monospermia de los ovocitos tratados con pOVGP1. ANOVA de una vía y test de Turkey de comparaciones múltiples. Las letras (a y b) indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Estos resultados nos muestran que sólo pOVGP1 es capaz de incrementar el rendimiento del sistema de FIV (porcentaje de ovocitos penetrados de manera monospermica y eficiencia de fecundación), que fue del 23 %, siendo alrededor del 8 % en los ovocitos expuestos al resto de proteínas recombinantes y al control (**Fig. 34**).

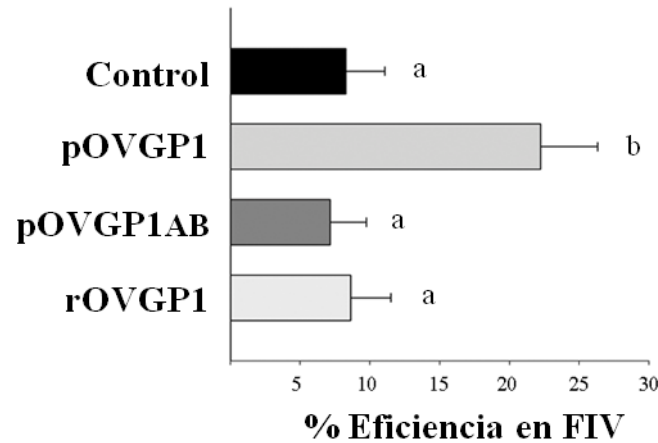


Figura 34. Resultados del sistema porcino de FIV utilizando las proteínas OVGP1 recombinantes pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1. Se representa el porcentaje de ovocitos penetrados que fueron monospermicos. Cada barra representa la media \pm el error estándar (SEM) para cada parámetro. ANOVA de una vía y test de Turkey de comparaciones múltiples. Las letras (a y b) indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Un dato importante a tener en cuenta es si las proteínas recombinantes están presentes en la ZP de los ovocitos en el momento de la FIV. Por ello, parte de los ovocitos incubados con las proteínas OVGP1 recombinantes son fijados y visualizados utilizando microscopía confocal justo después de hacer la FIV, tras la realización de la técnica inmunocitoquímica. Así, se observa que las tres proteínas recombinantes testadas (pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1) están presentes en la ZP de los ovocitos porcinos MIV (**Fig. 35**).

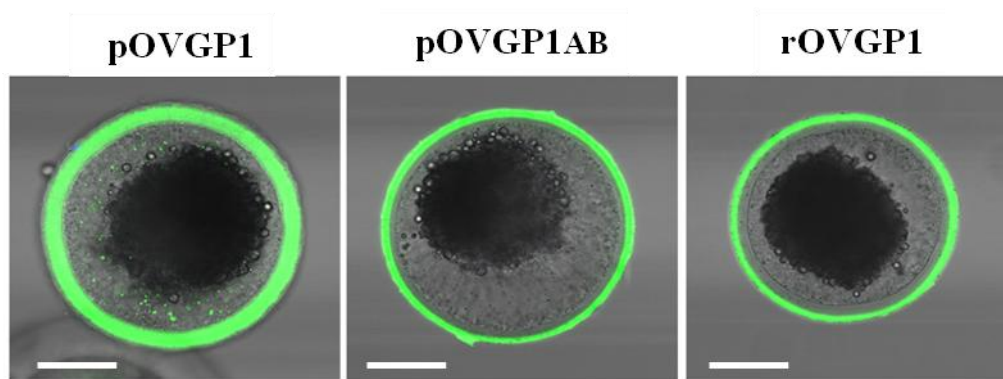


Figura 35. Las proteínas OVGP1 recombinantes estaban presentes en la ZP de los ovocitos porcinos MIV utilizados para realizar la FIV. Inmunofluorescencia de ovocitos porcinos tratados con pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 fijados justo después de hacer la FIV. Aparece señal en la ZP de los ovocitos tratados con las tres proteínas, pero sólo en aquellos que fueron tratados con pOVGP1 aparece señal en el citoplasma. Barra: 50 μ m.

5.8. Análisis homólogo y heterólogo entre proteínas OVGP1 recombinantes y ZP de diferentes especies

5.8.1. Unión homóloga y heteróloga de proteínas OVGP1 recombinantes a la ZP

Se analizó la presencia de unión homóloga y heteróloga entre las distintas proteínas OVGP1 y los ovocitos de diferentes especies (cerda, vaca y ratona) por medio de microscopía confocal de los ovocitos previamente incubados con las proteínas OVGP1 recombinantes porcina y de coneja a 125 μ g/mL, fijados y analizados mediante inmunohistoquímica. Se hicieron tres replicados del experimento, siendo el número de ovocitos utilizado en cada grupo de cada replicado de entre 5 y 15, según la disponibilidad (sobre todo teniendo en cuenta la baja disponibilidad en caso de ovocitos humanos).

Se detectó pOVGP1 en la ZP de ovocitos porcinos y bovinos MIV y también en la ZP de ovocitos de ratón (**Fig. 36**). rOVGP1 también fue detectada unida a la ZP de los ovocitos porcinos y bovinos MIV y ovocitos de ratón, mostrando una señal fluorescente intensa (**Fig. 36**).

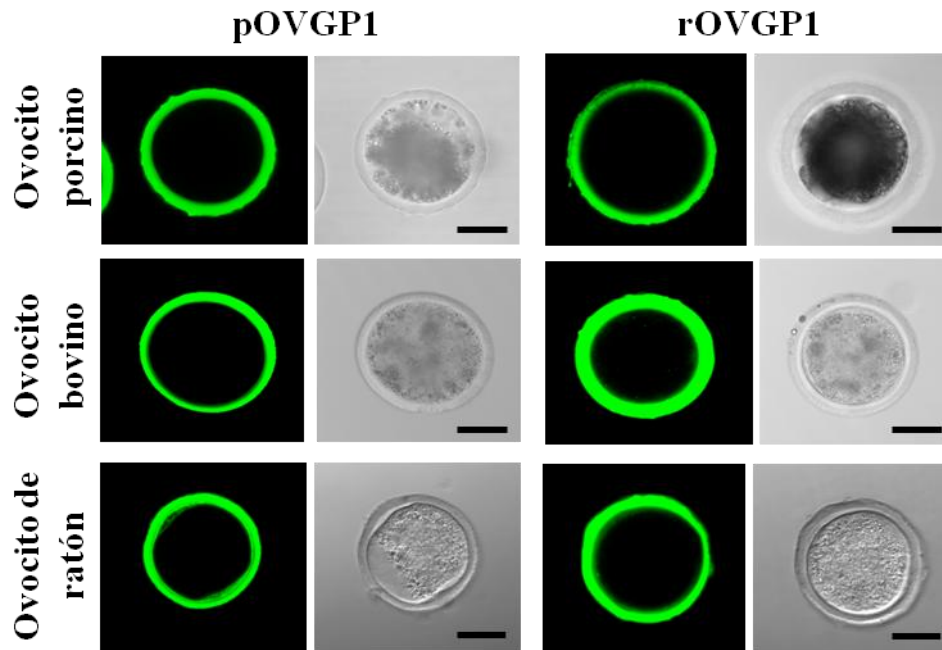


Figura 36. Inmunocitoquímica de fluorescencia tras la incubación homóloga y heteróloga de ovocitos y proteínas OVGP1 de diferentes especies. Incubación de pOVGP1 y rOVGP1 con ovocitos porcinos, bovinos y de ratón.

5.8.2. Efecto de las proteínas OVGP1 sobre la resistencia a la digestión proteolítica de la ZP de ovocitos de varias especies

Se incubaron ovocitos porcinos y bovinos MIV con las proteínas recombinantes OVGP1 porcina y de coneja a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ durante 60 min a 38.5 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se procedió a analizar la resistencia frente a digestión proteolítica de la ZP de los mismos utilizando una solución de pronasa al 0.5 % diluida en PBS.

Al tratar ovocitos porcinos MIV con pOVGP1 observamos un tiempo de digestión de la ZP de 24.13 ± 3.32 min (**Fig. 30**). En el caso de ovocitos bovinos, el tiempo de digestión fue de 53.09 ± 12.28 min (**tabla 6**). Se producen diferencias significativas en el endurecimiento de la ZP al utilizar pOVGP1 en la incubación de ovocitos porcinos y bovinos, comparados con el control ($p < 0.05$).

Cuando utilizamos rOVGP1 en la incubación de ovocitos previa al tratamiento con pronasa, observamos que el tiempo de digestión de la ZP de ovocitos porcinos fue de 989.5 ± 151.41 min (**Fig. 30**) y el de ovocitos bovinos 912 ± 224.86 (**tabla 6**).

Podemos afirmar que rOVGP1 incrementa la resistencia frente a la digestión proteolítica mediada por la enzima pronasa de manera estadísticamente significativa en ovocitos porcinos y bovinos MIV, comparándolos con el control ($p < 0.05$).

Tabla 6. Se muestran resultados de inmunofluorescencia (IF) y resistencia de ZP frente a la digestión proteolítica de la enzima pronasa al 0.5 % (RDE ZP) de ovocitos porcinos y bovinos tratados con pOVGP1 y rOVGP1. Se muestra que se ha detectado señal fluorescente en la ZP del ovocito (IF +) y si la ZP ha adquirido resistencia frente a la digestión proteolítica (RDE ZP +). Entre paréntesis, el tiempo de digestión obtenido de cada grupo de ovocitos (media \pm SEM). n= número de ovocitos tratados con pronasa en cada grupo.

	pOVGP1	rOVGP1
Ovocitos porcinos (Control endurecimiento de ZP 2.12 ± 0.14 min)	IF + RDE ZP + * (24.13 ± 3.32 min) n= 37	IF + RDE ZP + * (989.5 ± 151.41 min) n= 30
Ovocitos bovinos (Control endurecimiento de ZP 4.87 ± 0.59 min)	IF + RDE ZP + * (53.09 ± 12.28) n= 11	IF + RDE ZP + * (912 ± 224.86) n= 10

ANOVA de una vía. * muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo experimental y su control.

5.9. Efecto de la proteína pOVGP1 sobre el desarrollo embrionario bovino

5.9.1. Efecto de la suplementación con pOVGP1 en la FIV

La suplementación del medio de FIV bovino con pOVGP1 (día 0) no tuvo ningún efecto en la tasa de división embrionaria ni en el rendimiento de blastocistos obtenidos en la FIV. No se observó ningún efecto dependiente de la concentración. La tasa de división obtenida fue de entre 78.97 y 84.59 % y el rendimiento de blastocistos obtenidos en la FIV a día 9 de entre 20.28 a 27.55 % (**tabla 7**).

Tabla 7. Efecto de la suplementación con 10 o 50 µg/mL de pOVGP1 durante la fecundación *in vitro* (día 0) en el desarrollo embrionario bovino. El rendimiento de blastocistos se analizó en día 7, 8 y 9 del cultivo embrionario (D7, D8 y D9 respectivamente).

Grupos	N	División X ± S.E.M. (%) (n)	Rendimiento blastocistos		
			D7 X ± S.E.M. (%) (n)	D8 X ± S.E.M. (%) (n)	D9 X ± S.E.M. (%) (n)
Control	141	84.59±3.18 (119)	15.25±4.91 (21)	17.25±3.10 (24)	20.85±3.84 (29)
FIV 10	189	78.97±6.07 (146)	16.89±3.82 (30)	22.65±5.36 (40)	27.55±4.03 (50)
FIV 50	151	82.22±1.76 (124)	8.99±4.52 (13)	16.21±4.17 (24)	20.28±5.50 (30)

X=media. SEM= error estándar. El experimento se realizó por triplicado. N= número total de presuntos cigotos en cultivo. ANOVA de una vía ($P > 0.05$).

Para comprobar la actividad de la proteína recombinante pOVGP1 se fijaron los cigotos putativos justo después de la FIV y pudimos observar marcaje específico en su ZP, siendo más intenso en aquellos que habían sido incubados con 50 µg/mL de pOVGP1 (**Fig. 37**).

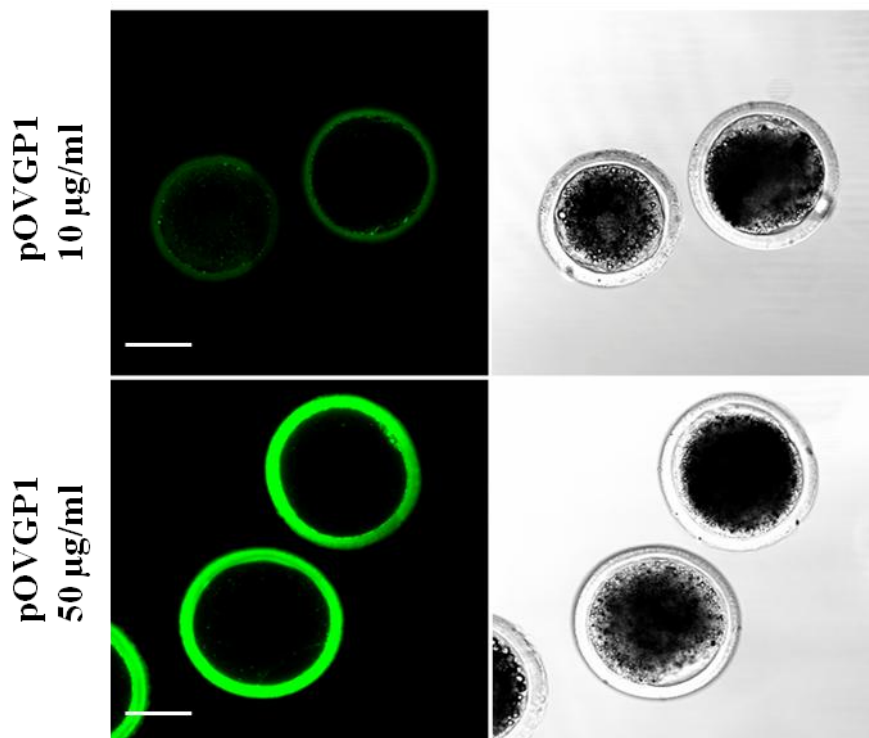


Figura 37. Inmunofluorescencia de cigotos putativos tras FIV suplementada con 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1. Tras la FIV los cigotos putativos fueron fijados, tras lo cual se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-histidinas. Observamos marcaje en la ZP de ambos grupos, siendo más intensa en el caso del tratamiento con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Barra: 50 μm .

5.9.2. Efecto de la suplementación con pOVGP1 en el CIV

Al suplementar durante el CIV bovino con pOVGP1, la tasa de división observada fue similar entre todos los grupos, con unos valores que van desde 83.59 a 84.59 % (**tabla 8**). Sin embargo, el rendimiento de blastocistos fue superior en el grupo CIV 50 (28.09 ± 3.62) comparándolo con el grupo control y con el tratado en cultivo con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CIV 10) (20.85 ± 3.84 y 18.22 ± 2.68 , respectivamente). Aunque no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en la tasa de división embrionaria ni en el rendimiento de los blastocistos (siendo $p > 0.05$), si se observó una tendencia positiva ($p = 0.067$) en el rendimiento de los blastocistos cuando se suplementó con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1 (CIV 50) (**tabla 8**).

Tabla 8. Efecto de la suplementación con 10 o 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1 durante el cultivo embrionario temprano *in vitro* (día 1-3.5) en el desarrollo embrionario. El rendimiento de blastocistos se analizó en día 7, 8 y 9 del cultivo embrionario (D7, D8 y D9 respectivamente).

Grupos	N	División X \pm S.E.M. (%) (n)	Rendimiento de blastocistos		
			D7 X \pm S.E.M. (%) (n)	D8 X \pm S.E.M. (%) (n)	D9 X \pm S.E.M. (%) (n)
Control	141	84.59 \pm 3.18 (119)	15.25 \pm 4.91 (21)	17.25 \pm 3.10 (24)	20.85 \pm 3.84 ^{a*} (29)
CIV 10	147	84.51 \pm 2.53 (124)	13.49 \pm 3.37 (20)	16.11 \pm 3.92 (24)	18.22 \pm 2.68 (27)
CIV 50	150	83.59 \pm 4.25 (125)	15.96 \pm 4.85 (24)	23.51 \pm 5.05 (35)	28.09 \pm 3.62 ^a (42)

X=media. SEM= error estándar. El experimento se realizó por triplicado. N= número total de presuntos cigotos en cultivo. ANOVA de una vía ($P > 0.05$)^{*1} $P = 0.067$

5.9.3. Efecto de la suplementación con pOVGP1 en FIV+CIV

Observamos que el uso de pOVGP1 como suplemento durante la FIV y CIV fue perjudicial para el desarrollo embrionario a altas dosis. La tasa de división fue similar entre el grupo control, el grupo en que se utilizó el suplemento de 10 µg/mL tanto en FIV como en CIV (FIV+CIV 10) y en el que se utilizó a 50 µg/mL en ambos (FIV+CIV 50) (84.59±3.18, 85.11±7.29 y 79.57±1.54 %, respectivamente). Por el contrario, la tasa de blastocistos a día 9 descendió de manera drástica en el grupo FIV+CIV 50 comparado con el grupo FIV+CIV 10 y con el control (12.65±0.92 vs. 24.20±2.23 y 20.83±3.84 %, respectivamente; P<0.05) (**tabla 9**). Se debe poner de manifiesto que sí observamos una tendencia positiva en el porcentaje de blastocistos obtenidos a día 8 y 9 al comparar el grupo FIV+CIV 10 con el control, con unos valores de p=0.051 a día 8 y p=0.058 a día 9.

Tabla 9. Efecto durante la fecundación *in vitro* y el cultivo embrionario temprano *in vitro* (día 0-3.5) de la suplementación con 10 o 50 µg/mL de pOVGP1 en el desarrollo embrionario. El rendimiento de blastocistos se analizó en día 7, 8 y 9 del cultivo embrionario (D7, D8 y D9 respectivamente).

Grupos	N	División X ± S.E.M. (%) (n)	Rendimiento de blastocistos		
			D7 X ± S.E.M. (%) (n)	D8 X ± S.E.M. (%) (n)	D9 X ± S.E.M. (%) (n)
Control	141	84.59±3.18 (119)	15.25±4.91 (21)	17.25±3.10 ^{a*1} (24)	20.85±3.84 ^{a*2} (29)
FIV + CIV 10	194	85.11±7.29 (164)	15.17±2.41 (28)	20.10±1.93 ^a (38)	24.20±2.23 ^a (46)
FIV + CIV 50	201	79.57±1.54 (159)	6.90±0.35 (14)	10.51±0.22 ^b (21)	12.65±0.92 ^b (26)

X=media. SEM= error estándar . N= número total de presuntos cigotos en cultivo. ANOVA de una vía (P< 0.05) ^{*1} P=0.051, ^{*2} P= 0.058

El tratamiento con pOVGP1 se realizó hasta el día 3.5 de cultivo, cuando se procedió a retirar la proteína del medio en todos los grupos, produciéndose el cultivo de los embriones hasta día 9 sin la presencia de OVGP1 en el medio. Al final del ensayo, únicamente se detectó la presencia de pOVGP1 en los blastocistos (día 9) que habían sido tratados con 50 µg/mL de pOVGP1 durante el CIV, apareciendo una débil señal en los tratados con esta concentración de proteína en la FIV, pero no en el CIV (**Fig. 37**).

En el resto de blastocistos, tratados con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1 durante la FIV, el CIV o ambos procesos, no se detectó la presencia de pOVGP1 en los mismos (**Fig. 38**).

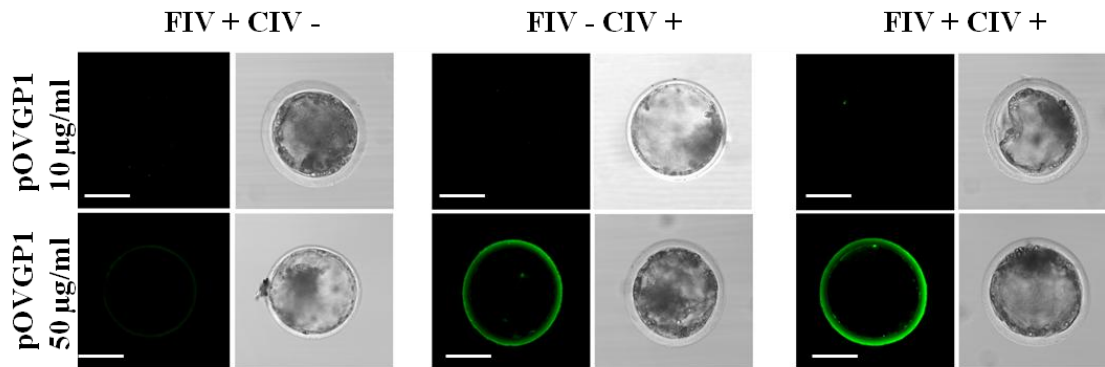


Figura 38. Inmunofluorescencia de blastocistos (día 9) tras suplementación con 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1 en FIV (FIV +), en cultivo (CIV +) o en ambos (FIV + CIV +). Los blastocistos fueron fijados, tras lo que se realizó una inmunofluorescencia confocal con un anticuerpo anti-histidina. Observamos marcaje en la ZP de aquellos tratados con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el CIV. Barra: 50 μm .

5.9.4. Detección de pOVGP1 en el interior de las blastómeras de blastocistos suplementados con pOVGP1 durante la FIV y el CIV

A los 3.5 días de cultivo embrionario, se procedió a fijar los embriones que habían sido tratados durante la FIV y el CIV con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1. La mitad de los embriones fijados fueron permeabilizados para observar si pOVGP1 estaba presente en el interior de las blastómeras embrionarias.

Se detectó señal fluorescente en la ZP de los embriones permeabilizados y no permeabilizados. Además, pudimos observar señal fluorescente asociada a la membrana de las blastómeras de los embriones no permeabilizados, apareciendo también en el interior de algunas blastómeras de los embriones que sí habían sido permeabilizados (**Fig. 39**).

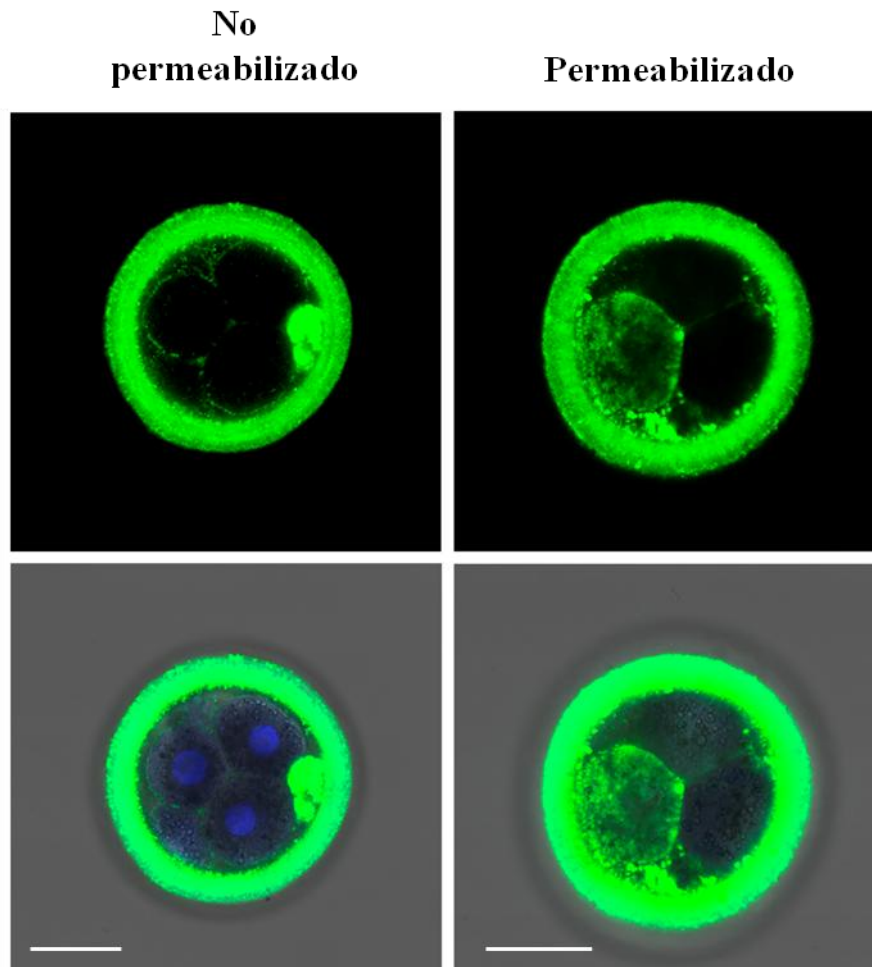


Figura 39. pOVGP1 está presente en la membrana y el citoplasma de las blastómeras de embriones bovinos (día 3.5) tratados con 50 µg/mL de pOVGP1 durante la FIV y el CIV. La inmunofluorescencia confocal realizada utilizando un anticuerpo anti-histidina muestra señal fluorescente en la membrana plasmática de embriones bovinos no permeabilizados y en el citoplasma de las blastómeras de embriones permeabilizados. La señal azul corresponde a la tinción de ácidos nucleicos Hoechst 33342. Barra: 50 µm.

5.9.5. Análisis de la expresión génica de blastocistos bovinos tras el tratamiento con pOVGP1

5.9.5.1. Efecto de la suplementación en la FIV

La suplementación con pOVGP1 a 10 y 50 µg/mL durante la FIV incrementó de manera significativa la expresión del gen que sintetiza la acuaporina *AQP3* en ambas concentraciones de proteína, comparándolas con el control ($P < 0.05$). El gen relacionado

con la homeostasis del retículo endoplasmático, *ATF4*, fue sobre-expresado en el grupo de blastocistos suplementados con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1 en la FIV (FIV 50) ($P<0.05$), mientras que en el grupo FIV tratado con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1, se observó una tendencia de sobre expresión ($P=0.054$) comparándolo con el control. En el caso del gen implicado en la comunicación célula-célula, *GJA1*, se observó que fue infra-expresado en el grupo FIV 10 ($P<0.05$) (Fig. 40).

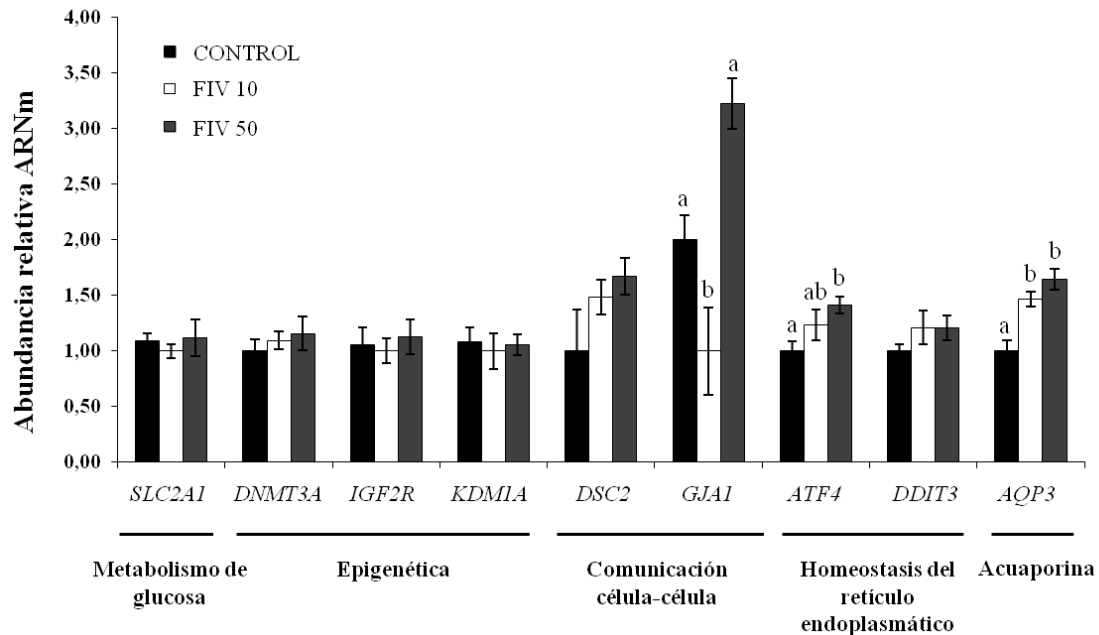


Figura 40. Expresión génica de blastocistos bovinos suplementados con 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1 durante la FIV. Se muestran la abundancia relativa de ARNm para los genes estudiados en los grupos tratados con pOVGP1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FIV 10), con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FIV 50) y sin suplementar (control). A y b muestran diferencias significativas entre grupos ($P<0.05$).

5.9.5.2. Efecto de la suplementación en CIV

El uso de pOVGP1 como suplemento durante el CIV mostró una expresión génica análoga del gen *AQP3* a la observada en la suplementación de la FIV, apareciendo sobre-expresado con diferencias significativas tanto en el grupo tratado con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como en el tratado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1 en comparación con el grupo control ($P<0.05$). Otro gen que mostró también sobre-expresión en ambos grupos fue *ATF4* ($P<0.05$). En relación con el gen *GJA*, la tendencia mostrada fue similar a la observada en el grupo experimental con suplementación durante la FIV, aunque no se encontraron diferencias significativas entre grupos, como podemos observar en la figura 41. Además, *DSC2*, un gen que forma parte de la categoría de proteínas de

adhesión celular, fue sobre-expresado en ambos grupos suplementados con pOVGP1 (CIV 10 y CIV 50) comparado con el control ($P<0.05$) (**Fig. 41**).

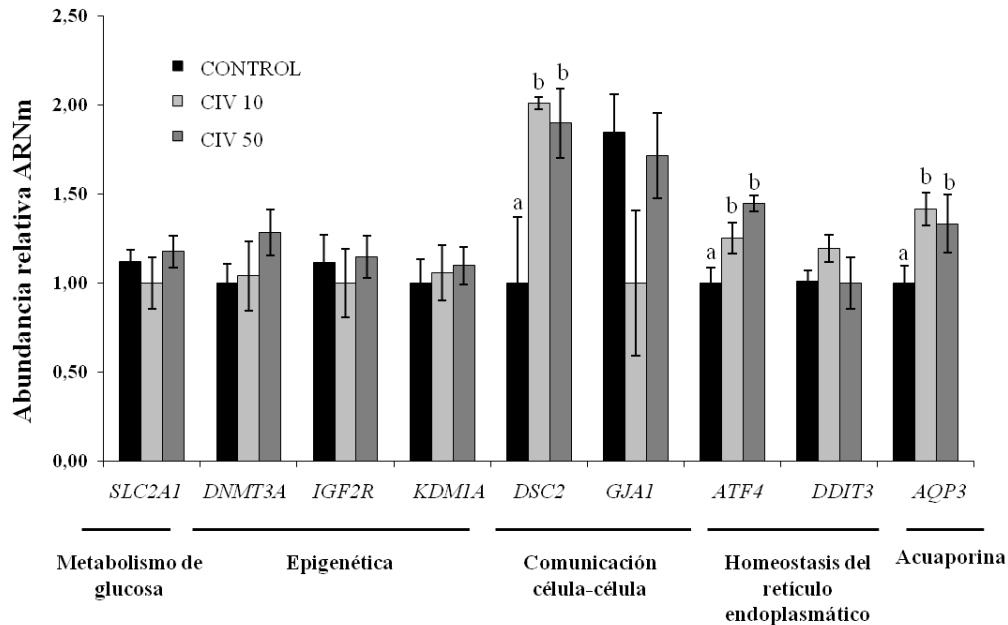


Figura 41. Expresión génica de blastocistos bovinos suplementados con 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pOVGP1 durante el CIV. Se muestran la abundancia relativa de ARNm para los genes estudiados en los grupos tratados con pOVGP1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CIV 10), con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CIV 50) y sin suplementar (control). A y b muestran diferencias significativas entre grupos ($P<0.05$).

5.9.5.3. Efecto de la suplementación en FIV y CIV

El uso de la proteína pOVGP1 durante FIV y CIV mostró un patrón de expresión génica similar al de la suplementación individual de cada uno de los procesos en relación a los genes *DSC2* y *AQP3*. También, pudimos observar que el gen *GJA1* presentó una disminución de la expresión en el grupo FIV+CIV 10, como ocurrió de manera similar en la suplementación en FIV y en CIV. El gen *ATF4* fue también sobre-expresado en blastocistos sometidos a una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mostrando el grupo FIV+CIV 50 una tendencia ($P=0.076$) al ser comparados con el grupo control. Debemos destacar el hecho de que el gen *DNMT3A*, relacionado con marcadores epigenéticos, fue sobre-expresado en el grupo FIV+CIV 50 comparado con los demás grupos ($P<0.05$) (**Fig. 42**).

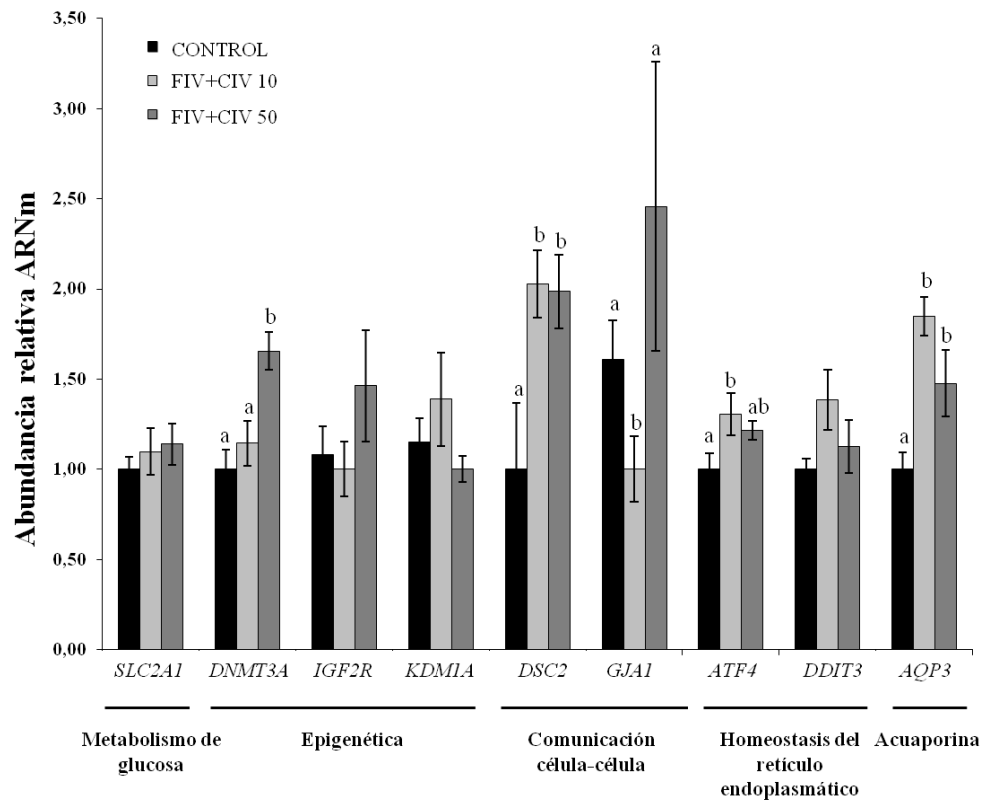
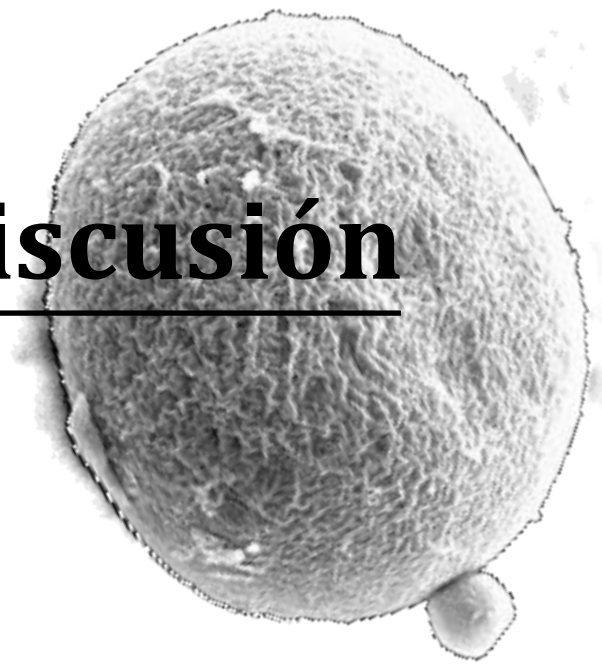


Figura 42. Expresión génica de blastocistos bovinos suplementados con 10 y 50 µg/mL de pOVGP1 durante la FIV y el CIV. Se muestran la abundancia relativa de ARNm para los genes estudiados en los grupos tratados con pOVGP1 a 10 µg/mL (FIV+CIV 10), con 50 µg/mL (FIV+CIV 50) y sin suplementar (control). A y b muestran diferencias significativas entre grupos ($P < 0.05$).

VI. Discusión



La glicoproteína oviductal OVGP1 está presente, en el momento de la fecundación y durante el desarrollo embrionario temprano, en un amplio rango de especies de mamíferos examinadas (Buhi, 2002). Los efectos que tiene esta proteína sobre los eventos reproductivos están mediados, principalmente, a través de la interacción de la misma con la ZP del ovocito. OVGP1 participa en el mecanismo del endurecimiento pre-fecundación de la ZP, modificando su actividad durante la fecundación y evitando la polispermia en la especie porcina y bovina (Coy *et al.*, 2008a). OVGP1 también modifica la capacidad de unión y penetración del espermatozoide con la ZP, aumentándola en algunas especies como hámster, gato y la especie humana (Boatman *et al.*, 1995, OdayBowman *et al.*, 1996, Hribal *et al.*, 2014a, Yang *et al.*, 2015) y disminuyéndola en otras como el cerdo (Kouba *et al.*, 2000). También se ha detectado la proteína OVGP1 en el espacio perivitelino, membrana plasmática y cuerpos multivesiculares de blastómeras, sugiriendo un proceso endocítico (Kan *et al.*, 1993), que sería responsable de algún posible efecto de la proteína sobre el embrión. De ese modo, el uso de OVGP1 en los procesos de FIV y desarrollo embrionario temprano ha mostrado un efecto positivo, mejorando la eficiencia de la fecundación, así como el número y la calidad de los blastocistos obtenidos (Hill *et al.*, 1996b, Yong *et al.*, 2002, McCauley *et al.*, 2003, Lloyd *et al.*, 2009b, Aviles *et al.*, 2010, Pradeep *et al.*, 2011). A pesar de todos estos datos sobre la función de OVGP1 en reproducción, hasta el momento no se conoce su mecanismo molecular de actuación, por lo que es imprescindible la realización de un estudio molecular de OVGP1 y su función en reproducción.

Un punto importante a tener en cuenta es que aparecen discrepancias en el impacto fisiológico que muestra OVGP1 en el momento de la fecundación entre las diferentes especies estudiadas. Respecto a esta cuestión, es interesante destacar que se ha descrito que el gen que codifica OVGP1 está sometido a una evolución adaptativa rápida (Swanson *et al.*, 2001), lo que habría producido la divergencia de esta proteína oviductal en las diferentes especies de mamíferos, haciéndolas diferentes entre sí. Por otro lado, un estudio detallado de la secuencia aminoacídica de OVGP1 ha revelado un mayor grado de similitud en el extremo N-terminal de la proteína que el extremo C-terminal entre las diferentes especies (Aviles *et al.*, 2010). Por ello, se ha hipotetizado acerca de que el extremo C-terminal constituya un dominio de unión y de reconocimiento especie-específico. Por lo tanto, es necesario el estudio de la

implicación del extremo C-terminal de OVGP1 en fecundación. En esta tesis, nosotros hemos caracterizado por primera vez la unión molecular que se produce entre OVGP1 y la ZP y hemos mostrado que proteínas OVGP1 recombinantes con diferentes longitudes en el extremo C-terminal modifican los patrones de unión a la ZP y remodelan su estructura afectando a la resistencia frente a la digestión con pronasa y los parámetros de la FIV.

6.1. Implicación de las regiones de la secuencia de OVGP1 en su función

El estudio comparativo de las secuencias aminoacídicas de OVGP1 mostró que la proteína porcina presenta tres regiones (A, B y D) que están conservadas entre las proteínas OVGP1 de varios mamíferos (Aviles *et al.*, 2010) (**Fig. 5**). OVGP1 de coneja posee también estas tres regiones, aunque la secuencia correspondiente a la región D es casi inexistente, provocando que OVGP1 de coneja sea 52 aminoácidos más corta que OVGP1 porcina. Para analizar la implicación molecular de la región D presente en el extremo C-terminal, se generó una proteína OVGP1 recombinante porcina truncada en esta región. Todas las proteínas recombinantes fueron correctamente expresadas y secretadas al medio de crecimiento por los dos tipos de células de mamífero empleados en este estudio, confirmando así que el diseño empleado para cada una de ellas era correcto. El medio de crecimiento de las células HEK 293T fue utilizado para purificar las proteínas recombinantes mediante IMAC, mientras que en el caso de las células CHO, se utilizó directamente este medio de crecimiento donde habían sido secretadas las proteínas recombinantes, para llevar a cabo los ensayos moleculares y fisiológicos.

Tanto las proteínas purificadas procedentes de la línea celular HEK 293T, como las presentes en el medio de secreción celular, procedentes de la línea CHO, mostraron actividad biológica en cuanto a la capacidad de unirse a la ZP de ovocitos. En consecuencia, podríamos decir que la eliminación de la región D y las regiones DB no altera la ruta de síntesis y el correcto plegamiento de OVGP1, al menos en las líneas celulares CHO y HEK 293T.

6.2. Efecto de la glicosilación en las proteínas recombinantes expresadas

OVGP1 es considerada una proteína mucina (se conoce como MUC9), definidas como proteínas que contienen típicamente una serie de dominios con repeticiones en tándem ricos en serina, treonina y prolina en la región C-terminal, por lo que están fuertemente O-glicosiladas (Lagow *et al.*, 1999). Se ha descrito que al utilizar las líneas celulares CHO y HEK 293T en la expresión de proteínas recombinantes, se produce un patrón de glicosilación de las proteínas diferente en cada línea celular (Van den Nieuwenhof *et al.*, 2000, Gaudry *et al.*, 2008). Así, las proteínas glicosiladas por las células CHO contienen mayor cantidad de ácido siálico, mientras que las proteínas glicosiladas por las HEK 293T poseen residuos terminales de GalNAc que las anteriores no contienen (Suen *et al.*, 2010, Zeck *et al.*, 2011). Sin embargo, el peso molecular de las proteínas recombinantes expresadas en las dos líneas celulares fue prácticamente el mismo.

En relación a las N-glicosilaciones, podemos decir que el tratamiento de pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1 con la enzima N-glicosidasa F mostró que las tres proteínas son N-glicosiladas por las líneas celulares en que son expresadas. El descenso de peso molecular tras el tratamiento coincidió con la posible escisión de tres N-glicanos, que estarían presentes en las tres posiciones potenciales a ser N-glicosiladas (Asn 62, 402 y 441) en OVGP1 porcina y de uno (Asn 402) en OVGP1 de coneja, determinadas por análisis *in silico*.

Se observa que la ausencia de la región D no alteraba el patrón de N-glicosilación de la OVGP1 porcina, ya que los tres sitios potenciales a ser N-glicosilados en pOVGP1 estarían presentes en la región A. Por tanto, la variación en 10 kDa de peso molecular observada entre pOVGP1 y pOVGP1AB al hacer un SDS-PAGE se debe a la pérdida de los 46 aminoácidos que habían sido eliminados (correspondientes a la región D) y a los carbohidratos O-unidos de los seis sitios potenciales de O-glicosilación presentes en la región del extremo C-terminal eliminada. Además, el descenso en el peso molecular entre la proteína porcina completa y la truncada en la región D, después de ser tratadas con N-glicosidasa F, es el mismo.

La N-deglicosilación observada en pOVGP1 que había sido expresada tanto en células CHO como en HEK 293T mostró que la proteína estaba siendo N-glicosilada de

manera similar en ambas líneas celulares, ya que el descenso en el peso molecular tras el tratamiento era el mismo. Sin embargo, en el caso de la OVGP1 porcina observamos un pequeño descenso en el peso molecular comparado con la OVGP1 nativa detectada en el FO, probablemente debida a una modificación en el patrón de glicosilación de los azúcares O-unidos. En este estudio descartamos la existencia de patrones específicos de glicosilación que provoquen la unión de OVGP1 a la ZP, en virtud de que las proteínas recombinantes de coneja y de cerda expresadas en ambas líneas celulares mostraban una afinidad igual por la ZP del ovocito. Además, el uso de OVGP1 deglicosilada de gata, procedente de un sistema de expresión bacteriano, provocó un incremento significativo en la unión de espermatozoides a la ZP, aunque no se estudió la presencia de OVGP1 en la ZP de los ovocitos, mientras que no se observó efecto en la tasa de división y en el rendimiento de mórulas y blastocistos obtenidos (Hribal *et al.*, 2014a). Estas evidencias hacen suponer que la glicosilación de OVGP1 no es esencial para que la proteína cumpla algunas de sus funciones, como en este caso el incremento significativo en la unión de espermatozoides a la ZP. Sin embargo, la presencia/ausencia de la región D, donde existen O-glicosilaciones, si influencia el patrón de interacción entre OVGP1 y ZP, como discutiremos más adelante.

6.3. La región A es la responsable de la interacción de OVGP1 con la ZP en la especie porcina

Se ha descrito una alta similitud entre la región A de OVGP1, localizada en su extremo N-terminal y la familia de enzimas quitinasas (Jaffe *et al.*, 1996). Sin embargo, OVGP1 no posee actividad enzimática (DeSouza *et al.*, 1995) debido a la falta de un residuo de ácido glutámico esencial en su secuencia (Buhi, 2002), aunque el dominio similar a quitinasas que posee OVGP1 podría retener la propiedad de unir azúcares y contribuir a su asociación con los gametos (Malette *et al.*, 1995). Cuando generamos péptidos recombinantes correspondientes a cada región de pOVGP1, solamente el correspondiente a la región A fue capaz de unirse a la ZP de ovocitos porcinos, demostrando que la capacidad de unión de OVGP1 al gameto femenino es debida a la presencia de esta región y probablemente, debida a la presencia del sitio similar a quitinasas. Además, el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos ha revelado la presencia de cuatro regiones correspondientes con dominios de unión a Class III PDZ (Kadam *et al.*, 2007) y tres de ellos están localizados en la región A. Estos sitios podrían

estar involucrados en interacciones moleculares con otras proteínas del FO importantes en la fecundación y desarrollo embrionario (Coy *et al.*, 2015), generando un microambiente necesario para controlar el proceso de fecundación. Sin embargo, esta región A no afecta a la propiedad de unión especie-específica, ya que en este trabajo se ha observado unión de OVGP1 porcina y OVGP1 de coneja a la ZP de ovocitos de cerda, vaca y ratona. Estas uniones heterólogas se deben a que la región A está altamente conservada entre las especies de mamíferos (Aviles *et al.*, 2010). Se ha descrito en la bibliografía otras uniones heterólogas entre OVGP1 humana y ZP de babuino y viceversa (OdayBowman *et al.*, 1996), OVGP1 humana y ZP de hámster (Reuter *et al.*, 1994) y OVGP1 bovina y ZP porcina (Lloyd *et al.*, 2009b).

6.4. El extremo C-terminal de OVGP1 influye en la maduración de la ZP en el oviducto y en su endocitosis por el ovocito

La ZP de ovocitos ováricos se modifica durante la foliculogénesis con el objetivo de estar preparada para el encuentro con el espermatozoide en el oviducto. Estos cambios se conocen con el término de “maduración zonal” (Aviles *et al.*, 1996a, Aviles *et al.*, 2000a). Además, varios estudios han mostrado que la ZP es modificada después de la ovulación durante su tránsito por el oviducto (Oikawa *et al.*, 1988, Robitaille *et al.*, 1988, Kolbe *et al.*, 2005, Coy *et al.*, 2008a). Sin embargo, no existen muchas evidencias acerca del proceso responsable de los cambios que ocurren en la ZP después de la ovulación, conocido como la “maduración oviductal”.

Si tenemos en cuenta la morfología de la superficie de la ZP, varios artículos asumen la existencia de una correlación entre el tipo de morfología y el estado de madurez de la ZP. Utilizando un microscopio de polarización se distinguen tres capas bien diferenciadas en la ZP y se ha aplicado la apariencia de las mismas como marcador de calidad ovocitaria y desarrollo embrionario (Pelletier *et al.*, 2004, Shen *et al.*, 2005, Rama Raju *et al.*, 2007). Por otro lado, algunos autores (Motta *et al.*, 1991, Calafell *et al.*, 1992, Familiari *et al.*, 1992) describieron la existencia de una superficie porosa a modo de red con un incremento en la rugosidad de la superficie de ZP principalmente en ovocitos maduros, mientras que los ovocitos inmaduros poseen una superficie compacta sin poros (Papi *et al.*, 2010). Todas estas modificaciones ocurren cuando los ovocitos ovulados están inmersos en el FO, pero no existen evidencias sobre los

factores moleculares implicados en este mecanismo. Abe y Oikawa dividieron la ZP de hámster en tres regiones topográficas mediante observaciones ultraestructurales y observaron que la distribución de OVGP1 en esas tres regiones era diferente, lo que sugería que el número de sitios de unión a OVGP1 está distribuido de manera variable a través del espesor de ZP (Abe *et al.*, 1990).

En este estudio, hemos observado que la proteína OVGP1 porcina completa se incorpora a más de la mitad del espesor de la ZP de ovocitos porcinos. Sin embargo, al utilizar OVGP1 porcina que no posee la región D (pOVGP1AB) y OVGP1 de coneja (rOVGP1), la proteína era retenida de forma más superficial. Podríamos decir que pOVGP1 fue capaz de penetrar en las tres capas de la ZP diferenciadas bajo luz polarizada (Rama Raju *et al.*, 2007), mientras que pOVGP1AB sólo en la más externa y parte de la capa central y rOVGP1 se mantendría estancada en la capa más superficial. Una característica interesante a destacar que hemos observado es que se unen cantidades equivalentes de las tres proteínas recombinantes testadas a la ZP. Estos datos sugieren que en el caso de la proteína porcina pOVGP1AB y de coneja rOVGP1, la proteína está más concentrada en la superficie de la ZP, probablemente modificando morfológicamente la estructura de la misma. En efecto, la visualización de la superficie de la matriz de ovocitos incubados con pOVGP1 nos mostró que la ZP mantenía la estructura porosa indicando que la proteína recombinante estaba totalmente inmersa en la matriz, de acuerdo con la morfología descrita para ovocitos maduros. Sin embargo, rOVGP1 aparecía taponando la mayoría de poros de la ZP, compactada en la superficie de la matriz. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la region D del extremo C-terminal modula el patrón de unión de OVGP1 a la ZP y así, la morfología externa del ovocito, pudiendo generar la maduración oviductal de la matriz extracelular del ovocito descrita anteriormente. En este trabajo mostramos como OVGP1 de coneja modifica la porosidad de la ZP de manera diferente a la OVGP1 de cerda, lo que podría conllevar modificaciones fisiológicas del ovocito, como aquellas que afectan al endurecimiento de la ZP frente a la digestión proteolítica.

6.5. La región D de pOVGP1 es necesaria para que se produzca la endocitosis de la proteína por el ovocito porcino MIV

La presencia de pOVGP1 en los cuerpos multivesiculares de ovocitos porcinos MIV que hemos descrito en este trabajo y en las blastómeras de embriones en desarrollo (Boice *et al.*, 1990b, Kan *et al.*, 1993), sugiere una posible endocitosis de la proteína, que está en concordancia con la descripción de una caja de clatrina en la región A de OVGP1 (Kadam *et al.*, 2007). Este hecho podría explicar la influencia de OVGP1 en las etapas tempranas de desarrollo embrionario que se han descrito para varias especies (Yong *et al.*, 2002, Pradeep *et al.*, 2011, Hribal *et al.*, 2014a)

Cuando se incubaron ovocitos con los péptidos correspondientes a cada una de las regiones de la proteína, no fueron detectados en el citoplasma, ni siquiera el correspondiente a la región A (pOVGP1A). Sí observamos una endocitosis de OVGP1 porcina por el ovocito, aunque la deficiencia en la región D en OVGP1 porcina bloqueó la presencia de dicha proteína en el citoplasma. Tampoco la región D fusionada con MBP fue capaz de ser endocitada por el ovocito. En relación a estos datos obtenidos, podríamos afirmar que la región D no es la responsable del proceso de endocitosis, pero si sería necesaria su presencia en la secuencia de OVGP1 para que se lleve a cabo dicho proceso. La ausencia de la región D modificaría el plegamiento de OVGP1 haciendo que quede estancada en la superficie de la ZP.

6.6. La región C-terminal de OVGP1 modifica los parámetros de fertilidad entre especies

Se ha descrito la proteína OVGP1 como uno de los componentes del FO involucrado en el endurecimiento pre-fecundación de la ZP. En este proceso, la ZP adquiere resistencia frente a la digestión proteolítica con pronasa durante el tránsito del ovocito por el oviducto (Coy *et al.*, 2008a). El presente estudio demuestra, de manera clara, que OVGP1 es el factor presente en el FO responsable de este efecto de endurecimiento de la ZP. Los ovocitos porcinos incubados con OVGP1 recombinante porcina mostraron un tiempo de digestión similar, aunque un poco superior, al de ovocitos incubados con FO porcino (Coy *et al.*, 2008a). Sin embargo, la proteína OVGP1 porcina con la región D eliminada, incrementa el tiempo de digestión cuatro

veces comparado con OVGP1 completa. Nosotros hemos mostrado que el extremo C-terminal de OVGP1 es responsable de modular el endurecimiento frente a proteasas de la ZP. De hecho, OVGP1 de coneja mostró el tiempo de digestión más largo de entre todas las proteínas probadas. En vista de estos resultados, sugerimos que la falta de la región D en rOVGP1 sería la responsable del patrón característico de unión de OVGP1 a ZP y por consiguiente, del efecto específico en el tiempo de digestión. Estos datos justifican de manera clara los resultados publicados recientemente donde muestran que el FO de coneja es el responsable del mayor incremento en la resistencia de la ZP frente a digestión proteolítica en ovocitos de todas las especies testadas (ratón, rata, hámster, conejo, oveja, cabra cerdo y vaca) (Mondejar *et al.*, 2013b), mientras que el FO humano no presenta efecto en el tiempo de digestión de ovocitos porcinos. En este trabajo hemos probado que la ausencia de la región D incrementa el tiempo que tarda la ZP en degradarse. Por lo tanto, podemos sugerir que la ausencia de ciertas regiones de OVGP1 sería la causa de la modificación del efecto fisiológico de la proteína. De la misma manera, la presencia de regiones adicionales en el extremo C-terminal de OVGP1, como la región E en la especie humana o la región C en ratón, podría modificar también su actividad. Este cambio en la actividad de la proteína produciría un distinto remodelado de la matriz de la ZP, que podría favorecer la penetración de OVGP1 a través de la misma. Este proceso justificaría el hecho de que la ZP oviductal no sea resistente a la degradación proteolítica en la especie humana (Mondejar *et al.*, 2013a), donde OVGP1 podría estar más implicada en el desarrollo embrionario que en el bloqueo de la polispermia. Del mismo modo, en ratón, la presencia de la región C también podría provocar la reducción que se ha descrito en la unión OVGP1-ZP (Lyng *et al.*, 2009).

Cabe señalar, que cuando analizamos el efecto de pOVGP1 y rOVGP1 en el endurecimiento de la ZP, descubrimos que la ZP de los ovocitos porcinos y bovinos incrementaba la resistencia frente a la proteólisis mediada por pronasa. Probablemente, el que pOVGP1 y rOVGP1 endurezcan la ZP porcina y bovina, se deba a que poseen una composición de la ZP similar, formada por las glicoproteínas ZP2, ZP3 y ZP4 (Hedrick *et al.*, 1987a, Noguchi *et al.*, 1994).

La habilidad del FO de inducir el endurecimiento de la ZP es proporcional a su habilidad de incrementar la tasa de monospermia después de FIV en el sistema porcino (Mondejar *et al.*, 2013b) y por consiguiente, de controlar la polispermia. Se observa que OVGP1 recombinante porcina posee el mismo efecto que el FO en el sistema de FIV

porcina (Coy *et al.*, 2008a). El tratamiento de ovocitos porcinos con pOVGP1 produjo un incremento significativo en las tasas de monospermia comparado con el control, sin verse afectadas las tasas de penetración, por lo que los resultados que obtuvimos en la FIV porcina resultan en un incremento general del rendimiento del sistema FIV (eficiencia de fecundación). Sin embargo, sí que observamos una diferencia entre el tratamiento con pOVGP1 recombinante y con el FO porcino examinado anteriormente, ya que mientras que el tratamiento con pOVGP1 no varía el número de espermatozoides unidos a la ZP, el FO los disminuye (Coy *et al.*, 2008a). Los responsables de estas diferencias podrían ser otros componentes presentes en el FO porcino, que no estaban presentes en la proteína recombinante purificada utilizada en este trabajo, como son DMBT1 (Teijeiro *et al.*, 2012, Ambruosi *et al.*, 2013), osteopontina (Hao *et al.*, 2006), plasmina (Coy *et al.*, 2012b), lactoferrina (Zumoffen *et al.*, 2013), etc, que han sido detectadas unidas a la ZP del ovocito y descritas como moduladoras de la unión de los espermatozoides con la ZP. De este modo, confirmamos que hemos producido una proteína OVGP1 porcina por medio de tecnología recombinante que es biológicamente activa y fácil de purificar, lo que la hace idónea para ser incorporada como un componente potenciador en medios de FIV.

Por otro lado, esperábamos que OVGP1 truncada en su región D (pOVGP1AB), la cual presentaba un tiempo de digestión proteolítica de ZP mayor que pOVGP1, mejorase de igual o mejor manera la eficiencia de fecundación. Sin embargo, la incubación con pOVGP1AB no mostró efectos en los parámetros de FIV en porcino, por lo que los datos obtenidos en este trabajo sugieren que podríamos desligar el efecto del endurecimiento de la ZP de la eficiencia del proceso de fecundación que habían sido previamente relacionados (Coy *et al.*, 2008b) cuando la región D no está presente en OVGP1 y por tanto, la conformación proteica podría no ser la adecuada.

Aunque la polispermia ocurre en otras especies, el grado de fecundación polispermica que se observa en el sistema porcino es mucho mayor. De este modo, el problema de la penetración polispermica es en gran parte especie-específico y confinado a la FIV porcina (Wang *et al.*, 1997, Abeydeera *et al.*, 1998). Por este motivo, Coy y colaboradores han investigado el modo de mejorar el rendimiento del sistema FIV, sobre todo en la especie porcina. Mostraron que tanto el FO perteneciente a la especie bovina como a la porcina, incrementaba la tasa de monospermia en la FIV, produciéndose únicamente el descenso de la unión de espermatozoides a la ZP en el

caso del cerdo (Coy *et al.*, 2008a). Una posible explicación al fenómeno de la reducción de la polispermia en el sistema porcino sería que OVGP1 se une a la ZP y forma una barrera física modificando los sitios de unión a espermatozoides presentes en ella (McCauley *et al.*, 2003). Otra explicación podría deberse a que el espermatozoide penetra la ZP gracias a su capacidad física (Bedford, 2004), por lo que sólo aquellos con la habilidad (o la fuerza) para atravesar la ZP, que se habría vuelto resistente a proteasas al estar en contacto con OVGP1, podrían fecundar el ovocito con éxito. Nosotros observamos que el número de espermatozoides unidos a la ZP fue similar cuando los ovocitos fueron incubados con las tres proteínas recombinantes (pOVGP1, pOVGP1AB y rOVGP1) y el control, pero sólo pOVGP1 fue capaz de incrementar el porcentaje de monospermia obtenido. Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos correlacionar el incremento del endurecimiento enzimático de la ZP con la mejora de las tasas de FIV en porcino, pero sólo cuando la región D está presente en la proteína. En consecuencia, podríamos atribuir a la región C-terminal de OVGP1 una función especie-específica modulando el paso de los espermatozoides a través de la matriz ZP remodelada.

Por otro lado, OVGP1 posee un efecto positivo en la unión espermatozoide-ZP en cualquiera de las demás especies estudiadas. En hámster, la proteína OVGP1 recombinante incrementa el número de espermatozoides unidos a la ZP (Yang *et al.*, 2015). OVGP1 humana incrementa la unión de espermatozoides a la ZP en ensayos de unión a hemizonas humanas (OdayBowman *et al.*, 1996). Curiosamente, este autor describe que OVGP1 humana incrementa la unión espermatozoide-ZP en un sistema homólogo, mientras que OVGP1 de babuino disminuye la unión entre ZP y espermatozoide humano, sugiriendo que OVGP1 también juega un papel especie-específico en la unión de los espermatozoides a la ZP del ovocito (OdayBowman *et al.*, 1996, Schmidt *et al.*, 1997b).

Cabe destacar el hecho de que OVGP1 de babuino (P36718) muestra una identidad del 94 % con OVGP1 humana (Q12889), pero OVGP1 humana presenta una región extra en el extremo C-terminal, la región E, que no está presente en el babuino. Por otro lado, Coy y colaboradores mostraron que la incubación de ovocitos porcinos con FO bovino incrementaba las tasas de monospermia (Coy *et al.*, 2008a). En este sistema heterólogo, OVGP1 muestra una identidad del 78 % entre ambas especies (porcina y bovina), la diferencia es que ambas proteínas comparten las mismas regiones

conservadas (A, B y D) (**Fig.5**). Nosotros hemos utilizado un sistema heterólogo, con proteínas en las que su extremo C-terminal es diferente. Cuando se testó OVGP1 de coneja en FIV porcina, la proteína no afectó a los parámetros de FIV. Todos estos datos sugieren que la presencia/ausencia de regiones conservadas en el extremo C-terminal de OVGP1 modifica la asociación de OVGP1 con la ZP, afectando de manera específica al remodelamiento de la matriz y por consiguiente, a la penetración de la ZP por parte del espermatozoide. Otro factor que debemos considerar es que OVGP1 podría también modificar la actividad espermática. En otras palabras, la modificación especie-específica podría ser también influenciada a nivel espermático, por lo que se deberán realizar estudios en el futuro con OVGP1 y espermatozoides en un sistema heterólogo para aportar más información acerca de este hecho.

En algunos estudios se ha observado cambios estructurales que ocurren en la matriz de la ZP durante el desarrollo del ovocito y tras la fecundación (Wassarman *et al.*, 1991, Monne *et al.*, 2011). Por el contrario, ningún estudio ha demostrado de manera minuciosa la base estructural que hace a la ZP competente para la fecundación, debido a que no existe información estructural de alta resolución sobre los filamentos que componen la ZP. Por lo tanto, aún no se conoce el tipo de estructura tridimensional que facilita el éxito en la fecundación, ni el mecanismo por el cual proteínas intrínsecas de la ZP controlan la estructura de ovocitos no fecundados. Recientemente, se ha descrito en *Xenopus laevis* que lo que hace competente a la matriz del ovocito para la fecundación está regulado por la interacción directa entre la proteína dicalcina y gp41, que es un ortólogo de ZP3 en la rana (Miwa *et al.*, 2015). Dicalcina podría actuar como una proteína reguladora clave involucrada en hacer la ZP competente para la fecundación modificando la estructura tridimensional de los filamentos de ZP (Miwa, 2015). De igual manera, OVGP1 podría generar el microambiente estructural necesario para que el espermatozoide se una y atraviese la ZP y alcance la membrana plasmática del ovocito.

6.7. Influencia de OVGP1 porcina en el desarrollo embrionario y en la expresión génica de embriones bovinos

Estudios *in silico* han mostrado la presencia de una caja de clatrina en la región A de OVGP1, lo que sugiere la endocitosis de la proteína (Kadam *et al.*, 2007). Este dato, junto con los resultados obtenidos en esta investigación sobre la presencia de

pOVGP1 en los cuerpos multivesiculares de ovocitos porcinos MIV y los publicados en otros trabajos acerca de la detección de OVGP1 en las blastómeras de embriones en desarrollo (Boice *et al.*, 1990b, Kan *et al.*, 1993), sugieren un potencial efecto por parte de OVGP1 en las etapas tempranas de desarrollo embrionario. De hecho, OVGP1 mejora la formación y desarrollo de embriones (McCauley *et al.*, 2003, Aviles *et al.*, 2010). Además, se ha descrito que HCgp-39, una proteína similar a quitinasas, es la responsable de iniciar una cascada de señalización en células del tejido conectivo, que desemboca en el incremento de la proliferación celular (Recklies *et al.*, 2002, Ling *et al.*, 2004). Lo mismo podría ocurrir con OVGP1 en las blastómeras, pero siendo modulado este efecto por el extremo C-terminal entre especies. Este descubrimiento concuerda con el hecho de que en ratón, anticuerpos contra la región C-terminal de OVGP1 bloquea al embrión en estadio de dos células en el desarrollo embrionario (Yong *et al.*, 2002).

Se han realizado estudios utilizando OVGP1 tanto recombinante como purificada del FO o utilizando FO completo, para observar su efecto en desarrollo embrionario temprano. Los datos publicados al utilizar FO muestran discrepancias en el efecto producido, probablemente debido al momento del tratamiento y a la cantidad de FO con el que se suplementó. Cebrián-Serrano y colaboradores utilizaron FO bovino para tratar ovocitos bovinos durante 30 minutos antes de la FIV, no encontrando diferencias significativas entre el grupo tratado y el control en las tasas de división y de blastocistos obtenidos, ni en el grupo tratado con FO en que se produjo un desarrollo embrionario partenogénico realizado al activar artificialmente ovocitos MII (Cebrian-Serrano *et al.*, 2013). Debemos tener en cuenta que en el sistema *in vivo*, el ovocito está en contacto con el FO mucho más tiempo que el empleado en este estudio (Hunter, 2002). Tampoco observaron diferencias en la morfología del blastocisto tras el tratamiento (Cebrian-Serrano *et al.*, 2013), al igual que Lloyd y colaboradores, quienes no observaron diferencias en la morfología de blastocistos porcinos tratados con FO bovino también durante 30 min antes de la FIV (Lloyd *et al.*, 2009b). No obstante, en este último trabajo si observaron una mejoría en el porcentaje de división de los embriones porcinos, además de que el número de blastocistos obtenidos a partir de ovocitos tratados con FO bovino fue mayor que los no tratados (Lloyd *et al.*, 2009b). De igual manera, al utilizar una fracción de FO rica en OVGP1 durante la FIV, se observó un incremento significativo en la tasa de división y el número de blastocistos obtenidos

en oveja (Hill *et al.*, 1996a). Sin embargo, la adición de OVGP1 durante el cultivo *in vitro* después de la FIV en oveja, no mostró efecto en la tasa de división y se observó que incrementa el tiempo que necesita el embrión para alcanzar el estado de blastocisto (Hill *et al.*, 1996b). También se observó que la eliminación de OVGP1 del cultivo a los tres días no modifica los resultados obtenidos, lo que sugiere que el efecto que tiene la proteína es durante los primeros tres días de desarrollo, por eso en nuestro trabajo los embriones están en presencia de OVGP1 hasta el día 3.5 y no más. Lopera-Vasquez y colaboradores mostraron que la suplementación durante el cultivo embrionario con concentraciones de FO bovino de 5, 10 y 25 % tenían un efecto negativo en el desarrollo embrionario, mientras que al utilizar concentraciones de 1.25 y 0.625 %, los embriones llegaban a día 9 del desarrollo y en ese momento, los blastocistos obtenidos eran de alta calidad, lo que se reflejaba en la criotolerancia que mostraban y el número de células totales que poseían (Lopera-Vasquez *et al.*, 2015).

Por otro lado, el tratamiento con proteínas OVGP1 purificadas a partir de FO no mostró efecto en la tasa de desarrollo de los blastocistos (Hill *et al.*, 1997; Vansteenbrugge *et al.* 1997) o sólo la mejoró de manera parcial (a día 6 sí, pero no a día 7) observándose un efecto positivo en el desarrollo y la calidad de aquellos embriones que habían sido suplementados con una baja concentración (Martus *et al.*, 1998). En la especie porcina, el tratamiento pre-FIV y durante la FIV con OVGP1 nativa purificada a partir de explante de tejido oviductal (10 µg/mL), incrementó el número de ovocitos fecundados que alcanzan el estadio de blastocisto, pero no la tasa de división, mientras que al utilizar OVGP1 durante la FIV (10 µg/mL) y el CIV (50 y 100 µg/mL) a la vez, disminuía el efecto observado anteriormente (Kouba *et al.*, 2000).

El problema de utilizar fracciones de FO ricas en OVGP1 o el FO completo, sería la propia naturaleza compleja del mismo. Es un fluido que presenta continuas variaciones *in vivo* debido a las modificaciones del oviducto a lo largo del ciclo estral (Leese *et al.*, 2008) y a cada región oviductal (Roblero *et al.*, 1976, Buih *et al.*, 2000), como por ejemplo en la cantidad y tipo de proteínas secretadas en cada momento, con el objetivo de crear diferentes microambientes (Desantis *et al.*, 2011) que sean óptimos para el embrión dependiendo del estado de desarrollo en el que se encuentre. Es difícil trasladar este proceso a condiciones *in vitro* utilizando FO. Por ello, el uso de la tecnología de proteínas recombinantes y su purificación nos sirve de gran ayuda para poder mimetizar las condiciones *in vivo* de manera más sencilla, ya que podemos

conseguir la concentración exacta de cada proteína en el momento que nos interese. De esta manera, en el presente estudio se ha recurrido a esta tecnología para la obtención de la proteína OVGPI.

En la bibliografía se ha descrito un efecto producido por OVGPI en la expresión génica en sistema heterólogo, al incubar ovocitos porcinos con FO bovino previo a la FIV, así como una mejora en las tasas de división embrionaria y desarrollo de los blastocistos (Lloyd *et al.*, 2009b). En nuestro trabajo, observamos una tendencia positiva en el porcentaje de blastocistos bovinos obtenidos a día 9 al tratar los ovocitos durante el CIV con 50 µg/mL de pOVGPI y durante FIV+CIV con 10 µg/mL de pOVGPI. También se detectó que el uso de pOVGPI recombinante como suplemento durante todo el proceso *in vitro* (la FIV y el CIV) fue perjudicial para el desarrollo embrionario a altas dosis. No observamos diferencias en la tasa de división entre los dos grupos tratados y el grupo control, pero el rendimiento de blastocistos a día 9 descendió de manera drástica en el grupo en que se suplementó con 50 µg/mL durante FIV+CIV. En cabra y oveja, el uso de OVGPI en maduración, fecundación y cultivo *in vitro* a baja concentración (10 µg/mL) aumenta la tasa de división en embriones y la formación de blastocistos, pero presenta efecto inhibitorio a concentraciones mayores (50 y 100 µg/mL) (Pradeep *et al.*, 2011) al igual que ocurre en nuestro caso. Son similares los resultados publicados por Lopera-Vasquez y colaboradores (2015) utilizando FO, que muestran un efecto negativo en el desarrollo de los blastocistos al suplementar el medio de CIV con una alta concentración de FO bovino. Estos datos nos indican la importancia de la determinación de una dosis óptima de esta proteína para la mejora de los procesos reproductivos realizados *in vitro*. Por otro lado, los datos obtenidos por Hribal y colaboradores son similares a los nuestros, ya que observaron que el uso de OVGPI felina recombinante en FIV en gata no varía las tasas de división embrionaria ni el número de mórulas y blastocistos obtenidos (Hribal *et al.*, 2014a).

Por el contrario, el grupo de Hribal si observó un efecto producido por OVGPI al analizar la expresión de ARNm del gen *GJAI* que codifica la conexina de unión tipo GAP alfa 1 (también conocida como CX43), observando un incremento significativo de su expresión al utilizar la proteína felina en FIV. Por el contrario, en nuestros resultados observamos una expresión reducida de *GJAI* en todos los grupos suplementados con pOVGPI. *GJAI* es un gen implicado en la comunicación célula-célula que se ha utilizado como marcador de calidad embrionaria y se ha descrito presente en

blastocistos producidos *in vivo*, pero no expresado o con un nivel muy bajo de expresión en los generados *in vitro* en gato y en la especie bovina (Wrenzycki *et al.*, 1996, Waurich *et al.*, 2010). Se ha demostrado un incremento en la expresión de este gen cuando se produce el paso del embrión de 8-16 células hasta blastocisto (Lonergan *et al.*, 2003) en el oviducto.

Nuestros resultados muestran la sobreexpresión del gen *AQP3* en todos los tratamientos realizados con OVGP1 porcina. *AQP3* es un gen que codifica para la traducción de la acuaporina 3. Las acuaporinas son proteínas que forman canales de membrana que facilitan el movimiento rápido y pasivo del agua (Agre *et al.*, 2003, Benga, 2012). Se ha detectado su presencia en ovocitos y embriones de ratón y humanos (Xiong *et al.*, 2013). Se ha visto que juega un papel crucial en la homeostasis celular y en el transporte de criopreservantes en ovocitos y blastocistos de ratón (Edashige *et al.*, 2003, Edashige *et al.*, 2006, Seki *et al.*, 2011), por lo que el incremento de la expresión de este gen mejora la supervivencia de ovocitos de ratón tras la criopreservación y regula la apoptosis del embrión durante la misma (Edashige *et al.*, 2007, Bell *et al.*, 2009, Kuzmany *et al.*, 2011, Yamaji *et al.*, 2011). El descenso en la expresión de este gen está asociado a una tasa baja de fecundación (Meng *et al.*, 2008) e inhibe el desarrollo embrionario en embriones de ratón de 2 células, sugiriendo un importante papel en desarrollo embrionario. En el ratón knockout para *AQP3* se ha observado un deterioro en la formación de las células de la epidermis (Hara-Chikuma *et al.*, 2008). Los ovocitos y embriones tratados con OVGP1 porcina muestran una sobreexpresión de *AQP3*, lo que sugiere que OVGP1 porcina podría ser responsable de una mejora en el desarrollo del embrión

En el presente trabajo aparece de igual modo un aumento significativo en los grupos FIV 50, CIV 10, CIV 50 y FIV+CIV 10 y una tendencia en los grupos FIV 10 y FIV+CIV 50, de la abundancia de ARNm del gen que codifica el factor de la transcripción 4 (*ATF4*). *ATF4* es un factor de activación de la transcripción que se ha descrito crítico para una proliferación celular normal, sobre todo durante la alta proliferación que se requiere en la hematopoyesis fetal, produciéndose una anemia fetal severa si no está presente (Masuoka *et al.*, 2002). También se ha descrito que la deficiencia en *ATF4* en embriones de ratón produce un defecto grave en la formación de la lente ocular (Tanaka *et al.*, 1998). Podemos decir que OVGP1 porcina podría estar involucrada en una mejora de la proliferación celular del embrión en formación.

Otro de los genes que muestra diferencias tras el tratamiento con pOVGP1 es *DSC2*. *DSC2* (desmocolina 2) es un miembro de la superfamilia de las cadherinas. Es una proteína de adhesión celular que está presente en los desmosomas (Buxton *et al.*, 1992, Buxton *et al.*, 1993). Las uniones de los desmosomas juegan un papel importante en la integridad y actividad de señalización en los tejidos (Green *et al.*, 2000) y por tanto en la estabilización de la expansión del blastocisto (Fleming *et al.*, 1991, Collins *et al.*, 1995). Se ha descrito una alta abundancia del transcrito del gen *DSC2* en el estadio de mórula y blastocisto (Bloor *et al.*, 2002) y se ha observado que la abundancia relativa del ARNm es significativamente mayor en blastocistos de buena calidad comparado con los de mala calidad (Sathanawongs *et al.*, 2012). La expresión de este gen afecta la calidad embrionaria, por lo que podría ser utilizado como marcador en cultivo *in vitro*. En nuestro trabajo hemos obtenido una sobreexpresión del gen *DSC2*, en los dos tratamientos en los que se utilizó pOVGP1 en CIV y en FIV+CIV. Podemos decir que la suplementación de los embriones porcinos durante el cultivo embrionario temprano con pOVGP1 favorece la producción de embriones de buena calidad.

Se ha obtenido igualmente diferencias de expresión en un gen relacionado con la epigenética del embrión. La familia de metiltransferasas (DNMTS) media el establecimiento y mantenimiento de patrones dinámicos de metilación del ADN del genoma. *DNMT3* (metil transferasa 3 alfa de ADN) codifica una metiltransferasa que transfiere grupos metilo a dinucleótidos previamente demetilados (Lee *et al.*, 2015). La metilación del ADN es un evento epigenético de gran importancia en la regulación génica ya que el mantenimiento de una metilación óptima del ADN durante la maduración de los ovocitos es esencial en la viabilidad y desarrollo de los embriones (Barton *et al.*, 2001, Messerschmidt *et al.*, 2014). En nuestro trabajo observamos que el gen *DNMT3A*, fue sobreexpresado solamente en el grupo FIV+CIV 50, lo que sugiere que es importante la presencia de OVGP1 tanto en la FIV como en el CIV para la correcta instauración de marcadores epigenéticos. En oveja, se ha descrito que la metilación global del ADN y la abundancia relativa del ARNm del gen *DNMT3A* era menor en los ovocitos, cigotos y embriones de dos células procedentes de gametos de ovejas adultas que de corderos (Fang *et al.*, 2016), los cuales están asociados con procesos de metilación del ADN perturbado, lo que podría ser responsable del potencial de desarrollo menor que presentan los ovocitos y embriones procedentes de corderos.

En otros trabajos realizados con ovocitos tratados con FO, se ha observado una diferencia de expresión de algunos genes que no han sido estudiados en el presente trabajo de investigación. En relación al uso de FO bovino en el tratamiento de ovocitos previo a la FIV, se observó una diferencia significativa en la expresión de los genes *G6PD* y *SOD2* en los blastocistos bovinos del grupo tratado (Cebrian-Serrano *et al.*, 2013) y una reducción de la expresión génica del gen pro-apoptótico *BAX* acompañada de un aumento de la expresión del gen antiapoptótico *BCL2L1*, además de un aumento en la abundancia de *TFAM*, gen relacionado con la protección frente al impacto adverso de la transcripción y replicación, en blastocistos porcinos (Lloyd *et al.*, 2009b).

La técnica de FIV es una tecnología ampliamente utilizada, pero las tasas de eficiencia varían entre especies. El aporte de ciertas proteínas oviductales en el medio de FIV podría mejorar las tasas de fecundación, no sólo en el número de embriones obtenidos, sino también en la calidad de los mismos. Debido a los resultados obtenidos en este trabajo, podríamos afirmar que la incorporación de OVGPI al medio de fecundación y cultivo supondría una mejora de la calidad de los embriones obtenidos por técnicas *in vitro*, sin perjudicar las tasas de éxito. Es importante utilizar los recursos científicos disponibles en encontrar un modelo que cada vez se asemeje más al proceso *in vivo*, puesto que es en los primeros estadios del desarrollo embrionario donde se generan los patrones de expresión génica y epigenética que van a marcar el desarrollo del nuevo individuo.

En este trabajo hemos producido una proteína recombinante que mejora la eficiencia de fecundación en su sistema homólogo. Hemos descrito su actividad molecular, producida por el extremo C-terminal de la proteína, que puede extrapolarse a otras especies de acuerdo con la presencia/ausencia de las regiones D, C o E. Desde el punto de vista evolutivo, es interesante tener en cuenta la presencia de regiones específicas en OVGPI responsables de modular su actividad y por tanto, las condiciones específicas de cada especie intrínsecas a la fisiología reproductiva. Dejamos abierto un campo emocionante para analizar la correlación entre la región C-terminal de OVGPI y el efecto especie-específico en reproducción, por ejemplo en OVGPI humana, probablemente debido al desplazamiento de su efecto en el remodelamiento de la matriz ZP para favorecer la ruta endocítica e influenciar las primeras etapas del desarrollo embrionario temprano.

Para concluir, en esta tesis doctoral se propone un modelo en el que describimos la unión de OVGP1 a la ZP del ovocito a través de la región A, que está altamente conservada entre las especies de mamíferos estudiadas y que al mismo tiempo proporciona un anclaje para la unión de otras proteínas oviductales. La región C-terminal de OVGP1 modularía la unión OVGP1-ZP, regula la actividad de OVGP1 y justifica la función que cumple OVGP1 en fecundación en las diferentes especies. En el sistema porcino, OVGP1 remodela la estructura de la ZP afectando al endurecimiento enzimático y mejorando la eficiencia de la FIV. Además, la presencia de la región D en el extremo C-terminal de OVGP1 es responsable de la endocitosis de la proteína durante el paso del ovocito a través del oviducto, antes, durante y después de la fecundación. Hemos observado un efecto positivo de OVGP1 porcina en la expresión génica de blastocistos bovinos, produciendo el tratamiento con la proteína una variación en la expresión de los genes *GJAI*, *AQP3*, *ATF4*, *DSC2* y *DNMT3*.

VII. Conclusiones



- I. Las proteínas OVGP1 recombinantes son expresadas y secretadas al medio de cultivo por células de mamífero HEK 293T y CHO.
- II. La eliminación de la región D y las regiones BD del extremo carboxilo terminal de OVGP1 no altera su biosíntesis y su secreción.
- III. OVGP1 se une a la ZP del ovocito a través de la región A presente en el extremo amino terminal de la proteína.
- IV. El extremo carboxilo terminal de OVGP1 modula la penetrabilidad de la proteína a través de la ZP del ovocito y remodela la morfología de la ZP.
- V. OVGP1 es endocitada por el ovocito, siendo para ello indispensable la presencia de la región D del extremo carboxilo terminal de la proteína.
- VI. OVGP1 es el factor presente en el FO responsable del aumento de la resistencia de la ZP frente a la digestión enzimática mediada por pronasa, siendo el extremo carboxilo terminal el responsable de modular dicho endurecimiento.
- VII. OVGP1 mejora la eficiencia de la fecundación en la especie porcina al ser incorporada al medio de la FIV. Es la región D en el extremo carboxilo terminal de OVGP1 la responsable de esta mejora en la eficiencia de fecundación.
- VIII. El uso de OVGP1 como suplemento en el momento de la FIV o durante el CIV muestra una tendencia positiva en el rendimiento del sistema bovino, mientras que su uso en ambos procesos, es perjudicial. No obstante, el tratamiento de ovocitos con OVGP1 durante la FIV y el CIV en el sistema bovino mejora la calidad de los embriones obtenidos.
- IX. En este trabajo, se ha obtenido una proteína OVGP1 porcina por medio de tecnología recombinante, que es biológicamente activa y fácil de purificar.

Además, OVGP1 recombinante mejora el rendimiento de la FIV y la calidad de los embriones producidos, lo que la hace idónea para ser incorporada como un componente beneficioso en medios de cultivo celulares utilizados en técnicas de reproducción asistida.

VIII. Summary and Conclusions



8.1. Introduction

Oviducts have long been considered mere conduits for gametes and embryos, but numerous studies performed in recent years have demonstrated that the oviduct is involved in several important processes (gamete maturation, capacitation, sperm selection, polyspermy regulation, embryo development, etc.) that are necessary for the correct gamete and embryo physiology (Aviles *et al.*, 2010, Coy *et al.*, 2012a, Hunter, 1998, 2012, Gualtieri *et al.*, 2013). Moreover, in species with internal fertilization, the oviduct is the site of fertilization and early cleavage of the zygote (Hunter, 2005; Menezo and Guerin, 1997). During their trip through the oviductal tube, gametes and early embryos are bathed in oviductal fluid (OF), a mixture of blood plasma, oviductal epithelial cell secretion, the fluid released by follicles during ovulation and some reflux from the uterus (Aviles *et al.*, 2010, Leese, 1988, Malayer *et al.*, 1988, Roberts *et al.*, 1975). This complex fluid contains many metabolic compounds (Harris *et al.*, 2005; Hugentobler *et al.*, 2008; Hugentobler *et al.*, 2010, Leese *et al.*, 2008, Tay *et al.*, 1997) and a great variety of proteins (Aviles *et al.*, 2010, Buhi *et al.*, 2000, Georgiou *et al.*, 2007, Killian, 2004). The major non-serum protein present in the OF is the estrogen-dependent oviductal protein (OVGP1), also named oviductin or mucin-9 (Buhi, 2002).

OVGP1 belongs to the glycosyl hydrolase 18 family, all of whose members have a great identity and similarity in the N-terminal domain. This domain has been described as the catalytic domain of chitinases, meaning that OVGP1 is also a member of the chitinase family. However, OVGP1 lacks an essential glutamic acid residue in this N-terminal domain and, consequently, chitinase activity (Buhi, 2002). *OVGP1* gene has been identified in several placental species (Arias *et al.*, 1994, Buhi *et al.*, 1996, Desouza and Murray, 1995b, Donnelly *et al.*, 1991, Killian, 2004, Sendai *et al.*, 1994, Suzuki *et al.*, 1995, Verhage *et al.*, 1997a). However, it was reported that this protein is not expressed by the oviduct of rats because its homologous *OVGP1* is a pseudogene (Tian *et al.*, 2009).

Like other members of the chitinase family, OVGP1 has a large number of O-glycosylations, mainly located within the carboxy terminal region of the protein. Moreover, analysis of the sequence shows that the N-terminal region of the mature polypeptide OVGP1 has a high degree of identity (77-84%) and similarity (86-90%) among the studied species. However, C-terminal regions show a low degree of identity

(37-63%) and similarity (50-75%), with several insertions/deletions in their sequence. This C-terminal region of OVGP1 proteins contains mucin-type tandem-repeat sequences. Hamster OVGP1 has six repeats of 15 aminoacids each (Paquette *et al.*, 1995), human OVGP1 three repeats of 15 aminoacids and two incomplete repeats (Arias *et al.*, 1994), mouse OVGP1 has 21 repeats of seven aminoacids (Sendai *et al.*, 1995) and baboon, cattle, sheep and pig contain incomplete or no tandem-repeat sequences (Donnelly *et al.*, 1991, Malette *et al.*, 1995).

The OVGP1 sequence shows the presence of a signal peptide and several post-translational modification sites involved in the secretory pathway (Buhi, 2002). In addition, a clathrin box for endocytosis is present in the sequence (Kadam *et al.*, 2007) and OVGP1 has also been reported to be endocytosed by developing blastocysts (Kan *et al.*, 1993). It has been hypothesized that undergoes degradation through the ubiquitin pathway (Kan *et al.*, 1993). Moreover, *in silico* analysis of the deduced amino acid sequence has also revealed the presence of a Class III PDZ-binding domain in the OVGP1 of human, baboon, porcine and bonnet, suggesting that OVGP1 is a component of multi-protein complexes (Kadam *et al.*, 2007).

Comparison of the amino acid sequences of several mammalian OVGP1 reveals the existence of five different regions (A-E) (Aviles *et al.*, 2010). The A region corresponds to the N-terminal of the protein and it has a high degree of identity in monotremes, marsupials and placentals. This region is conserved in different mammals, as is the D region. The B region contains multiple insertions/deletions and shows low identity among different mammals. The C region is an insertion present only in *Mus* genus and the E region is typical of human, chimpanzee and orangutan (Aviles *et al.*, 2010). All mammalian OVGP1 proteins possess region A (archetypal of chitinase domain at the N-terminal) but differ in the length of the core proteins and therefore the presence/absence of the other regions in C-terminal position.

Several studies have shown that OVGP1 activity differs between species, as occurs with the amino acid sequence. It has been demonstrated that OVGP1 is necessary to overcome early embryonic block in mice (Yong *et al.*, 2002), to increase sperm capacitation and fertilization in cows (King *et al.*, 1994), to increase sperm-egg binding (Yang *et al.*, 2015) and penetration (Boatman and Magnoni, 1995) rates in hamster and human hemizona (OdayBowman *et al.*, 1996), to enhance embryo cleavage rates and

blastocyst formation including blocking polyspermy in goat (Pradeep *et al.*, 2011) and to increase the quality of *in vitro* matured and fertilized embryo in cat (Hribal *et al.*, 2014a). More specifically, in the porcine system, OVGP1 contributes to the control of polyspermy (Coy *et al.*, 2008a), improves *in vitro* fertilization efficiency (McCauley *et al.*, 2003) and increases the number of fertilized eggs that reach the blastocyst stage (Kouba *et al.*, 2000).

All these studies have highlighted the significant role of OVGP1 during the early events of the reproductive process, where it is necessary for the normal triggering of fertilization and early embryonic development. Consequently, OVGP1 would seem to be suitable for incorporation into the synthetic medium to improve assisted reproductive technologies. Despite the robust data obtained concerning the contribution of OVGP1 in reproductive physiology in different species, the molecular mechanism that would explain its role remains to be established. An *in silico* analysis could not confirm the contribution of every region of OVGP1 to its activity. What it is more, the relationship between the species-specific role of the protein and the presence/absence of the different C-terminal regions is unclear. For this reason this study makes a molecular and physiological assessment of the role of OVGP1 and its C-terminal region in fertilization.

8.2. Methods

To investigate the role of OVGP1 and its C-terminal region, several proteins were cloned with histidine tag at the C-terminal into three different expression vectors (pcDNA3.1 (+), pcDNA3 (+) and pHLsec3: full length porcine OVGP1 (pOVGP1) (Q28990), which consisted of 527 aa, including regions A (1-472), B (473-481) and D (482-527) (Aviles *et al.*, 2010); rabbit OVGP1 (rOVGP1) (Q95LB3), which contained 475 aa, where regions A (1-458) and B (459-467) were highly conserved compared with pig but region D was almost absent, and porcine OVGP1 which was truncated in the D region (pOVGP1AB) but had 481aa, including regions A (1-472) and B (473-481). In order to analyze the molecular implications of the different OVGP1 regions, each region of the protein was also cloned: A region (pOVGP1A) (aa 1-472), D region (mMBP-pOVGP1D) (aa 482-527) and BD regions (mMBP-pOVGP1BD) (aa 473-527). Because of the small size of the D and BD regions of pOVGP1, both of them were produced by fusing with maltose binding protein (mMBP) to improve the secretion and stabilize the

folding of the protein without affecting the activity (Bokhove *et al.*, 2016). Junction fragments and PCR products of all plasmids were verified by DNA sequencing and the presence of recombinant protein was confirmed by immunoblot after expression in heterologous HEK 293T and CHO cells. To perform the physiological analysis, recombinant proteins expressed in HEK 293T cells were purified by immobilized metal-affinity chromatography (IMAC). The cloned proteins were used to carry out molecular and physiological experiments: SDS-PAGE, Western-blot and Coomassie blue analysis; confocal immunofluorescence and immunogold transmission electron microscopy analysis; *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC); ZP resistance to proteolysis and mRNA abundance using the reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique.

8.3. Results and discussion

8.3.1. OVGPI binds to ZP through the N-terminal region

Using the recombinant proteins pOVGPI, pOVGPIAB and rOVGPI expressed in mammalian cell lines to perform confocal immunofluorescence analysis, we showed that the three proteins were able to bind to the ZP of IVM porcine oocytes. When recombinant proteins were generated from each region, only the protein corresponding to A region was able to bind to the ZP, demonstrating that the chitinase-like site could be associated with binding ability of region A to the ZP. Moreover, *in silico* analysis of the deduced amino acid sequence also revealed the presence of four regions corresponding to a Class III PDZ-binding domain (Kadam *et al.*, 2007), three of which are located within region A. Such sites could be related to molecular interactions with other proteins from oviductal fluids that are involved in mammalian fertilization or embryo development (Coy and Yanagimachi, 2015), generating the microenvironment necessary to control the fertilization process. However, this study has been shown that the A region is not involved in the species-specific binding property when the OVGPI cross-reactivity between species was analysed. Using pOVGPI and rOVGPI to incubate human, mouse, porcine and bovine oocytes, both recombinant proteins were seen to bind with the oocytes of the four species, except rOVGPI with human oocytes.

The idea of a specific O-glycosylation pattern triggering ZP-binding was discarded seeing that recombinant proteins expressed in two cells lines (CHO and HEK

293T) had equal affinity for the ZP. We also noticed that the absence of the D region did not alter the N-glycosylation pattern since three putative N-glycosylation sites in porcine pOVGP1 were localized in A region. Therefore, the 10 kDa shift observed using SDS-PAGE in truncated protein (pOVGP1AB) compared with the full length one (pOVGP1) might be attributed to the lack of 50 amino acids and O-glycosylation sites within the D region in C-terminal. All the recombinant proteins were secreted into the cell growth medium and their biological activity was confirmed by their capacity to bind to the ZP. Thus, deletion of the D region does not alter the synthesis pathway and proper folding of the OVGP1 protein.

8.3.2. C-terminal region of OVGP1 modulates the binding to the ZP

Using confocal analyses also it was detected that different C-terminal lengths of the protein modify the binding pattern to the ZP. While pOVGP1 was incorporated in more than half of the ZP thickness, rOVGP1 and truncated pOVGP1AB were retained in the outer part of the matrix, blocking the outer matrix pores. Despite the different distribution pattern through the ZP, equivalent amounts of protein were recovered from the oocytes incubated with all three proteins. When oocytes were incubated with pOVGP1, imaging of the ZP surface by confocal analysis showed the outer surface of the ZP as a mesh-like structure with numerous fenestrations formed of numerous pores and hollows, indicating that the protein was integrated in the 3D scaffold of the matrix. By contrast, the ZP of oocytes incubated with rOVGP1 showed as a spongy surface with very few or no porous areas, while proteins seemed to be stacked on the surface of the matrix forming a protein layer, blocking the pores. So, the porous surface observed in oocytes incubated with pOVGP1 was significantly higher ($p < 0.05$) than in oocytes incubated with rOVGP1. As regard the morphology of the ZP surface, several authors have assumed a correlation between surface morphology and the stage of maturity. Some authors (Calafell et al., 1992; Familiari et al., 1992; Motta et al., 1991) described a net-like porous surface, especially in mature oocytes, with increased roughness on the ZP surface, while immature oocytes had a compact type of surface without pores (Papi *et al.*, 2010). All these modifications were observed when ovulated oocytes were immersed in the OF, but there was no evidence concerning molecular factors involved in this mechanism. In our study, it was observed that the porcine full length OVGP1 was

incorporated in more than half of the ZP thickness. However, OVGP1 lacking region D led to the proteins being retained on the surface of the matrix. An intriguing feature that deserves mention is the observation that an equivalent amount of recombinant proteins tested was trapped within the ZP, suggesting that in the case of truncated porcine OVGP1 and rabbit OVGP1, more protein is concentrated on the surface of the matrix, probably modifying the ZP morphological structure. These results suggest that the region D at C-terminal modulates the ability of OVGP1 to bind to the ZP and the surface morphology of oocyte, generating oviductal maturation of the oocyte extracellular matrix.

8.3.3. Deletion of region D prevents OVGP1 endocytosis by the oocyte

Specific dotted labeling corresponding to pOVGP1 in the cortex ooplasm of IVM porcine oocytes was observed by confocal immunofluorescence. pOVGP1 was also detected within the multivesicular-like bodies located inside of the oocyte and in the cortex by immunogold transmission electron microscopy. These data suggest that pOVGP1 was endocytosed by the oocyte. By contrast, deletion of the c-terminal region prevents OVGP1 endocytosis because no signal was detected in the oocytes incubated with pOVGP1AB when domain D was deleted. Here, we assume that the lack of endocytosis of truncated OVGP1 is due to the protein being retained in the outer region of the ZP. Negative immunostaining was also observed when A, BD and D regions were incubated with the oocyte, suggesting that the full protein needs to be present to ensure the protein structure necessary to penetrate the entire ZP and to be endocytosed by the oocyte. Moreover, pOVGP1 incubation showed that protein is time-dependent accumulated in the oocyte cortex. The presence of the OVGP1 in multivesicular-like bodies observed here in IVM oocytes and in blastomeres of developing embryos (Kan et al., 1993) might explain the influence of OVGP1 in the early stage of development that has been reported for many species (Hribal *et al.*, 2014a, Pradeep *et al.*, 2011, Yong *et al.*, 2002).

8.3.4. Effect of recombinant OVGP1 proteins on ZP resistance to proteolysis

OVGP1 has been referred to as one of the OF components involved in enzymatic ZP hardening, whereby ZP acquires resistance to proteolytic digestion during oocyte transits along the oviductal tube (Coy *et al.*, 2008a). In order to check the influence of OVGP1 on ZP hardening, IVM porcine oocytes were exposed to 125 and 250 µg/mL of pOVGP1 and pOVGP1AB before testing the resistance of the ZP to proteolytic digestion. The ZP of porcine oocytes exposed to pOVGP1 at 125 and 250 µg/mL were dissolved by pronase in 24 (24.14 ± 3.32 min) and 102 (102 ± 11.39 min) minutes respectively, suggesting a dose-dependent effect of OVGP1 on ZP resistance to enzymatic proteolysis. In the case of oocytes exposed to porcine pOVGP1AB, the resistance of ZP to proteolysis increased to 112 (125 µg/ml, 112.52 ± 25.58 min) and 464 (250 µg/ml, 464.90 ± 73.48 min) minutes. The ZP of IVM porcine oocytes exposed to rOVGP1 at different concentrations showed digestion times of 6.35 ± 0.81 min (5 µg/ml), 312.21 ± 63.14 min (50 µg/ml) and 989.50 ± 151.41 min (125 µg/ml). Proteins lacking region D at the C-terminal showed higher resistance in the face of ZP digestion by pronase than full-length porcine OVGP1 at the same protein concentration. The present study clearly demonstrates that OVGP1 is at least one of the factors responsible for the ZP hardening in OF since oocytes incubated with recombinant porcine OVGP1 protein had a digestion time similar to that of oocytes incubated with OF (Coy *et al.*, 2008a). When the effect of incubating porcine, bovine and mouse oocyte with rOVGP1 and pOVGP1 on the ZP hardening was analyzed, we found that only the ZP of bovine and porcine oocytes increased resistance to proteolysis ($p < 0.05$). This difference is probably due to the difference in the protein composition of ZP between mouse, in which the ZP is composed of the proteins ZP1, ZP2 and ZP3, and pig and cow, whose ZP are composed of ZP2, ZP3 and ZP4 proteins.

Here, we prove that OVGP1 C-terminal is responsible for modulating the enzymatic hardening of ZP. We suggest that the lack of D region in rabbit OVGP1 is responsible for the pattern of ZP binding and, ultimately, for the specific effect on digestion time. This result clearly justifies the data published recently on how rabbit OF produced the largest increase in ZP resistance of all species tested (mouse, rat, hamster, rabbit, sheep, goat, pig and cow) (Mondéjar *et al.*, 2013c), while human oviductal fluid

lacked the effect on digestion time in porcine and human oocytes (Mondéjar *et al.*, 2013c). We confirm that the absence of region D increases digestion time necessary to degrade the ZP, while presence of an additional region in OVGPI C-terminal, region E, in humans or region C in mice, could remodel the matrix in different ways, favoring its penetration of ZP and justifying the absence of oviductal enzymatic ZP hardening in humans and OVGPI-ZP binding reduction in mice (Lyng and Shur, 2009). In humans, OVGPI may be more implicated in embryo development.

8.3.5. Only full porcine OVGPI increases fertilization efficiency

The ability of the OF to induce ZP hardening is proportional to its ability to induce monospermy after IVF in the pig system (Mondejar *et al.*, 2013b) and therefore, to control polyspermy. A comparison of IVF parameters between oocytes exposed to different recombinant proteins before and during the IVF process, together with their controls, was carried out with IVM porcine oocytes. Recombinant full length pOVGPI protein presented a significant increase in the percentage of monospermy (21.82 ± 5.62) ($p < 0.05$) compared with recombinant OVGPI from rabbit (rOVGPI, 8.60 ± 2.92) and porcine OVGPI truncated at C-terminal (pOVGPIAB, 7.14 ± 2.61). The percentage of monospermic oocytes exposed to rOVGPI and pOVGPIAB was similar to that in the control group (8.25 ± 2.80). However, no significant differences were seen in the percentage of penetration and number of spermatozoa bound to the ZP between oocytes exposed to the different recombinant proteins and control. The results showed that only full length recombinant pOVGPI was able to increase the final output of the IVF system (percentage of penetrated monospermic oocytes and fertilization efficiency) which was around 23% and 8% in the oocytes exposed to the shorter recombinant proteins and control, respectively. Moreover, we expected that truncated porcine OVGPI, which showed increased enzymatic hardening, might also improve fertilization efficiency. However, the incubation of OVGPI truncated at C-terminal had no effect in IVF parameters in pig. Here, the increase in enzymatic hardening only correlated with an improvement in the IVF rates when region D was present. Moreover, the numbers of spermatozoa bound to the ZP were similar when oocytes were incubated with each of the three proteins and control. It is demonstrated that OVGPI increases enzymatic hardening but a species-specific role modulating the sperm permissiveness throughout the remodeled ZP network can be attributed to OVGPI C-terminal. It has been reported

that treatment with porcine OF decreases the number of spermatozoa bound to the ZP (Coy *et al.*, 2008a). On the other hand, OVGPI has a positive effect on sperm-ZP binding in hamster, because recombinant OVGPI increased the number of spermatozoa bound to the ZP (Yang *et al.*, 2015). Human OVGPI during sperm-hemizona binding was found to enhance the binding of sperm to the ZP (OdayBowman *et al.*, 1996). Curiously, this author describes that homologous OVGPI enhances sperm binding to the ZP, whereas heterologous OVGPI inhibits the effect, suggesting that OVGPI plays a role in the species-specific characteristics of sperm-ZP binding (OdayBowman *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997b). In this context, it is important to highlight that although baboon OVGPI (P36718) shows 94% identity with human OVGPI (Q12889), the latter has an extra region, E, at the C-terminal which is absent in baboon. Moreover, Coy and co-workers showed that incubation of porcine oocytes with bovine oviductal fluid increased the rates of monospermy (Coy *et al.*, 2008a). In this heterologous system, OVGPI protein shows 78% identity but both share the same conservative regions (A, B and D). Here we obtain similar results in a heterologous system with proteins containing different regions at C-terminous. When rabbit OVGPI was tested in pig IVF, the protein did not affect the IVF parameters. All these data suggest that the presence/absence of conservative regions in C-terminal modify protein association to the ZP, specifically affecting matrix remodeling and hence sperm penetration of the ZP. Another factor that should be considered is that OVGPI may also modify sperm activity, in which case species-specific modification might also be influenced at sperm level.

8.3.6. Influence of OVGPI on in vitro embryo development

It has been shown that co-culturing embryos with oviductal cells or the *in vivo* culture of embryos in oviducts of recipient animals increases the success of development following IVF (Rizos *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2004). It had also been described that OVGPI influences the early stage of development in many species (Hribal *et al.*, 2014a; Pradeep *et al.*, 2011; Yong *et al.*, 2002). OVGPI increased the cleavage rate and the blastocyst yield in sheep (Hill *et al.*, 1996a), but the addition of the same protein in IVC after IVF increased the time taken by the embryo to reach the blastocyst stage (Hill *et al.*, 1996b). In the porcine system, treatment with OVGPI before and during IVF increased the number of oocytes reaching the blastocyst stage, but not the cleavage rate (Kouba *et al.*, 2000) and the use of cat OVGPI did not

improve cleavage or blastocyst rates (Hribal *et al.*, 2014a). So, in order to evaluate the effect of pOVGP1 protein in bovine early embryo development we tested the effect of 10 or 50 µg/mL of the protein during IVF (Day 0-1), IVC (Day 1-3.5) or both (Day 0-3.5). Whereas supplementation during IVF or IVC did not show any statistical effect on the cleavage rate or the blastocyst yield, there was a positive tendency in the blastocyst rate when 50µg/mL of pOVGP1 was used during IVC. A higher percentage of blastocysts at Day 9 was obtained when 10 µg/mL of pOVGP1 was used only during IVF (27.55±4.03) or when 50 µg/mL of pOVGP1 was used only during IVC (28.09±3.62) compared with the control (20.85±3.84). Supplementation with pOVGP1 during fertilization and culture was detrimental for embryo development at the higher dose. Thus, although the cleavage rate was similar between the control, IVF+IVC 10 and IVF+IVC 50 groups (84.59±3.18, 85.11±7.29 and 79.57±1.54%, respectively) the blastocyst rate at Day 9 decreased drastically in the IVF+IVC 50 group compared with the control and IVF+IVC 10 groups (12.65±0.92 vs. 20.83±3.84 and 24.20±2.23, respectively; (P<0.05). In agreement with the above, Pradeep and co-workers showed that the use of 10 µg/mL of OVGP1 increased the cleavage rate and the number of embryos that reach the blastocyst stage, but, using higher concentrations (50 and 100 µg/mL), it had an inhibitory effect (Pradeep *et al.*, 2011), as occurred with our results. These results show the importance of establishing the optimal dose of the protein.

8.3.7. OVGP1 affects relative mRNA abundance

Day 3.5 embryos cultured in 50 µg/mL of pOVGP1 during IVC showed a fluorescent signal bound to ZP, plasma membrane and embryo cytoplasm. These results demonstrate that pOVGP1 is attached to the ZP and endocytosed during early embryo development, which may have a positive effect on embryo quality and early embryo development. It had been shown that OVGP1 increases the expression of some genes involved in early embryo development (Hribal *et al.*, 2014a; Lloyd *et al.*, 2009b). So, we evaluate whether pOVGP1 had any effect on bovine embryo gene expression using RT-qPCR. Supplementation with 50µg/mL of pOVGP1 during IVF increased the expression of activating transcription factor 4 (*ATF4*), a gene related with endoplasmic reticulum homeostasis, while 10 and 50 µg/mL of pOVGP1 up-regulated the expression of aquaporin 3 (*AQP3*), a gene positively correlated with survival after vitrification (P<0.05). In addition to these genes, supplementation with 10 and 50µg/mL of

pOVGP1 during IVC also increased the expression of desmocollin 2 (*DSC2*), a gene involved in cell to cell communication ($P<0.05$). Finally, supplementation during IVF+IVC up-regulated the same genes (*ATF4*, *AQP3* and *DSC2*) in both concentrations (10 and 50 $\mu\text{g/mL}$) but only when the 50 $\mu\text{g/mL}$ concentration was used, DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha (*DNMT3A*), a gene related with epigenetics, was seen to be up-regulated ($P<0.05$). Moreover, the relative mRNA abundance of *DSC2*, *ATF4* and *AQP3*, marker genes of embryo quality, and the up-regulation of the epigenetics-related gene *DNMT3A* in blastocysts after OVGP1 treatment demonstrated the value of recombinant oviductin for increasing embryo quality.

In conclusion, we propose a model in which OVGP1 binds to ZP through region A, which is highly conserved among different species and which provides the anchor for other oviductal proteins. C-terminal regions of OVGP1 modulate OVGP1-ZP binding, regulate OVGP1 activity and explain the role played by OVGP1 in reproduction among species. In porcine, OVGP1 remodels the ZP structure, affecting ZP hardening and improving IVF efficiency and, even more importantly, the presence of a D region at C-terminal ensures OVGP1 endocytosis as oocytes pass through the oviduct, before and after fertilization. The inclusion of certain oviductal proteins in the IVF medium could improve fertility rates, not only as regard the numbers of potential embryos but also the quality of the same. We successfully used recombinant DNA technology to generate a biologically active and easily purified recombinant porcine OVGP1 protein. This protein could be incorporated as an enhancer component of IVF media because of its effect in improving fertility efficiency in the porcine system and the positive effect shown on developmental related genes, indicating an improvement in bovine embryo quality. We also describe the molecular activity of OVGP1, which can be associated with its C-terminal region. We suggest that the activity of the protein in other species might depend on the presence/absence of regions D, C or E. Interesting evolutionary points of view also emerge about the presence of specific domains in OVGP1 that modulate its activity, and therefore intrinsic species-specific conditions in reproductive physiology.

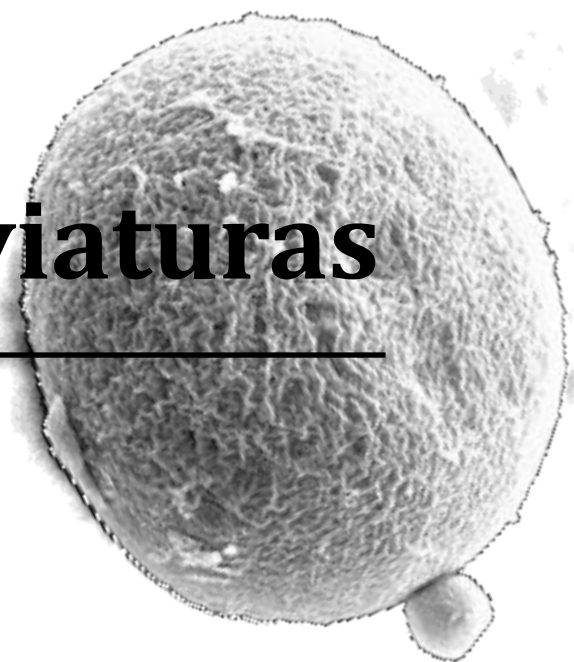
8.4. Conclusions

- I. Recombinant OVGPI proteins are efficiently expressed and secreted into the cell culture medium by mammalian HEK 293T and CHO cells.
- II. Removal of the carboxy-terminal D and BD regions of the OVGPI does not alter its biosynthesis and secretion.
- III. OVGPI binds to the ZP of oocytes through region A located in the amino terminus of the protein.
- IV. The OVGPI carboxy-terminal modulates the penetrability of the protein through the ZP and is responsible for altering its morphology.
- V. The presence of the carboxy-terminal D region of OVGPI is necessary to ensure endocytosis of the OVGPI by the oocyte.
- VI. OVGPI is the OF factor responsible for increasing ZP resistance to proteolytic digestion, while the carboxy-terminal of the protein modulates this hardening.
- VII. OVGPI increases the fertilization efficiency of the IVF porcine system, whose final output depends on the presence of the the carboxy-terminal D region of OVGPI.
- VIII. Incubation with OVGPI during IVF or IVC has a positive effect in the bovine system, while supplementation in both processes has a negative effect on the

final blastocyst output. Nevertheless, such incubation in both IVF and IVC improves embryo quality.

- IX. A biologically active and easily purified recombinant porcine OVGP1 has been generated. This protein improves fertility efficiency and embryo quality, and could be incorporated as a supplementary component of the cell culture medium used in assisted reproductive techniques with beneficial effects.

IX. Abreviaturas



aa: aminoácidos

ADN: ácido desoxiribonucleico

ADNc: ácido desoxiribonucleico complementario

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

AQP3: acuaporina 3

ARN: ácido ribonucleico

ARNc: ácido ribonucleico complementario

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

ATF4: factor activador de la transcripción 4

α -MAN: α -manosidasa

AWN: miembro de la familia de espermadhesinas

BSA: albúmina de suero bovino

β -GAL: β -galactosidasa

Ca²⁺: ión calcio

CCO: complejo cúmulo-ovocito

CETAB: bromuro de hexadecil-trimetilamonio

CHO: línea celular de ovario de hámster chino

CIV: cultivo *in vitro*

Cl⁻: ión cloro

CO: cúmulo ovífero

CO₂: dióxido de carbono

CT: ciclo umbral comparativo

dbAMPc: dibutiril AMP cíclico

DDIT3: transcrito 3 inducible por daño en el ADN

DSC2: desmocolina 2

DMBT1: proteína suprimida en tumores cerebrales malignos

DNMT3A: DNA (citosina-5-)-metiltransferasa 3 alfa

dNTPs: desoxirribonucleótidostrifosfato

DMSO: dimetilsulfóxido

DPBS: tampón fosfato salino de Dulbecco

DTT: ditioneitol

EPV: espacio perivitelino

ERE: elemento de respuesta a estrógenos
FIV: fecundación *in vitro*
FO: fluido oviductal
FOC: fluido oviductal de coneja
FOP: fluido oviductal porcino
FOS: fluido oviductal sintético
Folr4: receptor de folato
FSH: hormona folículo estimulante
GAG: glicosaminoglicano
GAG-S: glicosaminoglicano sulfatado
GC: gránulos corticales
GJA1: proteína de uniones gap alfa 1
GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas
GPI: glicosilfosfatidilinoxitol
hCG: gonadotropina coriónica humana
HCO₃⁻: ión bicarbonato
HEK 293T: línea celular de riñón embrionario humano
HRP: peroxidasa de rábano
HSPs: proteínas de choque térmico
ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides
IGF2R: receptor del factor de crecimiento 2 similar a la insulina
K⁺: ión potasio
KDM1A: demetilasa específica de lisina (K) 1A
LDH: lipoproteínas de alta densidad
LH: hormona luteinizante
L-PGDS: prostaglandina D sintasa tipo lipocalina
LTF: lactoferrina
MCO: medio de colección de ovocitos
Mg²⁺: ión magnesio
MIV: maduración *in vitro*
MII: metafase II
MUC1: mucina 1
MUC9: mucina9 u oviductina
MYH9: subunidad de miosina no muscular IIA

MΩ/cm: mili osmios por centímetro

Na⁺: ión sodio

NAGASA: β-N-acetyloglucosaminidasa

ON: óxido nítrico

ONS: óxido nítrico sintasa

OPN: osteopontina

OVGP1: glicoproteína específica del oviducto, Mucina-9 u Oviductina

PAEP: glicodelina, proteína placentaria 14 o proteína endometrial asociada a progesterona

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEI: polietilenimina

FF: fluido folicular

PMSG: gonadotropina sérica de yegua gestante

PNA: aglutinina de *Arachis hipogea*

PVA: polivinil- alcohol

PVDF: fluoruro de polivinilideno

P4: progesterona

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RA: reacción acrosómica

RDE: resistencia a la digestión en pronasa

RF: rojo fenol

RGD: arginina-glicina-ácido aspártico

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa

SBF: suero bovino fetal

SCL2A1: familia de transportadores de soluto 2 (transportador de glucosa facilitado) miembro 1

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

SEM: error estándar

SPP1: osteopontina

SPAM1: molécula de adhesión del espermatozoide.

SSF: solución salina fisiológica

TAE: tampón Tris, acetato y EDTA

TBST: tampón Tris, HCl, SDS y Tween 20

TRAs: técnicas de reproducción asistida

UI: unidades internacionales

VG: vesícula germinal

ZP: zona pelúcida

X. Anexos

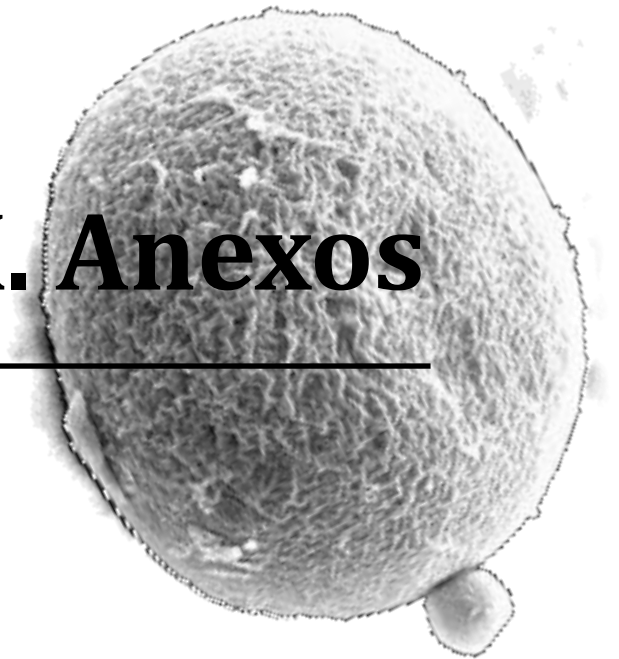


Tabla A1. Composición del medio de colección de ovocitos (MCO) bovinos.

MEDIO DE COLECCIÓN DE OVOCITOS (MCO)	
Componente	Concentración
Medio TCM-199 con sales de Earle y Glutamina (Sigma M-0393)	
Bicarbonato sódico (Sigma S-5761)	4,20 mM
Hepes (Sigma H-4034)	10,00 mM
Suero fetal bovino (Novalteck, 14-501)	2,00 % v/v
Glutamina (Sigma G-8540)	200,00 mM
Penicilina (Sigma P-3032)	10.000 UI/mL
Estreptomicina (Sigma S-9137)	10.000 UI/mL
Polivinilalcohol (PVA , Sigma P-8136)	0,005 g/L
Heparina (Analema, Vigo, España)	6 µl/mL
pH 7,4	

Tabla A2. Composición del medio de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos porcinos.

MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS PORCINOS (NCSU 37)	
Componente	Concentración (mM)
Cloruro de sodio (Sigma S-9888)	108,73
Bicarbonato sódico (Sigma S-5761)	25,07
Cloruro potásico (Sigma P-5405)	4,78
Dihidrógeno fosfato de potasio (Sigma P-5655)	1,19
Sulfato de magnesio heptahidratado (Sigma M-1880)	1,19
Cloruro cálcico dihidratado (Sigma C-7902)	1,70
Glucosa (Sigma G-7021)	5,55
Glutamina (Sigma G-8540)	1,00
D- Sorbitol (Sigma S-3889)	12,00
Penicilina G (Sigma P-3032)	0,18
Estreptomicina (Sigma S-9137)	39,00 UI/mL
Suplementos	Concentración
Cisteína (Sigma C-7352)	0,57 mM
β-mercaptoetanol (Sigma M-7154)	50,00 μM
Insulina (Sigma 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, España)	10,00 UI/mL
hCG (Laboratorios Intervet S.A. Salamanca, España)	10,00 UI/mL
pH 7,4	

Tabla A3. Composición del medio de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos.

MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS	
Componente	Concentración
Medio TCM-199 con sales de Earle y Glutamina (Sigma M-0393)	
L-Glutamina (Sigma G-8540)	2,00 mM
Piruvato de sodio (Sigma P-2256)	0,20 mM
Suero fetal bovino (Novalteck, 14-501)	10,00 % v/v
Gentamicina (Sigma 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
pH 7,4	

Tabla A4. Cebadores empleados en este trabajo. Se muestra el nombre de los oligonucleótidos con sus respectivas secuencias indicando si son directos (d) o reversos (r). Subrayadas se indican aquellas bases que no hibridan, generalmente introducidas para crear sitios de restricción. El sitio de reconocimiento por enzimas de restricción aparece en mayúsculas.

Cebador	Secuencia 5'→3'	TM (°C)
pOVGP1		
pOVGP1F (d)	gatcaGGTACC <u>atggggaagctgttctgtgggcgg</u>	79.8
pOVGP1R (r)	aagcaCAATTGttaatgatgatgatgatgatg <u>gtctgaccttctccagaggggagagtcac</u>	78.4
pOVGP1AB		
pOVGP1ABF (d)	gggcccAAGCTT <u>ggggcgccccc</u>	73.76
pOVGP1ABR (r)	gcgCTCGAGtcaatgatgatgatgatgatg <u>aggggtcatgccttctctccag</u>	68.97
pOVGP1A		
pOVGP1AF (d)	gggcccAAGCTT <u>ggggcgccccc</u>	73.76
pOVGP1AR (r)	gggcccCTCGAGtcaatgatgatgatgatgatg <u>ctcagcttccctctggagcgaca</u>	69.17
Fragmentos pOVGP1		
mMBP-pOVGP1DF (d)	aaggaaaaaGCGGCCGC <u>ggtgggcatccgtctgtg</u>	63.68
mMBP-pOVGP1DR (r)	ccgCTCGAG <u>gtctgaccttctccaga</u>	59.97
mMBP-pOVGP1BDF (d)	aaggaaaaaGCGGCCGC <u>gagccctggagagaaggcc</u>	61.85
mMBP-pOVGP1BDR (r)	ccgCTCGAG <u>gtctgaccttctccaga</u>	59.97
rOVGP1		
rOVGP1F (d)	cgcGGTACC <u>atgggaggtctgtctg</u>	62.24
rOVGP1R (r)	gggcccCTCGAGtcaatgatgatgatgatgatg <u>agcagaggtcatcgtcatcttg</u>	61.74

Tabla A5. Tampón de recorrido (10X): Se diluye hasta una concentración 1X para su uso rutinario.

Tampón de recorrido 10X	
Componente	Concentración
Tris Base	30,0 g/L
Glicina	144 g/L
SDS	10,0 g/L
El pH del tampón tras disolver todos los componentes debe de ser de 8,3.	

Tabla A6. Tampón de Transferencia (10X): Se diluye hasta una concentración 1X para su uso rutinario.

Tampón de transferencia 10X	
Componente	Concentración
Tris Base	5,8 g/L
Glicina	2,9 g/L
SDS	0,37 g/L
Metanol	200 mL/L

Tabla A7. TBST (10X): Se diluye hasta una concentración 1X para su uso rutinario.

Tampón TBST 10X	
Componente	Concentración
Tris Base	24 g/L
NaCl	88 g/L
Tween 20	10 mL/L
El pH del tampón antes de añadir el Tween 20 debe de ser de 7,6.	

Tabla A8. Anticuerpos utilizados en Western-blot e inmunocitoquímica.

Immunógeno	Dilución	Casa comercial	Referencia	Procedencia
Western-blot				
Anti-5xHis	1:2000	Quiagen	Cat. NO. 34660	Hilden, Alemania
Anti-OVGP1	1:10000	Abcam®	Ab118590	Cambridge, Gran Bretaña
Anti-β-actina HRP	1:5000	Abcam®	Ab20272	Cambridge, Gran Bretaña
Cabra anti-conejo IgG HRP	1:40000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2004	Heidelberg, Alemania
Cabra anti-ratón IgG HRP	1:5000	Chemicon International	AP124P	Temecula, CA, EEUU
Inmunocitoquímica				
Anti-5xHis	1:100	Quiagen	Cat. NO. 34660	Austin, TX, EEUU
Cabra-anti ratón IgG Alexa Fluor® 488	2.5:100	Life technologies	A11029	Waltham, MA, EEUU

Tabla A9. Composición del diluyente BTS para procesamiento de espermatozoides de verraco (Pursel *et al.*, 1975).

Diluyente BTS	
Componente	Concentración (mM)
Glucosa (Sigma G-7021)	0,0002
Na₂-EDTA . 2H₂O (Sigma S-5761)	36,36
NaHCO₃ (Sigma S-5761)	15,00
Citrato-Na₃ . 2H₂O (Sigma S-4641)	20,00
KCl (Sigma P-5405)	5,00
pH 7,2	

Tabla A10. Composición y preparación del gradiente de Percoll®.

Solución 10x stock	
Componente	Concentración (mM)
NaCl (Sigma S-9888)	799,96
KCl (Sigma S-5405)	30,85
NaH₂PO₄ · H₂O (Sigma S-9638)	28,98
Hepes (Sigma H-4034)	99,87
Percoll 90 %	
Componente	Concentración (mM)
Solución 10x stock	20 mL
NaHCO₃ (Sigma S-5761)	25,00
Lactato sódico (Sigma L-7900)	43,57
Percoll®	180,00 mL
MgCl₂ · 6H₂O (Sigma M-2393)	0,395
CaCl₂ 2 H₂O (Sigma C-7902)	1,95
Percoll 45 %	
Componente	Volumen (mL)
Percoll 90 %	5,00
BTS	5,00

Tabla A11. Composición del medio TALP (Tyrode-Albúmina-Lactato-Piruvato, (Rath *et al.*, 1999)

Medio TALP Stock	
Componente	Concentración (mM)
NaCl (Sigma S-9888)	114,06
NaHCO₃ (Sigma S-5761)	25,07
KCl (Sigma S-5405)	3,20
NaH₂PO₄ . H₂O (Sigma S-9638)	0,35
MgCl₂ . 6H₂O (Sigma M-2393)	0,50
Lactato de calcio . 5H₂O (Sigma C-8356)	8,00
Lactato sódico (Sigma L-7900)	10,00
Glucosa (Sigma C-7021)	5,00
Cafeína (Sigma C-0750)	2,00
Kanamicina (Sigma K-1377)	0,003
Rojo fenol (Sigma P-3532)	39,00 UI/mL
PVA (Sigma P-8136)	1,00 mg/mL
TALP Suplementado	
Componente	Concentración
BSA (Sigma A-9647)	0,03 % (w/v)
Piruvato sódico (Sigma P-2256)	0,12g/mL
pH 7,4	

Tabla A12. Composición del medio Tyrode's.

Medio Tyrode's Stock	
Componente	Concentración
Tyrode's Solution (Sigma T1788)	
Bicarbonato sódico (S-5761Sigma)	25 mM
Lactato sódico (Sigma L-4263)	22 mM
Piruvato sódico (Sigma P-4562)	1 mM
BSA libre de ácidos grasos (Sigma A-8806)	6 mg/mL
Heparina (Calbiochem 375095)	10 mg/mL
pH 7,4	

Tabla A13. Suplementación del fluido oviductal sintético (FOS) (Holm *et al.*, 1999).

FOS	
Componente	Concentración
FOS	
Lactato sódico (Sigma L-4263)	4,2 mM
Piruvato sódico (Sigma P-4562)	0,73 mM
BMN aminoácidos (Sigma B-6766)	30 µL/mL
MEM aminoácidos (Sigma M-7145)	10 µL/mL
Rojo fenol (P-0290)	1 µg/mL
pH 7,4	

Siglas del gen	Nombre del gen	Nº Acceso	Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')	Longitud del producto (pb)
<i>ACTB</i>	Actin, beta	AF191490.1	GAGAAGCTCTGCTACGTCG	CCAGACAGCACCGTGTGG	264
<i>ATF4</i>	Activating transcription factor 4	NM_001034342.2	CCGAGATGAGCTTTCTGAGC	AGCATCCTCCTTGCTGTTGT	224
<i>DDIT3</i>	DNA-damage-inducible transcript 3	NM_001078163.1	GTCACTGCCTTTCTCCTTCG	GGGAGGTGTGTGTGACCTCT	218
<i>DNMT3A</i>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha	AY271299	CTGGTGCTGAAGGACTTGGGC	CAGAAGAAGGGGCGGTCATC	318
<i>KDM1A</i>	Lysine (K)-specific demethylase 1A	XM_002685717.3	TTGGCCAACCTCTCAGAAGAC	CTCCACACCAGATGGTTCCTC	147
<i>DSC2</i>	Desmocollin 2	NM_001166526.1	CGCAACAACCTCCGGATGGATAT	GGTGGGTAATGCTGGAAACTGC	238
<i>GJA1</i>	Gap junction protein, alpha 1 (former <i>CX43</i>)	NM_174068.2	TGCCTTTCGTTGTAACACTCA	AGAACACATGAGCCAGGTACA	142
<i>H2AFZ</i>	H2A histone family, member Z	NM_174809	AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG	CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG	209
<i>IGF2R</i>	Insulin-like growth factor 2 receptor	NM_174352.2	GCTGCGGTGTGCCAAGTGAAAAAG	AGCCCCTCTGCCGTTGTTACCT	201
<i>AQP3</i>	Aquaporin 3	NM_001079794.1	CGGTGGTTTCCTCACCATCA	CAGAGGGGTAGGTGGCAAAG	299
<i>SCL2A1</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 1 (former <i>GLUT1</i>)	NM_174602.2	CTGATCCTGGGTCGCTTCAT	ACGTACATGGGCACAAAACCA	68

Tabla A14. Detalle de los cebadores utilizados para PCRq. Se muestra la secuencia de los oligonucleótidos indicando si son directos (d) o reversos (r) y la longitud del producto

XI. Bibliografía



- A**be, H. (1996). The mammalian oviductal epithelium: Regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histology and Histopathology* **11**, 743-768.
- Abe, H. and Hoshi, H. (2007). Regional and cyclic variations in the ultrastructural features of secretory cells in the oviductal epithelium of the Chinese Meishan pig. *Reproduction in Domestic Animals* **42**, 292-298.
- Abe, H. and Hoshi, H. (2008). Morphometric and ultrastructural changes in ciliated cells of the oviductal epithelium in prolific Chinese Meishan and Large White pigs during the oestrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals* **43**, 66-73.
- Abe, H. and Oikawa, T. (1990). Ultrastructural evidence for an association between an oviductal glycoprotein and the zona-pellucida of the golden-hamster egg. *Journal of Experimental Zoology* **256**, 210-221.
- Abe, H. and Oikawa, T. (1991). Immunocytochemical localization of an oviductal zona-pellucida glycoprotein in the oviductal epithelium of the golden-hamster. *Anatomical Record* **229**, 305-314.
- Abe, H., Onodera, M. and Sugawara, S. (1995a). Immunological detection and characterization of an estrus-associated antigen in the goat oviduct. *Journal of Experimental Zoology* **272**, 134-141.
- Abe, H., Satoh, T. and Hoshi, H. (1998). Primary modulation by oestradiol of the production of an oviduct-specific glycoprotein by the epithelial cells in the oviduct of newborn golden hamsters. *Journal of Reproduction and Fertility* **112**, 157-163.
- Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T. and Hoshi, H. (1995b). Bovine oviduct-specific glycoprotein - a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in-vitro. *Molecular Reproduction and Development* **42**, 226-232.
- Abe, H., Sendai, Y., Satoh, T. and Hoshi, H. (1995c). Secretory products of bovine oviductal epithelial-cells support the viability and motility of bovine spermatozoa in culture in-vitro. *Journal of Experimental Zoology* **272**, 54-61.
- Abeydeera, L.R., Wang, W.H., Prather, R.S. and Day, B.N. (1998). Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: Fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biology of Reproduction* **58**, 1316-1320.
- Acuña Meléndez, O.S. (2015). Análisis transcriptómico y proteómico del oviducto y útero bovino en la fase periovulatoria. *Proyecto de investigación*: .
- Agre, P. and Kozono, D. (2003). Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *Febs Letters* **555**, 72-78.
- Alminana, C., Heath, P.R., Wilkinson, S., Sanchez-Osorio, J., Cuello, C., Parrilla, I., *et al.* (2012). Early Developing Pig Embryos Mediate Their Own Environment in the Maternal Tract. *Plos One* **7**, 15.
- Ambrosi, B., Accogli, G., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Monget, P., *et al.* (2013). Deleted in malignant brain tumor 1 is secreted in the oviduct and involved in the mechanism of fertilization in equine and porcine species. *Reproduction* **146**, 119-133.

- Anderson, D.J., Abbott, A.F. and Jack, R.M. (1993). The role of complement component c3b and its receptors in sperm oocyte interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10051-10055.
- Araki, Y., Kurata, S., Oikawa, T., Yamashita, T., Hiroi, M., Naiki, M. and Sendo, F. (1987). A monoclonal antibody reacting with the zona pellucida of the oviductal egg but not with that of the ovarian egg of the golden hamster. *Journal of reproductive immunology* **11**, 193-208.
- Araki, Y., Nohara, M., Yoshida-Komiya, H., Kuramochi, T., Ito, M., Hoshi, H., *et al.* (2003). Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization. *Biochemical Journal* **374**, 551-557.
- Arias, E.B., Verhage, H.G. and Jaffe, R.C. (1994). Complementary deoxyribonucleic-acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biology of Reproduction* **51**, 685-694.
- Aricescu, A.R., Lu, W.X. and Jones, E.Y. (2006). A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **62**, 1243-1250.
- Asch, R., Simerly, C., Ord, T., Ord, V.A. and Schatten, G. (1995). The stages at which human fertilization arrests - Microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Human Reproduction* **10**, 1897-1906.
- Austin, C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Scientific Research Series B-Biological Sciences* **4**, 581-&.
- Aviles, M., Castells, M.T., Abascal, I., Martinez-Menarguez, J.A., Draber, P., Kan, F.W.K. and Ballesta, J. (1999). Cytochemical localization of GalNAc and GalNAc beta 1, 4Gal beta 1,4 disaccharide in mouse zona pellucida. *Cell and Tissue Research* **295**, 269-277.
- Aviles, M., El-Mestrah, M., Jaber, L., Castells, M.T., Ballesta, J. and Kan, F.W. (2000a). Cytochemical demonstration of modification of carbohydrates in the mouse zona pellucida during folliculogenesis. *Histochemistry and cell biology* **113**, 207-219.
- Aviles, M., Gutierrez-Adan, A. and Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Molecular Human Reproduction* **16**, 896-906.
- Aviles, M., Jaber, L., Castells, M.T., Ballesta, J. and Kan, F.W.K. (1996a). Evidence or modifications of carbohydrate residues in the mouse ovarian zona pellucida during the folliculogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **7**, 1783-1783.
- Aviles, M., Jaber, L., Castells, M.T., Ballesta, J. and Kan, F.W.K. (1997). Modifications of carbohydrate residues and ZP2 and ZP3 glycoproteins in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biology of Reproduction* **57**, 1155-1163.
- Aviles, M., Jaber, L., Castells, M.T., Kan, F.K.W. and Ballesta, J. (1996b). Modifications of the lectin binding pattern in the rat zona pellucida after in vivo fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **44**, 370-381.
- Aviles, M., Okinaga, T., Shur, B.D. and Ballesta, J. (2000b). Differential expression of glycoside residues in the mammalian zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development* **57**, 296-308.

- B**aba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S.-i. and Toyoda, Y. (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 31845-31849.
- Barros, C. and Yanagima.R (1971). Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* **233**, 268-&.
- Barton, S.C., Arney, K.L., Shi, W., Niveleau, A., Fundele, R., Surani, M.A. and Haaf, T. (2001). Genome-wide methylation patterns in normal and uniparental early mouse embryos. *Human Molecular Genetics* **10**, 2983-2987.
- Batista, R.I.T.P., Moro, L.N., Corbin, E., Alminana, C., Souza-Fabjan, J.M.G., de Figueirêdo Freitas, V.J. and Mermillod, P. (2016). Combination of oviduct fluid and heparin to improve monospermic zygotes production during porcine in vitro fertilization. *Theriogenology*.
- Bauersachs, S., Blum, H., Mallok, S., Wenigerkind, H., Rief, S., Prella, K. and Wolf, E. (2003). Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: A transcriptomics approach. *Biology of Reproduction* **68**, 1170-1177.
- Bauersachs, S., Rehfeld, S., Ulbrich, S.E., Mallok, S., Prella, K., Wenigerkind, H., *et al.* (2004). Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *Journal of Molecular Endocrinology* **32**, 449-466.
- Bearden HJ, Fuquay JW. 1997. Applied animal reproduction. 4th ed. Upper Saddle River, NJ:Prentice Hall.
- Bedford, J.M. (2004). Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biological Reviews* **79**, 429-460.
- Bell, C.E., Larivière, N.M., Watson, P.H. and Watson, A.J. (2009). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways mediate embryonic responses to culture medium osmolarity by regulating Aquaporin 3 and 9 expression and localization, as well as embryonic apoptosis. *Human reproduction* **24**, 1373-1386.
- Belve, A.R. and McDonald, M.F. (1968). Directional flow of fallopian tube secretion in romney ewe. *Journal of Reproduction and Fertility* **15**, 357-&.
- Benga, G. (2012). The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: molecular characteristics, functions and medical implications. *Molecular aspects of medicine* **33**, 518-534.
- Benoff, S. (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. *Molecular Human Reproduction* **3**, 599-637.
- Berger, T., Turner, K.O., Meizel, S. and Hedrick, J.L. (1989). Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biology of Reproduction* **40**, 525-530.
- Bergqvist, A.S., Killian, G., Erikson, D., Hoshino, Y., Bage, R., Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. (2005). Detection of Fas ligand in the bovine oviduct. *Animal Reproduction Science* **86**, 71-88.
- Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P. and Gutierrez-Adan, A. (2008). Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiological Genomics* **32**, 264-272.

- Bhatt, P., Kadam, K., Saxena, A. and Natraj, U. (2004). Fertilization, embryonic development and oviductal environment: role of estrogen induced oviductal glycoprotein. *Indian journal of experimental biology* **42**, 1043-1055.
- Bian, F.H., Mao, G.K., Guo, M., Mao, G.P., Wang, J.W., Li, J.X., *et al.* (2012). Gradients of natriuretic peptide precursor A (NPPA) in oviduct and of natriuretic peptide receptor 1 (NPR1) in spermatozoon are involved in mouse sperm chemotaxis and fertilization. *Journal of Cellular Physiology* **227**, 2230-2239.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D. and Wright, G.J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**, 483-487.
- Bishop, D.W. (1956). Active secretion in the rabbit oviduct. *American Journal of Physiology* **187**, 347-352.
- Black, D.L., Duby, R.T. and Riesen, J. (1963). Apparatus for continuous collection of sheep oviduct fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* **6**, 257-&.
- Blandau, R. (1973). Gamete transport in the female mammal. *Handbook of Physiology* **2**, 153-163.
- Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1980). Structure and function of the zona pellucida - identification and characterization of the proteins of the mouse oocytes zona pellucida. *Developmental Biology* **76**, 185-202.
- Bloor, D.J., Metcalfe, A.D., Rutherford, A., Brison, D.R. and Kimber, S.J. (2002). Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Molecular Human Reproduction* **8**, 237-245.
- Boatman, D.E. and Magnoni, G.E. (1995). Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden-hamster. *Biology of Reproduction* **52**, 199-207.
- Boatman, D.E. and Robbins, R.S. (1991). Bicarbonate - carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biology of Reproduction* **44**, 806-813.
- Boice, M.L., Geisert, R.D., Blair, R.M. and Verhage, H.G. (1990a). Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biology of Reproduction* **43**, 457-465.
- Boice, M.L., McCarthy, T.J., Mavrogianis, P.A., Fazleabas, A.T. and Verhage, H.G. (1990b). Localization of oviductal glycoproteins within the zona-pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*papio-anubis*). *Biology of Reproduction* **43**, 340-346.
- Boilard, M., Reyes-Moreno, C., Lachance, C., Massicotte, L., Bailey, J.L., Sirard, M.A. and 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. *Biology of Reproduction* **71**, 1879-1889.
- Bokhove, M., Al Hosseini, H.S., Saito, T., Dioguardi, E., Gegenschatz-Schmid, K., Nishimura, K., *et al.* (2016). Easy mammalian expression and crystallography of maltose-binding protein-fused human proteins. *Journal of Structural Biology* **194**, 1-7.
- Boot, R.G., Renkema, G.H., Strijland, A., Vanzonneveld, A.J. and Aerts, J. (1995). Cloning of a cDNA-encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26252-26256.
- Borland, R.M., Biggers, J.D., Lechene, C.P. and Taymor, M.L. (1980). Elemental composition of fluid in the human fallopian-tube. *Journal of Reproduction and Fertility* **58**, 479-482.

- Brewis, I.A., Winston, R.M.L. and Leese, H.J. (1992). Energy-metabolism of the human fallopian-tube. *Journal of Reproduction and Fertility* **95**, 257-262.
- Briton-Jones, C., Lok, I.H., Cheung, C.K., Chiu, T.T.Y., Cheung, L.P. and Haines, C. (2004). Estradiol regulation of oviductin/oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid expression in human oviduct mucosal cells in vitro. *Fertility and Sterility* **81**, 749-756.
- Briton-Jones, C., Lok, I.H., Yuen, P.M., Chiu, T.T.Y., Cheung, L.P. and Haines, C. (2001). Regulation of human oviductin mRNA expression in vivo. *Fertility and Sterility* **75**, 942-946.
- Broermann, D.M., Xie, S., Nephew, K.P. and Pope, W.F. (1989). Effects of the oviduct and wheat-germ agglutinin on enzymatic digestion of porcine zona pellucidae. *Journal of Animal Science* **67**, 1324-1329.
- Brown, C.R. and Cheng, W.K.T. (1986). Changes in composition of the porcine zona-pellucida during development of the oocyte to the 2-cell to 4-cell embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **92**, 183-191.
- Buhi, W., Alvarez, I., Sudhipong, V. and Dones-Smith, M. (1990). Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. *Biology of reproduction* **43**, 929-938.
- Buhi, W., Bazer, F., Alvarez, I. and Mirandot, M. (1991). In Vitro Synthesis of Oviductal Proteins Associated with Estrus and 17 β -Estradiol-Treated Ovariectomized Ewes*. *Endocrinology* **128**, 3086-3095.
- Buhi, W.C. (2002). Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* **123**, 355-362.
- Buhi, W.C., Alvarez, I.M., Choi, I., Cleaver, B.D. and Simmen, F.A. (1996). Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biology of Reproduction* **55**, 1305-1314.
- Buhi, W.C., Alvarez, I.M. and Kouba, A.J. (2000). Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs* **166**, 165-179.
- Buhi, W.C., Obrien, B., Alvarez, I.M., Erdos, G. and Dubois, D. (1993). Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona-pellucida, perivitelline space, and plasma-membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biology of Reproduction* **48**, 1274-1283.
- Buhi, W.C., Vallet, J.L. and Bazer, F.W. (1989). Denovo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture. *Journal of Experimental Zoology* **252**, 79-88.
- Bureau, M., Bailey, J.L. and Sirard, M.A. (2002). Binding regulation of porcine spermatozoa to oviductal vesicles in vitro. *Journal of Andrology* **23**, 188-193.
- Burkitt, M., Walker, D., Romano, D.M. and Fazeli, A. (2012). Using computational modeling to investigate sperm navigation and behavior in the female reproductive tract. *Theriogenology* **77**, 703-716.
- Burkman, L.J., Overstreet, J.W. and Katz, D.F. (1984). A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviducal isthmus. *Journal of Reproduction and Fertility* **71**, 367-376.
- Buxton, R.S., Cowin, P., Franke, W.W., Garrod, D.R., Green, K.J., King, I.A., et al. (1993). Nomenclature of the desmosomal cadherins. *Journal of Cell Biology* **121**, 481-483.

- Buxton, R.S. and Magee, A.I. (1992). Structure and interactions of desmosomal and other cadherins. *Seminars in cell biology* **3**, 157-167.
- Bylander, A., Nutu, M., Wellander, R., Goksor, M., Billig, H. and Larsson, D.G.J. (2010). Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8**, 8.
- Calafell, J.M., Nogues, C., Ponsa, M., Santalo, J. and Egozcue, J. (1992). Zona-pellucida surface of immature and invitro matured mouse oocytes - analysis by scanning electron-microscopy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **9**, 365-372.
- Campos, I., Coy, P., Romar, R., Ruiz, S. and Gadea, J. (2001). Effects of maturational stage, cumulus cells and coincubation of mature and immature cumulus-oocyte complexes on in vitro penetrability of porcine oocytes. *Theriogenology* **55**, 1489-1500.
- Cancel, A.M., Chapman, D.A. and Killian, G.J. (1997). Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction* **57**, 1293-1301.
- Carlson, D., Black, D.L. and Howe, G.R. (1970). Oviduct secretion in cow. *Journal of Reproduction and Fertility* **22**, 549-&.
- Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., *et al.* (1994). Physiological consequences of loss of plasminogen-activator gene-function in mice. *Nature* **368**, 419-424.
- Carney, D., Haviland, D., Noack, D., Wetsel, R., Vik, D. and Tack, B. (1991). Structural aspects of the human C5 gene. Intron/exon organization, 5'-flanking region features, and characterization of two truncated cDNA clones. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 18786-18791.
- Carrasco, L.C., Coy, P., Aviles, M., Gadea, J. and Romar, R. (2008a). Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reproduction Fertility and Development* **20**, 808-817.
- Carrasco, L.C., Romar, R., Aviles, M., Gadea, J. and Coy, P. (2008b). Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction* **136**, 833-842.
- Cebrian-Serrano, A., Salvador, I., Garcia-Rosello, E., Pericuesta, E., Perez-Cerezales, S., Gutierrez-Adan, A., *et al.* (2013). Effect of the Bovine Oviductal Fluid on In Vitro Fertilization, Development and Gene Expression of In Vitro-Produced Bovine Blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals* **48**, 331-338.
- Chang, H.X. and Suarez, S.S. (2010). Rethinking the Relationship Between Hyperactivation and Chemotaxis in Mammalian Sperm. *Biology of Reproduction* **83**, 507-513.
- Chang, M. (1955). Developpement de la capacité fertilisatrice des spermatozoides du lapin al'interieure du tractus genital femelle et fecondabilité des oeufs de lapine. *La fonction tubaire et ses troubles. Masson, Paris*, 40-52.
- Chang, M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**, 697-698.
- Chang, M.C. (1966). TRansport of eggs from fallopian tube to uterus as a function of oestrogen. *Nature* **212**, 1048-&.
- Chiu, P.C.N., Chung, M.K., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Ho, P.C., *et al.* (2007a). Cumulus oophorus-associated glycodelin-C displaces sperm-bound

- glycodelin-A and -F and stimulates spermatozoa-zona pellucida binding. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 5378-5388.
- Chiu, P.C.N., Chung, M.K., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Ho, P.C., *et al.* (2007b). Glycodelin-A interacts with fucosyltransferase on human sperm plasma membrane to inhibit spermatozoa-zona pellucida binding. *Journal of Cell Science* **120**, 33-44.
- Clulow, J., Trudeau, V.L. and Kouba, A.J. (2014) Amphibian Declines in the Twenty-First Century: Why We Need Assisted Reproductive Technologies. In *Reproductive Sciences in Animal Conservation: Progress and Prospects*, W.V. Holt, J.L. Brown, P. Comizzoli (eds.). Berlin, Springer-Verlag Berlin, pp. 275-316.
- Collins, J.E., Lorimer, J.E., Garrod, D.R., Pidsley, S.C., Buxton, R.S. and Fleming, T.P. (1995). Regulation of desmocollin transcription in mouse preimplantation embryos. *Development* **121**, 743-753.
- Comer, M.T., Leese, H.J. and Southgate, J. (1998). Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium. *Human Reproduction* **13**, 3114-3120.
- Comizzoli, P. (2015). Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian Journal of Andrology* **17**, 640-645.
- Comizzoli, P. and Holt, W.V. (2014) Recent Advances and Prospects in Germplasm Preservation of Rare and Endangered Species. In *Reproductive Sciences in Animal Conservation: Progress and Prospects*, W.V. Holt, J.L. Brown, P. Comizzoli (eds.). Berlin, Springer-Verlag Berlin, pp. 331-356.
- Conner, S.J., Lefievre, L., Hughes, D.C. and Barratt, C.L.R. (2005). Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Human Reproduction* **20**, 1148-1152.
- Coy, P. and Aviles, M. (2010). What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biological Reviews* **85**, 593-605.
- Coy, P., Canovas, S., Mondejar, I., Saavedra, M.D., Romar, R., Grullon, L., *et al.* (2008a). Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 15809-15814.
- Coy, P., Gadea, J., Rath, D. and Hunter, R.H.F. (2009). Differing sperm ability to penetrate the oocyte in vivo and in vitro as revealed using colloidal preparations. *Theriogenology* **72**, 1171-1179.
- Coy, P., Gadea, J., Romar, R., Matas, C. and Garcia, 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**, 279-288.
- Coy, P., Garcia-Vazquez, F.A., Visconti, P.E. and Aviles, M. (2012a). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* **144**, 649-660.
- Coy, P., Grullon, L., Canovas, S., Romar, R., Matas, C. and Aviles, M. (2008b). Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* **135**, 19-27.
- Coy, P., Jimenez-Movilla, M., Garcia-Vazquez, F.A., Mondejar, I., Grullon, L. and Romar, R. (2012b). Oocytes use the plasminogen-plasmin system to remove supernumerary spermatozoa. *Human Reproduction* **27**, 1985-1993.

- Coy, P. and Yanagimachi, R. (2015). The Common and Species-Specific Roles of Oviductal Proteins in Mammalian Fertilization and Embryo Development. *Bioscience* **65**, 973-984.
- Croxatto, H.B. and Ortiz, M.E.S. (1975). Egg transport in fallopian-tube. *Gynecologic Investigation* **6**, 215-225.
- Cseh, S. and Solti, L. (2000). Importance of assisted reproductive technologies in the conservation of wild, rare or indigenous ungulates: Review article. *Acta Veterinaria Hungarica* **48**, 313-323.
- D**ale, B. and DeFelice, L. (2011). Polyspermy prevention: facts and artifacts? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **28**, 199-207.
- Davachi, N.D., Shahneh, A.Z., Kohram, H., Zhandi, M., Shamsi, H., Hajiyavand, A.M. and Saadat, M. (2015). Differential influence of ampullary and isthmic derived epithelial cells on zona pellucida hardening and in vitro fertilization in ovine. *Reproductive Biology*.
- Dean, J. (2004). Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays* **26**, 29-38.
- Dell'Aquila, M.E., De Felici, M., Massari, S., Maritato, F. and Minoia, P. (1999). Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Biology of Reproduction* **61**, 533-540.
- Denhardt, D.T. and Guo, X.J. (1993). Osteopontin - A protein with diverse functions. *Faseb Journal* **7**, 1475-1482.
- Desantis, S., Zizza, S., Accogli, G., Acone, F., Rossi, R. and Resta, L. (2011). Morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium during oestrus. *Theriogenology* **75**, 671-678.
- Desouza, M.M. and Murray, M.K. (1995). An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* **136**, 2485-2496.
- DeSouza, M.M. and Murray, M.K. (1995). An estrogen-dependent sheep oviductal glycoprotein has glycan linkages typical of sialomucins and does not contain chitinase activity. *Biology of reproduction* **53**, 1517-1526.
- Devine, P.L. and McKenzie, I.F. (1992). Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *Bioessays* **14**, 619-625.
- Dickens, C.J., Comer, M.T., Southgate, J. and Leese, H.J. (1996). Human Fallopian tubal epithelial cells in vitro: Establishment of polarity and potential role of intracellular calcium and extracellular ATP in fluid secretion. *Human Reproduction* **11**, 212-217.
- Dickens, C.J., Maguiness, S.D., Comer, M.T., Palmer, A., Rutherford, A.J. and Leese, H.J. (1995). HUman tubal fluid - Formation and composition during vascular perfusion of the fallopian-tube. *Human Reproduction* **10**, 505-508.
- Dickens, C.J., Southgate, J. and Leese, H.J. (1993). Use of primary cultures of rabbit oviduct epithelial-cells to study the ionic basis of tubal fluid formation. *Journal of Reproduction and Fertility* **98**, 603-610.
- Dietzel, E., Wessling, J., Floehr, J., Schafer, C., Ensslen, S., Denecke, B., *et al.* (2013). Fetuin-B, a Liver-Derived Plasma Protein Is Essential for Fertilization. *Developmental Cell* **25**, 106-112.

- Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Mori, C., Nakamura, N., PoormanAllen, P., *et al.* (1996). Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3264-3268.
- Donnelly, K.M., Fazleabas, A.T., Verhage, H.G., Mavrogianis, P.A. and Jaffe, R.C. (1991). Cloning of a recombinant complementary DNA to a baboon (*Papio anubis*) estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Molecular Endocrinology* **5**, 356-364.
- Dovolou, E., Samartzi, F., Perreau, C., Krania, F., Cordova, A., Vainas, E., *et al.* (2016). The activity of three glycosidases (beta-N-acetylglucosaminidase, alpha-mannosidase, and beta-galactosidase) in the follicular fluid and in the maturation medium affects bovine oocyte maturation. *Theriogenology* **85**, 1468-1475.
- Ducibella, T., Kurawasa, S., Rangarajan, S., Kopf, G.S. and Schultz, R.M. (1990). Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Developmental biology* **137**, 46-55.
- Duranthon, V., Watson, A.J. and Lonergan, P. (2008). Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction* **135**, 141-150.
- E**bisch, I.M.W., Thomas, C.M.G., Wetzels, A.M.M., Willemsen, W.N.P., Sweep, F. and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2008). Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertility and Sterility* **90**, 2340-2350.
- Edashige, K., Ohta, S., Tanaka, M., Kuwano, T., Valdez, D.M., Hara, T., *et al.* (2007). The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. *Biology of reproduction* **77**, 365-375.
- Edashige, K., Tanaka, M., Ichimaru, N., Ota, S., Yazawa, K., Higashino, Y., *et al.* (2006). Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biology of Reproduction* **74**, 625-632.
- Edashige, K., Yamaji, Y., Kleinhans, F. and Kasai, M. (2003). Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction* **68**, 87-94.
- Edwards, L.J. and Leese, H.J. (1993). Glucose-transport and metabolism in rabbit oviduct epithelial-cells. *Journal of Reproduction and Fertility* **99**, 585-591.
- Ehrenwald, E., Foote, R.H. and Parks, J.E. (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Molecular Reproduction and Development* **25**, 195-204.
- Einspanier, R., Lauer, B., Gabler, C., Kamhuber, M. and Schams, D. (1997). Egg-cumulus-oviduct interactions and fertilization. *Fate of the Male Germ Cell* **424**, 279-289.
- Eisenbach, M. and Giojalas, L.C. (2006). Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 276-285.
- Ekhlesi-Hundrieser, M., Sinowatz, F., De Wilke, I.G., Waberski, D. and Topfer-Petersen, E. (2002). Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Molecular Reproduction and Development* **61**, 32-41.

- El-Mestrah, M. and Kan, F.W.K. (2001). Distribution of lectin-binding glycosidic residues in the hamster follicular oocytes and their modifications in the zona pellucida after ovulation. *Molecular Reproduction and Development* **60**, 517-534.
- Elhassan, Y.M., Wu, G., Leanez, A.C., Tasca, R.J., Watson, A.J. and Westhusin, M.E. (2001). Amino acid concentrations in fluids from the bovine oviduct and uterus and in KSOM-based culture media. *Theriogenology* **55**, 1907-1918.
- Ellington, J.E., Igotz, G.G., Ball, B.A., Meyerswallen, V.N. and Currie, W.B. (1993). Denovo protein-synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial-cells changes during coculture with bull spermatozoa. *Biology of Reproduction* **48**, 851-856.
- Elliott, R.M.A., Lloyd, R.E., Fazeli, A., Sostaric, E., Georgiou, A.S., Satake, N., *et al.* (2009). Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. *Reproduction* **137**, 191-203.
- Engle, C.C. and Foley, C.W. (1975). Certain physiochemical properties of uterine tubal fluid, follicular-fluid, and blood-plasma in mare. *American Journal of Veterinary Research* **36**, 149-154.
- Estes Jr, W. (1924). Ovarian implantation. *Surg Gynecol Obstet* **38**, 394.
- Estes, W.L. and Heitmeyer, P. (1934). Incidence of pregnancy following ovarian implantation. *The American Journal of Surgery* **24**, 563-581.
- Evsikov, A.V., Graber, J.H., Brockman, J.M., Hampl, A., Holbrook, A.E., Singh, P., *et al.* (2006). Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes & Development* **20**, 2713-2727.

- F**abryova, K. and Simon, M. (2009). Function of the cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes. *General Physiology and Biophysics* **28**, 1-7.
- Familiari, G., Heyn, R., Relucenti, M. and Sathananthan, H. (2008). Structural changes of the zona pellucida during fertilization and embryo development. *Frontiers in Bioscience* **13**, 6730-6751.
- Familiari, G., Nottola, S.A., Macchiarelli, G., Micara, G., Aragona, C. and Motta, P.M. (1992). Human zona-pellucida during invitro fertilization - an ultrastructural-study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Molecular Reproduction and Development* **32**, 51-61.
- Familiari, G., Nottola, S.A., Micara, G., Aragona, C. and Motta, P.M. (1988). Is the sperm-binding capability of the zona pellucida linked to its surface structure? A scanning electron microscopic study of human in vitro fertilization. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer* **5**, 134-143.
- Familiari, G., Relucenti, M., Heyn, R., Micara, G. and Correr, S. (2006). Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microscopy Research and Technique* **69**, 415-426.
- Fang, Y., Zhang, X.S., Zhang, J.L., Zhong, R.Z. and Zhou, D.W. (2016). Global DNA methylation and related mRNA profiles in sheep oocytes and early embryos derived from pre-pubertal and adult donors. *Animal Reproduction Science* **164**, 144-151.
- Farin, P.W., Piedrahita, J.A. and Farin, C.E. (2006). Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* **65**, 178-191.

- Fazeli, A., Affara, N.A., Hubank, M. and Holt, W.V. (2004). Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. *Biology of Reproduction* **71**, 60-65.
- Fazeli, A., Elliott, R.M.A., Duncan, A.E., Moore, A., Watson, P.F. and Holt, W.V. (2003). In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal apical plasma membrane preparations. *Reproduction* **125**, 509-517.
- Fazeli, A., Hage, W.J., Cheng, F.P., Voorhout, W.F., Marks, A., Bevers, M.M. and Colenbrander, B. (1997). Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biology of Reproduction* **56**, 430-438.
- Fazleabas, A.T. and Verhage, H.G. (1986). The detection of oviduct-specific proteins in the baboon (*papio-anubis*). *Biology of Reproduction* **35**, 455-462.
- Fernandez-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jimenez, A., Perez-Crespo, M., Ramirez, M.A., *et al.* (2004). Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 5880-5885.
- Fischer, B. and Bavister, B.D. (1993). Oxygen-tension in the oviduct and uterus of rhesus-monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* **99**, 673-679.
- Fleming, T.P., Garrod, D.R. and Elsmore, A.J. (1991). Desmosome biogenesis in the mouse preimplantation embryo. *Development* **112**, 527-539.
- Florman, H.M. and Ducibella, T. (2006). Fertilization in mammals. *Knobil and Neill's physiology of reproduction* **3**, 55-112.
- Freeman, D.A., Woods, G.L., Vanderwall, D.K. and Weber, J.A. (1992). Embryo-initiated oviductal transport in mares. *Journal of Reproduction and Fertility* **95**, 535-538.
- Funahashi, H. and Day, B.N. (1993). Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes invitro. *Journal of Reproduction and Fertility* **98**, 179-185.
- Funahashi, H., Ekwall, H., Kikuchi, K. and Rodriguez-Martinez, H. (2001). Transmission electron microscopy studies of the zona reaction in pig oocytes fertilized in vivo and in vitro. *Reproduction* **122**, 443-452.
- Funahashi, H., Ekwall, H. and Rodriguez-Martinez, H. (2000). Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biology of Reproduction* **63**, 1437-1442.
- G**abler, C., Chapman, D.A. and Killian, G.J. (2003). Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction* **126**, 721-729.
- Gabler, C., Oda, S., Muller, K., Schon, J., Bondzio, A. and Einspanier, R. (2008). Exploring cumulus-oocyte-complex-oviductal cell interactions: gene profiling in the bovine oviduct. *Journal of Physiology and Pharmacology* **59**, 29-42.
- Gadella, B. (2011). Interaction of sperm with the zona pellucida during fertilization. *Reproduction in Domestic Ruminants VII*, 267.
- Gandolfi, F. (1995). Functions of proteins secreted by oviduct epithelial-cells. *Microscopy Research and Technique* **32**, 1-12.

- Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., Richardson, L., Brown, C.R. and Moor, R.M. (1989). Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial-cells and their function in embryonic-development. *Development* **106**, 303-&.
- Gandolfi, F., Modina, S., Brevini, T.A.L., Galli, C., Moor, R.M. and Lauria, A. (1991). Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona-pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *European Journal of Basic and Applied Histochemistry* **35**, 383-392.
- Gandolfi, F. and Moor, R.M. (1987). Stimulation of early embryonic-development in the sheep by coculture with oviduct epithelial-cells. *Journal of Reproduction and Fertility* **81**, 23-28.
- Ganguly, A., Sharma, R.K. and Gupta, S.K. (2008). Bonnet monkey (*Macaca radiata*) ovaries, like human oocytes, express four zona pellucida glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development* **75**, 156-166.
- Garcia, M.L., Peiro, R., Argente, M.J., Merchan, M., Folch, J.M., Blasco, A. and Santacreu, M.A. (2010). Investigation of the oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) gene associated with embryo survival and development in the rabbit. *Journal of Animal Science* **88**, 1597-1602.
- Gardner, D.K. (2008). Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reproduction Fertility and Development* **20**, 9-18.
- Gardner, D.K., Lane, M., Calderon, I. and Leeton, J. (1996). Environment of the preimplantation human embryo in vivo: Metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and Sterility* **65**, 349-353.
- Gardner, D.K. and Leese, H.J. (1990). Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism invitro. *Journal of Reproduction and Fertility* **88**, 361-368.
- Gaudry, J.P., Arod, C., Sauvage, C., Busso, S., Dupraz, P., Pankiewicz, R. and Antonsson, B. (2008). Purification of the extracellular domain of the membrane protein GlialCAM expressed in HEK and CHO cells and comparison of the glycosylation. *Protein Expression and Purification* **58**, 94-102.
- George, S.H.L., Greenaway, J., Milea, A., Clary, V., Shaw, S., Sharma, M., *et al.* (2011). Identification of abrogated pathways in fallopian tube epithelium from BRCA1 mutation carriers. *Journal of Pathology* **225**, 106-117.
- Georgiou, A.S., Snijders, A.P.L., Sostaric, E., Aflatoonian, R., Vazquez, J.L., Vazquez, J.M., *et al.* (2007). Modulation of the oviductal environment by gametes. *Journal of Proteome Research* **6**, 4656-4666.
- Georgiou, A.S., Sostaric, E., Wong, C.H., Snijders, A.P.L., Wright, P.C., Moore, H.D. and Fazeli, A. (2005). Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**, 1785-1796.
- Gerena, R., Irikura, D., Urade, Y., Eguchi, N., Chapman, D. and Killian, G. (1998). Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biology of reproduction* **58**, 826-833.
- Glass LE. (1969). Immunocytological studies of the mouse oviduct. In: Hafes E, editor: University of Chicago press. 54-72.
- Goncalves, R.F., Chapman, D.A., Bertolla, R.P., Eder, I. and Killian, G.J. (2008a). Pre-treatment of cattle semen or oocytes with purified milk osteopontin affects in

- vitro fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science* **108**, 375-383.
- Goncalves, R.F., Staros, A.L. and Killian, G.J. (2008b). Oviductal Fluid Proteins Associated with the Bovine Zona Pellucida and the Effect on In Vitro Sperm-Egg Binding, Fertilization and Embryo Development. *Reproduction in Domestic Animals* **43**, 720-729.
- Gott, A.L., Gray, S.M., James, A.F. and Leese, H.J. (1988). The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. *Biology of Reproduction* **39**, 758-763.
- Goudet, G. (2011). Fertilisation in the horse and paracrine signalling in the oviduct. *Reproduction Fertility and Development* **23**, 941-951.
- Goudet, G., Mugnier, S., Callebaut, I. and Monget, P. (2008). Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. *Biology of Reproduction* **78**, 796-806.
- Green, K.J. and Gaudry, C.A. (2000). Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nature reviews Molecular cell biology* **1**, 208-216.
- Greve, J.M. and Wassarman, P.M. (1985). Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *Journal of Molecular Biology* **181**, 253-264.
- Griffiths, G.S., Miller, K.A., Galileo, D.S. and Martin-DeLeon, P.A. (2008). Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. *Reproduction* **135**, 293-301.
- Grippo, A.A., Henault, M.A., Anderson, S.H. and Killian, G.J. (1992). Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous-cycle. *Journal of Dairy Science* **75**, 58-65.
- Grippo, A.A., Way, A.L. and Killian, G.J. (1995). Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* **105**, 57-64.
- Gualtieri, R., Boni, R., Tosti, E., Zagami, M. and Talevi, R. (2005). Intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation during the release of bovine sperm adhering to the fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction* **129**, 51-60.
- Gualtieri, R., Mollo, V., Barbato, V. and Talevi, R. (2010). Ability of sulfated glycoconjugates and disulfide-reductants to release bovine epididymal sperm bound to the oviductal epithelium in vitro. *Theriogenology* **73**, 1037-1043.
- Gualtieri R, Mollo V, Braun S, Barbato V, Fiorentino I, Talevi R. (2013). Bovine oviductal monolayers cultured under three-dimension conditions secrete factors able to release spermatozoa adhering to the tubal reservoir *in vitro*. *Theriogenology* **79**,429-35.
- Gupta, S.K. and Bhandari, B. (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian Journal of Andrology* **13**, 97-105.
- Gupta, S.K., Bhandari, B., Shrestha, A., Biswal, B.K., Palaniappan, C., Malhotra, S.S. and Gupta, N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research* **349**, 665-678.
- Gutierrez-Adan, A., Rizos, D., Fair, T., Moreira, P.N., Pintado, B., De La Fuente, J., *et al.* (2004). Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development* **68**, 441-448.

- Hachen, A., Jewgenow, K. and Braun, B.C. (2012). Sequence analysis of feline oviductin and its expression during the estrous cycle in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* **77**, 539-549.
- Hafez, E. and Hafez, B. (2000). Reproducción e inseminación artificial en animales.
- Hafez, E.S.E. and Blandau, R.J. (1969) mammalian oviduct; comparative biology and methodology. In *International Symposium on the Mammalian Oviduct (1967: Washington State University)*. University of Chicago Press.
- Hakala, B.E., White, C. and Recklies, A.D. (1993). Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial-cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 25803-25810.
- Halbert, S.A., Tam, P.Y. and Blandau, R.J. (1976). Egg transport in rabbit oviduct. Role of cilia and muscle. *Science* **191**, 1052-1053.
- Hamner, C.E. and Williams, W.L. (1964). Identification of sperm stimulating factor of rabbit oviduct fluid. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **117**, 240-&.
- Hao, Y.H., Mathialagan, N., Walters, E., Mao, J.D., Lai, L.X., Becker, D., *et al.* (2006). Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biology of Reproduction* **75**, 726-733.
- Hara-Chikuma, M. and Verkman, A. (2008). Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *Journal of Molecular Medicine* **86**, 221-231.
- Harding, J.E. (2001). The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *International Journal of Epidemiology* **30**, 15-23.
- Harper, M.J. (1977). Contraception--retrospect and prospect. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques* **21**, 293-407.
- Harris, S.E., Gopichandran, N., Picton, H.M., Leese, H.J. and Orsi, N.M. (2005). Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* **64**, 992-1006.
- Hedrick, J.L. and Wardrip, N.J. (1987a). On the macromolecular-composition of the zona-pellucida from porcine oocytes. *developmental biology* **121**, 478-488.
- Hedrick, J.L., Wardrip, N.J., and Berger, T. (1987b). differences in the macromolecular-composition of the zona-pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *Journal of Experimental Zoology* **241**, 257-262.
- Herrler, A., Krusche, C.A., Muller-Schottle, F. and Beier, H.M. (2004). Haptoglobin expression and release by rabbit oviduct and endometrium, its localization in blastocyst extra-embryonic matrix and fluid during preimplantation time. *Human Reproduction* **19**, 2730-2737.
- Hey, N.A. and Aplin, J.D. (1996). Sialyl-Lewis x and Sialyl-Lewis a are associated with MUC1 in human endometrium. *Glycoconjugate Journal* **13**, 769-779.
- Hilkens, J., Ligtenberg, M.J.L., Vos, H.L. and Litvinov, S.V. (1992). Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 359-363.

- Hill, J., Walker, S., Brown, G. and Nancarrow, C. (1996a). The effects of an estrus-associated oviductal glycoprotein on the in vitro fertilization and development of ovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* **46**, 1379-1388.
- Hill, J., Walker, S., Brown, G. and Nancarrow, C. (1996b). The effects of an ovine oviductal estrus-associated glycoprotein on early embryo development. *Theriogenology* **46**, 1367-1377.
- Hill, J.L., Wade, M.G., Nancarrow, C.D., Kelleher, D.L. and Boland, M.P. (1997). Influence of ovine oviductal amino acid concentrations and an ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* **47**, 164-169.
- Hoffman, L.H., Olson, G.E., Carson, D.D. and Chilton, B.S. (1998). Progesterone and implanting blastocysts regulate Muc1 expression in rabbit uterine epithelium. *Endocrinology* **139**, 266-271.
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T. and Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52**, 683-700.
- Holt, W.V., Brown, J.L. and Comizzoli, P. (2014) Reproductive Science as an Essential Component of Conservation Biology. In *Reproductive Sciences in Animal Conservation: Progress and Prospects*, W.V. Holt, J.L. Brown, P. Comizzoli (eds.). Berlin, Springer-Verlag Berlin, pp. 3-14.
- Holt, W.V. and Fazeli, A. (2010). The Oviduct as a Complex Mediator of Mammalian Sperm Function and Selection. *Molecular Reproduction and Development* **77**, 934-943.
- Holt, W.V. and Van Look, K.J.W. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* **127**, 527-535.
- Hoodbhoy, T., Joshi, S., Boja, E.S., Williams, S.A., Stanley, P. and Dean, J. (2005). Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 12721-12731.
- Hribal, R., Hachen, A., Jewgenow, K., Zahmel, J., Fernandez-Gonzalez, L. and Braun, B.C. (2014a). The influence of recombinant feline oviductin on different aspects of domestic cat (*Felis catus*) IVF and embryo quality. *Theriogenology* **82**, 742-749.
- Hribal, R., Hachen, A., Zahmel, J., Gonzalez, L.F., Jewgenow, K. and Braun, B.C. (2014b). The effect of recombinant feline oviductin used in the cat IVF system. *Reproduction in Domestic Animals* **49**, 24-25.
- Hugentobler, S.A., Diskin, M.G., Leese, H.J., Humpherson, P.G., Watson, T., Sreenan, J.M. and Morris, D.G. (2007). Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Molecular Reproduction and Development* **74**, 445-454.
- Hugentobler, S.A., Humpherson, P.G., Leese, H.J., Sreenan, J.M. and Morris, D.G. (2008). Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Molecular Reproduction and Development* **75**, 496-503.
- Hugentobler, S.A., Sreenan, J.M., Humpherson, P.G., Leese, H.J., Diskin, M.G. and Morris, D.G. (2010). Effects of changes in the concentration of systemic

- progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. *Reproduction Fertility and Development* **22**, 684-694.
- Hung, P.H. and Suarez, S.S. (2010). Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. *Reproduction in Domestic Ruminants VII* **67**, 257-266.
- Hunter, R. (1967). The effects of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig. *Journal of reproduction and fertility* **13**, 133-147.
- Hunter, R. (1988) *The Fallopian Tubes: Their Role in Fertility and Infertility* Springer-Verlag, Berlin.
- Hunter, R. (1991a) Fertilization in the pig and horse. In *A comparative overview of mammalian fertilization*. Springer, pp. 329-349.
- Hunter, R. (2009). Temperature gradients in female reproductive tissues and their potential significance. *Anim Reprod* **6**, 7-15.
- Hunter, R., Cicinelli, E. and Einer-Jensen, N. (2007). Peritoneal fluid as an unrecognised vector between female reproductive tissues. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* **86**, 260-265.
- Hunter, R., Nichol, R. and Crabtree, S. (1980). Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reproduction Nutrition Développement* **20**, 1869-1875.
- Hunter, R.H. (2001). Histophysiology of the Fallopian tubes in relation to sperm binding, release, and completion of capacitation. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia* **106**, 279-289.
- Hunter, R.H.F. (1968). Attempted fertilization of hamster eggs following transplantation into uterus. *Journal of Experimental Zoology* **168**, 511-&.
- Hunter, R.H.F. (1972a). Fertilization in pig - sequence of nuclear and cytoplasmic events. *Journal of Reproduction and Fertility* **29**, 395-&.
- Hunter, R.H.F. (1972b). Local action of progesterone leading to polyspermic fertilization in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* **31**, 433-&.
- Hunter, R.H.F. (1980) *Physiology and technology of reproduction in female domestic animals*, Academic Press.
- Hunter, R.H.F. (1989). Ovarian programming of gamete progression and maturation in the female genital-tract. *Zoological Journal of the Linnean Society* **95**, 117-124.
- Hunter, R.H.F. (1991b). Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Molecular Reproduction and Development* **29**, 385-391.
- Hunter, R.H.F. (1994). Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development* **39**, 176-181.
- Hunter, R.H.F. (1995). Ovarian endocrine control of sperm progression in the fallopian tubes. *Oxford Reviews of Reproductive Biology, Vol 17* **17**, 85-124.
- Hunter, R.H.F. (1998). Have the Fallopian tubes a vital role in promoting fertility? *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica* **77**, 475-486.
- Hunter, R.H.F. (2002). Vital aspects of fallopian tube physiology in pigs. *Reproduction in Domestic Animals* **37**, 186-190.
- Hunter, R.H.F. (2003) *Physiology of the Graafian follicle and ovulation*, Cambridge University Press.
- Hunter, R.H.F. (2005). The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reproduction Nutrition Development* **45**, 281-290.

- Hunter, R.H.F. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biological Reviews* **87**, 244-255.
- Hunter, R.H.F., Coy, P., Gadea, J. and Rath, D. (2011). Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **28**, 191-197.
- Hunter, R.H.F., Flechon, B. and Flechon, J.E. (1991). Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation - A scanning electron-microscope study. *Tissue & Cell* **23**, 641-656.
- Hyllner, S.J., Westerlund, L., Olsson, P.E. and Schopen, A. (2001). Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: Members of a unique group of structural proteins. *Biology of Reproduction* **64**, 805-811.
- Inoue, M. and Wolf, D.P. (1974). Comparative solubility properties of zonae pellucidae of unfertilized and fertilized mouse ova. *Biology of Reproduction* **11**, 558-565.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**, 234-238.
- Iritani, A., Gomes, W.R. and Vandemark, N.L. (1969). Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biology of reproduction* **1**, 72-76.
- Iritani, A., Sato, E. and Nishikaw.Y (1974). Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *Journal of Animal Science* **39**, 582-587.
- Ishikawa, Y., Usui, T., Yamashita, M., Kanemori, Y. and Baba, T. (2016). Surfing and Swimming of Ejaculated Sperm in the Oviduct. *Biology of reproduction, biolreprod.* 115.135418.
- Izquierdo-Rico, M.J., Jimenez-Movilla, M., Llop, E., Perez-Oliva, A.B., Ballesta, J., Gutierrez-Gallego, R., *et al.* (2009). Hamster Zona Pellucida Is Formed by Four Glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. *Journal of Proteome Research* **8**, 926-941.
- Jaffe, R.C., Arias, E.B., OdayBowman, M.B., Donnelly, K.M., Mavrogianis, P.A. and Verhage, H.G. (1996). Regional distribution and hormonal control of estrogen-dependent oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid in the baboon (*Papio anubis*). *Biology of Reproduction* **55**, 421-426.
- Jankovic, S.M., Protic, B.A. and Jankovic, S.V. (2004). Contractile effect of acetylcholine on isolated isthmic segment of fallopian tubes. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* **26**, 87-91.
- Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends in biochemical sciences* **15**, 291-294.
- Jimenez-Movilla, M., Martinez-Alonso, E., Castells, M.T., Izquierdo-Rico, M.J., Saavedra, M.D., Gutierrez-Gallego, R., *et al.* (2009). Cytochemical and biochemical evidences for a complex tridimensional structure of the hamster zona pellucida. *Histology and Histopathology* **24**, 599-609.
- Kadam, K.M., D'Souza, S.J., Bandivdekar, A.H. and Natraj, U. (2006). Identification and characterization of oviductal glycoprotein-binding protein partner on gametes:

- epitopic similarity to non-muscle myosin IIA, MYH 9. *Molecular Human Reproduction* **12**, 275-282.
- Kadam, K.M., D'Souza, S.J. and Natraj, U. (2007). Identification of cellular isoform of oviduct-specific glycoprotein: role in oviduct tissue remodeling? *Cell and Tissue Research* **330**, 545-556.
- Kan, F., St-Jacques, S. and Bleau, G. (1988). Immunoelectron microscopic localization of an oviductal antigen in hamster zona pellucida by use of a monoclonal antibody. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **36**, 1441-1447.
- Kan, F., St-Jacques, S. and Bleau, G. (1989). Immunocytochemical evidence for the transfer of an oviductal antigen to the zona pellucida of hamster ova after ovulation. *Biology of reproduction* **40**, 585-598.
- Kan, F.W.K. and Esperanzate, P.W.B. (2006). Surface mapping of binding of oviductin to the plasma membrane of golden hamster spermatozoa during in vitro capacitation and acrosome reaction. *Molecular Reproduction and Development* **73**, 756-766.
- Kan, F.W.K., Roux, E. and Bleau, G. (1993). Immunolocalization of oviductin in endocytic compartments in the blastomeres of developing embryos in the golden-hamster. *Biology of Reproduction* **48**, 77-88.
- Kan, F.W.K., Roux, E., Stjacques, S. and 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. *Anatomical Record* **226**, 37-47.
- Kane, M.T., Morgan, P.M. and Coonan, C. (1997). Peptide growth factors and preimplantation development. *Human Reproduction Update* **3**, 137-157.
- Kapur, R.P. and Johnson, L.V. (1985). An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Developmental Biology* **112**, 89-93.
- Kapur, R.P. and Johnson, L.V. (1986). Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *Journal of Experimental Zoology* **238**, 249-260.
- Kapur, R.P. and Johnson, L.V. (1988). Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute a glycoprotein to the extracellular-matrix of mouse oocytes. *Anatomical Record* **221**, 720-729.
- Katarzyna, S.-M., Wiesław, B. and Anna, R. (2010). The tunica mucosa of the oviduct in case of ovarian cysts presence in sows. *Folia Histochemica et Cytobiologica* **48**, 148-156.
- Kavanaugh, J.F. and Killian, G.J. (1988). Bovine oviductal cannulations. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research* **1**, 201-208.
- Kawano, N., Kang, W.J., Yamashita, M., Koga, Y., Yamazaki, T., Hata, T., *et al.* (2010). Mice Lacking Two Sperm Serine Proteases, ACR and PRSS21, Are Subfertile, but the Mutant Sperm Are Infertile In Vitro. *Biology of Reproduction* **83**, 359-369.
- Keefer, C.L. (2015). Artificial cloning of domestic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 8874-8878.
- Killian, G. (2011). Physiology and endocrinology symposium: Evidence that oviduct secretions influence sperm function: A retrospective view for livestock. *Journal of Animal Science* **89**, 1315-1322.

- Killian, G.J. (2004). Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science* **82-3**, 141-153.
- Killian, G.J., Chapman, D.A., Kavanaugh, J.F., Deaver, D.R. and Wiggin, H.B. (1989). Changes in phospholipids, cholesterol and protein-content of oviduct fluid of cows during the estrous-cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* **86**, 419-426.
- Kim, N.H., Funahashi, H., Abeydeera, L.R., Moon, S.J., Prather, R.S. and Day, B.N. (1996). Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* **107**, 79-86.
- Kim, R.N., Kim, D.W., Choi, S.H., Chae, S.H., Nam, S.H., Kim, A., et al. (2011). Major chimpanzee-specific structural changes in sperm development-associated genes. *Functional & Integrative Genomics* **11**, 507-517.
- King, R.S., Anderson, S.H. and Killian, G.J. (1994a). Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *Journal of Andrology* **15**, 468-478.
- King, R.S. and Killian, G.J. (1994b). Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biology of Reproduction* **51**, 34-42.
- Kolbe, T. and Holtz, W. (2005). Differences in proteinase digestibility of the zona pellucida of in vivo and in vitro derived porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* **63**, 1695-1705.
- Kolle, S., Dubielzig, S., Reese, S., Wehrend, A., Konig, P. and Kummer, W. (2009). Ciliary Transport, Gamete Interaction, and Effects of the Early Embryo in the Oviduct: Ex Vivo Analyses Using a New Digital Videomicroscopic System in the Cow. *Biology of Reproduction* **81**, 267-274.
- Kolle, S., Sinowatz, F., Boie, G. and Palma, G. (1998). Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Molecular Reproduction and Development* **49**, 435-443.
- Komiya, H., Onuma, T., Hiroi, M. and Araki, Y. (1996). In situ localization of messenger ribonucleic acid for an oviduct-specific glycoprotein during various hormonal conditions in the golden hamster. *Biology of reproduction* **55**, 1107-1118.
- Konar, S., Singha, K.B., Mondal, M.K. and Ghosh, T. (2014). Ultrastructural study of human ampullary endosalpinx in different stages of ovarian cycle. *Journal of the Anatomical Society of India* **63**, 137-141.
- Kouba, A.J., Abeydeera, L.R., Alvarez, I.M., Day, B.N. and Buhi, W.C. (2000). Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. *Biology of Reproduction* **63**, 242-250.
- Kumaresan, A., Ansari, M.R., Garg, A. and Kataria, M. (2006). Effect of oviductal proteins on sperm functions and lipid peroxidation levels during cryopreservation in buffaloes. *Animal Reproduction Science* **93**, 246-257.
- Kuzmany, A., Havlicek, V., Wrenzycki, C., Wilkening, S., Brem, G. and Besenfelder, U. (2011). Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. *Theriogenology* **75**, 482-494.

- La Spina, F.A., Molina, L.C.P., Romarowski, A., Vitale, A.M., Falzone, T.L., Krapf, D., *et al.* (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Developmental Biology* **411**, 172-182.
- Lachance, C., Bailey, J.L. and Leclerc, P. (2007). Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Human Reproduction* **22**, 2606-2614.
- Lagow, E., DeSouza, M.M. and Carson, D.G. (1999). Mammalian reproductive tract mucins. *Human Reproduction Update* **5**, 280-292.
- Lamblin, G. and Roussel, P. (1993). Airway mucins and their role in defense against microorganisms. *Respiratory Medicine* **87**, 421-426.
- Lapensee, L., Paquette, Y. and Bleau, G. (1997). Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertility and Sterility* **68**, 702-708.
- Lapointe, J. and Bilodeau, J.F. (2003). Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biology of Reproduction* **68**, 1157-1164.
- Lapointe, J., Roy, M., St-Pierre, I., Kimmins, S., Gauvreau, D., MacLaren, L.A. and Bilodeau, J.F. (2006). Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases (NOS) (neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS) in the oviducts. *Endocrinology* **147**, 5600-5610.
- Lapointe, S. and Sirard, M.A. (1996). Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* **44**, 234-240.
- Lavery, K., Way, A. and Killian, G. (2003). Identification and immunohistochemical localization of a haptoglobin-like protein in the tissues and fluids of the bovine (*Bos taurus*) ovary and oviduct. *Reproduction* **125**, 837-846.
- Lazzari, G., Colleoni, S., Lagutina, I., Crotti, G., Turini, P., Tessaro, I., *et al.* (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**, 748-757.
- Lee, C.-L., Lam, K.K.W., Koistinen, H., Seppala, M., Kurpysz, M., Fernandez, N., *et al.* (2011). Glycodelin-A as a paracrine regulator in early pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology* **90**, 29-34.
- Lee, D.S., Ueta, Y.Y. and Suzuki, H. (2006a). Expression of amphiregulin during the pre- and post-implantation period in the mouse reproductive tract. *Journal of Reproduction and Development* **52**, 781-787.
- Lee, J.Y., Lee, J., Yue, H. and Lee, T.-H. (2015). Dynamics of nucleosome assembly and effects of DNA methylation. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 4291-4303.
- Lee, K.-F. and Yeung, W.S.B. (2006b). Gamete/embryo - oviduct interactions: implications on in vitro culture. *Human fertility (Cambridge, England)* **9**, 137-143.
- Lee, K.F., Chow, J.F.C., Xu, J.S., Chan, S.T.H., Ip, S.M. and Yeung, W.S.B. (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. *Biology of Reproduction* **64**, 910-917.

- Lee, Y.L., Cheong, A.W.Y., Chow, W.N., Lee, K.F. and Yeung, W.S.B. (2009). Regulation of Complement-3 Protein Expression in Human and Mouse Oviducts. *Molecular Reproduction and Development* **76**, 301-308.
- Leese, H.J. (1988). The formation and function of oviduct fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* **82**, 843-856.
- Leese, H.J. (1995). Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Human Reproduction Update* **1**, 63-72.
- Leese, H.J. (1998). Human embryo culture: Back to nature. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **15**, 466-468.
- Leese, H.J. and Gray, S.M. (1985). Vascular perfusion - a novel means of studying oviduct function. *American Journal of Physiology* **248**, E624-E632.
- Leese, H.J., Hugentobler, S.A., Gray, S.M., Morris, D.G., Sturmey, R.G., Whitear, S.-L. and Sreenan, J.M. (2008). Female reproductive tract fluids: Composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reproduction Fertility and Development* **20**, 1-8.
- Leese, H.J., Tay, J.I., Reischl, J. and Downing, S.J. (2001). Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* **121**, 339-346.
- Lefebvre, R. and Suarez, S.S. (1996). Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biology of Reproduction* **54**, 575-582.
- Lefievre, L., Conner, S.J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., *et al.* (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction* **19**, 1580-1586.
- Leveille, M.C., Roberts, K.D., Chevalier, S., Chapdelaine, A. and Bleau, G. (1987). Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona-pellucida. *Biology of Reproduction* **36**, 227-238.
- Li, R.F., Whitworth, K., Lai, L.X., Wax, D., Spate, L., Murphy, C.N., *et al.* (2007). Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Molecular Reproduction and Development* **74**, 1228-1235.
- Lin, P., Chen, F., Yang, Y., Song, Y., Li, X., Lan, X., *et al.* (2012). GRP78 expression and immunohistochemical localization in the female reproductive tract of mice. *Theriogenology* **78**, 1824-1829.
- Ling, H. and Recklies, A.D. (2004). The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Biochemical Journal* **380**, 651-659.
- Lippes, J., Pragay, D.A., Bartholo.Wr and Enders, R.G. (1972). Collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception* **5**, 85-&.
- Liu, C.Y., Litscher, E.S., Mortillo, S., Sakai, Y., Kinloch, R.A., Stewart, C.L. and Wassarman, P.M. (1996). Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5431-5436.
- Liu, L.P.S., Chan, S.T.H., Ho, P.C. and Yeung, W.S.B. (1998). Partial purification of embryotrophic factors from human oviductal cells. *Human Reproduction* **13**, 1613-1619.

- Liu, Q., Xie, Q.Z., Zhou, Y. and Yang, J. (2015). Osteopontin is expressed in the oviduct and promotes fertilization and preimplantation embryo development of mouse. *Zygote* **23**, 622-630.
- Lloyd, R.E., Elliott, R.M.A., Fazeli, A., Watson, P.F. and Holt, W.V. (2009a). 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**, 408-418.
- Lloyd, R.E., Fazeli, A., Watson, P.F. and Holt, W.V. (2012). The oviducal protein, heat-shock 70-kDa protein 8, improves the long-term survival of ram spermatozoa during storage at 17 degrees C in a commercial extender. *Reproduction Fertility and Development* **24**, 543-549.
- Lloyd, R.E., Romar, R., Matas, C., Gutierrez-Adan, A., Holt, W.V. and Coy, P. (2009b). Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction* **137**, 679-687.
- Lok, I.H., Britton-Jones, C.M., Yuen, P.M. and Haines, C.J. (2002). Variable expression of oviductin mRNA at different stages of human reproductive cycle. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **19**, 569-576.
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D. and Evans, A.C.O. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* **65**, 137-152.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Moreira, P.M., Pintado, B., de la Fuente, J. and Boland, M.P. (2003). Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction* **69**, 1424-1431.
- Lonergan, P., Woods, A., Fair, T., Carter, F., Rizos, D., Ward, F., *et al.* (2007). Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction Fertility and Development* **19**, 861-868.
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Lloreda, V., Coy, P., Gutierrez-Adan, A., *et al.* (2015). Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*.
- Lopez-Ubeda, R., Garcia-Vazquez, F.A., Romar, R., Gadea, J., Munoz, M., Hunter, R.H.F. and Coy, P. (2015). Oviductal Transcriptome Is Modified after Insemination during Spontaneous Ovulation in the Sow. *Plos One* **10**, 18.
- Luo, S.Z., Mao, C.H., Lee, B. and Lee, A.S. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 5688-5697.
- Lyng, R. and Shur, B.D. (2007). Sperm-egg binding requires a multiplicity of receptor-ligand interactions: new insights into the nature of gamete receptors derived from reproductive tract secretions. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **65**, 335-351.
- Lyng, R. and Shur, B.D. (2009). Mouse oviduct-specific glycoprotein is an egg-associated ZP3-independent sperm-adhesion ligand. *Journal of Cell Science* **122**, 3894-3906.
- Lyons, R.A., Saridogan, E. and Djahanbakhch, O. (2006). The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Human Reproduction Update* **12**, 363-372.

- M**aas, D.H.A., Storey, B.T. and Mastroianni, L. (1977). Hydrogen-ion and carbon-dioxide content of oviductal fluid of rhesus-monkey (*macaca-mulatta*). *Fertility and Sterility* **28**, 981-985.
- Malayer, J.R., Hansen, P.J. and Buhi, W.C. (1988). Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *Journal of Experimental Zoology* **248**, 345-353.
- Malette, B. and Bleau, G. (1993). Biochemical-characterization of hamster oviductin as a sulfated zona-pellucida-binding glycoprotein. *Biochemical Journal* **295**, 437-445.
- Malette, B., Paquette, Y., Merlen, Y. and Bleau, G. (1995). Oviductins possess chitinase-like and mucin-like domains - a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific zp-associating glycoproteins. *Molecular Reproduction and Development* **41**, 384-397.
- Maresh, G.A., Timmons, T.M. and Dunbar, B.S. (1990). Effects of extracellular-matrix on the expression of specific ovarian proteins. *Biology of Reproduction* **43**, 965-976.
- Marnbula, S.S., Stevenson, M.A., Ogawa, K. and Calderwood, S.K. (2007). Mechanisms for Hsp70 secretion: Crossing membranes without a leader. *Methods* **43**, 168-175.
- Marston, J.H., Penn, R. and Sivelle, P.C. (1977). Successful auto-transfer of tubal eggs in rhesus-monkey (*macaca-mulatta*). *Journal of Reproduction and Fertility* **49**, 175-176.
- Martinez, S.P., Viggiano, M., Franchi, A., Herrero, M., Ortiz, M., Gimeno, M. and Villalon, M. (2000). Effect of nitric oxide synthase inhibitors on ovum transport and oviductal smooth muscle activity in the rat oviduct. *Journal of reproduction and fertility* **118**, 111-117.
- Martus, N.S., Verhage, H.G., Mavrogianis, P.A. and Thibodeaux, J.K. (1998). Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility* **113**, 323-329.
- Mastroianni, L., Beer, F., Shah, U. and Clewe, T.H. (1961). Endocrine regulation of oviduct secretions in rabbit. *Endocrinology* **68**, 92-&.
- Masuoka, H.C. and Townes, T.M. (2002). Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. *Blood* **99**, 736-745.
- McBride, D.S., Boisvert, C., Bleau, G. and Kan, F.W. (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. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **52**, 1001-1009.
- McBride, D.S., Boisvert, C., Bleau, G. and Kan, F.W.K. (2004b). 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. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **52**, 1001-1009.
- McBride, D.S., Boisvert, C., Bleau, G. and Kan, F.W.K. (2004c). Evidence for the regulation of glycosylation of golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviductin during the estrous cycle. *Biology of Reproduction* **70**, 198-203.

- McBride, D.S., Brockhausen, I. and Kan, F.W. (2005). Detection of glycosyltransferases in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviduct and evidence for the regulation of O-glycan biosynthesis during the estrous cycle. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1721**, 107-115.
- McCauley, T., Buhi, W., Didion, B. and Day, B. (2001) Exposure of oocytes to porcine oviduct-specific glycoprotein reduces the incidence of polyspermic penetration in vitro. In *Sixth International Conference on Pig Reproduction*.
- McCauley, T.C., Buhi, W.C., Wu, G.M., Mao, J., Caamano, J.N., Didion, B.A. and Day, B.N. (2003). Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biology of Reproduction* **69**, 828-834.
- McEvoy, T.G., Sinclair, K.D., Young, L.E., Wilmut, I. and Robinson, J.J. (2000). Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Human fertility* **3**, 238-246.
- McGee, E.A., Hsu, S.Y., Kaipia, A. and Hsueh, A.J.W. (1998). Cell death and survival during ovarian follicle development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **140**, 15-18.
- McNutt, T., Rogowski, L., Vasilatosyounken, R. and Killian, G. (1992). Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during invitro capacitation. *Molecular Reproduction and Development* **33**, 313-323.
- McNutt, T.L. and Killian, G.J. (1991). Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation invitro. *Journal of Andrology* **12**, 244-252.
- Menezo, Y. and Guerin, P. (1997). The mammalian oviduct: Biochemistry and physiology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **73**, 99-104.
- Meng, Q.X., Gao, H.J., Xu, C.M., Dong, M.Y., Sheng, X., Sheng, J.Z. and Huang, H.F. (2008). Reduced expression and function of aquaporin-3 in mouse metaphase-II oocytes induced by controlled ovarian hyperstimulation were associated with subsequent low fertilization rate. *Cellular Physiology and Biochemistry* **21**, 123-128.
- Merchan, M., Peiro, R., Argente, M.J., Santacreu, M.A., Garcia, M.L., Blasco, A. and Folch, J.M. (2009). Analysis of the oviductal glycoprotein 1 polymorphisms and their effects on components of litter size in rabbits. *Animal Genetics* **40**, 756-758.
- Merchan, M., Peiro, R., Santacreu, M.A., Francino, O. and Folch, J.M. (2007). Rabbit oviductal glycoprotein 1 gene: Genomic organization polymorphism analysis and mRNA expression. *Molecular Reproduction and Development* **74**, 687-693.
- Merchan, M., Rendon, M. and Folch, J.M. (2006). Assignment of the oviductal glycoprotein 1 gene (OVGP1) to porcine chromosome 4q22 -> q23 by radiation hybrid panel mapping. *Cytogenetic and Genome Research* **114**, 93C-U13.
- Messerschmidt, D.M., Knowles, B.B. and Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes & development* **28**, 812-828.
- Mikkelsen, T.S., Wakefield, M.J., Aken, B., Amemiya, C.T., Chang, J.L., Duke, S., et al. (2007). Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences. *Nature* **447**, 167-U161.

- Miller, J.G.O. and Schultz, G.A. (1987). Amino-acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive-tract. *Biology of Reproduction* **36**, 125-129.
- Miwa, N. (2015). Dicalcin, a zona pellucida protein that regulates fertilization competence of the egg coat in *Xenopus laevis*. *The Journal of Physiological Sciences* **65**, 507-514.
- Miwa, N., Ogawa, M., Hanaue, M. and Takamatsu, K. (2015). Fertilization competence of the egg-coating envelope is regulated by direct interaction of dicalcin and gp41, the *Xenopus laevis* ZP3. *Scientific reports* **5**.
- Mondejar, I., Acuna, O.S., Izquierdo-Rico, M.J., Coy, P. and Aviles, M. (2012). The Oviduct: Functional Genomic and Proteomic Approach. *Reproduction in Domestic Animals* **47**, 22-29.
- Mondejar, I., Aviles, M. and Coy, P. (2013a). The human is an exception to the evolutionarily-conserved phenomenon of pre-fertilization zona pellucida resistance to proteolysis induced by oviductal fluid. *Human Reproduction* **28**, 718-728.
- Mondejar, I., Martinez-Martinez, I., Aviles, M. and Coy, P. (2013b). Identification of Potential Oviductal Factors Responsible for Zona Pellucida Hardening and Monospermy During Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction* **89**.
- Mondéjar Corbalán, I. (2012). 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. *Proyecto de investigación*: .
- Monne, M. and Jovine, L. (2011). A Structural View of Egg Coat Architecture and Function in Fertilization. *Biology of Reproduction* **85**, 661-669.
- Motta, P.M., Familiari, G., Nottola, S.A., Micara, G. and Aragona, C. (1991). Microstructural events of human egg investments during in vitro fertilization. Ultrastructure of the zona pellucida and cumulus oophorus. *Bulletin de l'Association des anatomistes* **75**, 89-91.
- Mugnier, S., Kervella, M., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Deleuze, S., et al. (2009). The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reproductive Biology and Endocrinology* **7**, 16.
- Murray, M.K. (1995). Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological-changes in secretory status and cell height. *Biology of Reproduction* **53**, 653-663.
- Murray, M.K. and DeSouza, M.M. (1995). Messenger RNA encoding an estrogen-dependent oviduct secretory protein in the sheep is localized in the apical tips and basal compartments of fimbria and ampulla epithelial cells implying translation at unique cytoplasmic foci. *Molecular reproduction and development* **42**, 268-283.
- N**akanishi, T., Isotani, A., Yamaguchi, R., Ikawa, M., Baba, T., Suarez, S.S. and Okabe, M. (2004). Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biology of Reproduction* **71**, 959-965.

- Nancarrow, C.D. and Hill, J.L. (1995). Oviduct proteins in fertilization and early embryo development. *Journal of Reproduction and Fertility*, 3-13.
- Neuer, A., Spandorfer, S.D., Giraldo, P., Dieterle, S., Rosenwaks, Z. and Witkin, S.S. (2000). The role of heat shock proteins in reproduction. *Human Reproduction Update* **6**, 149-159.
- Newman, G.R. (1999). LR White embedding for immunoelectron microscopy. *Histochemical Journal* **31**, 79-79.
- Nichol, R., Hunter, R.H.F., Gardner, D.K., Leese, H.J. and Cooke, G.M. (1992). Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood-plasma of pigs during the periovulatory period. *Journal of Reproduction and Fertility* **96**, 699-707.
- Nichol, R., Hunter, R.H.F., Gardner, D.K., Partridge, R., Leese, H.J. and Cooke, G.M. (1998). Concentrations of energy substrates in oviduct fluid in unilaterally ovariectomised pigs. *Research in Veterinary Science* **65**, 263-264.
- Noguchi, S., Yonezawa, N., Katsumata, T., Hashizume, K., Kuwayama, M., Hamano, S., *et al.* (1994). Characterization of the zona-pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized-eggs. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1201**, 7-14.
- Norwood, J.T., Hein, C.E., Halbert, S.A. and Anderson, R.G.W. (1978). Polycationic macromolecules inhibit cilia-mediated ovum transport in rabbit oviduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 4413-4416.
- Nutu, M., Weijdegard, B., Thomas, P., Thurin-Kjellberg, A., Billig, H. and Larsson, D.G.J. (2009). Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors beta and gamma in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7**, 14.
- O'Day-Bowman, M.B., Mavrogianis, P.A., Minshall, R.D. and Verhage, H.G. (2002). In vivo versus in vitro oviductal glycoprotein (OGP) association with the zona pellucida (ZP) in the hamster and baboon. *Molecular Reproduction and Development* **62**, 248-256.
- Odaybowman, M.B., Mavrogianis, P.A., Fazleabas, A.T. and Verhage, H.G. (1995). A human oviduct-specific glycoprotein - synthesis, secretion, and localization during the menstrual-cycle. *Microscopy Research and Technique* **32**, 57-69.
- OdayBowman, M.B., Mavrogianis, P.A., Reuter, L.M., Johnson, D.E., Fazleabas, A.T. and Verhage, H.G. (1996). Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following in vitro incubation. *Biology of Reproduction* **54**, 60-69.
- Odor, D.L., Gaddumrosse, P. and Rumery, R.E. (1983). Secretory-cells of the oviduct of the pig-tailed monkey, *macaca-nemestrina*, during the menstrual-cycle and after estrogen-treatment. *American Journal of Anatomy* **166**, 149-172.
- Odor, D.L., Gaddumrosse, P., Rumery, R.E. and Blandau, R.J. (1980). Cyclic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual-cycle and after estrogen-treatment in the pig-tailed monkey, *macaca-nemestrina*. *Anatomical Record* **198**, 35-57.

- Oehninger, S., Veeck, L., Franken, D., Kruger, T.F., Acosta, A.A. and Hodgen, G.D. (1991). Human preovulatory oocytes have a higher sperm-binding ability than immature oocytes under hemizona assay conditions - evidence supporting the concept of zona maturation. *Fertility and Sterility* **55**, 1165-1170.
- Oikawa, T., Sendai, Y., Kurata, S. and Yanagimachi, R. (1988). A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical-properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete Research* **19**, 113-122.
- Oliphant, G., Bowling, A., Eng, L.A., Keen, S. and Randall, P.A. (1978). Permeability of rabbit oviduct to proteins present in serum. *Biology of Reproduction* **18**, 516-520.
- Oliphant, G., Reynolds, A.B., Smith, P.F., Ross, P.R. and Marta, J.S. (1984). Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. *Biology of Reproduction* **31**, 165-174.
- Oliphant, G. and Ross, P.R. (1982). Demonstration of production and isolation of 3 sulfated glycoproteins from the rabbit oviduct. *Biology of Reproduction* **26**, 537-544.
- Ortiz, M.E., Bedregal, P., Carvajal, M.I. and Croxatto, H.B. (1986). Fertilized and unfertilized ova are transported at different rates by the hamster oviduct. *Biology of Reproduction* **34**, 777-781.
- P**an, Y. O. N. G., Zheng, G. U., Luo, J. P., Wang, J. R., & Tso, J. K. (2002). Antibodies against the C-terminal peptide of rabbit oviductin inhibit mouse early embryo development to pass 2-cell stage. *Cell research* **12**(1), 69-78.
- Papi, M., Brunelli, R., Sylla, L., Parasassi, T., Monaci, M., Maulucci, G., et al. (2010). Mechanical properties of zona pellucida hardening. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **39**, 987-992.
- Paquette, Y., Merlen, Y., Malette, B. and Bleau, G. (1995). Allelic polymorphism in the hamster oviductin gene is due to a variable number of mucin-like tandem repeats. *Molecular Reproduction and Development* **42**, 388-396.
- Parrish, J.J., Krogenaes, A. and Suskoparrish, J.L. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in-vitro fertilization and early embryonic-development. *Theriogenology* **44**, 859-869.
- Pelletier, C., Keefe, D.L. and Trimarchi, J.R. (2004). Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertility and Sterility* **81**, 850-856.
- Perkins, J.L. and Goode, L. (1967). Free amino acids in oviduct fluid of ewe. *Journal of Reproduction and Fertility* **14**, 309-&.
- Perkins, J.L., Goode, L., Wilder, W.A. and Henson, D.B. (1965). Collection of secretions from oviduct and uterus of ewe. *Journal of Animal Science* **24**, 383-&.
- Phillips, D.M. and Shalgi, R.M. (1980). Surface properties of the zona pellucida. *Journal of Experimental Zoology* **213**, 1-8.
- Pirnazar, P., Wolinsky, L., Nachnani, S., Haake, S., Pilloni, A. and Bernard, G.W. (1999). Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *Journal of Periodontology* **70**, 370-374.
- Pollard, J.W., Plante, C., King, W.A., Hansen, P.J., Betteridge, K.J. and Suarez, S.S. (1991). Fertilizing-capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial-cells. *Biology of Reproduction* **44**, 102-107.

- Pradeep, M.A., Jagadeesh, J., De, A.K., Kaushik, J.K., Malakar, D., Kumar, S., *et al.* (2011). Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on in vitro embryo development. *Theriogenology* **75**, 1005-1015.
- Pursel, V.G. and Johnson, L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa - fertilizing-capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science* **40**, 99-102.
- Q**uinn, P., Kerin, J.F. and Warnes, G.M. (1985). Improved pregnancy rate in human invitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and Sterility* **44**, 493-498.
- R**ama Raju, G.A., Prakash, G.J., Krishna, K.M. and Madan, K. (2007). Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reproductive biomedicine online* **14**, 166-174.
- Rankin, T., Familari, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., BlanchetteMackie, J., *et al.* (1996). Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* **122**, 2903-2910.
- Rankin, T., Talbot, P., Lee, E. and Dean, J. (1999). Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* **126**, 3847-3855.
- Rankin, T.L., O'Brien, M., Lee, E., Wigglesworth, K., Eppig, J. and Dean, J. (2001). Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* **128**, 1119-1126.
- Rao, V.H., Sarmah, B.C. and Bhattacharyya, N.K. (1984). Xenogenous fertilization of goat ova in the rabbit oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility* **71**, 377-379.
- Rapisarda, J.J., Mavrogianis, P.A., Odaybowman, M.B., Fazleabas, A.T. and Verhage, H.G. (1993). Immunological characterization and immunocytochemical localization of an oviduct-specific glycoprotein in the human. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **76**, 1483-1488.
- Rath, D., Long, C.R., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Schreier, L.L. and Johnson, L.A. (1999). In vitro production of sexed embryos for gender preselection: High-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *Journal of Animal Science* **77**, 3346-3352.
- Recklies, A.D., White, C. and Ling, H. (2002). The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase beta-mediated signalling pathways. *Biochemical Journal* **365**, 119-126.
- Reuter, L.M., O'Day-Bowman, M.B., Mavrogianis, P.A., Fazleabas, A.T. and Verhage, H.G. (1994). In vitro incubation of golden (Syrian) hamster ovarian oocytes and human sperm with a human oviduct specific glycoprotein. *Molecular reproduction and development* **38**, 160-169.
- Rios, M., Hermoso, M., Sanchez, T.M., Croxatto, H.B. and Villalon, M.J. (2007). Effect of oestradiol and progesterone on the instant and directional velocity of

- microsphere movements in the rat oviduct: gap junctions mediate the kinetic effect of oestradiol. *Reproduction Fertility and Development* **19**, 634-640.
- Rittling, S.R., Matsumoto, H.N., McKee, M.D., Nanci, A., An, X.R., Novick, K.E., *et al.* (1998). Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* **13**, 1101-1111.
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M.P., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., de la Fuente, J. and Gutierrez-Adan, A. (2002a). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for blastocyst quality. *Biology of Reproduction* **66**, 589-595.
- Rizos, D., Pintado, B., De La Fuente, J., Lonergan, P. and Gutierrez-Adan, A. (2007). Development and pattern of mRNA relative abundance of bovine embryos cultured in the isolated mouse oviduct in organ culture. *Molecular Reproduction and Development* **74**, 716-723.
- Rizos, D., Ramirez, M.A., Pintado, B., Lonergan, P. and Gutierrez-Adan, A. (2010). Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology* **73**, 777-785.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P. and Lonergan, P. (2002b). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* **61**, 234-248.
- Roberts, G.P., Parker, J.M. and Symonds, H.W. (1975). Proteins in luminal fluid from bovine oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility* **45**, 301-313.
- Robitaille, G., Stjacques, S., Potier, M. and Bleau, G. (1988). Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biology of Reproduction* **38**, 687-694.
- Roblero, L., Biggers, J.D. and Lechene, C.P. (1976). Electron-probe analysis of elemental microenvironment of oviducal mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **46**, 431-434.
- Roblero, L.S. and Riffo, M.D. (1986). High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos invitro. *Fertility and Sterility* **45**, 412-416.
- Rodriguez-Martinez, H., Saravia, F., Wallgren, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vazquez, J.M., *et al.* (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* **63**, 514-535.
- Roux, E. and Kan, F.W.K. (1995). Stage-specific immunolabeling for oviductin in the secretory granules of the oviductal epithelium of the golden-hamster during the estrous-cycle. *Anatomical Record* **241**, 369-376.
- S**aint-Dizier, M., Marnier, C., Tahir, M.Z., Grimard, B., Thoumire, S., Chastant-Maillard, S. and Reynaud, K. (2014). OVGP1 Is Expressed in the Canine Oviduct at the Time and Place of Oocyte Maturation and Fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **81**, 972-982.
- Sakai, Y., Araki, Y., Yamashita, T., Kurata, S., Oikawa, T., Hiroi, M. and Sendo, F. (1988). Inhibition of invitro 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. *Journal of Reproductive Immunology* **14**, 177-189.

- Saling, P.M., Storey, B.T. and Wolf, D.P. (1978). Calcium-dependent binding of mouse epididymal spermatozoa to zona pellucida. *Developmental Biology* **65**, 515-525.
- Sasanami, T., Pan, J.Z., Doi, Y., Hisada, M., Kohsaka, T., Toriyama, M. and Mori, M. (2002). Secretion of egg envelope protein ZPC after C-terminal proteolytic processing in quail granulosa cells. *European Journal of Biochemistry* **269**, 2223-2231.
- Sathanawongs, A., Nganvongpanit, K. and Mekchay, S. (2012). Expression Patterns of Cell Adhesion Molecules in Bovine Preimplantation Embryos Cultured in vitro. *Thai Journal of Veterinary Medicine* **42**, 455-461.
- Satoh, T., Abe, H., Sendai, Y., Iwata, H. and Hoshi, H. (1995). Biochemical-characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability in-vitro. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1266**, 117-123.
- Satouh, Y., Inoue, N., Ikawa, M. and Okabe, M. (2012). Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci* **125**, 4985-4990.
- Schmidt, A., Mavrogianis, P.A., OdayBowman, M.B., Jaffe, R.C. and Verhage, H.G. (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. *American Journal of Reproductive Immunology* **38**, 377-383.
- Schmidt, A., Mavrogianis, P.A., OdayBowman, M.B. and Verhage, H.G. (1997b). Species-specific effect of oviductal glycoproteins on hamster sperm binding to hamster oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **46**, 201-207.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101-1108.
- Schroeder, A.C., Schultz, R.M., Kopf, G.S., Taylor, F.R., Becker, R.B. and Eppig, J.J. (1990). Fetuin inhibits zona-pellucida hardening and conversion of zp2 to zp2f during spontaneous mouse oocyte maturation invitro in the absence of serum. *Biology of Reproduction* **43**, 891-897.
- Seki, S., Edashige, K., Wada, S. and Mazur, P. (2011). Effect of the expression of aquaporins 1 and 3 in mouse oocytes and compacted eight-cell embryos on the nucleation temperature for intracellular ice formation. *Reproduction* **142**, 505-515.
- Sendai, Y., Komiya, H., Suzuki, K., Onuma, T., Kikuchi, M., Hoshi, H. and Araki, Y. (1995). Molecular-cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biology of Reproduction* **53**, 285-294.
- Seytanoglu, A., Georgiou, A.S., Sostaric, E., Watson, P.F., Holt, W.V. and Fazeli, A. (2008). Oviductal cell proteome alterations during the reproductive cycle in pigs. *Journal of Proteome Research* **7**, 2825-2833.
- Shalgi, R., Smith, T.T. and Yanagimachi, R. (1992). A quantitative comparison of the passage of capacitated and incapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biology of Reproduction* **46**, 419-424.
- Shao, R.J. (2010). Understanding the mechanisms of human tubal ectopic pregnancies: new evidence from knockout mouse models. *Human Reproduction* **25**, 584-587.
- Shemesh, M. (2001). Actions of gonadotrophins on the uterus. *Reproduction* **121**, 835-842.

- Shen, Y., Stalf, T., Mehnert, C., Eichenlaub-Ritter, U. and Tinneberg, H.R. (2005). High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Human Reproduction* **20**, 1596-1606.
- Shi, D.B., Komatsu, K., Uemura, T. and Fujimori, T. (2011). Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct. *Genes to Cells* **16**, 282-290.
- Shirley, B. and Reeder, R.L. (1996). Cyclic changes in the ampulla of the rat oviduct. *Journal of Experimental Zoology* **276**, 164-173.
- Sinowatz, F., Kolle, S. and Topfer-Petersen, E. (2001). Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* **168**, 24-35.
- Sjoblom, C., Wikland, M. and Robertson, S.A. (1999). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Human Reproduction* **14**, 3069-3076.
- Slavik, T. and Fulka, J. (1999). Oviduct secretion contributes to the establishment of species specific barrier preventing penetration of oocytes with foreign spermatozoa. *Folia Biologica* **45**, 53-57.
- Smith, T.T. and Yanagimachi, R. (1991). Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility* **91**, 567-573.
- Soleilhavoup, C., Riou, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P., et al. (2016). Proteomes of the Female Genital Tract During the Oestrous Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics* **15**, 93-108.
- Spargo, S.C. and Hope, R.M. (2003). Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biology of reproduction* **68**, 358-362.
- Stambaugh, R., Noriega, C. and Mastroia, L. (1969). Bicarbonate ion - corona cell dispersing factor of rabbit tubal fluid. *Journal of Reproduction and Fertility* **18**, 51-&.
- Stetson, I., Izquierdo-Rico, M.J., Moros, C., Chevret, P., Lorenzo, P.L., Ballesta, J., et al. (2012). Rabbit zona pellucida composition: A molecular, proteomic and phylogenetic approach. *Journal of Proteomics* **75**, 5920-5935.
- Stjacques, S. and Bleau, G. (1988). Monoclonal-antibodies specific for an oviductal component associated with the hamster zona pellucida. *Journal of Reproductive Immunology* **12**, 247-261.
- Styrna, J., Bilinska, B. and Krzanowska, H. (2002). The effect of a partial Y chromosome deletion in B10.BR-Y-del mice on testis morphology, sperm quality and efficiency of fertilization. *Reproduction Fertility and Development* **14**, 101-108.
- Suarez, S.S. (1998). The oviductal sperm reservoir in mammals: Mechanisms of formation. *Biology of Reproduction* **58**, 1105-1107.
- Suarez, S.S. (2001). Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cells Tissues Organs* **168**, 105-112.
- Suarez, S.S. (2006). Gamete and zygote transport. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* **1**, 113-145.
- Suarez, S.S. (2007). Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: Inspiration for assisted reproduction. *Reproduction Fertility and Development* **19**, 103-110.
- Suarez, S.S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *International Journal of Developmental Biology* **52**, 455-462.

- Suarez, S. S. (2015). Gamete and zygote transport: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, **2**, 197-.
- Suarez, S.S. and Dai, X.B. (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biology of Reproduction* **46**, 686-691.
- Suen, K.F., Turner, M.S., Gao, F., Liu, B., Althage, A., Slavin, A., *et al.* (2010). Transient expression of an IL-23R extracellular domain Fc fusion protein in CHO vs. HEK cells results in improved plasma exposure. *Protein Expression and Purification* **71**, 96-102.
- Sun, T., Lei, Z. and Rao, C.V. (1997). A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Molecular and cellular endocrinology* **131**, 97-108.
- Surveyor, G.A., Gendler, S.J., Pemberton, L., Das, S.K., Chakraborty, I., Julian, J., *et al.* (1995). Expression and steroid hormonal-control of muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology* **136**, 3639-3647.
- Sutton, R., Nancarrow, C., Wallace, A. and Rigby, N. (1984). Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviducal fluid of the sheep. *Journal of reproduction and fertility* **72**, 415-422.
- Suzuki, K., Sendai, Y., Onuma, T., Hoshi, H., Hiroi, M. and Araki, Y. (1995). Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biology of Reproduction* **53**, 345-354.
- Swanson, W.J., Zhang, Z.H., Wolfner, M.F. and Aquadro, C.F. (2001). Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2509-2514.
- Szulanczyk, K. (2009). Histological changes within ovarian cortex, oviductal and uterine mucosa in case of ovarian cysts presence in sows. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* **47**, 99-103.
- Szöllösi, D. and Hunter, R. (1978). The nature and occurrence of the acrosome reaction in spermatozoa of the domestic pig, *Sus scrofa*. *Journal of anatomy* **127**, 33.
- T**alevi, R., Barbato, V., De Iorio, S., Mollo, V., Capriglione, T., Ricchiari, L., *et al.* (2010a). Is there a role for endocannabinoids in sperm-oviduct interaction? *Reproduction* **140**, 247-257.
- Talevi, R. and Gualtieri, R. (2010b). Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* **73**, 796-801.
- Tanaka, T., Tsujimura, T., Takeda, K., Sugihara, A., Maekawa, A., Terada, N., *et al.* (1998). Targeted disruption of ATF4 discloses its essential role in the formation of eye lens fibres. *Genes to Cells* **3**, 801-810.
- Tay, J.I., Rutherford, A.J., Killick, S.R., Maguiness, S.D., Partridge, R.J. and Leese, H.J. (1997). Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents. *Human Reproduction* **12**, 2451-2456.
- Teijeiro, J.M. and Marini, P.E. (2012). The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro-AKAP4 phosphorylation. *Reproduction* **143**, 773-785.
- Teng, C.T., Beard, C. and Gladwell, W. (2002). Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat, and hamster. *Biology of Reproduction* **67**, 1439-1449.

- Tesarik, J., Pilka, L. and Travník, P. (1988). Zona pellucida resistance to sperm penetration before the completion of human oocyte maturation. *Journal of Reproduction and Fertility* **83**, 487-495.
- Thibault, C., Szöllösi, D. and GÉRARD, M. (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Développement* **27**, 865-896.
- Thompson, J.G., Mitchell, M. and Kind, K.L. (2007). Embryo culture and long-term consequences. *Reproduction Fertility and Development* **19**, 43-52.
- Tian, J.D., Gong, H., Thomsen, G.H. and Lennarz, W.J. (1997). Gamete interactions in *Xenopus laevis*: Identification of sperm binding glycoproteins in the egg vitelline envelope. *Journal of Cell Biology* **136**, 1099-1108.
- Tian, X., Pascal, G., Fouchecourt, S., Pontarotti, P. and Monget, P. (2009). Gene Birth, Death, and Divergence: The Different Scenarios of Reproduction-Related Gene Evolution. *Biology of Reproduction* **80**, 616-621.
- Tienthai, P., Kjellen, L., Pertoft, H., Suzuki, K. and Rodriguez-Martinez, H. (2000). Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reproduction Fertility and Development* **12**, 173-182.
- Tienthai, P., Sajjarengpong, K. and Techakumphu, M. (2009). Light and Scanning Electron Microscopic Studies of Oviductal Epithelium in Thai Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) at the Follicular and Luteal Phases. *Reproduction in Domestic Animals* **44**, 450-455.
- Tokuhiro, K., Ikawa, M., Benham, A.M. and Okabe, M. (2012). Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 3850-3855.
- Topfer-Petersen, E. and Calvete, J.J. (1996). Sperm-associated protein candidates for primary zona pellucida-binding molecules: structure-function correlations of boar spermadhesins. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **50**, 55-61.
- Topfer-Petersen, E., Romero, A., Varela, P.F., Ekhlasi-Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L. and Calvete, J.J. (1998). Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**, 217-224.
- Trounson, A.O., Willadsen, S.M. and Rowson, L.E.A. (1977). Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured invitro and invivo and transferred to oviducts of rabbits and cows. *Journal of Reproduction and Fertility* **51**, 321-&.
- Turunen, H.T., Sipilä, P., Krutskikh, A., Toivanen, J., Mankonen, H., Hämäläinen, V., et al. (2012). Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice. *Biology of reproduction* **86**, 1-8.
- Tynan, S., Pacia, E., Haynes-Johnson, D., Lawrence, D., D'Andrea, M.R., Guo, J.Z., et al. (2005). The putative tumor suppressor deleted in malignant brain tumors 1 is an estrogen-regulated gene in rodent and primate endometrial epithelium. *Endocrinology* **146**, 1066-1073.
- Umez, T. and Tomooka, Y. (2004). An evidence of stromal cell populations functionally linked with epithelial cell populations in the mouse oviduct. *Zoological Science* **21**, 319-326.

- V**an den Nieuwenhof, I.M., Koistinen, H., Easton, R.L., Koistinen, R., Kämäräinen, M., Morris, H.R., *et al.* (2000). Recombinant glycodelin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodelin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in Chinese hamster ovary cells. *European Journal of Biochemistry* **267**, 4753-4762.
- Van Soom, A., Tanghe, S., De Pauw, I., Maes, D. and de Kruif, A. (2002). Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reproduction in Domestic Animals* **37**, 144-151.
- Van Soom, A., Wrathall, A., Herrler, A. and Nauwynck, H. (2009). Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? *Reproduction, Fertility and Development* **22**, 21-31.
- Vanwinkle, L.J., Campione, A.L. and Kester, S.E. (1985). A possible effect of the Na⁺ concentration in oviductal fluid on amino-acid uptake by cleavage-stage mouse embryos. *Journal of Experimental Zoology* **235**, 141-145.
- Verhage, H.G. and Fazleabas, A.T. (1988a). The invitro synthesis of estrogen-dependent proteins by the baboon (*papio-anubis*) oviduct. *Endocrinology* **123**, 552-558.
- Verhage, H.G., Fazleabas, A.T. and Donnelly, K. (1988b). The invitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology* **122**, 1639-1645.
- Verhage, H.G., Fazleabas, A.T., Mavrogianis, P.A., O'Day-Bowman, M.B., Donnelly, K.M. and Jaffe, R.C. (1997a). The baboon oviduct: characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Human Reproduction Update* **3**, 541-552.
- Verhage, H.G., Fazleabas, A.T., Mavrogianis, P.A., OdayBowman, M.B., Schmidt, A., Arias, E.B. and Jaffe, R.C. (1997b). Characteristics of an oviductal glycoprotein and its potential role in fertility control. *Journal of Reproduction and Fertility*, 217-226.
- Verhage, H.G., Mavrogianis, P.A., Boice, M.L., Li, W. and Fazleabas, A.T. (1990). Oviductal epithelium of the baboon: Hormonal control and the immuno-gold localization of oviduct-specific glycoproteins. *American journal of anatomy* **187**, 81-90.
- Verhage, H.G., Mavrogianis, P.A., Boomsma, R.A., Schmidt, A., Brenner, R.M., Slayden, O.V. and Jaffe, R.C. (1997c). Immunologic and molecular characterization of an estrogen-dependent glycoprotein in the rhesus (*Macaca mulatta*) oviduct. *Biology of Reproduction* **57**, 525-531.
- Vieira, E.G., Chapman, D. and Killian, G. (1999). Evidence for multiple forms of Estrus-associated protein in bovine oviductal fluid associated with oviduct region and stage of the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 202-202.
- Vincent, C., Pickering, S. and Johnson, M. (1990). The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *Journal of reproduction and fertility* **89**, 253-259.
- Visconti, P.E. and Florman, H.M. (2010). Mechanisms of Sperm-Egg Interactions: Between Sugars and Broken Bonds. *Science Signaling* **3**, 3.
- W**anderling, S., Simen, B.B., Ostrovsky, O., Ahmed, N.T., Vogen, S.M., Gidalevitz, T. and Argon, Y. (2007). GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle

- development because it regulates insulin-like growth factor Secretion. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 3764-3775.
- Wang, H.B., Guo, Y., Wang, D.Z., Kingsley, P.J., Marnett, L.J., Das, S.K., *et al.* (2004). Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos. *Nature Medicine* **10**, 1074-1080.
- Wang, K.X. and Denhardt, D.T. (2008). Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **19**, 333-345.
- Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Cantley, T.C. and Day, B.N. (1997). Effects of oocyte maturation media on development of pig embryos produced by in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility* **111**, 101-108.
- Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Prather, R.S. and Day, B.N. (1998). Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **49**, 308-316.
- Ward, P.P., Mendoza-Meneses, M., Cunningham, G.A. and Conneely, O.M. (2003). Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 178-185.
- Ward, P.P., Paz, E. and Conneely, O.M. (2005). Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, 2540-2548.
- Warren, W.C., Hillier, L.W., Graves, J.A.M., Birney, E., Ponting, C.P., Grutzner, F., *et al.* (2008). Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution (vol 453, pg 175, 2008). *Nature* **455**, 256-256.
- Wassarman, P.M. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annual Review of Biochemistry* **57**, 415-442.
- Wassarman, P.M. (2008). Zona pellucida glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 24285-24289.
- Wassarman, P.M. and Litscher, E.S. (2012a). Biogenesis of the Mouse Egg's Extracellular Coat, the Zona Pellucida. *Current topics in developmental biology* **102**, 243-266.
- Wassarman, P.M. and Litscher, E.S. (2012b). Influence of the zona pellucida of the mouse egg on folliculogenesis and fertility. *International Journal of Developmental Biology* **56**, 833-839.
- Wassarman, P.M. and Mortillo, S. (1991). Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int Rev Cytol* **130**, 85-110.
- Waurich, R., Ringleb, J., Braun, B.C. and Jewgenow, K. (2010). Embryonic gene activation in in vitro produced embryos of the domestic cat (*Felis catus*). *Reproduction* **140**, 531-540.
- Way, A.L., Schuler, A.M. and Killian, G.J. (1997). Influence of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on sperm-egg binding and fertilization in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* **109**, 95-101.
- Wegner, C.C. and Killian, G.J. (1991). In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona-pellucida. *Molecular Reproduction and Development* **29**, 77-84.
- Welsch, U. and Sobotta, J. (2008) *Histología*, Ed. Médica Panamericana.
- White, R.R., Brady, M., Capper, J.L., McNamara, J.P. and Johnson, K.A. (2015). Cow-calf reproductive, genetic, and nutritional management to improve the

- sustainability of whole beef production systems. *Journal of Animal Science* **93**, 3197-3211.
- Winuthayanon, W., Bernhardt, M.L., Padilla-Banks, E., Myers, P.H., Edin, M.L., Hewitt, S.C., *et al.* (2015). Oviductal estrogen receptor alpha signaling prevents protease-mediated embryo death. *eLife* **4**, e10453.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J. and Niemann, H. (1996). Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Journal of reproduction and fertility* **108**, 17-24.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J.W. and Niemann, H. (1999). Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular Reproduction and Development* **53**, 8-18.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Korsawe, K., Lemme, E. and Niemann, H. (2005). Addition to methods used already, such as Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reproduction Fertility and Development* **17**, 23-35.
- Wright, R.W., Cupps, P.T., Gaskins, C.T. and Hillers, J.K. (1977). Comparative solubility properties of zona-pellucidae of unfertilized murine, ovine and bovine ova. *Journal of Animal Science* **44**, 850-853.
- X**iong, Y., Tan, Y.J., Xiong, Y.M., Huang, Y.T., Hu, X.L., Lu, Y.C., *et al.* (2013). Expression of Aquaporins in Human Embryos and Potential Role of AQP3 and AQP7 in Preimplantation Mouse Embryo Development. *Cellular Physiology and Biochemistry* **31**, 649-658.
- Y**amaji, Y., Seki, S., Matsukawa, K., Koshimoto, C., Kasai, M. and Edashige, K. (2011). Developmental ability of vitrified mouse oocytes expressing water channels. *Journal of Reproduction and Development* **57**, 403-408.
- Yamanouchi, H., Umezu, T. and Tomooka, Y. (2010). Reconstruction of Oviduct and Demonstration of Epithelial Fate Determination in Mice. *Biology of Reproduction* **82**, 528-533.
- Yamaoka, S. (1987). Cilium movement of human oviduct. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi* **39**, 777-784.
- Yan, G.M., Zhang, G.J., Fang, X.D., Zhang, Y.F., Li, C., Ling, F., *et al.* (2011). Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques. *Nature Biotechnology* **29**, 1019-1089.
- Yanagima.R (1970). Movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Journal of Reproduction and Fertility* **23**, 193-&.
- Yanagimachi, R. (1984). Fertilization in mammals. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine* **9**, 81-85.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction* **1**, 189-317.
- Yanagimachi, R. (2009). Germ Cell Research: A Personal Perspective. *Biology of Reproduction* **80**, 204-218.

- Yanagimachi, R. (2011). Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biology of reproduction* **85**, 4-5.
- Yang, C.H. and Yanagimachi, R. (1989). Differences between mature ovarian and oviductal oocytes - a study using the golden-hamster. *Human Reproduction* **4**, 63-71.
- Yang, X.J., Zhao, Y.W., Yang, X.L. and Kan, F.W.K. (2015). Recombinant Hamster Oviductin Is Biologically Active and Exerts Positive Effects on Sperm Functions and Sperm-Oocyte Binding. *Plos One* **10**, 24.
- Yaniz, J.L., Lopez-Gatius, F. and Hunter, R.H.F. (2006). Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Anatomia Histologia Embryologia-Journal of Veterinary Medicine Series C* **35**, 28-34.
- Yaniz, J.L., Lopez-Gatius, F., Santolaria, P. and Mullins, K.J. (2000). Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anatomical Record* **260**, 268-278.
- Yeung, W.S.B., Lee, K.F., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M. and Chiu, P.C.N. (2009). Effects of glycodefins on functional competence of spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology* **83**, 26-30.
- Yin, L., Chung, C.M., Huo, R., Liu, H., Zhou, C., Xu, W., *et al.* (2009). A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 900-908.
- Yong, P., Gu, Z., Luo, J.P., Wang, J.R. and Tso, J.K. (2002). Antibodies against the C-terminal peptide of rabbit oviductin inhibit mouse early embryo development to pass 2-cell stage. *Cell Research* **12**, 69-78.
- Young, L.E., Sinclair, K.D. and Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction* **3**, 155-163.
- Z**eck, A., Pohlentz, G., Schlothauer, T., Peter-Katalinić, J. and Regula, J.r.T. (2011). Cell type-specific and site directed N-glycosylation pattern of FcγRIIIa. *Journal of proteome research* **10**, 3031-3039.
- Zhang, H. and Martin-DeLeon, P.A. (2003). Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: Evidence for its expression in the female reproductive tract. *Biology of Reproduction* **69**, 446-454.
- Zhang, K., Baeckstrom, D., Brevinge, H. and Hansson, G.C. (1996). Secreted MUC1 mucins lacking their cytoplasmic part and carrying sialyl-Lewis a and x epitopes from a tumor cell line and sera of colon carcinoma patients can inhibit HL-60 leukocyte adhesion to E-selectin-expressing endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **60**, 538-549.
- Zhuo, L.S., Yoneda, M., Zhao, M., Yingsung, W., Yoshida, N., Kitagawa, Y., *et al.* (2001). Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility - A study by inactivation of the bikunin gene in mice. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7693-7696.
- Zumoffen, C.M., Gil, R., Caille, A.M., Morente, C., Munuce, M.J. and Ghersevich, S.A. (2013). A protein isolated from human oviductal tissue in vitro secretion, identified as human lactoferrin, interacts with spermatozoa and oocytes and modulates gamete interaction. *Human Reproduction* **28**, 1297-1308.

