



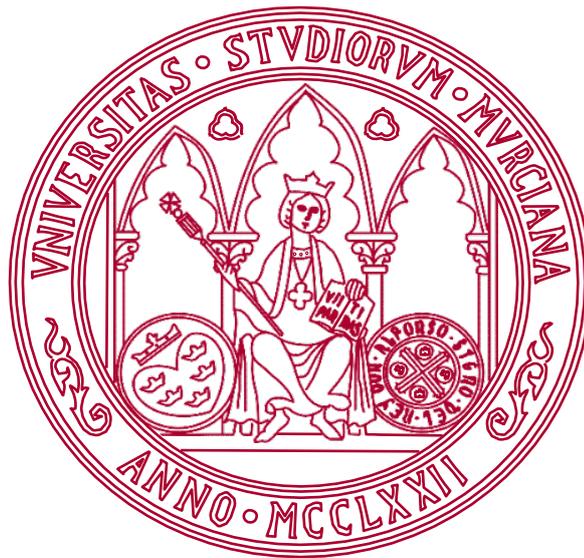
# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Estudio de las Proteínas Haptoglobina y Lactadherina  
en el Oviducto Porcino y su Participación en los  
Eventos Reproductivos**

**Dña. Ascensión Pilar Guillén Martínez  
2018**





# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Estudio de las proteínas haptoglobina y  
lactadherina en el oviducto porcino y su  
participación en los eventos reproductivos**

**Da. Ascensión Pilar Guillén Martínez  
2018**





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. **Manuel Avilés Sánchez**, Catedrático de Universidad del Área de Patología Humana en el Departamento de Biología Celular e Histología, AUTORIZA:

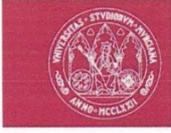
La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de las proteínas haptoglobina y lactadherina en el oviducto porcino y su participación en los eventos reproductivos**”, realizada por D<sup>a</sup> **Ascensión Pilar Guillén Martínez**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de mayo de 2018



Facultad de Medicina  
Departamento de Biología Celular e Histología  
Campus Universitario de Espinardo. 3100 Murcia





UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D<sup>a</sup>. **María José Izquierdo Rico**, Profesor Contratado Doctor de Universidad del Área de Patología Humana del Departamento de Biología Celular e Histología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de las proteínas haptoglobina y lactadherina en el oviducto porcino y su participación en los eventos reproductivos**”, realizada por D<sup>a</sup> **Ascensión Pilar Guillén Martínez**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de mayo de 2018



Facultad de Medicina  
Departamento de Biología Celular e Histología  
Campus Universitario de Espinardo. 3100 Murcia



D<sup>a</sup>. **Carla Moros Nicolás**, Doctora por la Universidad de Murcia, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Estudio de las proteínas haptoglobina y lactadherina en el oviducto porcino y su participación en los eventos reproductivos**”, realizada por D<sup>a</sup> **Ascensión Pilar Guillén Martínez**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Alicante, a 05 de Junio de 2018



Carla Moros Nicolás



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

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada durante el periodo de disfrute de un contrato predoctoral FPU de la Universidad de Murcia. Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Proyecto AGL2012-40180-C03-02 y Proyecto AGL2015-70159-P). Así mismo, se ha desarrollado en el marco de los Programas de Ayudas a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia de la Fundación Séneca (04542/GERM/06 y 19357/PI/14).



## COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Guillén-Martínez A, Moros C, Acuña OS, Izquierdo-Rico MJ, Avilés M. **Determination of expression of MFGE8 in porcine oviduct and uterus**. Póster. 3° World Congress of Reproductive Biology. Edimburgo (Escocia), 2014.
- Guillén-Martínez A, Moros C, Izquierdo-Rico MJ, Ballesta J, Avilés M. **Identification of the mRNA coding for MFGE8 in porcine oviduct (Sus scrofa)**. Póster. 12° Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA). Alicante (España), 2014.
- Soriano-Úbeda C, Guillén-Martínez A, Romero-Aguirregomez J, Avilés M and Coy P. **Effect of lactadherin protein on porcine *in vitro* fertilization**. Póster. 12° Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA) Alicante (España), 2014.
- Guillén-Martínez A, Acuña OS, Soriano-Úbeda C, Jara L, López Albors, O, Coy P, Ballesta J, Izquierdo-Rico, MJ, Avilés M. **Identification of lactadherin in the porcine oviduct**. Comunicación oral. XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología- (SEHIT) VI International Congress of Histology and Tissue Engineering- II Congreso Iberoamericano de Histología. Bilbao (España), 2015.
- Guillén-Martínez A, Izquierdo Rico MJ, Moros C, Olsson F, López Albors O, Algarra B, Canha A, González-Brusi L, Jara L, Jiménez-Movilla M, Avilés M. **Analysis of MFGE8 gene expression in the porcine oviduct during the estrous cycle**. Póster. 18° International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Tours (Francia), 2016.
- López-Úbeda R, Soriano-Úbeda C, Matás C, García-Vázquez FA, Avilés M, Guillén-Martínez A, Izquierdo-Rico MJ. **Localización de haptoglobina en el oviducto porcino y su efecto en la fecundación *in vitro***. Comunicación oral. XVII Jornadas sobre producción animal. AIDA-ITEA (Asoc. Interprofesional para el Desarrollo Agrario-Información Técnica Económica Agraria). Zaragoza (España), 2017.
- López-Úbeda R, Guillén-Martínez A, García-Vázquez FA, Avilés M, Izquierdo-Rico MJ. **Identification of haptoglobin protein in sow oviductal fluid**. Póster. 14° Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal (AERA). Barcelona (España), 2017.



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

## **ARTÍCULOS**

Guillén-Martínez A, González-Brusi L, Orjuela-Gasca C, Gómez-Torres MJ, Soriano-Úbeda C, Izquierdo Rico MJ, Avilés M. **Effect of lactadherin protein on porcine reproduction.** (En preparación).

García-Vázquez FA, Guillén-Martínez A, López-Úbeda R, Soriano-Úbeda C, Avilés M, Izquierdo-Rico MJ. **Analysis of the expression of haptoglobin in the porcine oviduct and its effect on *in vitro* fertilization.** (En preparación).



# *Agradecimientos*

---



Quiero comenzar estas palabras de agradecimiento mencionando a mis directores de Tesis, Manuel Avilés Sánchez, María José Izquierdo Rico y Carla Moros Nicolás por lo mucho que se han involucrado en la realización de este trabajo. Gracias por todo lo que me han aportado en estos años, porque sin vuestra enseñanza y apoyo no habría logrado este enorme reto. Manolo, muchas gracias por abrir el camino a la investigación a una inexperta y curiosa matrona, por mostrarme el asombroso mundo de la reproducción, por tu afán investigador y por darme ejemplo para esforzarme en realizar el mejor trabajo posible. Sobre todo, gracias por tu paciencia y calidez humana en mi etapa maternal, no ha sido sencillo de compaginar. María José, gracias de todo corazón por tus ánimos y consejos, por el gusto de un trabajo bien hecho, por ser tan resolutiva y por tu encomio en mis momentos difíciles. Tú has sido un gran ejemplo en la lucha diaria de la “conciliación” familiar y laboral, mostrando que el esfuerzo vale la pena. Me he sentido muy afortunada de tener tu guía en esta etapa, pero sobre todo tu amistad y cariño. Carla, has sido compañera y maestra desde el primer día. Tu enorme paciencia ante mi inexperiencia y tu sonrisa a pesar de ello, junto con tu disponibilidad en todo momento han hecho que este camino sea más fácil. Gracias por tu serenidad en los momentos desesperantes en los que parecía que nada iba a salir, por tu meticulosidad y trabajo exquisito. Carla, has sido la mejor maestra que podía tener, tu apoyo y amistad en esta etapa final de Tesis ha sido un regalo.

A todos los profesores del Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina: a Concha Ferrer, Esther Beltrán, Emma Martínez, M<sup>a</sup> Teresa Castells, Emilio Gómez, José Ángel Martínez, Juan Francisco Madrid, Luis Miguel Pastor y José Ballesta. También a Mari Carmen y a Ángel. Un sincero agradecimiento a María Jiménez Movilla por su ayuda siempre que la he necesitado, por sus buenos consejos y por la tranquilidad que trasmite. También a Vicente, por su buen humor y gran ayuda en la etapa final de esta Tesis.

A mis compañeros del Departamento de Biología Celular e Histología con los que he compartido esta etapa predoctoral, y son los que mejor conocen los buenos y malos ratos que se pasan en la búsqueda de los tan deseados resultados. Gracias a Leo, Analuce, Julieta, Paula, Salva y Jesús. Un agradecimiento muy especial a Blanca, Narci, Lourdes y Rebeca por vuestra amistad y generosidad. Vosotros habéis hecho que esta haya sido una bonita experiencia.

A Pilar Coy y el resto de profesores del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria por permitirme trabajar allí. En especial, gracias a Fran García por toda su

ayuda y su buena disponibilidad, y a Soledad Rodríguez por el buen humor y hacer más llevadera la recogida de muestras en matadero. Y un sincero agradecimiento a Cristina Soriano por su ayuda en cualquier momento, siempre con paciencia y una sonrisa. También mi agradecimiento a Octavio López, por compartir sus conocimientos con amabilidad y de muy buena gana.

A las compañeras de pasillo, de Bioquímica, a Ana, Ceci, María, Marta y Julia por aportar la alegría y la música de fondo. Gracias a Conchi por su apoyo incondicional en mi lactancia y regalarme su sonrisa en todo momento.

A la empresa El Pozo Alimentación S.A. por facilitarnos las muestras biológicas sin las cuales no habría sido posible realizar esta Tesis Doctoral.

A mis queridos amigos Alonso, Vicky y Gloria, gracias por vuestro cariño y ánimo a pesar de la distancia, por apoyarme en esta meta a pesar de las dificultades, por ser en verdad los mejores amigos que una puede tener.

A mi padre Francisco, por su amor incondicional, por cuidarme siempre, por ser mi gran apoyo al retomar mis estudios, por enseñarme que el esfuerzo tiene su recompensa y por ser el mejor abuelo del mundo para mis niños. Sin tu cariño y tu ayuda, nada de esto habría sido posible...y yo no sería quien soy hoy.

A Guille, mi tan querido hermano mayor, mi guía en los momentos difíciles, mi apoyo incondicional, quien me pone los pies en la tierra, por estar conmigo siempre, siempre, siempre...A mi madre y mis hermanos, porque a pesar de la obligada distancia, he podido contar con vuestro cariño.

A toda mi extensa familia política, por los buenos ratos y la buena disposición para todo, especialmente por cuidar como vuestros a mis hijos, en mis muchas horas de ausencia durante este doctorado. Gracias de todo corazón a Mónica y Juani, por ser las “otras” mamás de mi Felipe.

A Pedro, por quererme tal y como soy, por haber compartido y sufrido a mi lado todos estos años de estudios, por tu enorme paciencia, por cuidarme y creer en mí, por ser un buen padre para nuestros hijos.

Y finalmente, el más dulce agradecimiento a mis niños, Francisco y Felipe, por ser la razón de mi esfuerzo, la alegría de mi vida, mis lágrimas más felices. Vuestra llegada lo cambió todo, le dio la vuelta a mis prioridades y a mis sueños. Jamás imaginé poder sentir un amor tan incondicional. Todo cobra sentido cuando sonreís.

**A mi padre**  
*Mi ejemplo a seguir*



**A mis hijos Francisco y Felipe**  
*Mi razón de ser*



*“El mayor azote de la vida moderna es tener que dar importancia a cosas que, en realidad, no la tienen”*

*Rabindranath Tagore  
Premio Nobel de Literatura, 1913.*



# *Índice*

---



# INDICE

<b>I. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Objetivos</b> .....	<b>7</b>
<b>III. Revisión bibliográfica</b> .....	<b>10</b>
3.1 Aspectos moleculares de la fecundación .....	13
3.1.1 Ciclo estral en la especie porcina .....	15
3.2. Oviducto.....	16
3.2.1 Anatomía .....	16
3.2.2 Histología .....	18
3.3 Fluido oviductal .....	20
3.3.1 Formación del fluido oviductal .....	21
3.3.2 Composición del fluido oviductal .....	21
3.3.2.1 Agua y electrolitos.....	22
3.3.2.2 Sustratos energéticos .....	24
3.3.2.3 Lípidos .....	24
3.3.2.4 Aminoácidos.....	24
3.3.2.5 Proteínas .....	25
3.3.2.6 Exosomas y microvesículas en el fluido oviductal.....	36
3.3.3 Expresión génica del oviducto .....	38
3.3.4 Proteoma del oviducto.....	41
3.4. Funciones del oviducto .....	42
3.4.1 Funciones del oviducto respecto al espermatozoide .....	43
3.4.2 Funciones del oviducto respecto al ovocito .....	48
3.4.3 Funciones del oviducto respecto al embrión.....	49
3.4.3.1 Efecto de la fecundación <i>in vitro</i> sobre el desarrollo embrionario.....	52
3.5 Haptoglobina.....	55
3.5.1 Estructura de la proteína haptoglobina.....	55
3.5.2 Expresión y diversas funciones de la haptoglobina .....	58
3.5.2.1 Haptoglobina como proteína de unión a hemoglobina.....	58
3.5.2.2 Haptoglobina como proteína de fase aguda.....	59
3.5.2.3 Otras funciones de la haptoglobina .....	60
3.5.3 Relación de la haptoglobina con la función reproductiva.....	63
3.5.3.1 Haptoglobina y el fluido oviductal .....	65
3.6 Lactadherina.....	67
3.6.1 Estructura de la proteína lactadherina .....	68
3.6.2 Expresión y diversas funciones de la lactadherina.....	68

3.6.3 Relación de la proteína lactadherina con la función reproductiva .....	71
<b>IV. Material y Métodos</b> .....	<b>73</b>
4.1 Reactivos.....	75
4.2 Obtención del material biológico.....	75
4.2.1 Ovarios .....	75
4.2.1.1 Obtención y transporte.....	75
4.2.1.2 Lavado .....	75
4.2.2 Ovocitos .....	76
4.2.2.1 Maduración <i>in vitro</i> .....	76
4.2.3 Oviductos, fluido oviductal y útero.....	77
4.2.3.1 Obtención de fluido oviductal porcino .....	79
4.2.4 Procesado del semen porcino .....	79
4.2.5 Fecundación <i>in vitro</i> porcina en presencia de proteínas oviductales .....	80
4.2.5.1 Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de haptoglobina.....	80
4.2.5.2 Fecundación <i>in vitro</i> en presencia de lactadherina.....	81
4.2.5.2.1 Incubación de ovocitos con lactadherina y fecundación <i>in vitro</i> .....	81
4.2.5.2.2 Incubación de espermatozoides con lactadherina y fecundación <i>in vitro</i> .....	81
4.2.5.3 Evaluación de la fecundación <i>in vitro</i> .....	82
4.2.5.4 Análisis estadísticos de la fecundación <i>in vitro</i> .....	83
4.3 Obtención de muestras y análisis para biología molecular.....	83
4.3.1 Obtención de ARN total de oviducto y útero porcino.....	83
4.3.2 Síntesis <i>in vitro</i> de ADN complementario de oviducto y útero porcino .....	84
4.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	84
4.3.4 Electroforesis en gel de agarosa .....	86
4.3.5 Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados .....	87
4.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa .....	87
4.3.6.1 Análisis estadísticos de la amplificación por RT-PCR en tiempo real....	88
4.3.7 Determinación de la concentración de proteínas.....	88
4.3.8 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).....	89
4.3.9 Tinción con azul de coomassie.....	89
4.3.10 Western-blot .....	90
4.3.10.1 Transferencia a membrana.....	90
4.3.10.2 Inmunodetección en membrana.....	90
4.4 Inmunohistoquímica para microscopía óptica .....	91
4.4.1 Fijación de las muestras .....	91

4.4.2	Inclusión de tejidos en bloques de parafina .....	91
4.4.3	Inmunohistoquímica en portaobjetos .....	91
4.5	Análisis proteómico de fluido oviductal mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	93
4.5.1	Digestión de fluido oviductal con tripsina.....	94
4.5.2	Digestión del gel de electroforesis con tripsina.....	94
4.5.3	Separación y análisis de las muestras digeridas con tripsina .....	95
<b>V.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>97</b>
5.1	Haptoglobina.....	99
5.1.1	Abundancia relativa del ARN codificante para haptoglobina en el oviducto porcino.....	99
5.1.2	Detección de haptoglobina en fluido oviductal porcino.....	100
5.1.2.1	Detección de haptoglobina en fluido oviductal porcino mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y Western-blot.....	100
5.1.3	Detección de haptoglobina en tejido oviductal .....	105
5.1.4	Efecto de la proteína haptoglobina sobre la fecundación <i>in vitro</i> .....	107
5.2	Lactadherina.....	109
5.2.1	Detección del ARN codificante para lactadherina en el oviducto porcino ..	109
5.2.2	Abundancia relativa del ARN codificante para lactadherina en el oviducto porcino.....	111
5.2.3	Detección de lactadherina en el fluido oviductal porcino .....	113
5.2.3.1	Detección de lactadherina en fluido oviductal porcino mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y Western-blot.....	113
5.2.4	Efecto de la proteína lactadherina sobre la fecundación <i>in vitro</i> .....	117
<b>VI.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>121</b>
6.1	La proteína haptoglobina y su relación con el proceso reproductivo .....	123
6.1.1	La proteína haptoglobina en el oviducto de mamíferos .....	124
6.1.2	La proteína haptoglobina y el espermatozoide.....	126
6.2	La proteína lactadherina y su relación con el proceso reproductivo.....	129
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>135</b>
<b>VIII.</b>	<b>Resumen .....</b>	<b>139</b>
8.1	La proteína haptoglobina en el oviducto porcino .....	142
8.2	La proteína lactadherina en el oviducto porcino.....	143
<b>IX.</b>	<b>Abreviaturas.....</b>	<b>145</b>
<b>X.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>149</b>
<b>XI.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>155</b>



# *I. Introducción*

---



La fecundación es un complejo proceso biológico que ha sido objeto de estudio de numerosos investigadores. En este proceso están implicadas una gran variedad de proteínas y moléculas de ambos gametos, las cuales participan en la unión y el reconocimiento específico de los mismos en función de la especie. Ésta tiene lugar en el oviducto, donde se ha visto que sus secreciones son fundamentales para su desarrollo óptimo. Diversos estudios han demostrado que el oviducto es una pieza clave en procesos como la capacitación y selección espermática, la maduración de gametos y el desarrollo embrionario temprano (Hunter, 1991, Avilés *et al.*, 2010, Coy *et al.*, 2012a, Hunter, 2012a, Pérez-Cerezales *et al.*, 2018).

En la actualidad, se han ido perfeccionando las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) tanto para su utilización en la reproducción del ser humano, como de especies animales, incluidas las que están en peligro de extinción (Clulow *et al.*, 2014, Holt *et al.*, 2014, Comizzoli, 2015).

A pesar de los muchos avances, estas técnicas continúan sin lograr una eficiencia óptima, observándose que en un gran número de especies disminuye la eficiencia *in vitro* en comparación con el modelo *in vivo* (Avilés *et al.*, 2010, Mondéjar *et al.*, 2012, Coy *et al.*, 2015, Lopera-Vasquez *et al.*, 2017). Los diferentes motivos que marcan estas diferencias parecen estar relacionados con deficiencias en la maduración final de los gametos, fallos en la interacción ovocito-espermatozoide o en la escasa habilidad del recién formado cigoto para desarrollarse adecuadamente, así como a fallos endometriales durante la implantación. La mayor parte de estos procesos tienen lugar en el oviducto, lo que puede estar marcando la diferencia con las técnicas reproductivas *in vitro*, siendo estos aspectos a nivel molecular, objeto de investigación en la actualidad para la mejora de dichas técnicas (Kleijkers *et al.*, 2015, Cánovas *et al.*, 2017, Pérez-Cerezales *et al.*, 2018).

Diversos estudios han demostrado una mejora en las condiciones de producción de embriones al utilizar diversas estrategias: el uso de medio de cultivo suplementado con diferentes proteínas y factores de crecimiento oviductales, el cocultivo con células epiteliales o la transferencia de embriones a oviductos de otras especies, optimizándose así el desarrollo embrionario temprano (Gandolfi *et al.*, 1987, Lonergan *et al.*, 2003, Gutiérrez-Adán *et al.*, 2004, Rizos *et al.*, 2007, Rizos *et al.*, 2010, Maillo *et al.*, 2016, Almiñana *et al.*, 2017, Pérez-Cerezales *et al.*, 2018). Este hecho confiere al oviducto un papel primordial en el proceso de la fecundación.

El avance en el conocimiento de la biología de la reproducción, concretamente en los aspectos moleculares y fisiológicos que ocurren en el oviducto durante la fecundación puede aplicarse con diferentes fines, los cuales podrían dar lugar a nuevos medios de cultivo artificiales con una mayor similitud fisiológica. Este hecho redundaría en la mejora de la cantidad y calidad de embriones producidos *in vitro*, tanto en la especie humana como de especies en peligro de extinción, así como en el aumento de las tasas de reproducción de animales de uso comercial o de animales con fines biomédicos (Holt *et al.*, 2014, Keefer, 2015, White *et al.*, 2015a, Almiñana *et al.*, 2017, Pérez-Cerezales *et al.*, 2018).

El trabajo científico desarrollado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de proteínas oviductales que están presentes tanto en el momento de la fecundación, como en las etapas tempranas del desarrollo embrionario.

Una de ellas es la proteína la haptoglobina (Hp), presente en diversos tejidos y con una gran variedad de funciones biológicas, incluido el sistema reproductor de mamíferos. Esta proteína ha sido previamente detectada en el testículo, cuya función parece estar relacionada con el mantenimiento de los niveles de hierro necesarios para la espermatogénesis (O'Bryan *et al.*, 1997). En el caso del aparato reproductor femenino, esta proteína se ha detectado en diversos órganos de diferentes especies, entre ellas el endometrio humano (Sharpe-Timms *et al.*, 2000). También se ha detectado su presencia en el fluido oviductal de coneja, de vaca y en el fluido oviductal porcino (FOP) en presencia de ovocitos (Herrler *et al.*, 2004, Lavery *et al.*, 2004, Georgiou *et al.*, 2005). La detección de esta proteína y la función que pueda desempeñar en el oviducto en la especie porcina (*Sus scrofa*) es parte del estudio llevado a cabo en este trabajo.

La otra proteína estudiada en esta Tesis Doctoral es la lactadherina, presente en diversos tejidos como el epidídimo, donde se adhiere al espermatozoide (Ensslin *et al.*, 1998) y desempeña diferentes funciones, como la de facilitar interacciones intercelulares, entre las que se encuentra la unión entre el espermatozoide y la zona pelúcida (ZP) del ovocito (Ensslin *et al.*, 2003). Aunque en un trabajo previo ha detectado a esta proteína en el útero porcino (Ensslin *et al.*, 1998), esta investigación se centra en el estudio de lactadherina en el oviducto porcino.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado diversas técnicas de biología molecular y celular para la detección de ambas proteínas en el FOP, en el epitelio oviductal, y para comparar su expresión en diferentes fases del ciclo estral de la cerda. También se ha

utilizado la proteína recombinante lactadherina y la proteína purificada del suero Hp para ver su efecto en el proceso de la FIV.

Este estudio nos permitirá conocer mejor las funciones que tienen estas dos proteínas en el proceso de la fecundación, así como su posible aplicación directa en técnicas de reproducción asistida (TRAs). La suplementación de estas proteínas en los medios de cultivo utilizados podría favorecer la mejora de los resultados obtenidos, tal y como ha sido el uso beneficioso de una glicoproteína específica del oviducto (oviductina) sobre la monospermia en la vaca y en la cerda (Coy *et al.*, 2008, Algarra *et al.*, 2016).



## ***II. Objetivos***

---



En vista de lo expuesto anteriormente y con el propósito de ampliar el conocimiento actual sobre las proteínas Hp y lactadherina, su efecto fisiológico en la reproducción como componente del fluido oviductal en la especie porcina, los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1.- Determinar la abundancia relativa del ARN codificante para la proteína haptoglobina en el oviducto porcino en diferentes fases del ciclo estral.
- 2.- Detectar la presencia de la proteína haptoglobina en el FOP en diferentes fases del ciclo estral.
- 3.- Localizar la secreción de la proteína haptoglobina en el epitelio oviductal porcino.
- 4.- Analizar el efecto fisiológico de la proteína haptoglobina sobre la FIV.
- 5.- Detectar el ARN codificante para la proteína lactadherina en el oviducto porcino.
- 6.- Determinar la abundancia relativa del ARN codificante para la proteína lactadherina en el oviducto porcino en diferentes fases del ciclo estral.
- 7.- Detectar la presencia de la proteína lactadherina en el FOP en diferentes fases del ciclo estral.
- 8.- Analizar el efecto fisiológico de la proteína lactadherina sobre la FIV.



### ***III. Revisión bibliográfica***

---



### 3.1 Aspectos moleculares de la fecundación

El proceso de fecundación en mamíferos implica la participación de diversas proteínas de unión ya que supone una interacción especie-específica entre células que presentan un alto nivel de especialización, como son el óvulo y el espermatozoide (Evans *et al.*, 2002, Okabe, 2014). Para que este proceso ocurra, es necesario que se sucedan una serie de acontecimientos previos para que la fusión entre el espermatozoide y el óvulo se realice con éxito.

Como preparación previa a este evento, es necesario que los espermatozoides experimenten en su superficie diversos cambios estructurales y bioquímicos a su paso tanto por el tracto reproductor masculino como el femenino para poder fecundar el óvulo. Durante su trayecto por el epidídimo se integran y se asocian lípidos y proteínas exógenas a la superficie espermática. De forma paralela, se eliminan otras proteínas asociadas a su superficie a la vez que se produce la migración de diversos componentes de la membrana plasmática del espermatozoide (Kirchhoff *et al.*, 1996, Tulsiani *et al.*, 2012, Bromfield, 2014, Dacheux *et al.*, 2014). La superficie del espermatozoide se complementa con otras proteínas tras la eyaculación, debido al contacto con las secreciones de las glándulas accesorias, creándose así una capa de proteínas que protege la membrana plasmática del espermatozoide de una capacitación prematura (Töpfer-Petersen *et al.*, 1998, Dacheux *et al.*, 2014). Además, una vez lleguen al tracto reproductor femenino, los espermatozoides deben superar diferentes condiciones, como la acidez vaginal y el moco cervical que elimina patógenos y espermatozoides no móviles (Yanagimachi, 1994, Bromfield *et al.*, 2014, Tung *et al.*, 2015).

En mamíferos como el cerdo, es durante este recorrido donde se eliminan esos factores de la superficie del espermatozoide que evitan la capacitación temprana, adquiriendo su capacidad para fecundar en el oviducto, donde los espermatozoides se unen al epitelio oviductal y forman un reservorio en la región caudal del istmo (Suárez, 2016). Con la ovulación, los espermatozoides se desprenderán de las células oviductales y avanzarán hasta el sitio de fecundación, finalizando durante ese trayecto su capacitación (Töpfer-Petersen *et al.*, 2002, Tosti *et al.*, 2016). En el ser humano, la fecundación ocurre en la ampolla oviductal y en la especie porcina en la región ampular-ístmica (Hunter, 2002).

Durante la capacitación, la fluidez de la membrana espermática aumenta con la pérdida de colesterol (Davis *et al.*, 1979, Visconti *et al.*, 1999) y se han observado cambios en las concentraciones de iones intracelulares (Visconti *et al.*, 2011) junto con la hiperpolarización de la membrana plasmática (Hernández-González *et al.*, 2006), el aumento de la actividad de proteína quinasa A (Krapf *et al.*, 2010), y la fosforilación de tirosinas (Arcelay *et al.*, 2008, López-Úbeda *et al.*, 2015a, Tanphaichitr *et al.*, 2015). Diversos estudios han mostrado la dinámica de migración de proteínas y su redistribución de unos subdominios a otros de la superficie espermática durante la capacitación (Töpfer-Petersen *et al.*, 1990, Blobel *et al.*, 1992, Tanphaichitr *et al.*, 2015).

Una vez capacitados, los espermatozoides se encontrarán con el óvulo rodeado por el cúmulo ovífero, el cual deberán atravesar para poder unirse a la ZP. También es necesario que el espermatozoide sufra la reacción acrosómica (RA) para que la fecundación ocurra, aunque no existe un consenso sobre el lugar exacto en el que ésta se produce. Algunos estudios describen que la RA se produce mientras el espermatozoide avanza a través de las células del cúmulo, mientras que otros sugieren que es en la superficie de la ZP (Szöllösi *et al.*, 1978, Yanagimachi, 1994). Además, en todas las especies no ocurre de forma similar, como en el ratón, donde se ha descrito que la mayoría de espermatozoides no sufren la RA cerca o en contacto con la ZP, sino mucho antes, en el segmento superior del istmo (Jin *et al.*, 2011, La Spina *et al.*, 2016, Muro *et al.*, 2016). El paso siguiente supone la fusión de las membranas de los dos gametos, tras la cual el óvulo se activará y se desencadenará la reacción cortical, evitando así la entrada de más espermatozoides o polispermia, formándose el cigoto (Visconti *et al.*, 2010, Burkart *et al.*, 2012, Bianchi *et al.*, 2014, Okabe, 2014).

A lo largo de los años se han ido identificando en muchas especies de mamíferos numerosas proteínas asociadas a la superficie espermática y que participan en las distintas fases de la fecundación (Snell *et al.*, 1996, Töpfer-Petersen, 1990). En un principio se atribuyó a la  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa (GalT) la unión del espermatozoide a la ZP (Miller *et al.*, 1992), aunque posteriormente se ha demostrado la existencia de diversas proteínas espermáticas con afinidad por las glicoproteínas de la ZP (Shur *et al.*, 2006, Van Gestel, *et al.*, 2007, Tanphaichitr *et al.*, 2015). También se ha propuesto que estas proteínas forman complejos de alto peso molecular, asumiendo su complementariedad y posibles interacciones entre dichos componentes (Nixon *et al.*, 2009, Tanphaichitr *et al.*, 2015). En estos complejos se ha demostrado la presencia de GalT, distintas chaperonas, como las proteínas de choque térmico (HspA5, Hsp60), espermadhesinas y otras

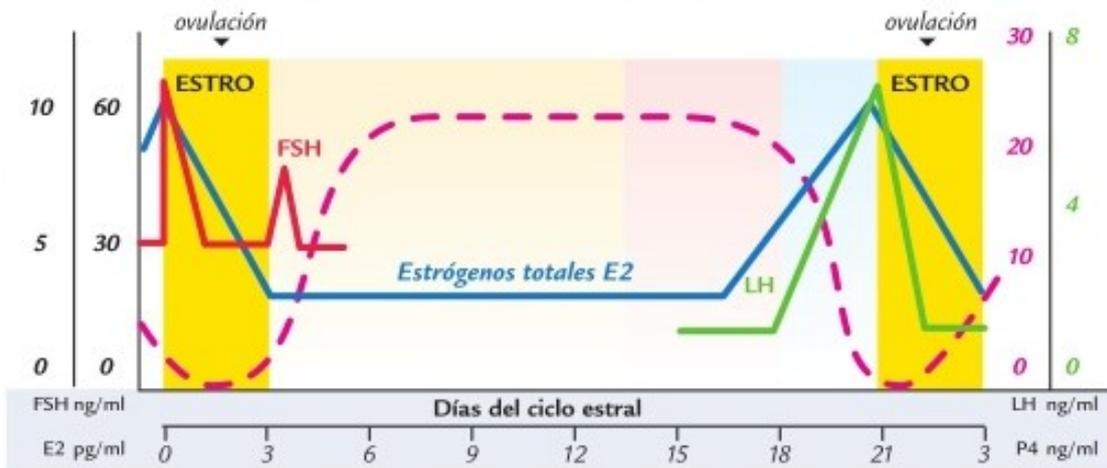
proteínas (Nixon *et al.*, 2009), entre las que se encuentra la proteína lactadherina (Ensslin *et al.*, 1998), la cual analizaremos más adelante por ser objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

#### 3.1.1 Ciclo estral en la especie porcina

El ciclo estral en la cerda dura normalmente 21 días y se define como el tiempo entre el inicio de una ovulación y el comienzo de la siguiente. El ciclo estral depende de las diferentes hormonas reproductivas para que se complete con éxito. El desarrollo folicular comienza después de la ovulación del folículo del ciclo del estro anterior (día 0), cuando hay un aumento de la hormona folículo estimulante (FSH) que "recluta" un grupo de folículos que comienzan a desarrollarse. El mayor desarrollo de estos folículos requiere la secreción de FSH y de la hormona luteinizante (LH). Los folículos en crecimiento secretan estradiol que estimula la secreción de LH, que a su vez induce la ovulación y libera el óvulo. Después de la ovulación, las estructuras foliculares se transforman en cuerpos lúteos. A continuación, 1-2 días después del apareamiento, estas estructuras comienzan a producir y liberar la hormona progesterona, que es la responsable de permitir y mantener la gestación. Si no hay fecundación, el útero secreta prostaglandina F2 $\alpha$ , lo que provoca que el cuerpo lúteo involucre y deje de producir progesterona, a los 17 días del ciclo. En este momento, un nuevo conjunto de folículos comienza a desarrollarse, y el proceso se repite. Si se produce la fecundación, los cuerpos lúteos permanecen funcionales y continúan secretando progesterona durante la gestación.

En esta Tesis Doctoral utilizamos cerdas en cuatro fases diferentes del ciclo estral en diferentes ensayos: fase folicular temprana, con una elevación de estrógenos y LH (los ovarios contienen solo folículos de 1-2 mm de diámetro); folicular tardía, justo antes de la ovulación, cuando los niveles de estrógenos y LH son máximos (los ovarios presentan más de 6 folículos de 8-12 mm de diámetro); fase luteal temprana o postovulatoria, es el momento de la fecundación y niveles altos de FSH (los ovarios presentan de 6-12 corpúsculos hemorrágicos); fase luteal tardía, con niveles altos de progesterona (los ovarios contienen de 6-12 cuerpos lúteos). También se utilizaron cerdas primerizas prepúberes como uno de los controles de expresión. En estas cerdas prepúberes, los órganos endocrinos y su capacidad de respuesta a la regulación de retroalimentación aún no se han desarrollado, y los cambios morfológicos y funcionales en el tracto genital

femenino no pueden ser inducidos por las hormonas reproductivas (Evans *et al.*, 2001). Esta regulación hormonal del ciclo estral porcino se describe en la **Figura 1**.



**Figura 1. Ciclo estral de la cerda y su regulación hormonal.** Diagrama que representa la secreción de las diferentes hormonas reproductivas a lo largo del ciclo estral y su relación con la ovulación. **FSH:** hormona folículo estimulante (línea roja). **E<sub>2</sub>:** Estrógenos (línea azul). **P<sub>4</sub>:** Progesterona (línea rosa punteada). **LH:** hormona luteinizante (línea verde).

### 3.2. Oviducto

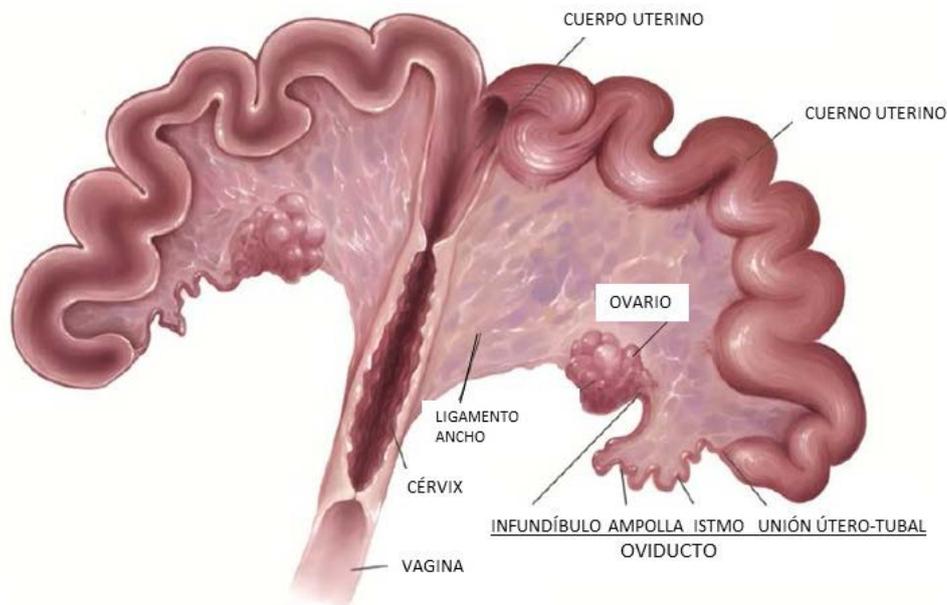
Los oviductos son un par de órganos tubulares que van desde los ovarios en su extremo infundibular, hasta la porción distal del útero en el otro extremo. Se les denomina trompas de Falopio en primates y en la mujer. (Welsch *et al.*, 2008).

La importancia del oviducto y sus secreciones en relación con el éxito de la fecundación va en aumento conforme se van conociendo más detalles de su composición a nivel celular y molecular. La investigación actual resalta su papel no solo en el transporte de los gametos, sino en diversos aspectos de la fecundación y en el desarrollo embrionario temprano (Holt *et al.*, 2010, Coy *et al.*, 2012a, Hunter, 2012a, Li *et al.*, 2017, Lopera-Vázquez *et al.*, 2017, Cánovas *et al.*, 2017, Pérez-Cerezales *et al.*, 2018).

#### 3.2.1 Anatomía

En el oviducto se diferencian anatómicamente cuatro regiones (Leese, 1988, Menezo *et al.*, 1997) que desde el ovario hasta el útero son: el infundíbulo, la ampolla, el istmo y la unión útero-tubárica, con una longitud variable según la especie de mamífero

que se trate (16-18 centímetros en la mujer y 28-30 centímetros en la cerda) (**Fig. 2**). El infundíbulo posee forma de embudo y es la parte próxima al ovario, con el que mantiene una cercana conexión mediante unas prolongaciones conocidas como las fimbrias. La ampolla oviductal, que supone dos terceras partes del oviducto, es considerada como la porción secretora del oviducto y es donde tiene lugar la fecundación en la mayoría de las especies mamíferas. El otro tercio corresponde al istmo, una región más muscular y estrecha que la ampolla que también una alta proporción de células secretoras, aunque varía morfológicamente según la especie. Fue en el istmo del hámster donde se demostró por primera vez que los espermatozoides se unían al epitelio del mismo formándose un reservorio (Yanagimachi *et al.*, 1963), el cual también se ha descrito en otras especies de mamíferos como la cerda (Hunter, 1981), la oveja (Hunter *et al.*, 1983) y la vaca (Hunter *et al.*, 1984). La última porción del oviducto es la unión útero-tubárica o porción intramural (en la mujer). Esta unión presenta características morfológicas diferentes entre especies: por ejemplo, en la cerda esta unión está bordeada por largas prolongaciones mucosas digitiformes y en la vaca y oveja se caracteriza por la formación de un pliegue, en especial durante el estro (Wrobel *et al.*, 1993, Hafez, 2000).



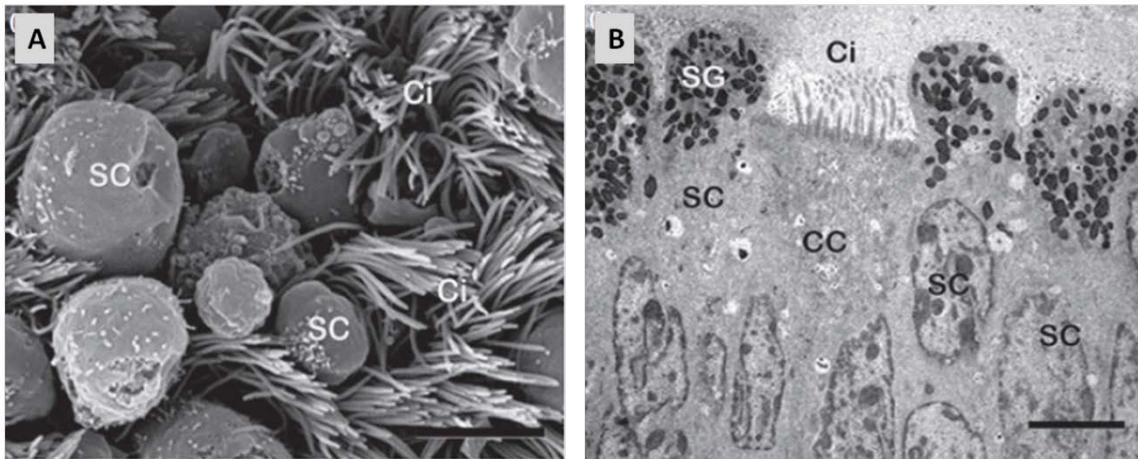
**Figura 2. Anatomía del aparato reproductor de la cerda.** Modificado de Soriano-Úbeda *et al.*, 2013.

### 3.2.2 Histología

Histológicamente el oviducto está formado por tres capas. La más externa es la capa serosa, representada por el peritoneo y que se continúa con el ligamento ancho. Esta capa está compuesta por un mesotelio y una delgada capa de tejido conjuntivo.

La capa media o muscular está compuesta por dos capas en sentidos contrapuestos: una circular interna más gruesa y otra longitudinal externa más delgada. En el oviducto, esta capa va aumentando de espesor según avanza desde el extremo ovárico hacia el extremo uterino (Yániz *et al.*, 2000, Desantis *et al.*, 2011).

La última es una capa mucosa que está en contacto con la luz y está revestida por un epitelio cilíndrico simple ciliado y una lámina propia de tejido conjuntivo laxo. Este epitelio posee dos tipos de células, ciliadas y secretoras (**Fig. 3**), junto con células linfoides dispersas (Umezu *et al.*, 2004, Yamanouchi *et al.*, 2010). La estructura interna de las células secretoras del oviducto presenta numerosos gránulos de secreción, como es típico en las células que sintetizan proteínas de forma activa (Brenner *et al.*, 1994).



**Figura 3: Células epiteliales de la unión ampular-ístmica 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. Células ciliadas (CC), células secretoras (SC), gránulos secretores (SG) y cilios (Ci). Barra: 5  $\mu$ m. (Modificado de Mondéjar *et al.*, 2012).

Esta capa mucosa posee numerosos pliegues ramificados en la ampolla que van disminuyendo conforme se avanza hacia el istmo, donde su luz es estrecha con pequeñas elevaciones que ya no están ramificadas. Intercalados entre ellas hay un sistema de criptas, bolsillos y surcos (Hunter *et al.*, 1991, Yaniz *et al.*, 2000, Yaniz *et al.*, 2006, Desantis *et al.*, 2011).

En las células ciliadas del oviducto ocurren cambios en el momento cercano a la ovulación, también llamada fase folicular del ciclo estral. Estas células poseen los cinocilios, unos cilios delgados y móviles extendidos hacia la luz que parecen estar implicados en la progresión espermática, así como en el transporte de óvulos (Hunter, 1994, Abe *et al.*, 2008). El movimiento y la frecuencia del batido ciliar está modulada por estrógenos y progesterona de una manera dependiente de la dosis en humanos y ratones, moviéndose con mayor rapidez en la fase ovulatoria que en la fase luteal (Bylander *et al.*, 2010, Bylander *et al.*, 2013). A estos movimientos ciliares se le suman las contracciones del oviducto, colaborando en el desplazamiento de los gametos hasta la zona de fecundación, así como en el posterior transporte de la mórula hasta el útero (Shi *et al.*, 2011, Spassky *et al.*, 2017).

Las células secretoras sintetizan proteínas de forma activa y su superficie apical está cubierta de numerosas microvellosidades. Sus gránulos secretores varían en número y tamaño en los diferentes segmentos del oviducto. También hay variaciones si estos gránulos están en la zona basal o apical de los pliegues, según la especie o la fase del ciclo estral en la que se encuentre (Abe, 1996, Yaniz *et al.*, 2000, Yaniz *et al.*, 2006, Abe *et al.*, 2007, Desantis *et al.*, 2011). Las hormonas ováricas son las que regulan la secreción de estas células, necesarias en la maduración de los gametos y para la posterior nutrición y protección del embrión (Hunter, 1994, Abe *et al.*, 1995, Gandolfi, 1995, Hunter, 2012a, Suárez, 2015, Li *et al.*, 2017).

La distribución de estos dos tipos celulares parece tener un papel funcional, ya que varía según la región oviductal, siendo más abundantes las células ciliadas donde el ovocito ha de ser captado por la superficie oviductal (zona de fimbrias e infundíbulo), y se van reduciendo en dirección al istmo. Por el contrario, las células secretoras son más numerosas en dirección al istmo, donde su secreción proteica es necesaria para la interacción del óvulo, el espermatozoide y el embrión preimplantado (Abe *et al.*, 2008, Yamanouchi *et al.*, 2010, Spassky *et al.*, 2017).

Además, durante el ciclo estral se producen cambios en el epitelio de las fimbrias y en la ampolla, siendo escasas estas variaciones en el istmo y la unión útero-tubárica. En la fase folicular temprana se produce una ciliogénesis y un aumento de la altura celular ciliar en las fimbrias y la ampolla, acentuándose más en la fase post-ovulatoria temprana (Abe *et al.*, 2008, Tienthai *et al.*, 2009). Sin embargo, durante la fase luteal tardía se produce una deciliación y atrofia en estas porciones, viéndose disminuido el porcentaje de células ciliadas (Odor *et al.*, 1980, Abe *et al.*, 2008, Konar *et al.*, 2014).

Las células secretoras localizadas en el infundíbulo y ampolla también sufren transformaciones de modo que el punto de máxima secreción se produce en la fase preovulatoria, aumentando el número de gránulos de secreción (Shirley *et al.*, 1996, Abe *et al.*, 2007). En cambio, en la región de la ampolla durante la fase luteal, estas células disminuyen el contenido de los gránulos de secreción y en el infundíbulo no poseen estos gránulos (Odor *et al.*, 1983).

Esta variabilidad celular en el oviducto también se observa en los diferentes tipos de células ciliadas y secretoras según la zona del oviducto. La influencia hormonal también influye en el desarrollo de un microambiente diferente según la región y las diferentes etapas del ciclo estral, creando una composición bioquímica única (Abe, 1996, Desantis *et al.*, 2011).

Por lo tanto, la composición de la mucosa oviductal es quien determina la creación de un microambiente oviductal, el cual está involucrado en la migración de gametos, desplazamiento y desarrollo embrionario, jugando así un papel esencial para la reproducción (Szulanczyk, 2009, Katarzyna *et al.*, 2010, Winuthayanon *et al.*, 2015). La existente variabilidad en la composición de las secreciones oviductales nos muestra los muchos elementos que aún faltan por conocer y que deberían tenerse en cuenta en el intento de mejorar las condiciones de fecundación y de cultivo embrionario *in vitro*.

### 3.3 Fluido oviductal

El fluido oviductal (FO) es una mezcla compleja formada a partir de: la secreción de las células epiteliales del oviducto, de componentes del trasudado sanguíneo, el contenido de los folículos ováricos que se libera tras la ovulación, el fluido peritoneal (en especies carentes de bolsa ovárica) y por fluido uterino cuando hay reflujo a través de la unión útero-tubárica (Leese, 1988, Malayer *et al.*, 1988, Avilés *et al.*, 2010).

El FO contiene numerosos componentes metabólicos (Tay *et al.*, 1997, Harris *et al.*, 2005, Leese *et al.*, 2008, Hugentobler *et al.*, 2010), así como una gran diversidad de proteínas (Buhi *et al.*, 2000, Killian, 2004, Georgiou *et al.*, 2007, Avilés *et al.*, 2010). Se ha demostrado que el proteoma oviductal cambia con las diferentes etapas del ciclo estral (Lamy *et al.*, 2016, Soleilhavoup *et al.*, 2016), la presencia de gametos (Georgiou *et al.*, 2005, Lopez-Úbeda *et al.*, 2015b) o la presencia de embriones (Smits *et al.*, 2017), incluyendo además la dieta materna como factor de variabilidad (Harding, 2001, Leese *et al.*, 2008).

Diversos estudios han demostrado que las secreciones oviductales modulan procesos importantes en la fecundación, como la unión del espermatozoide a la ZP y el desarrollo embrionario temprano (Hunter, 1991, Kim *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1998, Buhi, 2002, McCauley *et al.*, 2003, Coy *et al.*, 2008, Lloyd *et al.*, 2009a, Winuthayanon *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2017, Gadella, 2017). Debido a esta complejidad en su composición, se sospecha de la existencia de diferentes mecanismos moleculares que aún quedan por descubrir y esclarecer.

#### 3.3.1 Formación del fluido oviductal

La formación del FO está regulada por hormonas. Del ovario proceden las prostaglandinas y los esteroides (estradiol, progesterona); otras hormonas proceden del fluido peritoneal, otras del intestino y mesenterios, las hormonas ováricas, y las asociadas a depósitos de tejido graso (leptinas) (Bishop, 1956, Mastroianni *et al.*, 1961, Hunter *et al.*, 2007, Hunter, 2012a).

Otro elemento implicado en la formación de FO es la secreción transepitelial de iones cloro (Cl<sup>-</sup>) hacia el oviducto, y se considera al adenosín trifosfato (ATP) extracelular como regulador de la formación del FO (Dickens *et al.*, 1995, Dickens *et al.*, 1996).

Los neurotransmisores del sistema nervioso simpático (adrenalina y noradrenalina) también tienen un efecto sobre la formación de FO ya que producen vasoconstricción y disminuye el aporte sanguíneo al oviducto, inhibiendo así su formación. Además, pueden influir directamente en el oviducto produciendo absorción en presencia de noradrenalina o secreción bajo la influencia de acetilcolina (Jankovic *et al.*, 2004).

#### 3.3.2 Composición del fluido oviductal

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la composición del FO con la finalidad tanto de comprender mejor los procesos reproductivos, así como para poder diseñar medios de cultivo de gametos, de FIV y de desarrollo de embriones que se asemejen en lo posible a las condiciones existentes *in vivo*.

Existen diferencias cuantitativas y cualitativas del FO a lo largo del ciclo estral y también dependiendo de la zona del oviducto tal y como se ha visto en el ratón, el cual

presenta una composición elemental del FO diferente en el istmo y en la ampolla (Roblero *et al.*, 1976). Estas variaciones parecen ser un mecanismo para la creación de diferentes microambientes en función de la región oviductal y los distintos gránulos secretores, tal y como hemos comentado en apartados anteriores (Desantis *et al.*, 2011, Maillo *et al.*, 2016)

Otros elementos que también podrían influir en el tejido oviductal son glicosidasas procedentes de las células foliculares y del fluido folicular. Se ha observado que durante su maduración el complejo cúmulo-ovocito (CCO) capta  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -GAL) a la vez que secreta  $\beta$ -N-acetyloglucosaminidasa (NAGASA), presentando incluso diferencias en el ovocito si su maduración es individual o en grupo (Dovolou *et al.*, 2016). Un indicador de la adecuada maduración del ovocito parece ser una elevada actividad de  $\alpha$ -manosidasa ( $\alpha$ -MAN) en el medio, lo que se asocia a un aumento en la tasa de división y el número resultante de células del embrión (Dovolou *et al.*, 2016). La actividad de estas tres glicosidasas ( $\beta$ -GAL, NAGASA y  $\alpha$ -MAN) en el FO ha sido descrita durante las fases folicular y luteal (Carrasco *et al.*, 2008a).

#### 3.3.2.1 Agua y electrolitos

El FO se compone mayoritariamente de agua y electrolitos procedentes de la sangre. Su variación es la responsable del ajuste de la osmolaridad y pH, influyendo también en importantes procesos como la capacitación, movilidad espermática, RA y fecundación (Leese *et al.*, 1985, Gott *et al.*, 1988, Grippo *et al.*, 1992). Las concentraciones de iones son esenciales para la regulación de la actividad enzimática y el pH del oviducto (Leese *et al.*, 2001)

Se considera de forma general que las concentraciones de algunos iones son similares en el plasma y en el FO, como son el  $\text{Cl}^-$ , el sodio ( $\text{Na}^+$ ) y el magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), mientras que otros presentan diferencias: los niveles de potasio ( $\text{K}^+$ ) son significativamente mayores en el FO que en el plasma; el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) puede estar en niveles similares o menores en el FO que en el plasma; la concentración de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) en el FO es superior a la del plasma. También puede haber diferencias en algún ion en concreto entre especies (Borland *et al.*, 1980, Menezo *et al.*, 1997).

Se conocen diversas funciones de los electrolitos presentes en el FO. La concentración de  $\text{HCO}_3^-$  presente en el FO promueve la dispersión de las células de la corona radiada y favorece el entorno adecuado para el desarrollo embrionario (Stambaug

*et al.*, 1969, Maas *et al.*, 1977). El  $\text{HCO}_3^-$  también estimula la respiración, el movimiento de hiperactivación y la RA en espermatozoides (Visconti *et al.*, 1995).

El  $\text{Na}^+$  es necesario para la nutrición del embrión, estando relacionado con la unión del espermatozoide de ratón a la ZP (Saling *et al.*, 1978) además de participar en la captación de aminoácidos por los embriones tempranos de ratona (Vanwinkle *et al.*, 1985). El nivel de  $\text{Na}^+$  también está implicado en la interacción de proteínas oviductales con la superficie del espermatozoide y su movilidad (Grippeo *et al.*, 1992, Lapointe *et al.*, 1996). En estudios realizados con FO de coneja, animales de granja y primates se ha observado que el catión mayoritario es el  $\text{Na}^+$  y el principal anión el  $\text{Cl}^-$ . El transporte de  $\text{Na}^+$  es bidireccional entre la mucosa y serosa del oviducto y en las mismas proporciones, mientras que en el  $\text{Cl}^-$  el transporte es unidireccional hacia la mucosa oviductal. Esta secreción transepitelial de iones  $\text{Cl}^-$  hacia el oviducto parece ser la fuerza motriz para la formación del FO en humanos (Dickens *et al.*, 1996). El  $\text{Cl}^-$  se considera esencial para mantener la osmolaridad, pero también se ha visto que participa activamente en las vías de señalización que regulan la capacitación espermática, como es la fosforilación de tirosinas, el aumento de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), la hiperactivación, así como la RA inducida por la ZP (Wertheimer *et al.*, 2008).

Los niveles altos de  $\text{K}^+$  en el FO (aprox. 50 mM), se han relacionado con la mejora en la división embrionaria e implantación en el humano (Quinn *et al.*, 1985) y en el ratón (Roblero *et al.*, 1986). Esta elevada concentración de  $\text{K}^+$  podría estar implicada en la inhibición del movimiento de los espermatozoides en el reservorio espermático del istmo en la coneja, la cual se puede revertir con piruvato (Burkman *et al.*, 1984).

Existe una variabilidad de las concentraciones de electrolitos en el FO entre mamíferos. En un reciente estudio en la alpaca (*Vicugna pacos*) se encontró que el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Na}^+$  eran los principales iones en el FO (Apichela *et al.*, 2015), mientras que en la especie bovina son  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  durante el ciclo estral (Hugentobler *et al.*, 2004, Grippeo *et al.*, 1992). El rango de concentración de  $\text{Na}^+$  detectado en la alpaca fue cinco veces mayor que el descrito en la especie bovina y el de  $\text{K}^+$  diez veces mayor. En cuanto a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  observada en el FO de la alpaca, se vio que era inferior ( $\leq 0.8$  mM) a los niveles que facilitan la capacitación de espermatozoides, la RA y la hiperactivación en varias especies (0.9-2.0 mM) (Grippeo *et al.*, 1992). En la cerda, los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran en mayor concentración que el  $\text{Mg}^{2+}$  y fósforo (Iritani, *et al.*, 1974).

### 3.4.2.2 Sustratos energéticos

La glucosa y el piruvato se consideran los principales sustratos energéticos presentes en el FO (Brewis *et al.*, 1992). El lactato, glutamato, glucógeno y aminoácidos (aa) también están relacionados con el soporte metabólico de gametos y/o embriones (Leese *et al.*, 1985).

La concentración de estos componentes en el FO varía con respecto a la del plasma, según la región del oviducto y según la especie. En el FO, la cantidad de glucosa es inferior a la del suero (Menezo *et al.*, 1997), y lo mismo ocurre en la ampolla en fase post-ovulatoria respecto a la región ampular-ístmica (Leese *et al.*, 2008). En cambio, existe una mayor concentración de lactato en FO que en suero, a causa del metabolismo de la glucosa del oviducto, donde las células epiteliales producen el 75 % del lactato del FO a partir de la glucosa vascular y el otro 25 % procede del lactato vascular (Leese, 1988, Menezo *et al.*, 1997, Nichol *et al.*, 1998). El piruvato, los lípidos y los aa también están presentes en el FO y sus niveles varían a través del ciclo estral en ratones, conejos, cerdos y en humano (Nieder *et al.*, 1983, Nichol *et al.*, 1992, Leese *et al.*, 1993, Tay *et al.*, 1997).

### 3.3.2.3 Lípidos

El FO contiene fosfolípidos, triglicéridos, colesterol libre y colesterol esterificado y utilizan como transportadores a lipoproteínas de alta densidad (LDH), las cuales podrían participar en la capacitación espermática durante la fase folicular (Ehrenwald *et al.*, 1990). La albúmina también se utiliza como tal, ya que podría contener esteroides (Menezo *et al.*, 1997). La concentración de fosfolípidos es generalmente mayor durante la fase no luteal, mientras que los niveles de colesterol son menores. 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).

### 3.3.2.4 Aminoácidos

El papel de los aa en el FO se considera esencial, ya que aportan un sustrato energético al embrión y actúan como precursores de proteínas y ácidos nucleicos. También están implicados en la regulación de pH, la señalización de moléculas y como quelantes de metales pesados (Gardner, 2008).

Aunque existen pequeñas variaciones entre especies en la composición de aa del FO, existe un claro predominio de la glicina sobre el resto de los aa mayoritarios presentes: alanina, aspartato, glutamato, serina y taurina (Gardner, 2008). Se ha descrito la implicación de glicina y alanina en la protección del embrión frente al estrés osmótico y en la regulación del pH (Fischer *et al.*, 1993). También se considera beneficioso el uso de taurina e hipotaurina, junto a glicina y alanina, para el desarrollo de embriones de diferentes especies *in vitro* (Menezo *et al.*, 1997). Se ha observado que la hipotaurina juega papel importante en la capacitación espermática, la viabilidad de los gametos y en el desarrollo e implantación del embrión al captar radicales libres y dar lugar a taurina, lo que resulta en un efecto antioxidante y de protección de membranas celulares (Leese *et al.*, 2001).

#### 3.3.2.5 Proteínas

En la actualidad se pueden identificar numerosas proteínas presentes en los complejos fluidos corporales. Esta identificación junto con el estudio del patrón de expresión génica en diferentes tejidos es posible gracias al descifrado del genoma de múltiples especies sumado a los avances en la técnica de espectrometría de masas (Pérez-Cerezales *et al.*, 2018).

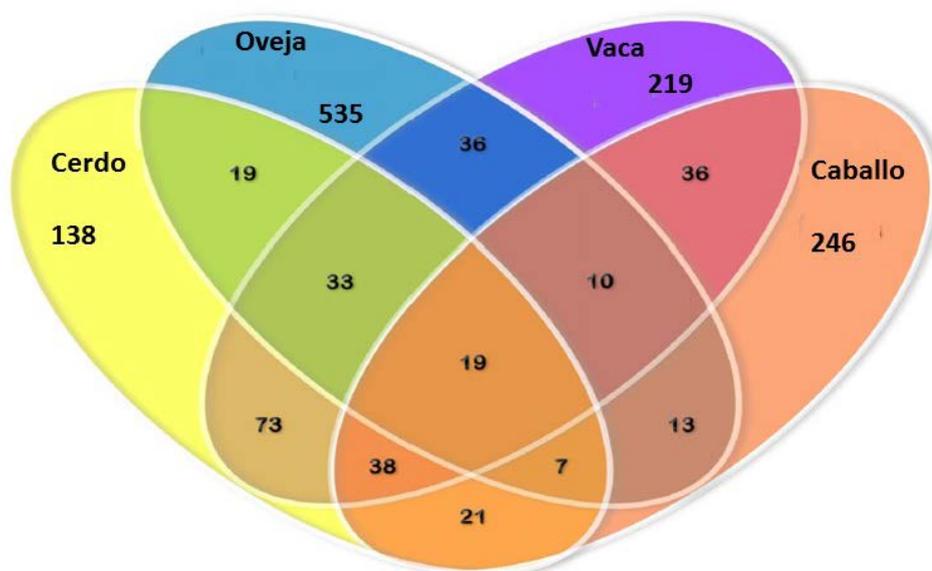
De las proteínas presentes en el FO provenientes del trasudado plasmático vemos que las más abundantes son la albúmina (un 60-80 % del total de proteínas) (Menezo *et al.*, 1997) y la inmunoglobulina G, las cuales suponen aproximadamente el 95 % de las proteínas séricas presentes en el FO (Oliphant *et al.*, 1978). Respecto a la variación de la concentración de proteínas en FO durante el ciclo estral se ha visto que en la especie bovina no habían diferencias significativas entre la fase folicular ( $54.28 \pm 3.71 \mu\text{g/mL}$ ) y la luteal ( $55.89 \pm 2.93 \mu\text{g/mL}$ ) (Carrasco *et al.*, 2008a). Sin embargo, en la especie porcina sí que se han descrito diferencias en la cantidad de proteína total en oviducto entre la fase folicular tardía (momento previo a la ovulación) ( $2118.6 \pm 200.7 \mu\text{g/oviducto}$ ) respecto a la fase luteal temprana (tras la ovulación) ( $1680.5 \pm 122.8 \mu\text{g/oviducto}$ ) (Carrasco *et al.*, 2008b).

En las especies de mamíferos examinadas hasta la fecha, la composición del FO es análoga, lo que sugiere que los principales procesos biológicos en el oviducto se conservan (Seytanoglu *et al.*, 2008, Cerny *et al.*, 2015, Acuña *et al.*, 2017) (**Fig. 4**). Sin embargo, algunos componentes claves para el embrión parecen estar presentes dado el

éxito del desarrollo embrionario en oviductos de especies heterólogas (Rizos *et al.*, 2010). Hasta ahora, se han identificado unos 2400 genes ortólogos expresados en el oviducto de cerdo y vaca (Acuña *et al.*, 2017) y más de 1090 genes ortólogos son comunes al transcriptoma de oviducto de humanos, cerdos y vacas (Cerny *et al.*, 2015, Tone *et al.*, 2008, Mondéjar *et al.*, 2012). En el oviducto de cerdo, se expresan casi 5000 genes, de los cuales el 11% y el 7% corresponden a proteínas de membrana y secretadas, respectivamente (Acuña *et al.*, 2017, Kim *et al.*, 2018). Estas proteínas son teóricamente más relevantes porque entran en contacto directo con los gametos y los embriones. A través del análisis de microarrays, se ha sugerido la presencia de 314 proteínas secretadas por el epitelio oviductal (Acuña *et al.*, 2017). Recientemente se han analizado los genes expresados diferencialmente entre los diferentes tejidos reproductivos de la cerda (ovario, oviducto y endometrio) a lo largo del ciclo estral y analizaban los genes puente compartidos por dos o más tejidos (Kim *et al.*, 2018). Las tres redes de tejido se conectaron formando una forma triangular y se identificaban 65 genes puente con un alto nivel de conectividad con todos los otros genes en la red. De los más de 5300 genes expresados en el oviducto durante el ciclo, solo 26 de ellos se expresan en todos los días del ciclo. Los niveles de expresión mostraron correlaciones negativas entre el ovario y los otros dos tejidos, y bajas correlaciones entre el endometrio y el oviducto. Las principales anotaciones funcionales se relacionaron con la biosíntesis de hormonas esteroides, la adhesión célula a célula y apoptosis celular, sugiriendo que la regulación de estas diferencias de expresión está sujeta a la síntesis de la hormona esteroide (Kim *et al.*, 2018).

Por otro lado, en un reciente estudio mediante cromatografía líquida en gel y realizado en ovejas cíclicas adultas, se han detectado hasta 624 proteínas diferentes (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Estas diferencias detectadas entre la expresión génica de proteínas secretadas entre análisis de microarrays y proteómicos puede deberse a varios factores, siendo el más probable el relacionado con el origen del FO. La composición del FO está influenciada por el trasudado de plasma sanguíneo, pero está regulada por las células epiteliales ciliadas y secretoras que forman una monocapa celular que recubre la luz, tal y como se ha descrito anteriormente. En consecuencia, solo algunas de las proteínas detectadas en el FO se transcriben en el oviducto. La albúmina es un ejemplo típico; esta proteína es la más abundante en el FO, pero su transcripción no está presente en las células de oviducto ya que el gen que codifica esta proteína solo se expresa en el hígado. Los datos del análisis detallado de las proteínas oviductales han sido *a priori*

bastante sorprendentes porque un número considerable de proteínas detectadas normalmente no se secretan. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de un gran número de proteínas que normalmente se encuentran en el citoplasma, el núcleo o las mitocondrias (Soleilhavoup *et al.*, 2016, Mondéjar *et al.*, 2012). En ovejas, las proteínas citoplásmicas representan más del 40% de las proteínas identificadas (Soleilhavoup *et al.*, 2016). La hipótesis más aceptada es que esta presencia de proteína es el resultado del desprendimiento de células epiteliales durante la renovación del epitelio (Pérez-Cerezales *et al.*, 2018).



**Figura 4. Diagrama de Venn que muestra proteínas oviductales solapadas y no solapadas en diferentes especies: cerdo, oveja, vaca y caballo.** Modificado de Pérez-Cerezales *et al.*, 2018.

Un reciente estudio ha comparado el proteoma del fluido del cérvix, el útero y el oviducto del tracto reproductor de la oveja. Los investigadores identificaron un total de 749 proteínas en el fluido procedente del cérvix, 827 en el útero y 624 en el oviducto (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Se vio que un total de 570 proteínas de las 940 identificadas, estaban presentes en el fluido de las tres regiones. Es probable que debido al intercambio de fluidos entre regiones unidas anatómicamente se compartan un mayor número de proteínas. También se detectaron proteínas que únicamente estaban presentes en una de las tres regiones: 74 en el moco cervical, 114 en el fluido uterino y 9 en el FO, teniendo posiblemente un papel específico en cada uno de estos fluidos. Estas 9 proteínas detectadas de forma exclusiva en el FO de la oveja son: proteína de unión a carbohidratos

AWN (la más abundante de estas 9), el factor de complemento D, proteína 2 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, proteína S100-A1, proteína S100-B, proteína Rab-1A relacionada con Ras, activador serina/treonina-proteína fosfatasa 2A, tricohialina y proteína de tumor D52 (Soleilhavoup *et al.*, 2016).

Entre las proteínas expresadas o secretadas por el oviducto de diferentes especies (Avilés *et al.*, 2010), se ha descrito que al menos 32 de estas proteínas oviductales se ven afectadas por la presencia de gametos, la mayoría por el gameto masculino (Georgiou *et al.*, 2005, Georgiou *et al.*, 2007). Estas numerosas proteínas que provienen del epitelio oviductal se han clasificado como: agentes de protección antioxidante, agentes de protección o defensa, factores de crecimiento, proteasas y sus inhibidores, citoquinas y sus receptores, hormonas y sus receptores, glicosidasas y glicosil-transferasas, otras enzimas, chaperonas y proteínas de choque térmico, glicosaminoglicanos y proteoglicanos, otras proteínas y otros componentes (Avilés *et al.*, 2010).

Una revisión reciente ha analizado algunas de las proteínas detectadas en oviducto y referidas anteriormente, para ver el papel especie-específico que tienen en la fecundación y desarrollo embrionario, encontrándose beneficios para la FIV en algunas de ellas (Avilés *et al.*, 2010, Coy *et al.*, 2015). A continuación, detallamos las características de las más importantes.

La **oviductina (OVGP1)**, también conocida como mucina MUC9 en la especie humana (Lapensee *et al.*, 1997), es la glicoproteína específica y no-sérica más abundante del FO (Malette *et al.*, 1995). Es probable que, debido a su conexión anatómica con el oviducto, también se haya detectado en el tapón mucoso del cérvix y en el fluido uterino cantidades traza de esta proteína (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Fue en conejo y poco después en hámster donde se detectó por primera vez OVGP1 como una proteína de alto peso molecular producida por las células no ciliadas del epitelio oviductal y secretada al FO, la cual se había unido a la ZP de ovocitos tras atravesar el oviducto (Oliphant *et al.*, 1984, Oikawa *et al.*, 1988). También se ha detectado OVGP1 unida a la ZP de otras especies como el babuino, bovino, humano, ovino, porcino y ratón (Buhi *et al.*, 1993, O'Day-Bowman *et al.*, 1996, 2002, Goncalves *et al.*, 2008, Gandolfi, *et al.*, 1989, Lyng *et al.*, 2009). OVGP1 es una proteína dependiente de estrógenos en muchas especies y por ello su secreción varía según la fase del ciclo estral, además de haber variaciones según la región oviductal y entre especies (Buhi *et al.*, 1993, Buhi *et al.*, 2000). Se ha observado un incremento del ARNm de OVGP1 hasta un valor máximo en tejido oviductal durante la fase folicular tardía en la mujer (Arias *et al.*, 1994), durante los días

0-2 del estro en cerda (Buhi *et al.*, 1996), en la oveja en estro y día 1 después de la fecundación (Desouza *et al.*, 1995) y en la vaca durante la fase estral (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Sin embargo, análisis recientes mediante microarrays, han detectado una elevada expresión de OVGP1 en el oviducto porcino, pero sin encontrar diferencias entre las fases del ciclo estral (Acuña *et al.*, 2017). También se ha descrito un aumento del número de gránulos secretores apicales que contienen OVGP1 en el epitelio oviductal y la cantidad de OVGP1 en el FO durante este periodo de máxima transcripción del gen (Buhi, 2002). Sin embargo, se ha descrito la rata (Arias *et al.*, 1994) no sintetizan OVGP1, debido a que su secuencia nucleotídica aparece como un pseudogen, y esto supone la no expresión de la proteína (Mugnier *et al.*, 2009, Tian *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha observado que OVGP1 resulta beneficiosa en los procesos de FIV (Buhi, 2002, Coy *et al.*, 2008). Coy y colaboradores han descrito la implicación de esta proteína en el endurecimiento de la ZP de forma previa a la fecundación. Ellos observaron que OVGP1 favorece que la ZP sea más resistente frente a la digestión de enzimas proteolíticas. Mediante el uso de glicosaminoglicanos como heparina junto con OVGP1 en las técnicas de FIV, se vio un relevante incremento de la monospermia en el sistema bovino y porcino. Esto parece ser debido a que los glicosaminoglicanos estabilizan la unión de OVGP1 a la ZP (Coy *et al.*, 2008, Algarra *et al.*, 2016). Recientemente se ha descrito la OVGP1 entre las proteínas oviductales que interaccionan con el espermatozoide y que está presente en el FO bovino en todas las etapas del ciclo, pero de forma más abundante en la fase preovulatoria (Lamy *et al.*, 2018).

La proteína **mucina-1** codificada por el gen MUC1 es otro miembro de la familia de las mucinas. La proteína es una fosfoproteína glicosilada descrita previamente en la trompa de Falopio humana (Al-Azemi *et al.*, 2009, Silva *et al.*, 2014) y se ha relacionado unos niveles de expresión alterados de la misma con la aparición de embarazos ectópicos (Savaris *et al.*, 2008). Un reciente estudio de nuestro grupo de investigación ha descrito por primera vez la proteína mucina-1 en el oviducto porcino y ha analizado su expresión en diferentes fases del ciclo estral (Acuña *et al.*, 2017). Mediante la técnica de microarrays se detectó que la expresión de mucina-1 se regula positivamente en las fases prepuberal, preovulatoria y luteal, con su expresión más baja durante la fase postovulatoria. Se ha detectado la proteína mucina-1 en las células del epitelio oviductal en todas las fases del ciclo mediante inmunohistoquímica, así como la identificación mediante análisis proteómico en el FO (Acuña *et al.*, 2017). En la especie humana también se ha detectado esta proteína en la superficie apical de las células epiteliales de

las trompas a lo largo del ciclo menstrual, pero la localización intracelular fue mínima durante la fase folicular y aumentando a un máximo durante la fase lútea (Al-Azemi *et al.*, 2009).

Las **proteínas de choque térmico (HSPs)** son una familia de proteínas detectadas en diferentes órganos reproductivos y se han considerado como proteínas beneficiosas para su uso en FIV (Dix *et al.*, 1996, Elliot *et al.*, 2009). Las HSPs se unen al espermatozoide durante su paso por el oviducto, detectándose proteínas de esta familia en el fluido y el epitelio oviductal de carnero (Lloyd *et al.*, 2012), cerdo (Georgiou *et al.*, 2005), humano (Lachance *et al.*, 2007), oveja (Soleilhavoup *et al.*, 2016), ratón (Lin *et al.*, 2012) y vaca (Boilard *et al.*, 2004). La proteína de choque térmico A2 (HSPA2) está presente en los espermatozoides humanos y se une con la arilsulfatasa A (ARSA) y con la molécula de adhesión al esperma 1 (SPAM1) (Redgrove *et al.*, 2012, Redgrove *et al.*, 2013, Bromfield *et al.* 2016). Se ha propuesto que SPAM1, con la actividad hialuronidasa que tiene, se une al espermatozoide en el oviducto para ayudarlo a atravesar las células de cúmulo (Griffiths *et al.*, 2008). También se ha descrito la función de la HSPA8 detectada en FO, relacionándose con la supervivencia espermática durante el periodo cercano a la ovulación (Soleilhavoup *et al.*, 2016), viéndose niveles cinco veces más altos de esta proteína en presencia de espermatozoides (Georgiou *et al.*, 2005). Además, se ha descrito la relación de HSPA8 con el mantenimiento de la viabilidad espermática en el jabalí, el cerdo, el carnero y el toro (King *et al.*, 1994, Desouza *et al.*, 1995, Goncalves *et al.*, 2008, Elliott *et al.*, 2009, Lloyd *et al.*, 2009b, Moein-Vaziri *et al.*, 2014). Aún no se conoce por completo el mecanismo por el cual HSPA8 y otras proteínas son liberadas por el epitelio del oviducto y son capaces de mejorar la supervivencia de los espermatozoides. Sin embargo, un estudio reciente ha sugerido que HSP y otras proteínas oviductales podrían liberarse a través de exosomas o microvesículas, lo que les permitiría interactuar con los gametos y ser el medio de transporte hacia el embrión (Campanella, 2014, Almiñana *et al.*, 2017).

La **osteopontina (OPN)** es otra proteína secretada por el oviducto que parece ejercer un papel modulador de la función espermática y en la interacción entre gametos (Hao *et al.*, 2006, Killian, 2011). Se conoce su síntesis en diferentes tejidos y su secreción a los fluidos corporales como el FO, en el cual se han detectado tres diferentes formas glicoproteicas de 25, 48 y 55 kDa (Gabler *et al.*, 2003, Killian, 2004, Killian, 2011). Se ha visto que OPN se sobreexpresa en oviducto de ratón en estro (Liu *et al.*, 2015) y de oveja (Soleilhavoup *et al.*, 2016), aunque también se ha detectado que en el oviducto de

la vaca la transcripción del gen de OPN no varía a lo largo del ciclo estral (Gabler *et al.*, 2003). Se ha detectado en la membrana plasmática del espermatozoide eyaculado de toro y su distribución en la membrana cambia tras la incubación con FO (Souza *et al.*, 2008). OPN posee una secuencia de unión a integrinas, el tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que media la unión celular, por lo que puede estar implicada en procesos de adhesión celular (Denhardt *et al.*, 1993). La proteína presenta dos dominios de unión a heparina y un sitio de unión a iones  $Ca^{2+}$ . En relación al papel que juega en reproducción, OPN se ha asociado con la fertilidad del macho en la especie bovina al hallarse presente en su plasma seminal (Cancel *et al.*, 1997) y por haberse detectado su secreción en la mucosa oviductal bovina (Gabler *et al.*, 2003) y ovina (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Diversos estudios han observado que el mecanismo por el cual la OPN participa en la unión espermatozoide-ovocito y en la fecundación, depende de la unión a integrinas mediante su secuencia RGD (Denhardt *et al.*, 1993). Sin embargo, parece ser que el papel de OPN en la fecundación varía según las especies analizadas. Se ha visto que el ratón *Knockout* (KO) para OPN es fértil y su descendencia presenta un desarrollo normal por lo que en esta especie no se considera esencial (Rittling *et al.*, 1998). Sin embargo, en la especie porcina se ha demostrado que la OPN reduce la RA espermática y la incidencia de polispermia en función de la dosis utilizada en FIV, viéndose un incremento de FIV normal (Hao *et al.*, 2006). Por contra, no se ha observado efecto en la FIV de caballo (Mugnier *et al.*, 2009).

La **lactoferrina (LTF)**, es una glicoproteína considerada multifuncional, viéndose relacionada con la regulación del crecimiento y diferenciación celular, la respuesta inmune e inflamatoria y la protección frente al desarrollo de cáncer y metástasis (Ward *et al.*, 2005). Además, ha sido detectada en el epitelio y en las secreciones oviductales en la mujer, encontrándose en abundancia en el FO durante la fase periovulatoria del ciclo (Zumoffen *et al.*, 2013). El hecho de que la expresión de LTF en el oviducto de rata y ratón sea mucho menor que en la especie humana parece estar relacionado con la mezcla de FO y uterino debido a la unión útero-tubárica que presenta la mujer y que conforma una única entidad morfofuncional (Hunter, 2002). Además, se ha visto que LTF también está presente en el endometrio de rata, ratón y hámster (Teng *et al.*, 2002). Sin embargo, es importante señalar que el ratón KO para LTF es fértil y su descendencia es normal (Ward *et al.*, 2003).

La **proteína suprimida en tumores malignos de cerebro 1**, codificada por el gen **DMBT1** es una glicoproteína que ha sido detectada en el epitelio endometrial de la rata

y del mono, con una secreción dependiente de estrógenos (Tynan *et al.*, 2005). Se ha detectado el ARNm de esta proteína en el oviducto bovino, porcino y humano (Mondejar *et al.*, 2012), observándose también la proteína en el epitelio y FO en las especies porcina y equina (Mondejar *et al.*, 2012, Ambruosi *et al.*, 2013). En la especie bovina también se ha observado DMBT1 en la superficie apical del epitelio oviductal, donde se une a espermatozoides capacitados y actúa como un mecanismo de selección espermática negativa. En los espermatozoides que han comenzado la capacitación de forma prematura, esta proteína produce la alteración del acrosoma y la supresión de la motilidad (Teijeiro *et al.*, 2012). También se ha visto un incremento del porcentaje de fecundación monospermica al preincubar ovocitos equinos y porcinos con la proteína DMBT1 antes de la FIV (Ambruosi *et al.*, 2013).

Se conocen al menos cuatro glicofomas diferentes de la proteína **glicodelina** (también conocida como PAEP, proteína endometrial asociada a progesterona o proteína placentaria 14) relacionadas con la fecundación. Se ha detectado la **glicodelina A** en líquido amniótico, la **glicodelina S** en el plasma seminal, la **glicodelina F** en el fluido folicular y la **glicodelina C** en las células del cúmulo (Yeung *et al.*, 2009). Se han relacionado a las glicodelinas con el desarrollo embrionario post-implantacional, ya que se han detectado en la secreción endometrial durante las primeras etapas del embarazo (Lee *et al.*, 2011). El oviducto humano también produce glicodelinas, observándose glicodelina A y F en el FO, así como en células oviductales cultivadas *in vitro* (Chiu *et al.*, 2007a). Se conocen diferentes receptores espermáticos de estas glicodelinas: existe un receptor de la glicodelina C distribuido por toda la cabeza espermática y mayoritariamente en la región ecuatorial; la glicodelina F se une en la zona de la membrana espermática que recubre el acrosoma por dos receptores diferentes, uno de ellos es compartido con glicodelina A. La glicodelina S posee también dos receptores distribuidos por toda la cabeza espermática (Yeung *et al.*, 2009). Las diferentes glicofomas tienen diversas funciones: la glicodelina S previene la capacitación espermática precoz suprimiendo el flujo del colesterol de su membrana plasmática; las glicodelinas A y F inhiben la RA prematura y la unión espermática a la ZP; la glicodelina C de las células cúmulo, reemplaza a las glicodelinas A y F para mejorar la RA y la unión espermática a la ZP (Chiu *et al.*, 2007b).

Se ha detectado al **complemento C3** en el FO, así como en los fluidos cervicales y uterinos en altas cantidades, con una mayor abundancia durante el estro en el moco uterino (Soleilhavoup *et al.*, 2016), por lo que se ha propuesto su regulación positiva por

estrógenos. Esto coincide con la secreción de C3 descrita en el oviducto de ratón y de la mujer bajo la influencia de estrógenos (Lee *et al.*, 2009). Además, se ha propuesto al complemento C3 como ligando entre el espermatozoide y el ovocito (Anderson *et al.*, 1993, Fabryova *et al.*, 2009). Esta proteína presenta una función embriotrófica en el ser humano después de que las células oviductales lo conviertan en iC3b (Lee *et al.*, 2009). Se ha descrito que la secreción oviductal de la proteína C3 aumenta en presencia de espermatozoides y se ha relacionado con la mejora de la viabilidad espermática (Georgiou *et al.*, 2007, Holt *et al.*, 2015).

Se conocen diversas funciones relacionadas con la fecundación de los componentes del **sistema plasminógeno-plasmina**, habiendo sido detectados en el plasma seminal, útero, oviducto y ovario de mamíferos (Ebisch *et al.*, 2008). Se ha visto una disminución significativa de la fertilidad de ratones KO para los dos activadores del plasminógeno en comparación con los de tipo salvaje (Carmeliet *et al.*, 1994). Además, se ha observado que el plasminógeno del FO porcino se une a la ZP y a la membrana plasmática del ovocito, y se activa dando plasmina cuando el primer espermatozoide contacta con el oolema. Esta activación evita la unión de otros espermatozoides al ovocito (Coy *et al.*, 2012b).

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 FOP 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 KO para los dos activadores del plasminógeno es significativamente menos fértil que el tipo salvaje (Carmeliet *et al.*, 1994).

Un reciente estudio de nuestro laboratorio ha demostrado la secreción en el oviducto de **colecistoquinina (CCK)** en la especie porcina (Acuña *et al.*, 2017), descrita en un principio como una hormona gastrointestinal y un abundante neuropéptido en el cerebro (Fink *et al.*, 1998). El estudio de la expresión de CCK en el oviducto en diferentes fases del ciclo estral de la cerda reveló que el gen CCK está regulado negativamente en las fases prepuberal, preovulatoria y lútea en comparación con la fase postovulatoria. Además, mediante inmunohistoquímica se ha detectado la proteína CCK a nivel de

células epiteliales y también ha demostrado su presencia en el FO mediante el análisis proteómico. Esto confirmaría la secreción de CCK al lumen oviductal (Acuña *et al.*, 2017). Además, las moléculas de CCK similares a la gastrina se han relacionado con mejoras en la FIV (Sasse *et al.*, 2000).

Las enzimas antioxidantes son otro grupo diferente de proteínas detectadas en abundancia en el FO durante el estro (Soleilhavoup *et al.*, 2016). La función bioquímica de las enzimas **Glutación peroxidasas** (GPX) es reducir los hidroperóxidos lipídicos a sus alcoholes correspondientes y reducir el peróxido de hidrógeno (Margis *et al.*, 2008). En células eucariotas, la familia GPX se divide en cinco clases: GPX1-GPX5 (Drevet, 2006). Se ha descrito que el ARNm de la **GPX1** es más abundante en el estro en el oviducto bovino (Lapointe *et al.*, 2003). La **GPX2** es una proteína que pertenece a esta familia de enzimas cuyo principal papel biológico es proteger el organismo contra el daño oxidativo, y recientemente se ha descrito su secreción en el oviducto de la cerda (Acuña *et al.*, 2017). Hasta ahora, **GPX5** era la única proteína de esta familia que se había relacionado con la reproducción. Esta proteína se expresa solamente en la región de la cabeza del epidídimo de mamíferos (Tramer *et al.*, 1998; Drevet 2006). Se ha demostrado que la proteína GPX5 está asociada con la protección de los espermatozoides durante el tránsito epididimario y el almacenamiento. Además, la secreción de la proteína GPX2 en el oviducto porcino se ha demostrado mediante inmunohistoquímica y análisis proteómico, al localizarse específicamente en las células epiteliales oviductales junto con la detección en el FO mediante espectrometría de masas (Acuña *et al.*, 2017). Esto sugiere una posible función de esta proteína en la protección de los gametos contra el daño oxidativo durante su tránsito a través del oviducto. Además, mediante la técnica de microarrays se detectó que la expresión de este gen era más alta durante la fase postovulatoria (Acuña *et al.*, 2017).

La **proteína de unión a fosfatidiletanolamina 4 (PEBP4)** es una proteína secretada por las células epiteliales del epidídimo, y se le ha relacionado con la estimulación de la motilidad espermática en los cerdos (An *et al.*, 2012). Acuña y colaboradores han descrito por primera vez su expresión en el oviducto porcino, encontrando diferencias durante el ciclo estral. Estos autores observaron que el gen PEBP4 se sobreexpresa en la fase postovulatoria en comparación con las otras fases, lo que confirmaría su presencia en el momento de la fecundación. La detección de la proteína PEBP4 en las células del epitelio oviductal y mediante análisis MS/MS sugiere

su secreción al FO (Acuña *et al.*, 2017), por lo que la presencia de esta proteína en el oviducto puede tener una función relacionada con los espermatozoides (An *et al.*, 2012).

Las taquiquininas y los receptores de taquiquininas están ampliamente distribuidos en el tracto reproductivo masculino y parecen estar implicados en la reproducción. Específicamente, **TAC3** también llamada neuroquinina B, se ha relacionado con el aumento de motilidad de los espermatozoides en la especie humana al unirse a los receptores de taquiquininas (Ravina *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2010). Además, TAC3 ha sido identificada en órganos reproductivos femeninos en diferentes especies, como la humana y la rata (Ghosh *et al.*, 2007; Cejudo-Roman *et al.*, 2012). Recientemente, se ha realizado un estudio sobre la expresión del gen TAC3 en el oviducto porcino en diferentes etapas del ciclo estral. Se observó una sobreexpresión tanto en cerdas prepúberes como en la fase preovulatoria, pero con una regulación reducida en las fases postovulatoria y luteal. La presencia de TAC3 en células epiteliales y la detección de varios péptidos en el FO indican una probable secreción de la proteína (Acuña *et al.*, 2017). Aunque se necesitan más estudios para investigar la presencia de receptores de taquiquininas específicos en la membrana plasmática del espermatozoide porcino, los resultados de este estudio sugieren que el oviducto puede modular la motilidad de los espermatozoides en el cerdo al producir TAC3.

La proteína **prostaglandina D sintasa tipo lipocalina (L-PGDS)** está presente en el FO bovino, siendo capaz de unirse a la ZP de los ovocitos. Sin embargo, actualmente se desconoce su función concreta, a pesar de haber sido identificada en el plasma seminal de toro como una proteína asociada a la fertilidad (Gerena *et al.*, 1998). No está clara la procedencia exacta de L-PGDS, pudiendo derivar del plasma sanguíneo o ser sintetizada y secretada por el epitelio oviductal (Goncalves *et al.*, 2008).

Se han descrito otras proteínas en el aparato reproductivo femenino de las que se conoce poco sobre su función. La proteína **haptoglobina (Hp)** ha sido detectada en tejido oviductal y FO de vaca, coneja y cerda (Lavery *et al.*, 2004, Herrler *et al.*, 2004, Georgiou *et al.*, 2005, Ramón *et al.*, 2012) aunque no se conoce su función en el tracto reproductor femenino. Haremos una revisión detallada acerca de esta proteína más adelante, ya que uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es investigar la función de Hp como componente del FO.

### 3.3.2.6 Exosomas y microvesículas en el fluido oviductal

El éxito de la gestación requiere una comunicación adecuada entre la madre y el embrión. Existen pruebas contundentes con respecto al intercambio de señales entre el embrión temprano y el oviducto que conducen a un desarrollo embrionario apropiado (Lee *et al.*, 2002). Recientemente, se ha descrito que los exosomas y microvesículas, ambas vesículas extracelulares presentes en el FO, pueden actuar como moduladores de esta comunicación cruzada única (Almiñana *et al.*, 2012, Maillo *et al.*, 2015).

Los exosomas y microvesículas se han identificado como componentes esenciales del fluido uterino (Ng *et al.*, 2013, Burns *et al.*, 2014) y del FO (Al-Dossary *et al.*, 2013, Lopera-Vasquez *et al.*, 2017). Los exosomas son vesículas de un diámetro entre 30-150 nm de origen endocitótico liberados tras la fusión de un cuerpo multivesicular con la membrana celular, mientras que las microvesículas tienen un diámetro de 100-1000 nm y brotan directamente de la membrana celular (Colombo *et al.*, 2014). Ambas se conocen colectivamente como vesículas extracelulares y se consideran herramientas importantes en la comunicación entre células al transferir su carga molecular (proteínas, ARNm, microARN) de una célula a otra. En el tracto reproductor materno, se han propuesto como herramientas importantes para regular las interacciones entre los gametos o embriones y la madre (Al-Dossary *et al.*, 2016, Burns *et al.*, 2016). Se ha observado que estos exosomas y microvesículas producidos por el FO *in vivo* y del cultivo *in vitro* de células epiteliales de oviducto bovino, parecen mejorar la criotolerancia de los embriones producidos *in vitro* (Lopera-Vasquez *et al.*, 2016, Lopera-Vasquez *et al.*, 2017).

Estudios recientes han evaluado la secreción y contenido de estas vesículas extracelulares producidas por el útero tanto de origen *in vivo* (Ng *et al.*, 2013, Burns *et al.*, 2016) como *in vitro* (Greening *et al.*, 2016, Bidarimath *et al.*, 2017). Hasta hace poco, solo se había identificado en los exosomas de oviducto la proteína PMCA4a, que es esencial para la hiperactivación de la movilidad y la fecundación (Al-Dossary *et al.*, 2013). Sin embargo, recientemente se ha llevado a cabo la caracterización de su contenido en el oviducto bovino tanto *in vivo* como *in vitro*, aumentando el conocimiento sobre el papel de dichas vesículas como moduladores de las interacciones entre oviducto, gametos y embriones (Almiñana *et al.*, 2017).

Almiñana y colaboradores han demostrado por primera vez diferencias sustanciales entre el contenido/secreción de vesículas extracelulares de oviducto *in vivo* e *in vitro*. Utilizando la espectrometría de masas identificaron 319 proteínas en dichas

vesículas, de las cuales 186 se expresaron diferencialmente al compararse *in vivo* e *in vitro*. Curiosamente, 97 se expresaron exclusivamente *in vivo*, 47 estaban presentes solo *in vitro* y 175 eran comunes. Además, observaron que tanto las células de oviducto *in vivo* como *in vitro* producen este tipo de vesículas, pero con diferentes características cualitativas y cuantitativas. El análisis de estas vesículas identificó proteínas clave implicadas en la unión de espermatozoides y ovocitos, en la fecundación y en el desarrollo embrionario. Entre estas, encontramos proteínas de choque térmico como HSP90, HSPA8 y HSP70, junto con otras como Miosina 9, OVGP1, gelsolina, anexina, ezrina y lactadherina (Almiñana *et al.*, 2017). La expresión de algunas de estas proteínas como HSPA8, HSP70, miosina 9 se detectó tanto en las células *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, una de las proteínas más abundantes del FO, como es OVGP1, solo fue detectada en la secreción *in vivo*, mientras que lactadherina solo fue identificada *in vitro*. Estas diferencias entre las poblaciones de exosomas *in vivo* e *in vitro* han sido descritas previamente (Ostman *et al.*, 2005) y podría deberse a las condiciones experimentales del estudio, ya que el cultivo de células epiteliales de oviducto en monocapa después de varios días, es menos probable que imiten el entorno oviductal, como se refleja en la pérdida de características morfológicas como cilios y gránulos secretores (Rottmayer *et al.*, 2006). También observaron que los embriones producidos *in vitro* podían internalizar estas vesículas producidas *in vivo*, siendo capaces de atravesar la ZP y ubicarse alrededor del núcleo de la mayoría de las células embrionarias. Esto hecho también suponía una mejora funcional en el desarrollo del embrión viéndose un aumento de la tasa de blastocisto, de prolongación de su supervivencia y mejora en la calidad del embrión (Almiñana *et al.*, 2017). Estos resultados están en línea con otros estudios que muestran la captación de exosomas uterinos por el embrión en etapas posteriores (Vilella *et al.*, 2015, Burns *et al.*, 2016, Greening *et al.*, 2016, Bidarimath, *et al.*, 2017). Estos estudios vienen a confirmar que los exosomas y microvesículas son componentes esenciales de las secreciones oviductales y uterinas, con su posible aplicación en los sistemas de FIV para optimizar la producción de embriones *in vitro*.

Uno de los efectos de estas vesículas oviductales, conocidas como oviductosomas, sobre la fertilidad se ha descrito en un estudio reciente con ratones KO para PMCA4, una bomba de Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática. Esta mutación generaba machos infértiles por la pérdida de su motilidad espermática. (Bathala *et al.*, 2018). Sin embargo, el grupo de la Dra. Martín-DeLeon observó que las hembras de PMCA4 *-/-* eran fértiles, a pesar de la expresión abundante de PMCA4 en oviductosomas en las hembras salvajes (PMCA4

+/+). A través de sus análisis, han descrito la sobreexpresión de PMCA1 en oviductosomas de la hembra PMCA4 -/- como una posible respuesta para compensar la ausencia del PMCA4. El PMCA1 podría transferirse desde los oviductosomas a los espermatozoides para compensar la carencia de PMCA4, ya que sus niveles fueron significativamente más altos en los espermatozoides capacitados que en los no capacitados (Bathala *et al.*, 2018). Este papel regulador de los oviductosomas explicaría algunas de las diferencias en la fecundación *in vivo* e *in vitro* en ratones modificados genéticamente.

#### 3.3.3 Expresión génica del oviducto

Es importante tener en cuenta las modificaciones de la expresión génica que ocurren en el oviducto con el fin de conocer su relación con los diferentes microambientes generados con sus secreciones. Se han estudiado los cambios de expresión génica en el oviducto en presencia de gametos, así como a lo largo del ciclo estral en diferentes especies.

Se han descrito variaciones de la expresión génica en el oviducto en presencia de gametos (masculinos y femeninos) así como con células de la granulosa y embriones. La unión de espermatozoides a las células del epitelio oviductal *in vitro* también produce cambios en la síntesis de proteínas (Ellington *et al.*, 1993). Además, el estudio de expresión génica en ratón tras la cópula con machos fértiles, mostró que hay una variación del transcriptoma oviductal en presencia de espermatozoides, con una sobreexpresión de prostaglandina peroxidasa sintasa y adrenomedulina (Fazeli *et al.*, 2004). En un estudio similar en el oviducto de la rata, se ha visto un cambio en la expresión de genes. De los 31,100 transcritos detectados, solo 17 genes se alteraban significativamente 6 horas después del apareamiento, 12 sobreexpresados y 5 con la expresión disminuida (Parada-Bustamante *et al.*, 2007). Entre estos genes se incluyen codificantes de enzimas tales como fosfolipasa B, canales iónicos y receptores de neurotransmisores.

Se ha realizado la caracterización de la expresión de varias proteínas en tejido oviductal bovino sólo en presencia de células del cúmulo y ovocitos (Einspanier *et al.*, 1997, Gabler *et al.*, 2008). Un estudio reciente realizado en la especie porcina ha mostrado la sobreexpresión de 17 genes, a la vez que una expresión reducida de 9 genes, en presencia de espermatozoides o embriones en el oviducto. Los genes modificados están

relacionados con transporte molecular, respuesta inflamatoria y sistema inmune, tráfico de proteínas, señalización e interacción celular y desórdenes del desarrollo (López-Úbeda *et al.*, 2015b). Por lo tanto, hay que considerar la importante influencia que tienen gametos y embriones sobre la expresión génica del oviducto con el fin de generar el adecuado microambiente oviductal (Georgiou *et al.*, 2005, Georgiou *et al.*, 2007, Almiñana *et al.*, 2012).

La regulación de la expresión génica en el oviducto a lo largo del ciclo estral también ha sido motivo de estudio en algunas especies. En humanos, se han realizado dos estudios sobre perfiles de expresión génica en las trompas de Falopio, uno que proporciona información sobre los genes expresados en el oviducto durante la fase lútea (Tone *et al.*, 2008) y el otro que compara el perfil de expresión génica de las células epiteliales en las fases folicular y luteal (George *et al.*, 2011). En el estudio de George y colaboradores se identificaron 5 genes sobreexpresados y 15 con expresión disminuida en las respectivas fases, viéndose la relación de algunos de estos genes con la fecundación y el desarrollo embrionario (George *et al.*, 2011).

En la especie bovina se han descrito cambios en la expresión génica de receptores de hormonas esteroideas dependientes del ciclo en el oviducto (Ulbrich *et al.*, 2003). Sin embargo, el primero en analizar los cambios en los perfiles de expresión génica de células epiteliales de oviducto durante el ciclo estral en la especie bovina fue el grupo de Wolf en dos estudios que proporcionaron el transcriptoma oviductal (Bauersachs *et al.*, 2003, Bauersachs *et al.*, 2004). En esos estudios, durante el período postovulatorio, los autores encontraron diferencias en 35 genes entre el oviducto ipsilateral y contralateral. De estos, 27 genes estaban sobreexpresados en el oviducto ipsilateral y 8 tenían su expresión disminuida (Bauersachs *et al.*, 2003). El análisis comparativo de la expresión génica entre las fases de estro y diestro mostró que 77 genes se expresaban diferencialmente: 37 genes sobreexpresados en la fase estro y 40 sobreexpresados en la fase diestro (Bauersachs *et al.*, 2004). Recientemente, otro estudio ha proporcionado un análisis del transcriptoma de células epiteliales oviductales bovinas. En dicho estudio, la expresión de 972 transcritos fueron sobreexpresados mientras que 597 transcritos mostraron una menor expresión en la fase folicular en comparación con la fase lútea, respectivamente (Cerny *et al.*, 2015).

En la especie porcina, destacamos dos estudios relacionados con la expresión génica post-inseminación. Uno de estos estudios incluyó la introducción de poblaciones de espermatozoides X o Y en los dos oviductos separados (Almiñana *et al.*, 2014). El análisis de microarrays reveló que 501 genes se alteraron consistentemente en el oviducto

en presencia de espermatozoides portadores del cromosoma Y en comparación con la presencia de espermatozoides portadores del cromosoma X. En otro estudio se comparó el transcriptoma oviductal entre cerdas inseminados y no inseminadas durante el estro espontáneo. El análisis funcional de los genes reveló que las principales vías afectadas por la inseminación estaban relacionadas con transporte molecular, respuesta inflamatoria y sistema inmune, tráfico de proteínas, señalización e interacción celular y desórdenes del desarrollo (Lopez-Ubeda *et al.*, 2015b).

Una reciente revisión sobre el efecto del apareamiento sobre la expresión génica en el oviducto, sugiere que existen numerosas funciones del oviducto que están reguladas en respuesta al apareamiento, como citamos a continuación (Parada-Bustamante *et al.*, 2016). Los genes asociados con cambios en el crecimiento y la diferenciación celular del oviducto, por ejemplo, podrían afectar la remodelación de la capa epitelial, permitiendo una activación y fecundación eficiente del ovocito, así como el desarrollo del embrión preimplantacional (Kapelnikov *et al.* 2008, Chen *et al.*, 2013). Otro grupo de genes se relaciona con la modulación del sistema inmune, que pueden participar en el mantenimiento de un entorno libre de microbios en el oviducto (Cárdenas *et al.*, 1998, Jeoung *et al.*, 2011) o proporcionar una tolerancia inmune materna frente a los antígenos paternos de las células espermáticas, como ocurre en el útero (Hancock *et al.*, 1986). Los genes asociados con la contracción del músculo liso podrían ayudar a regular la motilidad del oviducto (Rodríguez-Valentín *et al.*, 2006). Por otro lado, los cambios de expresión en genes que codifican proteínas de señalización o interacción celular pueden participar en el establecimiento del reservorio espermático en el oviducto (Cortés *et al.*, 2004, Suárez, 2016). Estos análisis de expresión génica muestran la influencia del apareamiento en las células de oviducto (Parada-Bustamante *et al.*, 2016).

En un reciente estudio, nuestro laboratorio ha identificado varias proteínas secretadas por el oviducto y cuya expresión está regulada por el ciclo estral en la especie porcina (Acuña *et al.*, 2017). Mediante la tecnología de microarrays, se ha identificado el perfil de expresión génica del oviducto porcino en diferentes etapas del ciclo estral. Se observó que el oviducto porcino expresaba un total de 4929 genes y se detectaron diferencias significativas en la expresión de varios genes conforme avanzaba el ciclo estral. El análisis de los genes expresados diferencialmente mostraba que un total de 86, 89 y 15 genes se sobreexpresaban en cerdas prepúberes, en fase preovulatoria y en fase luteal respectivamente, en comparación con los niveles observados en cerdas en fase postovulatoria. También se detectó que 80, 51 y 64 genes se regularon negativamente en

prepúberes, fase preovulatoria y luteal respectivamente, en comparación con las cerdas en fase postovulatoria. Más específicamente, los genes regulados positivamente en la fase preovulatoria proporcionan información sobre las proteínas involucradas en procesos biológicos como la capacitación de los espermatozoides o la maduración de los ovocitos. Otras proteínas detectadas estarían potencialmente involucradas en la fecundación como lo demuestran los genes que están sobreexpresados en la fase postovulatoria, junto con las proteínas implicadas en el desarrollo embrionario temprano, como son los genes sobreexpresados en la fase luteal (Acuña *et al.*, 2017).

#### 3.3.4 Proteoma del oviducto

El proteoma del FO ha sido estudiado en diferentes especies de mamíferos, como la vaca (Lamy *et al.*, 2016), la oveja (Soleilhavoup *et al.*, 2016), la yegua (Smits *et al.*, 2017), la cerda (Georgiou *et al.*, 2005, Mondéjar *et al.*, 2012) y la coneja (Yu *et al.*, 2016). El proteoma de las células epiteliales del oviducto también se ha estudiado en humanos (Wang *et al.*, 2016) y en cerdas (Seytanoglu *et al.*, 2008). El grupo de investigación del Dr. Fazeli ha realizado varios estudios sobre el proteoma oviductal porcino que son muy importantes para complementar los análisis de microarrays. Se identificaron modificaciones en el perfil del proteoma durante las etapas folicular y luteal del ciclo reproductivo mediante el cultivo *in vitro* en células epiteliales oviductales. Se detectaron 330 proteínas en fase folicular y 510 en la luteal, hallándose una sobreexpresión de 51 y 27 de estas proteínas respectivamente (Seytanoglu *et al.*, 2008) y cambios relacionados con la presencia de gametos en el tracto femenino (Georgiou *et al.*, 2005, Georgiou *et al.*, 2007).

Soleilhavoup y colaboradores han llevado a cabo el estudio proteómico de los diferentes fluidos del tracto reproductor de la oveja (cérvix, útero y oviducto) en estro y fase luteal, mostrando interesantes variaciones (Soleilhavoup *et al.*, 2016). Respecto a las proteínas específicas de cada segmento, el 70% del cérvix y 79% del oviducto presentaban una marcada expresión durante el estro. Sin embargo, la expresión de proteínas específicas en el útero era más equilibrada entre las dos fases, siendo del 51% en fase luteal. Algunas de las proteínas del FO con una sobreexpresión durante el estro son HSPA8, OVGPI, isocitrato deshidrogenasa, miosina 9, factor de elongación 1- $\alpha$ 1 y anexina A8; en la fase luteal son ceruloplasmina,  $\alpha$ -2-macroglobulina, gelsolina, factor

del complemento B y transtiretina (Soleilhavoup *et al.*, 2016). El significado biológico de esta regulación diferencial parece indicar que las proteínas que aumentan su abundancia en el moco del cérvix y en el FO están orientadas a la interacción con los gametos. El incremento durante la fase luteal en la abundancia de proteínas del fluido uterino, estaría dirigida a la interacción con el embrión. En concordancia con lo anterior, también se ha descrito que OPN, OVGP1, y HSPA8, cuya abundancia aumenta en el estro, son proteínas que interactúan con los gametos (Lloyd *et al.*, 2009b, Avilés *et al.*, 2010, Killian, 2011).

#### 3.4. Funciones del oviducto

Al oviducto se le han asignado diversas funciones: establecer el microambiente adecuado para la maduración y transporte de los gametos (Abe, 1996, Desantis *et al.*, 2011, Winuthayanon *et al.*, 2015), crear un reservorio espermático (Hunter *et al.*, 1980, Suárez, 2002), así como aportar los nutrientes y protección necesarios al embrión durante sus primeros estadios de su desarrollo. El FO también participa en la creación de una barrera que favorece la fecundación especie-específica, evitando la penetración de ovocitos con espermatozoides extraños (Slavik *et al.*, 1999). La diversidad de los componentes del FO está relacionada con las numerosas funciones en las que participa el oviducto, dotándole de una gran importancia fisiológica (Yanagimachi, 2009, Hunter, 2012a, Coy *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2017, Pérez-Cerezales *et al.*, 2018).

Al oviducto también se le ha otorgado una función inmunológica ya que debe cumplir una función defensiva ante agentes patógenos a la vez que respeta la presencia de los espermatozoides y embriones tempranos, los cuales podría identificar como agentes extraños (Bergqvist *et al.*, 2005). Se ha descrito la presencia del sistema Fas-FasL en el oviducto de la vaca, un mecanismo de tolerancia inmunológica que evita que espermatozoides y embriones tempranos sean atacados por células natural killer (NK) y linfocitos T citotóxicos (Bergqvist *et al.*, 2005). Se han detectado neutrófilos polimorfonucleares, la primera línea de defensa contra los microorganismos, en el FO bovino durante la etapa preovulatoria en condiciones fisiológicas. Este mecanismo defensivo parece estar regulado por un microambiente oviductal rico en prostaglandina E2 para proteger a los espermatozoides de la fagocitosis por parte de los neutrófilos, apoyando así la supervivencia del espermatozoide en el oviducto (Marey *et al.*, 2014, Marey *et al.*, 2016). Se ha descrito la expresión de receptores Toll-like y sus citoquinas,

los cuales forman parte de la regulación del sistema inmune innato, en células de trompas de Falopio en presencia de espermatozoides (Zandieh *et al.*, 2015). Estos receptores tienen relevancia en diversos eventos reproductivos, y se ha propuesto que juegan un importante papel en la interacción inmunológica de los espermatozoides con las trompas de Falopio para preparar un ambiente seguro en el momento de la fecundación (Zandieh *et al.*, 2015).

#### 3.4.1 Funciones del oviducto respecto al espermatozoide

Después de la cópula, un gran número de espermatozoides son depositados en la vagina o en el útero según la especie. Sólo un pequeño porcentaje del total de espermatozoides eyaculados alcanzará la ampolla oviductal, ya que la mayoría son eliminados por diferentes mecanismos (Yanagimachi, 1994). Los espermatozoides con serias anomalías en su morfología no tienen la capacidad de entrar en el oviducto (Styrna *et al.*, 2002), y aquellos con una morfología normal o con pequeñas anomalías pero con movimiento linear progresivo logran penetrar la unión útero-tubárica y llegar al istmo (Shalgi *et al.*, 1992, Holt *et al.*, 2004, Nakanishi *et al.*, 2004). En la especie porcina, se ha observado que los espermatozoides morfológicamente normales son seleccionados durante su viaje dentro del útero bajo la influencia del tracto reproductor femenino, descartándose en el reflujó y en el útero aquellos anormales, e incluso los de apariencia normal, pero con un tamaño más reducido. Se asegura así una población adecuada de espermatozoides en el oviducto para fecundar el óvulo (García-Vázquez *et al.*, 2015a, García-Vázquez *et al.*, 2015b).

Se ha observado en ratones modificados genéticamente que el paso a través de la unión útero-tubárica es un momento crítico en el transporte espermático (Tokuhiro *et al.*, 2012). Aunque es esencial la propia motilidad espermática para alcanzar la ampolla oviductal, las contracciones del oviducto también participan en el transporte de espermatozoides y en la formación del reservorio en el istmo de ratón (Ishikawa *et al.*, 2016). Poco después de que los espermatozoides entren en la región ístmica, las cabezas de los espermatozoides se unen a las células epiteliales del oviducto formando un reservorio funcional espermático en la zona caudal del istmo oviductal (Hunter *et al.*, 1980, Suárez, 2002). Los estudios de microscopía electrónica de barrido de espermatozoides bovinos ilustran la interacción física entre la cabeza del espermatozoide

y los cilios en la superficie apical de la célula epitelial oviductal (Pollard *et al.*, 1991, Suárez, 2008). Esta interacción se ha observado también en la especie humana (Morales *et al.*, 1996), en conejo (Smith *et al.*, 1997) y caballo (Dobrinski *et al.*, 1997). Sin embargo, en ratón se ha visto que los espermatozoides se unen y se separan de las células epiteliales durante su trayecto por el oviducto varias veces antes de llegar a la ampolla (Chang *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2018).

La participación del oviducto en la capacitación espermática está mediada por la unión de la cabeza a células epiteliales oviductales (Suárez, 1998, Goudet, 2011, Hunter, 2012a, Suárez, 2015). Estos espermatozoides inmersos en el FO rico en glicoproteínas, se estabilizan durante el periodo pre-ovulatorio y conservan la superficie de sus membranas intactas (Hunter, 2012b, Chang *et al.*, 2012). En esta región, el espermatozoide retrasa su proceso de capacitación y prolonga su supervivencia (Fazeli *et al.*, 2003, Suárez, 2008, Suárez, 2015). Mediante un sistema de video-microscópico, se ha observado la interacción de los espermatozoides con el oviducto en un modelo *ex vivo* en vacas. Se vio que después de alcanzar el oviducto, los espermatozoides formaban un reservorio en el istmo adhiriendo sus cabezas a células ciliadas. En el momento que había un COC en la ampolla, los espermatozoides se hiperactivaban, se liberaban y se dirigían hacia la ampolla, ayudados por contracciones del músculo liso oviductal para moverse con éxito contra la corriente causada por el movimiento ciliar. Recientemente, el grupo de la Dra. Suárez ha comenzado a identificar, a través de experimentos *ex vivo* e *in vitro*, patrones de movimiento flagelar interesantes, describiendo que los enlaces de los espermatozoides con el epitelio en la ampolla son diferentes a los del istmo (Chang *et al.*, 2012, Ardón *et al.*, 2016). Este hecho plantea preguntas como qué comportamiento tienen los espermatozoides antes de la fecundación y qué papel desempeñan los cilios del oviducto en la regulación de dicho comportamiento (Suárez, 2016). En este sentido, se ha descrito recientemente que en ratones KO para CEP164, una proteína que participa en la ciliogénesis de diferentes tejidos como el epidídimo y el oviducto. Existe una marcada reducción del número de cilios en estos tejidos, genera machos infértiles. Sin embargo, las hembras eran fértiles, cuestionando así el papel de la motilidad ciliar en la fertilidad femenina (Siller *et al.*, 2017).

Existen diferencias en función de la especie entre las moléculas encargadas de la unión de los espermatozoides a las células del epitelio oviductal (Talevi *et al.*, 2010b). Se ha observado que aquellos espermatozoides que poseen determinados receptores en su superficie, son capaces de unirse durante más de treinta horas a las células epiteliales

(Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005, Hunter, 2012a), siendo los carbohidratos especie-específicos expresados en el epitelio oviductal claves para esta unión. También la proteína anexina de la membrana apical de las células epiteliales junto con la proteína del plasma seminal BSP1 (o PDC 109) han sido propuestas como factores claves en esta unión (Hung *et al.*, 2010, Suárez, 2015, Defaus *et al.*, 2018). Un estudio reciente en la especie bovina, muestra que el tipo de unión del espermatozoide al epitelio ístmico difiere del que ocurre en la de la unión al epitelio de la ampolla, observándose que los espermatozoides unidos al epitelio ístmico pueden separarse por heparina, mientras que el espermatozoide unido al epitelio de la ampolla requiere tanto la heparina como la hiperactivación para separarse del epitelio. Esto sugiere que el tipo unión del espermatozoide en estas dos zonas es diferente y por lo tanto está mediada por diferentes factores (Ardón *et al.*, 2016).

Se ha visto que el ciclo estral de la hembra es el que modula la liberación de los espermatozoides de este reservorio, incrementándose en el periodo peri-ovulatorio (Suárez, 2008). Se han identificado algunas sustancias como los endocannabinoides (Gualtieri *et al.*, 2010, Talevi *et al.*, 2010a, Talevi *et al.*, 2010b), así como diversas proteínas como lactadherina (Silva *et al.*, 2017), como elementos involucrados en la unión y el desprendimiento del espermatozoide del oviducto (Hunter, 1981, Suárez, 2001), observándose además la relación entre la ovulación y la liberación del espermatozoide una vez capacitado (Smith *et al.*, 1991, Lefebvre *et al.*, 1996, Gualtieri *et al.*, 2005, Suárez, 2007, Lamy *et al.*, 2018). También se ha descrito que la actividad de algunas glicosidasas presentes en el FO varía a lo largo del ciclo estral. Estas enzimas podrían actuar sobre los residuos glucídicos o carbohidratos de las células epiteliales, participando así en la liberación de los espermatozoides del reservorio (Carrasco *et al.*, 2008a, Carrasco *et al.*, 2008b).

Otra de las funciones del oviducto sobre los espermatozoides implica guiarlos en su camino a través del sistema reproductor femenino mediante diferentes mecanismos. Las corrientes tubáricas participan en la reotaxis para conducir al espermatozoide hasta el lugar de fecundación. Este mecanismo permite al espermatozoide capacitado moverse a contracorriente, aunque parece ser un mecanismo pasivo como consecuencia de la hidrodinámica de los espermatozoides móviles (Miki *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2016, Pérez-Cerezales *et al.*, 2018). La termotaxis es otro de estos mecanismos, donde la capacidad termosensora de los espermatozoides les permite guiarse direccionalmente de acuerdo con el gradiente de temperatura del oviducto, tal como se ha observado en conejo, ratón, cerdo, vaca y humanos (Eisenbach *et al.*, 2006, Hunter, 2012b, Pérez-Cerezales *et*

*al.*, 2015). Parece que los espermatozoides tienen la capacidad de detectar dentro de un amplio rango de temperaturas, diferencias superficiales de temperatura inferiores a una centésima de grado Celsius, moviéndose hacia temperaturas más cálidas. Esta elevada sensibilidad solo podría lograrse con una familia de proteínas que funcionen como termosensores, sensibles a un rango de temperatura diferente que le permita detectar este gradiente y responder a él termotácticamente (Bahat *et al.*, 2012, Pérez-Cerezales *et al.*, 2018). Los estudios realizados sobre los canales termosensores y la diferencia de temperatura en el oviducto sugieren además que el gradiente de temperatura en el oviducto puede servir para influir en la expresión génica y la modificación proteica del óvulo y del embrión (Grinsted *et al.*, 1985, Eisenbach *et al.*, 2006, Ye *et al.*, 2007).

La quimiotaxis es el tercer mecanismo que interviene en el movimiento de los espermatozoides en el oviducto. La fusión del líquido folicular y del líquido oviductal después de la ovulación puede proporcionar una quimioatracción suficiente para asegurar la llegada de espermatozoides a la ampolla. Se han descrito como posibles quimioatrayentes al precursor del péptido natriurético (Bian *et al.*, 2012), a la progesterona producida por las células del cúmulo y a pequeñas citoquinas encontradas en el líquido folicular (Teves *et al.*, 2006, Oren-Benaroya *et al.*, 2008, Chang *et al.*, 2010, Pérez-Cerezales *et al.*, 2016) .

Como se ha citado anteriormente, solo los espermatozoides capacitados pueden migrar dentro de un gradiente de temperatura por termotaxis y responder por quimiotaxis para nadar hacia el ovocito. De este modo, la termotaxis y la quimiotaxis se pueden ver como mecanismos para seleccionar espermatozoides capacitados. De hecho, esta premisa abre el camino para un campo de investigación sobre la selección de espermatozoides utilizando estas propiedades de migración y sería interesante verificar la calidad de los espermatozoides que responden tanto por termotaxis como por quimiotaxis y examinar su eficacia en las TRAs (Pérez-Cerezales *et al.*, 2018).

En estudios recientes se ha observado *in vivo* en el ratón que la propia motilidad del espermatozoide es esencial para avanzar desde la región media del oviducto y poder alcanzar la ampolla, y una vez llegada a esta región, se ha observado una disminución de la velocidad de los espermatozoides a medida que se acercan al epitelio de la ampolla (Ishikawa *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2018 ). En la etapa preovulatoria, el espermatozoide se encuentra en el oviducto con una mucosidad extremadamente viscosa, lo que contribuye a la supresión de la motilidad espermática (Hunter *et al.*, 2011). Después de la ovulación, el FO se vuelve más fluido, lo que favorece el batido flagelar y la progresión

espermática en dirección a la ampolla oviductal (Suárez *et al.*, 1992, Hunter *et al.*, 2011). Por lo tanto, el espermatozoide se expone durante su viaje a través del oviducto a diferentes microambientes (agentes químicos, temperatura, viscosidad, etc) que le obligan a ir adaptando su patrón de motilidad a estas características (Coy *et al.*, 2012a, Suárez, 2015, Pérez-Cerezales *et al.*, 2018).

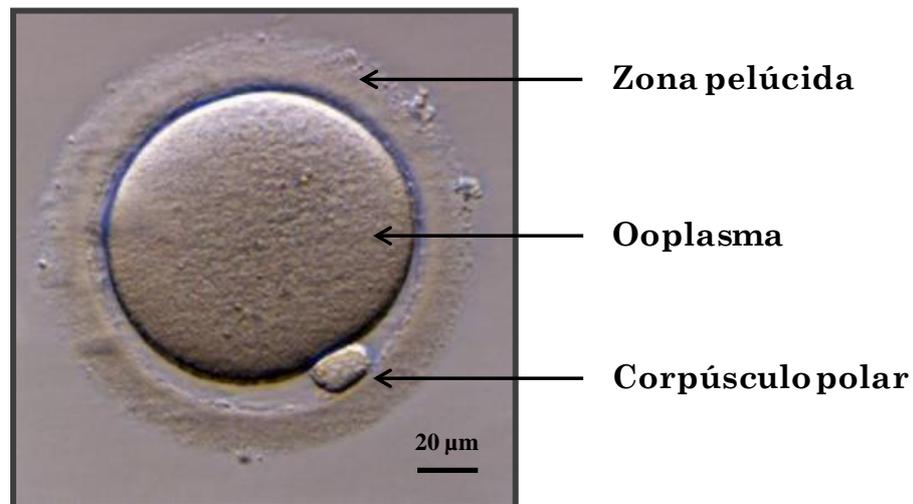
Se ha observado que el tracto genital femenino tiene un efecto positivo sobre el potencial de fecundación de espermatozoides, incluso si su fisiología está seriamente comprometida. Utilizando espermatozoides de ratones modificados genéticamente que eran estériles en experimentos de FIV, volvían a ser capaces de fecundar los óvulos en presencia de fluidos del tracto femenino (Kawano *et al.*, 2010, Turunen *et al.*, 2012). En base a ello, se ha propuesto el uso de secreciones del tracto genital femenino como medio para la mejora de la calidad seminal, incluso con los espermatozoides dañados tras su criopreservación (Mondéjar *et al.*, 2012). También se han observado efectos beneficiosos en la movilidad y viabilidad espermática, así como en la integridad acrosomal, con la adición de proteínas procedentes del FO de forma previa a la congelación espermática (Kumaresan *et al.*, 2006).

Se ha utilizado el FO como aditivo en medio de FIV en la especie porcina, produciendo un descenso de la penetración espermática y del número medio de espermatozoides por ovocito penetrado, lo que supone un avance en el control de la polispermia (Kim *et al.*, 1996, Coy *et al.*, 2008). Las sustancias presentes en el FO como carbohidratos, glicosaminoglicanos, catecolaminas, OPN, HSPs y norepinefrina modifican y modulan la función espermática (Killian, 2011). Se ha observado *in vitro* que los fluidos viscosos, como es el caso del FO, mejoran el movimiento espermático, así como la unión y penetración del ovocito (Coy *et al.*, 2009).

Esto indica que existen mecanismos de selección de espermatozoides dentro del oviducto o que los espermatozoides que logran llegar a la ampolla adquieren la capacidad de fecundar durante su trayecto dentro del oviducto. Se sabe que la maduración final del espermatozoide, se produce dentro del tracto genital femenino a través de su interacción con las secreciones del útero y del oviducto (Aitken *et al.*, 2013).

### 3.4.2 Funciones del oviducto respecto al ovocito

Un elemento esencial del ovocito y que está en contacto con el FO y con el epitelio oviductal es la ZP (**Fig. 5**). Esta matriz extracelular de mamíferos se sintetiza durante el crecimiento folicular en el ovario y en su formación puede intervenir el ovocito y las células de la granulosa o el ovocito solamente dependiendo de la especie de que se trate (Wassarman, 1988, Maresh *et al.*, 1990, Sinowatz *et al.*, 2001, Izquierdo-Rico *et al.*, 2011).



**Figura 5. Imagen de campo claro de un ovocito de mujer en metafase II.** Las flechas indican el ooplasma, la zona pelúcida (ZP) y el primer corpúsculo polar.

El óvulo permanece un tiempo en la región ampular-ístmica (Hunter, 1972) y se adhiere al epitelio de la ampolla oviductal hasta el momento de la fecundación (Croxatto *et al.*, 1975). Se han realizado grabaciones microscópicas en oviducto de vaca que sugieren que el CCO maduro se adhiere con fuerza al epitelio en el momento que alcanza la ampolla, y por contra un CCO degenerado flotaba en la luz oviductal (Kölle *et al.*, 2009).

También se ha descrito que algunos elementos procedentes del FO se unen a la ZP, como la proteína oviductal OVGPI y glicosaminoglicanos como heparina. Esto se traduce en una ZP más resistente a la digestión enzimática y a la penetración, lo que contribuye al control de la polispermia (Coy *et al.*, 2008). De hecho, el término endurecimiento de la ZP se consideraba hasta entonces como resultado de la secreción de los gránulos corticales ovocitarios tras la fecundación (conocido como reacción cortical).

Sin embargo, ahora se sabe que la ZP sufre estos cambios durante la maduración oviductal previa a la fecundación, conociéndose como “endurecimiento pre-fecundación de la ZP” en la especie porcina. Se ha visto que en la vaca y el cerdo los niveles de polispermia se ven afectados por el contacto de la ZP con el FO de forma significativa. El tratamiento de los ovocitos con FO antes de la FIV ha resultado en un incremento en la tasa de monospermia sin que hubiera un descenso en la penetración espermática (Kim *et al.*, 1996, Coy *et al.*, 2008). En la oveja y la cabra también se han encontrado resultados similares (Mondéjar Corbalán, 2012). Además, el que se hayan descrito diferencias significativas en la estructura y tamaño de la ZP entre ovocitos que han sido madurados *in vivo* e *in vitro*, refuerza la idea de que el oviducto participa en la maduración de la ZP del ovocito (Funahashi *et al.*, 2000). También se han detectado cambios en los residuos glucídicos en las glicoproteínas unidas a la ZP durante su paso por el oviducto después de la ovulación (Avilés *et al.*, 1996, Avilés *et al.*, 2000, El-Mestrah *et al.*, 2001).

#### 3.4.3 Funciones del oviducto respecto al embrión

Tras la fecundación, el embrión está alojado dentro del oviducto en contacto con las células epiteliales, además de estar expuesto y rodeado por el FO. El microambiente dentro del oviducto proporciona una temperatura estable, un pH óptimo y secreciones de fluidos que sirven de apoyo para el desarrollo embrionario (Maillo *et al.*, 2016).

El oviducto participa en el desarrollo del embrión antes de su implantación, produciendo los factores necesarios para su división. Este fenómeno se describió por primera vez en la especie ovina donde se cultivaron los embriones con las células epiteliales del oviducto. Los resultados mostraron que la tasa de división del blastocisto fue del 80% cuando los embriones fueron cultivados con células epiteliales oviductales, en comparación con una tasa de división del 33% cuando se cultivaron con células fibroblásticas (Gandolfi *et al.*, 1987). Este hallazgo mostró que la presencia de células epiteliales oviductales, y no cualquier otro tipo de célula somática, es crucial para el desarrollo del blastocisto. La mejora del desarrollo embrionario tras su cultivo con células epiteliales oviductales u oviducto explantado también se ha demostrado en otras especies, incluyendo el ratón (Sakkas *et al.*, 1990), el cerdo (White *et al.*, 1989), la vaca (Eyestone *et al.*, 1989) y la mujer (Yeung *et al.*, 1992). Aunque hoy en día los embriones pueden producirse sin la exposición al ambiente oviductal, diferentes estudios han demostrado

que los embriones cultivados en oviductos de oveja (Lazzari *et al.*, 2002, Rizos *et al.*, 2002), vaca (Fair *et al.*, 2001, Tesfaye *et al.*, 2007) o ratones (Rizos *et al.*, 2007) son de calidad superior a los producidos *in vitro*, en términos de morfología, expresión génica, criotolerancia y tasa de gestación después de la transferencia. Estos hallazgos indican que el epitelio oviductal y el FO proporciona al embrión el entorno fisiológico y bioquímico idóneo para su desarrollo antes de su implantación.

También se ha constatado que el intercambio de señales entre el embrión temprano y el oviducto conduce al adecuado desarrollo embrionario (Maillo *et al.*, 2016). En un estudio en cerdos se ha descrito que la presencia de embriones regula negativamente la expresión de genes relacionados con el sistema inmune (Almiñana *et al.*, 2012). En la vaca se ha visto que los genes regulados negativamente estaban relacionados con: a) el sistema del complemento, que ayuda a los anticuerpos y las células fagocíticas a eliminar los patógenos; b) inflamación, una de las primeras reacciones contra un cuerpo extraño; y c) el principal complejo de histocompatibilidad, que une los antígenos y los presenta a las células T (Maillo *et al.*, 2015). También parece lógico pensar que cualquier señal derivada del embrión se magnificará en especies portadoras de camadas en comparación con especies mono-ovulatorias, lo que explicaría la escasez de datos que demuestran un efecto del embrión en el oviducto *in vivo*. De hecho, se ha descrito la necesidad de transferir numerosos embriones (hasta 50) en el oviducto de vacas para detectar diferencias en el transcriptoma, mientras que cuando estaba presente un solo embrión en el oviducto (novillas preñadas versus novillas cíclicas) no se encontraban diferencias, lo que sugiere un efecto local del embrión (Maillo *et al.*, 2015). Recientemente en la especie equina también se ha descrito una influencia local del embrión sobre el transcriptoma del epitelio oviductal (Smits *et al.*, 2016).

El efecto del FO sobre el embrión se hace evidente tanto por la detección de factores embriotróficos en el oviducto como por el tiempo que permanece el embrión en este conducto. El embrión se ve expuesto durante un periodo de tiempo no inferior a 48h a estos factores, aunque dicho tiempo varía según la especie (Croxatto, 2002, Lee *et al.*, 2006, Avilés *et al.*, 2010, Schmaltz-Panneau *et al.*, 2014). Uno de estos factores es el complemento C3, el cual desempeña un papel embriotrófico después de ser convertido en iC3b por las células oviductales (Lee *et al.*, 2009). El factor embrionario 3 de células oviductales humanas desempeña un papel importante en la mejora del desarrollo embrionario previo a la implantación al promover la proliferación e inhibir la apoptosis (Xu *et al.*, 2004). Otros factores como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Adachi

*et al.*, 1995), el factor de crecimiento transformante (TGF) (Chegini *et al.*, 1994), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (Pfeifer *et al.*, 1994) también han sido detectados en la trompa de Falopio en humanos. Estos factores pueden influir en las diferentes etapas del desarrollo embrionario al producir: aumento de la tasa de blastocistos, aumento del número de células de la masa celular interna del blastocisto, protección contra efectos negativos de la transcripción/replicación del ADN mitocondrial y apoptosis (Lee *et al.*, 2006, Lloyd *et al.*, 2009a). El FO también va cambiando para proporcionar al embrión el ambiente más adecuado en cada momento (Buhi, 2002, Avilés *et al.*, 2010), ya que las necesidades metabólicas del embrión preimplantacional van cambiando durante su desarrollo (Leese, 1995, Leese *et al.*, 2008).

Durante el tiempo que está en el oviducto, el embrión pasa del metabolismo oxidativo al metabolismo glicolítico (Folmes *et al.*, 2014). Esta transición se acompaña de diferencias en la composición de nutrientes a medida que el embrión viaja a través del oviducto, de su maduración mitocondrial para permitir al embrión establecer su propio metabolismo y de un cambio en la tensión de oxígeno paralelo a este cambio en el metabolismo (Gardner *et al.*, 1996, Absalon-Medina *et al.*, 2014). Después del desprendimiento de las células del cúmulo, el embrión depende del FO y de su actividad antioxidante interna para protegerse contra el estrés inducido por las especies reactivas de oxígeno (ROS). El glutatión reducido, taurina, hipotaurina y cisteamina son los principales antioxidantes no enzimáticos presentes en ovocitos y embriones (Guerin *et al.*, 2001).

Otro elemento presente en el FO y que tiene una acción protectora sobre el embrión son los estrógenos. Estos actúan a través del receptor de estrógeno  $\alpha$  (codificado por el gen *Esr1*) en las células epiteliales del oviducto, protegiendo a los embriones del ataque del sistema inmunológico materno (Winuthayanon *et al.*, 2015). Se ha descrito que la pérdida del gen *Esr1* en las células epiteliales oviductales en ratones hembra daba como resultado un exceso de actividad de proteasas y una expresión aumentada de péptidos antimicrobianos tales como defensinas, dando como resultado la muerte embrionaria antes de la etapa de 2 células. Este estudio demostró que el gen *Esr1* epitelial es necesario para suprimir el sistema inmune innato, cambiando la expresión génica relacionada con la respuesta inflamatoria en el oviducto durante el día 1 y 2 de la gestación. Este resultado sugiere que sin las señales de los estrógenos a través del gen *Esr1* en las células epiteliales del oviducto, los embriones recién fecundados no son capaces de superar el sistema inmunológico de la madre (Winuthayanon *et al.*, 2015).

Los numerosos estudios evidencian el papel fundamental que el oviducto juega en las primeras etapas de la división embrionaria, donde también ocurre el paso de la regulación genómica materna a la embrionaria. De hecho, se han observado perturbaciones en la expresión génica de embriones cuando se desarrollan *in vitro* antes de ser transferidos al útero (Lonergan *et al.*, 2003, Wrenzycki *et al.*, 2005, Lonergan *et al.*, 2006).

#### **3.4.3.1 Efecto de la fecundación *in vitro* sobre el desarrollo embrionario**

Los avances tecnológicos como la FIV y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), usan procedimientos que pueden obviar el uso del oviducto y transferir los embriones fecundados directamente al útero. La presencia de estas tecnologías cuestiona el papel del oviducto y su necesidad para la reproducción humana y animal. Sin embargo, se ha producido un incremento de los estudios que manifiestan su preocupación con respecto al uso de TRAs, en parte por la descripción de cambios epigenéticos en los embriones debido a las condiciones de cultivo y la hiperestimulación ovárica controlada (Cánovas *et al.*, 2017).

Actualmente, los medios de cultivo utilizados en la FIV y en el cultivo embrionario presentan una composición parecida a los fluidos biológicos respecto a carbohidratos, aminoácidos y sales minerales. Anteriormente se había estado utilizando el suero sanguíneo como fuente de proteínas para estos medios de cultivo, pero se detectaron problemas como anormalidades locomotoras en ratón (Fernández-González *et al.*, 2004) y el “síndrome del ternero gigante” en oveja y vaca (Young *et al.*, 1998, McEvoy *et al.*, 2000). Por ello, hoy en día se utilizan medios químicamente semidefinidos, libres de proteínas. Sin embargo, es posible que las diferencias entre la composición proteica del suero sanguíneo y el FO, o diferencias en la concentración de las mismas, sean las causantes de estas anormalidades. También hay que considerar que las proteínas producidas por el epitelio oviductal pueden ser el factor clave para la correcta fecundación y desarrollo embrionario temprano, además de establecer los marcadores epigenéticos correctos en el embrión. Es por esto que el estudio de las proteínas presentes en el FO tiene una gran relevancia, enfocado hacia su uso como aditivo en los medios de maduración de gametos, de fecundación y de cultivo embrionario *in vitro*.

Una revisión reciente discutió cómo las TRAs influyen en la epigenética de los embriones tempranos y sugiriendo que la expresión génica en embriones en desarrollo podría ser alterada a través del medio en el que interactúan (Lucas, 2013). En la especie humana se ha descrito diferencias en la expresión génica de los ovocitos dependiendo del protocolo de maduración utilizado (Jones *et al.*, 2008, Virant-Klun *et al.* 2013). Por otra parte, varios estudios demostraron que el cultivo de embriones de ratón en diferentes composiciones de medios podría conducir a cambios epigenéticos y contribuir a defectos en el desarrollo y fenotipos aberrantes en la edad adulta (Reik *et al.*, 2001, Khosla *et al.*, 2001). Estos hallazgos indican que la composición de los medios y la hiperestimulación ovárica controlada pueden producir alteraciones epigenéticas en los embriones.

Un estudio reciente con sangre de cordón umbilical y placentas recogidas de niños concebidos por TRAs y niños concebidos de forma natural mostró que la fuente de alteración en el estado de metilación del ADN es el resultado de procedimientos de TRAs, en lugar de la fertilidad subyacente de los padres (Song *et al.*, 2015). Hiura y colaboradores propusieron que los trastornos de impronta son una combinación de procedimientos hereditarios, hiperestimulación ovárica controlada, TRAs y medios de cultivo que potencian la aparición temprana de las enfermedades (Hiura *et al.*, 2014). Un estudio ha mostrado la relación entre el peso al nacer y la fuente de proteína en medios de cultivo de embriones (Zhu *et al.*, 2014), lo que refuerza la hipótesis de que la composición proteica de los medios de cultivo juega un importante papel en la regulación correcta de marcas epigenéticas en el embrión en crecimiento.

En este sentido, hay que tener en cuenta que el número de niños nacidos desde el origen de las TRAs supera ya los 5 millones. Aunque la mayoría parece saludable, se han detectado tasas más altas de nacimientos prematuros (Rubens *et al.*, 2014), defectos congénitos no cromosómicos y efectos perinatales adversos en embarazos con TRAs (El Hajj *et al.*, 2013), con efectos a largo plazo que están siendo estudiados en seres humanos (Kissin *et al.*, 2014). Los datos de niños concebidos mediante TRAs revelan una incidencia importante de algunos trastornos de impronta genómica como el síndrome de Beckwith-Wiedemann, el síndrome de Angelman y el síndrome de Silver-Russell, en comparación con los bebés concebidos naturalmente (White *et al.*, 2015b). Esta evidencia destaca el importante vínculo entre los TRAs y los resultados de impronta epigenética en los niños.

Un estudio reciente propone que uno de los responsables de estos defectos podría ser el medio que se utiliza en el laboratorio para el manejo de los espermatozoides y los

ovocitos antes de la fecundación. Este mismo medio también se usa para mantener al embrión en desarrollo durante los primeros días antes de su transferencia al útero materno. Cánovas y colaboradores analizaron si la adición de fluidos del tracto reproductivo materno a este medio podría reducir los defectos en los niños concebidos a través de TRAs, (Cánovas *et al.*, 2017). Utilizando la especie porcina como modelo, estos investigadores compararon embriones concebidos de forma natural con los embriones de TRAs expuestos a los medios habituales y con embriones de TRAs crecidos en medios suplementados con FO y fluido uterino recogido del tracto genital de cerda. Se utilizaron tecnologías de vanguardia para secuenciar el genoma completo de todos los embriones y comparar los genes que estaban activos en cada caso. También se examinaron los marcadores químicos en el ADN o cambios epigenéticos, que activan o desactivan la expresión de genes sin cambiar el propio código de ADN. Sus análisis mostraron que los embriones concebidos con TRAs crecidos en el medio habitual, tenían diferentes patrones de expresión génica y cambios epigenéticos en comparación con embriones concebidos de forma natural. La expresión génica y los cambios epigenéticos en los embriones de TRAs crecidos con el fluido reproductor de cerdo presentaron una mayor similitud con los embriones concebidos naturalmente. Estos hallazgos sugieren que la expresión génica anormal en los embriones expuestos a los medios de TRAs puede conducir a defectos de nacimiento, y que el uso de fluidos reproductivos naturales puede ser una alternativa más segura (Cánovas *et al.*, 2017). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos experimentos se realizaron suplementando el medio de cultivo con solo un 1% de FO. Este porcentaje se aleja mucho de lo que ocurre en condiciones naturales, siendo necesarios estudios posteriores que aclaren este hecho.

Existen por lo tanto muchas evidencias sobre el importante y complejo papel que juega el oviducto en diferentes aspectos de maduración de gametos, fecundación y desarrollo embrionario temprano. Hemos visto que el oviducto sufre numerosos cambios en diversos aspectos: en su anatomía en las diferentes regiones, en la histología y fisiología de la mucosa durante el ciclo ovárico, en patrones de expresión génica que varían también durante el ciclo y por la presencia de gametos y embriones. Por ello, con el fin último de conocer el papel del oviducto en la reproducción, es necesario conocer de forma más precisa los genes expresados, así como las proteínas sintetizadas y secretadas por las diferentes regiones del oviducto, a lo largo del ciclo estral y otras condiciones fisiológicas. La información que se va obteniendo en diferentes especies contribuye a

entender los mecanismos responsables de la especie-especificidad y los que permanecen conservados entre ellas.

Por lo tanto, las investigaciones actuales no van en busca del componente clave del oviducto responsable del éxito del proceso de fecundación y desarrollo embrionario, sino que parecen ir encaminadas al estudio de la interacción entre diferentes elementos oviductales, lo que conlleva al éxito del proceso reproductivo.

### 3.5 Haptoglobina

La Hp es una  $\alpha$  2-glicoproteína presente en el plasma sanguíneo de los mamíferos. La Hp posee la capacidad de fijar la hemoglobina libre producida por la lisis de eritrocitos formando complejos estables, prácticamente irreversibles en condiciones fisiológicas (Nagel *et al.*, 1971, Putnam *et al.*, 1975, Andersen *et al.*, 2012).

Esta proteína fue descubierta por Polonovski y Jayle (1939) quienes la identificaron como el componente sérico que, al unirse a la hemoglobina liberada de los eritrocitos, inhibía su actividad oxidante además de facilitar su retirada de la circulación (Polonovski *et al.*, 1939).

La Hp se sintetiza principalmente en el hígado, aunque también se ha descrito su síntesis en tejido adiposo y el pulmón (Dobryczycka, 1997), así como en piel, bazo y riñón (Ebersole *et al.*, 2000).

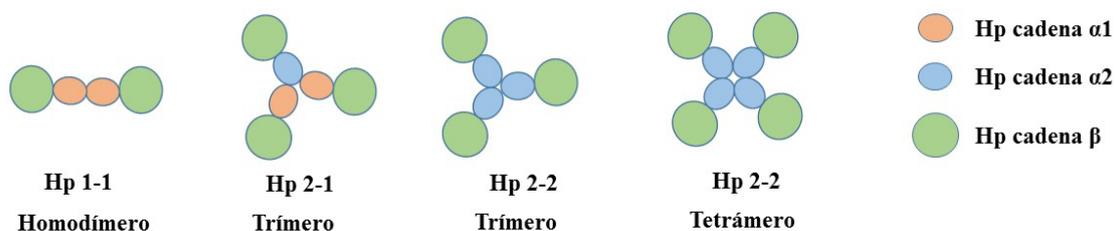
Otra función biológica importante de la Hp está relacionada con la respuesta de defensa del huésped a la infección y la inflamación (Dobryczycka, 1997; Yueh *et al.*, 2008), estando considerada como una proteína de fase aguda (PFA).

#### 3.5.1 Estructura de la proteína haptoglobina

El gen Hp humano existe en 2 formas alélicas principales, Hp1 y Hp2. El alelo Hp2 surgió por una aparente duplicación intragénica de un fragmento de ADN de 1.7 kb del gen Hp1. Por consiguiente, existen principalmente 3 genotipos de Hp: Hp 1-1, Hp2-1 y Hp2-2. La frecuencia de estos genotipos de Hp varía notablemente según las regiones geográficas (Smithies *et al.*, 1962, Maeda *et al.*, 1984). La existencia de los 3 fenotipos de Hp fue demostrada en la especie humana por Smithies (1955) por sus diferentes patrones de migración en la electroforesis en gel de almidón, y más tarde en

poliacrilamida (Peacock *et al.*, 1965). Este polimorfismo proteico fue uno de los primeros identificados en las proteínas plasmáticas del ser humano (Smithies *et al.*, 1955).

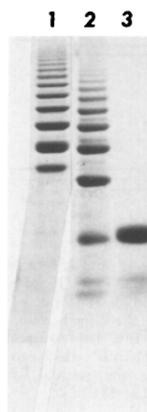
La proteína Hp que se encuentra en la mayoría de los mamíferos es una glicoproteína formada principalmente por 2 subunidades alfas ( $\alpha$ ) y dos subunidades betas ( $\beta$ ) unidas por puentes disulfuro entre una cisteína de las 2 cadenas  $\alpha$  para formar un homodímero,  $(\alpha\beta)_2$  de aproximadamente 90 kDa. La subunidad  $\alpha$  presenta un peso molecular de 16 a 23 kDa y la subunidad  $\beta$  de 36 a 42 kDa (Bensi *et al.*, 1985). En humanos, esta forma corresponde a la proteína Hp producida en personas portadoras de los dos 2 alelos Hp1, la denominada Hp1-1. Las variaciones estructurales en las cadenas  $\alpha$  son las responsables del polimorfismo entre los tres tipos de Hp humana más comunes. La cadena  $\alpha$  se presenta en dos formas alternativas Hp $\alpha$ 1 y Hp $\alpha$ 2, características de los fenotipos Hp1-1 y Hp2-2, respectivamente, mientras que el heterocigoto Hp2-1 contiene ambos tipos de cadenas  $\alpha$ . Esta clasificación también determina su tamaño molecular y sus diferencias de carga eléctrica. Esto es debido a que el alelo Hp2 contiene dos exones adicionales en comparación con el alelo Hp1. El alelo Hp1 contiene una copia de la secuencia en el exón 3, que codifica el dominio de multimerización de la proteína, permitiendo que se formen dímeros. Hp2 tiene dos copias de la secuencia que codifica este dominio de multimerización, lo que da lugar a la formación de multímeros. Esto se debe a que la parte del gen duplicada de la cadena  $\alpha$  incluye la cisteína involucrada en el enlace disulfuro (cisteína 33 en humanos) que une las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Por lo tanto, Hp1-1 es una molécula homodímera, mientras que Hp2-1 puede presentarse de múltiples formas incluyendo homodímero, trímero, tetrámero y otros polímeros lineales. La Hp2-2, por otra parte, puede estar constituida por dímeros, trímeros, tetrámeros y otros polímeros cíclicos. Usando microscopía electrónica, Wejman y colaboradores describieron la molécula Hp1-1 como una estructura alargada tipo barra con 2 grupos de formas esféricas, las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas por enlaces disulfuro, así como los diferentes polímeros que pueden formar las demás variantes de Hp (**Fig. 6**) (Smithies *et al.*, 1962, Wejman *et al.*, 1984, Nielsen *et al.*, 2009, Boettger *et al.*, 2016).



**Figura 6. Representación esquemática de la estructura cuaternaria de Hp.** Según observaron mediante microscopía electrónica Wejman y colaboradores (1984), la molécula Hp1-1 es estructura alargada tipo barra con 2 grupos de formas esféricas y ovaladas, las cadenas  $\beta$  y  $\alpha$  unidas por enlaces disulfuro. También se muestran ejemplos de estructuras de las moléculas Hp2-1 y Hp2-2, en las diferentes posibilidades de formar dímeros, trímeros o tetrameros. Figura modificada de Nielsen *et al.*, 2009.

Posteriormente se observaron otros polimorfismos que hacían que Hp avanzara más rápido o más lento en un gel de agarosa, por lo que estas variaciones en el alelo Hp1 daban lugar a los subtipos denominados Hp1S y Hp1F (Smithies *et al.*, 1962). Los productos de los alelos Hp1F y Hp1S difieren solo en un aminoácido, mientras que el alelo Hp2 es el resultado de una fusión de los alelos Hp1F y Hp1S, está presente solo en humanos y da lugar a una cadena  $\alpha$  más larga. La forma más común de Hp2 contiene ambos alelos y se llama Hp2FS, pero también existe una forma Hp2SS de baja frecuencia (Shindo, 1990). No se han descrito diferencias funcionales entre los alelos F y S.

Los tres tipos más comunes Hp presentan además una imagen electroforética diferente: el tipo Hp1-1 migra como una simple banda anódica; el fenotipo Hp2-1 presenta además de esa misma banda, una serie de bandas más lentas cuya intensidad disminuye en relación con la velocidad de migración; el fenotipo Hp2-2 carece de la banda Hp1-1 y presenta una serie de bandas, cada una ligeramente más lenta, que las correlativas al fenotipo Hp2-1 (**Fig. 7**) (Smithies *et al.*, 1962, Wejman *et al.*, 1984.).



**Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras purificadas de Hp en condiciones no desnaturalizantes, teñidas con azul de coomassie.** Calle 1: patrón de bandas de Hp2-2. Calle 2: patrón de bandas de Hp2-1. Calle 3: patrón de Hp1-1. Las bandas trazas por debajo de Hp1-1 se deben a una contaminación menor por la albúmina sérica. Las bandas que aparecen por encima de las bandas principales en la muestra Hp2-1 (Calle 2) son reales y representan especies poliméricas menores que comigran con bandas correspondientes en la muestra de Hp2-2 (Calle 1). Imagen tomada de Wejman *et al.*, 1984.

Los diferentes subtipos de Hp se han utilizado como marcadores genéticos en estudios poblacionales, estando avalado por la existencia de numerosos datos sobre la distribución geográfica de estas variaciones alélicas (Moral Castrillo, 1986, Carter *et al.*, 2007).

Este polimorfismo genético supone variaciones a nivel de proteína y se ha asociado con diferencias en propiedades inmunomoduladoras y anti-inflamatorias (Langlois *et al.*, 1996, Dobryszczyka, 1997). Diferentes estudios han demostrado que la variabilidad genética de Hp puede tener su repercusión clínica, influyendo en la susceptibilidad a enfermedades inmunoalérgicas e infecciosas, así como en los niveles de hierro y de colesterol en sangre (Langlois *et al.*, 1996, Van Vlierberghe *et al.*, 2004, Boettger *et al.*, 2016, Bjornsson *et al.*, 2017). También se ha asociado el polimorfismo de la Hp con la susceptibilidad y la gravedad de enfermedades como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, la diabetes gestacional y la preeclampsia (Mustafa *et al.*, 2004, Asleh *et al.*, 2006, Depypere *et al.*, 2006, Costa- Mallen *et al.*, 2008).

En la especie porcina, se ha determinado que el fenotipo de Hp es similar a la Hp1-1 humana, un homodímero  $(\alpha\beta)_2$  unido por puentes disulfuro y con un peso molecular aproximado de 120 kDa (Lockhart *et al.*, 1972, Yueh *et al.*, 2008). Las 2 cadenas  $\alpha$  poseen cada una un peso molecular de 14 kDa, y el peso molecular de las cadenas  $\beta$  es de 42 kDa aproximadamente (Yang *et al.*, 1999).

### **3.5.2 Expresión y diversas funciones de la haptoglobina**

#### **3.5.2.1 Haptoglobina como proteína de unión a hemoglobina**

La función fisiológica más conocida de la Hp es la de combinarse con la hemoglobina intravascular para facilitar su eliminación a través del hígado (Nagel *et al.*, 1971, Putnam *et al.*, 1975), protegiendo a túbulos renales de su lesión por acumulación de hemoglobina, así como evitar la pérdida de hierro por vía renal (Ebersole *et al.*, 2000, Fagoonee *et al.*, 2005). La hemoglobina transporta oxígeno en la sangre, pero también un compuesto potencialmente dañino para los tejidos debido a su grupo hemo altamente reactivo. Durante la hemólisis y el daño tisular, la hemoglobina se libera en el plasma, donde es capturada por la proteína Hp. Esto conduce a la formación del complejo hemoglobina-haptoglobina, una interacción proteica no covalente pero considerada irreversible. Posteriormente este complejo es captado por macrófagos a través de su

receptor CD163 con el fin de metabolizar su capacidad oxidante y ser eliminada del torrente sanguíneo (Nielsen *et al.*, 2007, Andersen *et al.*, 2012). Se ha descrito que este complejo también inhibe la peroxidación de lípidos estimulada por la hemoglobina (Lim *et al.*, 1998).

#### 3.5.2.2 Haptoglobina como proteína de fase aguda

La reacción de fase aguda es un mecanismo de respuesta del sistema inmunitario a una alteración de la homeostasis. Esta reacción puede ser ocasionada por daño tisular, infección, crecimiento neoplásico o desordenes inmunológicos (Heinrich, 1990, Kushner *et al.*, 1993).

Las PFA se definen como aquellas proteínas cuyas concentraciones plasmáticas se modifican al menos un 25% tras un estímulo inflamatorio. Su síntesis se produce mayoritariamente en el hígado como respuesta a las citoquinas inflamatorias liberadas (Kushner *et al.*, 1993).

Una clasificación comúnmente usada divide las PFA en positivas y negativas (Petersen *et al.*, 2004). Las PFA positivas son aquellas cuyos niveles se incrementan, como son la proteína C reactiva, la Hp, el amiloide A sérico y la  $\alpha$  1 –glicoproteína ácida. Las PFA negativas presentan un descenso en sus niveles tras el estímulo inflamatorio, como en el caso de la albúmina y la transferrina. El uso de Hp como PFA se utiliza para el diagnóstico de enfermedades hemolíticas e inflamatorias.

La Hp se considera PFA positiva en la especie porcina debido a que sus niveles se ven incrementados cuando se produce una reacción de fase aguda. Se ha descrito que, tras una inflamación experimental, los niveles de Hp en suero aumentan a las 48 horas del inicio del estímulo inflamatorio y desciende a los niveles basales a los 8 días (Eckersal *et al.*, 2010). Se ha detectado que cerdos con virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS) o con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* o *Toxoplasma gondii* presentan niveles altos de Hp. Cerdos con cojera, mordedura de la cola o diarrea, o sometidos a situaciones de estrés muestran un aumento significativo de los niveles plasmáticos de Hp. Por ello, se ha utilizado el nivel de Hp como biomarcador de enfermedades tanto clínicas y subclínicas, así como para la determinación del estatus sanitario de las explotaciones (Hiss *et al.*, 2003, Petersen *et al.*, 2004, Heo *et al.*, 2005, Yueh *et al.*, 2008, Gutiérrez Montes, 2008).

En otras especies como en la vaca se ha visto el aumento de los niveles de Hp en respuesta a la inflamación (Dobryszczycka, 1997). En esta especie, los valores bioquímicos y hematológicos de Hp en sangre también se utilizan como herramienta diagnóstica de enfermedad (Murata *et al.*, 2004). Además, debido a que el aumento de Hp es más pronunciado y prolongado en respuesta a la infección, se ha utilizado como marcador para la detección de enfermedad en becerros en comparación con otras PFA (Heegaard *et al.*, 2000, Ganheim *et al.*, 2007, Angen *et al.*, 2009), llegando a aumentar más de 100 veces con la estimulación inmune (Conner *et al.*, 1989).

#### 3.5.2.3 Otras funciones de la haptoglobina

Además de su unión a hemoglobina y su función como PFA, la Hp ha sido de interés por otras funciones (**Tabla 1**): posee un efecto inhibitorio de la síntesis de prostaglandinas (Jue *et al.*, 1983), es promotora de la angiogénesis, así como de la proliferación y diferenciación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Cid *et al.*, 1993). También muestra una acción inhibitoria de la actividad de la catepsina B, una proteasa capaz de digerir la matriz extracelular (Snellman *et al.*, 1967, Pagano *et al.*, 1982). La Hp tiene propiedades inmunosupresoras: disminuye la producción de anticuerpos en general y bloquea la respuesta de los neutrófilos a diversos estímulos (Oh *et al.*, 1990).

También se ha descrito la unión de Hp a los receptores de los leucocitos CD11b, sugiriendo una función inmunomoduladora (Ghmati *et al.*, 1996), juega un papel importante como antioxidante al prevenir la formación de radicales de oxígeno y reducir el estrés oxidativo celular (Gutteridge, 1987, Dobryszczycka, 1997, Miller *et al.*, 1997). Además, se ha descrito que Hp está implicada en el metabolismo de la hemoglobina en el hígado, que inhibe la filtración glomerular de la misma y reduce el daño oxidativo renal durante hemólisis (Lim, 2001). Otra capacidad que se ha otorgado a la proteína Hp es la de bacteriostática, al captar el hierro necesario para el crecimiento de bacterias (Eaton *et al.*, 1982).

**Tabla 1. Principales funciones de la Hp según diversos autores.**

<b>Función</b>	<b>Autores</b>
Unión a la hemoglobina	Putnam <i>et al.</i> , 1975
Inhibidora de proteasas (catepsinas B y L)	Snellman <i>et al.</i> , 1967 Pagano <i>et al.</i> , 1982
Bacteriostática	Eaton <i>et al.</i> , 1982
Antioxidante	Gutteridge, 1987
Inmunomoduladora	Kudo <i>et al.</i> , 1982 Jue <i>et al.</i> , 1983 Oh <i>et al.</i> , 1990 Ghmati <i>et al.</i> , 1996
Promotora de angiogénesis	Cid <i>et al.</i> , 1993
Previene la pérdida de hierro	Ebersole <i>et al.</i> , 2000 Fagoonee <i>et al.</i> , 2005
Metabolismo de hemoglobina en hígado, inhibición de filtración glomerular de hemoglobina y reducción del daño oxidativo renal durante hemólisis	Lim, 2001
Biomarcador de diversas enfermedades	Petersen <i>et al.</i> , 2002 Heo <i>et al.</i> , 2005 Yueh <i>et al.</i> , 2008 Millet <i>et al.</i> , 2008
Antioxidante y/o antimicrobiana en el pulmón	Yang <i>et al.</i> , 2003
Metabolismo de colesterol	Salvatore <i>et al.</i> , 2007 Salvatore <i>et al.</i> , 2009 Cigliano <i>et al.</i> , 2009 Spagnuolo <i>et al.</i> , 2013 Boettger <i>et al.</i> , 2016 Bjornsson <i>et al.</i> , 2017

La Hp se ha detectado en diversos fluidos corporales del ser humano y otros mamíferos: suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, etc (Dobryszczycka, 1997). También se ha observado que la Hp presenta una actividad antioxidante y/o antimicrobiana en la mucosa y en el fluido alveolar del pulmón, ejerciendo un papel protector contra la infección y en la reparación de tejidos lesionados (Yang *et al.*, 2003).

También se ha estudiado el papel de la Hp en su unión a apolipoproteínas y su papel en el metabolismo de moléculas de colesterol (Salvatore *et al.*, 2007, Salvatore *et al.*, 2009, Cigliano *et al.*, 2009, Spagnuolo *et al.*, 2013). Estudios recientes de las variaciones en la región cromosómica de Hp en más de 22.000 individuos han revelado una asociación entre los niveles de colesterol y las diferentes isoformas de la Hp (Boettger *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la Hp interacciona con la apolipoproteína E (APOE), actuando como antioxidante sobre ella, siendo la proteína APOE responsable del transporte y de mantener los niveles de colesterol en plasma. El equipo de investigadores elaboró un modelo para explicar la influencia de los polimorfismos de Hp en los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL). Entre las isoformas de la Hp, se observó que la capacidad antioxidante de Hp-2 es menor, proponiendo así que los alelos asociados a la isoforma Hp-1 reducen la carga oxidativa de APOE y permiten un mayor reciclaje de los lípidos del plasma, por lo que presentan niveles más bajos de colesterol total y colesterol LDL. Igualmente, los alelos que reducen la expresión de Hp-1, y por tanto la protección antioxidante que ejerce sobre APOE, contribuyen a elevar los niveles de colesterol y el riesgo de enfermedades arteriales coronarias (Boettger *et al.*, 2016, Bjornsson *et al.*, 2017).

Esta diversidad de funciones en las que parece estar implicada la proteína Hp sigue siendo objeto de estudio. En un ensayo con ratones KO para Hp, se describió que la falta de Hp no afectaba el aclaramiento de la hemoglobina plasmática libre en esos ratones, poniendo en entredicho que la función más relevante de Hp sea la de unirse a hemoglobina plasmática libre para facilitar su degradación posterior en el hígado (Lim *et al.*, 1998). Más bien, estos resultados mostraban que la función fisiológica más importante de la fuerte unión de hemoglobina-haptoglobina era la de inhibir la peroxidación de lípidos estimulada por la hemoglobina (Lim *et al.*, 1998).

### 3.5.3 Relación de la haptoglobina con la función reproductiva

El interés que tiene la Hp en el campo de la reproducción comienza con la detección de su expresión en órganos reproductores femeninos: ovario, endometrio, decidua, oviducto y líquido amniótico (Sharpe-Timms *et al.*, 2000, Berkova *et al.*, 2001, Herrler *et al.*, 2004) (**Tabla 2**). La Hp también participa en la funcionalidad del sistema reproductivo masculino. Se ha relacionado la presencia de Hp en las células de Leydig, Sertoli y células germinales con el mantenimiento de los niveles de hierro necesarios para la espermatogénesis (O'Bryan *et al.*, 1997).

**Tabla 2. Detección de Hp en órganos y fluidos reproductivos femeninos en diversas especies.**

Especie	Órgano	Autor
Ratón	Útero y ovario	Friedrichs <i>et al.</i> , 1995
Búfalo de agua	Fluido folicular	Bergamo <i>et al.</i> , 1995
Conejo	Endometrio en periodo de implantación Oviducto	Hoffman <i>et al.</i> , 1996 Olson <i>et al.</i> , 1997 Herrler <i>et al.</i> , 2004
Rata	Ovario	O'Bryan <i>et al.</i> , 1997
Vaca	Ovario y oviducto	Lavery <i>et al.</i> , 2003 Lavery <i>et al.</i> , 2004 Way <i>et al.</i> , 1998
Mujer	Líquido amniótico Endometrio Decidua Fluido folicular	Katnik <i>et al.</i> , 1990 Beier <i>et al.</i> , 1998 Porta <i>et al.</i> , 1999 Sharpe-Timms <i>et al.</i> , 2000 Berkova <i>et al.</i> , 2001 Schweigert <i>et al.</i> , 2006
Cerda	Fluido oviductal en presencia de ovocitos	Georgiou <i>et al.</i> , 2005

Se ha demostrado la expresión del ARNm de Hp en el endometrio de conejo durante la etapa de implantación (Olson *et al.*, 1997), así como en el útero de ratón (Friedrichs *et al.*, 1995). En el ser humano, se ha detectado tanto la subunidad  $\alpha$  (Beier *et al.*, 1998), así como la subunidad  $\beta$  (Berkova *et al.*, 2001) en secreciones uterinas, detectándose también en el estroma del endometrio (Sharpe-Timms *et al.*, 2000).

Además, se ha estudiado la presencia de Hp en el útero humano encontrándose diferencias en los niveles de Hp entre el útero gestante y no gestante. En este estudio se encontraron tres proteínas de 16, 20 y 42 kDa en muestras de tejido uterino gestante y no gestante al utilizar anticuerpos anti-Hp humana, cuyo peso molecular corresponde con las formas de las dos subunidades  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  respectivamente. El análisis mediante inmunohistoquímica y Western blot mostraba que el tejido decidual del útero gestante contiene niveles significativamente mayores de Hp que los endometrios no gestantes (Berkova *et al.*, 2001). Una de las posibles funciones de la Hp en el endometrio sería regular negativamente la respuesta inflamatoria, por lo que su presencia en el útero durante la implantación podría estar relacionada con la modulación de las reacciones maternas contra el blastocisto (Berkova *et al.*, 2001).

En el ser humano se han demostrado diferencias de fertilidad natural en función del fenotipo de Hp, detectándose que las mujeres con Hp1-1 poseen mejores tasas de fertilidad natural respecto a mujeres con otros fenotipos de Hp (Bottini *et al.*, 1999). Esto parece estar relacionado con que el Hp1-1 produce más proteínas y polímeros más pequeños que pueden difundir más fácilmente en el sitio de implantación, en comparación con las mujeres con genotipo Hp-2-2, viéndose que este produce menos proteínas y moléculas de gran tamaño que difunden con mayor dificultad al lugar de implantación (Javid, 1965, Bottini *et al.*, 1999). También se ha observado que el nivel sérico de anticuerpos frente a Hp es mayor en mujeres fértiles en comparación con otras infértiles (Berkova *et al.*, 1997).

Se ha descrito la presencia de niveles elevados de Hp en el fluido uterino durante la fase secretora (Beier *et al.*, 1998), así como la elevación de los niveles séricos Hp durante la gestación, viéndose un patrón bifásico con picos en el primer y tercer trimestre (Haram *et al.*, 1983), lo que sugiere que Hp juega un papel importante en la gestación.

Se ha demostrado que la Hp se une a la apolipoproteína A-1 (ApoA1) formando complejos proteínicos ApoA1/Hp y se transporta a los folículos ováricos humanos, en particular, ApoA1 se une a la cadena  $\beta$  de Hp (Porta *et al.*, 1999). En los folículos en crecimiento se filtra la sangre a través de la lámina basal, lo que permite el transporte de

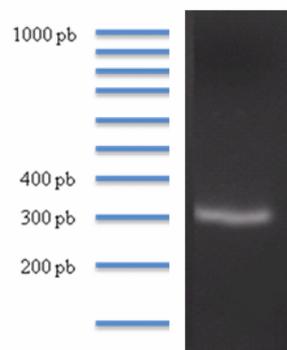
proteínas y a su vez realiza un cribado de células o proteínas plasmáticas que puedan interferir con la maduración y supervivencia del ovocito (Porta *et al.*, 1999, Schweigert *et al.*, 2006). Se ha asociado niveles altos o bajos de Hp en los fluidos foliculares de búfalos de agua con ovocitos atrésicos o sanos, respectivamente (Bergamo *et al.*, 1995). Un nivel alto de Hp podría desempeñar un papel tóxico en el folículo ya que al interactuar con la ApoA1 (Rademacher *et al.*, 1987, Kunitake *et al.*, 1994), podría inhibirse el suministro de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) a las células de la granulosa (Le Goff, 1994, Acton *et al.*, 1996). Además, se ha descrito que estos complejos de ApoA1-Hp, detectados previamente en el oviducto, tienen un efecto positivo sobre la motilidad del espermatozoide (Akerlöf *et al.*, 1991). Es necesario conocer mejor el papel de Hp en el proceso reproductivo, ya que los ratones KO para Hp eran fértiles, aunque su viabilidad se veía comprometida con una mayor tasa de mortalidad tras el nacimiento (Lim *et al.*, 1998).

#### 3.5.3.1 Haptoglobina y el fluido oviductal

Se van conociendo las diferentes proteínas presentes en el FO, y entre ellas está Hp. En el oviducto de la **vaca** se detectó mediante inmunohistoquímica una proteína similar a Hp, así como en el tejido ovárico. Esta proteína de 40 kDa compartía un 81% de identidad con la subunidad  $\beta$  de la Hp bovina se localizaba en la mucosa del oviducto ampular, pero no en la región del istmo (Lavery *et al.*, 2003). Anteriormente se había detectado la secreción intermitente de la proteína similar a Hp en suero y el FO bovino durante el ciclo estral (Way *et al.*, 1998). El análisis de la expresión del ARNm de Hp en el oviducto bovino y el hígado mostraban niveles bajos constitutivamente, pero se observaba que su expresión se regulaba positivamente durante la fase peri-estral del ciclo estral. Esto sugiere una secreción de Hp modulada por los esteroides ováricos durante el ciclo (Lavery *et al.*, 2004). El aumento de la biosíntesis de Hp hepática durante el celo conduciría a niveles elevados de Hp en la capa de células granulosas, el fluido folicular, y el oviducto ampular, donde la acumulación de proteína Hp es acentuada (Lavery *et al.*, 2003). Este sistema regulador garantizaría la concentración necesaria de Hp en el ovario y oviducto durante las etapas finales de desarrollo folicular y durante la capacitación, fecundación o desarrollo embrionario temprano, donde las propiedades inmunomoduladoras de Hp proporcionarían protección frente a la respuesta inmune materna.

En la **coneja** se ha detectado que el ARNm codificante para Hp se expresa en el oviducto 3 horas antes de la ovulación, descartando así su origen folicular, con una expresión ligeramente más alta en la ampolla que en el istmo (Herrler *et al.*, 2004). La proteína detectada compartía un 91% de identidad con la proteína Hp humana y se expresaba desde el día 1 hasta el día 3 posfecundación, periodo en el que los embriones pasan a través del oviducto, disminuyendo a niveles indetectables a partir de ese día. A partir del día 4, la expresión de Hp se localizaba en el endometrio, alcanzando un pico máximo en día 6. Por lo tanto, al menos parte de la proteína Hp detectada en el FO no se transporta desde el sistema vascular, si no que se expresa y secreta por la mucosa oviductal. Esta expresión temporal en el oviducto sugiere que la proteína Hp podría participar en el proceso de capacitación del espermatozoide o en el de la fecundación del óvulo (Herrler *et al.*, 2004).

En la **cerda** se ha detectado la proteína Hp en el oviducto en presencia de ovocitos (Georgiou *et al.*, 2005). Recientemente, en estudios realizados por nuestro grupo de investigación se identificó el ARNm de Hp en el oviducto porcino. Mediante técnicas de biología molecular se analizó la presencia de Hp en oviducto de cerda, hallándose evidencias de la expresión de este gen en las células oviductales (**Fig. 8**). La detección del ARNm de Hp en el oviducto fue en la unión ampular-ístmica, concretamente en la fase preovulatoria, lo que sugiere que la proteína Hp también estará presente en el FO de la especie porcina y sería sintetizada por las células secretoras del epitelio oviductal, jugando un papel en el proceso de la fecundación que aún está por determinar (Ramón *et al.*, 2012).



**Figura 8. Banda amplificada de 312 pares de bases correspondiente a un fragmento del ADNc de Hp porcina obtenida mediante reacción en cadena de la polimerasa. Imagen tomada de Ramón *et al.*, 2012.**

### 3.6 Lactadherina

La proteína lactadherina pertenece a la familia de glicoproteínas secretadas con afinidad de unión a las matrices extracelulares. Esta proteína se identificó inicialmente como una proteína secretada por la glándula mamaria, como el componente principal de los glóbulos grasos de la leche. Ésta y otras proteínas junto con triglicéridos, brotan de la superficie apical del epitelio mamario durante la lactancia rodeados por membrana (exosomas) (Stubbs *et al.*, 1990). Esta proteína se ha identificado de forma independiente en muchas especies, por lo que se le ha dado una variedad de nombres, incluidos SED1, p47, MFG-E8, rAGS, PAS6/7 y BA-46 (**Tabla 3**). Sin embargo, en estudios recientes se le denomina lactadherina y así está registrado en el Universal Protein Resource (UniProt), por lo que es el nombre que utilizaremos en esta Tesis Doctoral.

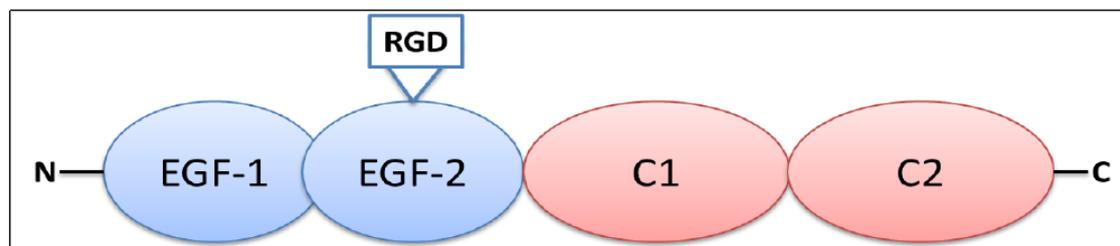
**Tabla 3. Nomenclatura de la proteína lactadherina, aislada en distintos tejidos y fluidos.**

Especie	Procedencia	Nombre	Autores
Ratón	Glándula mamaria (exosomas)	MFG-E8	Stubbs <i>et al.</i> , 1990
Cerdo	Espermatozoides	P47	Ensslin <i>et al.</i> , 1998
Ratón	Testículos	SED1	Ensslin <i>et al.</i> , 2003
Rata	Cerebro	rAGS	Ogura <i>et al.</i> , 1996
Humano	Glándula mamaria	BA46	Couto <i>et al.</i> , 1996
Humano	Endometrio (exosomas)	MFG-E8	Sarhan <i>et al.</i> , 2013
Vaca	Leche	PAS-6/7	Andersen <i>et al.</i> , 1997
Vaca	Leche	Lactadherina	Andersen <i>et al.</i> , 2000
Vaca	Fluido oviductal (exosomas)	Lactadherina	Almiñana <i>et al.</i> , 2017

### 3.6.1 Estructura de la proteína lactadherina

En los primeros estudios, la proteína lactadherina fue identificada en la membrana plasmática de los espermatozoides de cerdo al aislarse mediante cromatografía de afinidad una proteína de 47 kDa que se unía a las glicoproteínas de la ZP, por lo que se la denominó como p47 (Ensslin *et al.*, 1998). En estudios posteriores, el grupo del Dr. Shur caracterizó con más detalles esta proteína y decidieron denominarla SED1, en base a la presencia de diferentes dominios (Ensslin *et al.*, 2003, Shur *et al.*, 2004).

Las siglas SED designaban una proteína secretada que posee un péptido señal escindible y dos dominios funcionales distintos. El primero es un dominio N-terminal Notch-like de tipo II con dos repeticiones similares al factor EGF, el segundo de los cuales tiene un motivo de unión a integrina RGD (un tripéptido que media la unión celular, arginina-glicina-ácido aspártico). Se cree que la proteína lactadherina facilita la adhesión célula-matriz a través de la unión dependiente de RGD a receptores de integrina  $\alpha\beta 3/5$  de la superficie celular. El segundo dominio C-terminal presenta dos dominios discoidina /F5/8 similares a los dominios C1 y C2 de los factores de coagulación sanguínea V y VIII (Stubbs *et al.*, 1990) que se unen a fosfolípidos y/o matrices extracelulares a través de sustratos de glucósidos extracelulares (Ensslin *et al.*, 1998, Andersen *et al.*, 2000). Esta estructura se refleja en la **Figura 9**.



**Figura 9. Esquema de la estructura de la proteína lactadherina.** Posee una estructura en mosaico, con dos dominios EGF N-terminales seguidos por dos dominios discoidina /F5/8, similares a los dominios C1 y C2 de los factores de coagulación sanguínea V y VIII. El segundo dominio de tipo EGF contiene una secuencia de unión a integrina RGD. Modificada de Shur *et al.*, 2004.

### 3.6.2 Expresión y diversas funciones de la lactadherina

La proteína lactadherina aparece por primera vez en el embrión de ratón de 10 días, en las gónadas en desarrollo y donde se asocia al estroma de la cresta gonadal.

Conforme se van desarrollando las gónadas, la expresión de lactadherina aumenta y continúa localizándose en el compartimento periférico del estroma de la gónada primordial (Kanai *et al.*, 2000). Se ha propuesto que las células secretoras de lactadherina en las gónadas en desarrollo podrían ser las precursoras de conductos como el epidídimo, donde se produce una importante secreción de la misma en las gónadas adultas (Ensslin *et al.*, 2003). La presencia de lactadherina en el tracto reproductor masculino adulto de mamíferos tiene dos orígenes distintos. La primera de éstas ocurre en el aparato de Golgi de las células espermatogénicas y la segunda en el segmento inicial del epidídimo, donde los espermatozoides se ven expuestos a unos niveles muy altos de secreción de dicha proteína a su paso por este conducto (Ensslin *et al.*, 2003, Petrunkina *et al.*, 2003).

Se ha observado que el mecanismo de secreción de lactadherina en el epidídimo es similar al que se produce en la glándula mamaria, donde se encuentra en cuerpos citoplasmáticos multilaminares, que una vez unidos a la membrana de las células secretoras se liberan al lumen del conducto como exosomas o ‘epididimosomas’ conteniendo lactadherina (Oshima *et al.*, 2002, Martin-DeLeon, 2015). También se ha descrito que a lo largo de su recorrido por el epidídimo el espermatozoide conserva esta proteína y que células especializadas en la cola del epidídimo eliminan el exceso de lactadherina antes del paso al conducto deferente. La proteína se localiza en el espermatozoide porcino, en la región de la membrana plasmática que recubre el acrosoma y que posteriormente participará en la unión a la ZP del ovocito (Ensslin *et al.*, 2003, Petrunkina *et al.*, 2003).

En la especie porcina se ha visto que la proteína lactadherina se expresa en la glándula mamaria y en el testículo. Se ha localizado la proteína en espermatozoides en distintos estados funcionales (epididimarios, eyaculados y capacitados), en el extremo apical del acrosoma y en el acrosoma completo (Ensslin *et al.*, 1998, Petrunkina *et al.*, 2003).

La proteína lactadherina ha sido objeto de estudio en diferentes tejidos por su liberación a través de exosomas (Stubbs *et al.*, 1990). Un reciente estudio ha demostrado su secreción a través de exosomas en células oviductales bovinas. Almiñana y colaboradores han identificado esta proteína como parte del contenido de estas microvesículas. Se ha visto que estos exosomas actúan como moduladores de las interacciones entre oviducto, gametos y embriones, e incluso siendo absorbidos por embriones producidos *in vitro*, observándose una mejora en el desarrollo y la calidad del embrión (Almiñana *et al.*, 2017).

Anteriormente también se había identificado esta proteína asociada a microvesículas en cultivos *in vitro* de células endometriales bajo estimulación hormonal (Franchi *et al.*, 2008, Riggs *et al.*, 2009, Sarhan *et al.*, 2013). También se observó que la expresión génica de lactadherina en el endometrio se regulaba transcripcionalmente de forma positiva hasta 2,6 veces durante la ventana de implantación, por lo que se ha propuesto a esta proteína como un modulador de la fisiología endometrial, de la unión e invasión del trofoblasto a través de la regulación de los procesos de remodelación, apoptosis y angiogénesis en humanos (Mirkin *et al.*, 2005, Franchi *et al.*, 2011, Bocca *et al.*, 2010). Además, se ha descrito una alta expresión de lactadherina en vellosidades coriónicas humanas en todos los trimestres de gestación (tanto en citotrofoblastos como sincitiotrofoblastos) y en sitios de implantación murinos (Bocca *et al.*, 2012).

La proteína lactadherina desempeña en mamíferos distintas funciones según los diferentes tejidos en los que se expresa, ya que facilita diversas interacciones intercelulares, como ocurre en el epitelio epididimario (Ensslin *et al.*, 2003, Raymond *et al.*, 2009). Lactadherina contribuye a la eliminación fagocítica de células apoptóticas de eritrocitos envejecidos (Fens *et al.*, 2008) o de linfocitos en el tejido mamario (Atabai *et al.*, 2005), juega un papel fundamental durante el desarrollo de la glándula mamaria (Ensslin *et al.*, 2007) y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal y en la reparación de su mucosa (Bu *et al.*, 2007).

Diversos estudios han descrito diversas interacciones de lactadherina con otras proteínas. Además de su afinidad por las glicoproteínas de la ZP (Ensslin *et al.*, 1998, Ensslin *et al.*, 2003), se ha observado que interactúa con diferentes proteínas, como la proteína de membrana integral 2B, la cual que puede unirse a los espermatozoides (González-Cadavid *et al.*, 2014). También se ha relacionado a la proteína lactadherina con las apolipoproteínas A1 y A4 (González-Cadavid *et al.*, 2014), las cuales se expresan en el FO, participan en el metabolismo del colesterol y contribuyen a la capacitación espermática (Petrunkina *et al.*, 2003).

La proteína lactadherina puede actuar como una potente molécula proangiogénica implicada en la ramificación vascular (Silvestre *et al.*, 2005, Neutzner *et al.*, 2007). También se ha descrito su participación en los fotorreceptores diurnos de la retina. Lactadherina y su receptor de integrina  $\alpha\beta 5$  tienen un papel fundamental en la sincronización de la fagocitosis diurna de los fragmentos del segmento externo de fotorreceptores gastados, algo esencial en la visión (Nandrott *et al.*, 2008). Se ha asociado a esta proteína como un posible marcador tumoral en los carcinomas de mama (Peterson

*et al.*, 1990, Taylor *et al.*, 1997), así como la relación de sus niveles elevados en sangre periférica con pacientes con la enfermedad de lupus eritematoso (Yamaguchi *et al.*, 2008).

Se ha atribuido a la proteína lactadherina la propiedad de protección contra infecciones, ya que se ha observado que evita la unión de *Escherichia coli* a las células epiteliales intestinales de los lechones, (Shahriar *et al.*, 2006) y también está involucrada en la protección contra el rotavirus al unirse específicamente al virus, bloqueando de ese modo la unión del mismo a los receptores de la célula huésped e inhibiendo su replicación en niños lactantes (Newburg *et al.*, 1998).

#### **3.6.3 Relación de la proteína lactadherina con la función reproductiva**

Como se ha descrito anteriormente, a nivel reproductivo se ha visto que la proteína lactadherina participa en la unión entre el espermatozoide y el ovocito (Ensslin *et al.*, 1998), y que está involucrada en otros aspectos de la fisiología de los espermatozoides, como la capacitación y la RA (Petrunkina *et al.*, 2003)

La capacidad de la proteína lactadherina para funcionar como receptor espermático para la ZP se confirmó mediante el uso de ratones macho KO que no expresaban la proteína. Se observó que estos ratones presentaban una subfertilidad *in vivo* y una incapacidad de los espermatozoides para unirse a los ovocitos *in vitro* (Ensslin *et al.*, 2003). También se ha descrito que lactadherina reconoce dos de las glicoproteínas de la zona pelúcida, ZP2 y ZP3 (Ensslin *et al.*, 2003). En base a la capacidad de sus dominios de discoidina/F5/8 del extremo C terminal para unirse a matrices de carbohidratos, se cree que esta proteína se une a las glicoproteínas ZP2 y ZP3 mediante los residuos de carbohidratos, aunque hacen falta más estudios para confirmarlo (Fuentes-Prior *et al.*, 2002, Ensslin *et al.*, 2003).

En cuanto a los dominios EGF de la proteína y concretamente la secuencia RGD de unión a integrina, su función en la fecundación no se conoce. Sin embargo, una posibilidad sería que estos dominios participaran en las interacciones del espermatozoide con las células del tracto reproductor femenino, ya que las células epiteliales del útero y del oviducto expresan  $\alpha\beta$  integrinas (Chegini *et al.*, 2001). En esta misma línea, estudios previos han demostrado que la integrina  $\alpha\beta 3$  y la proteína lactadherina se expresan en células epiteliales primarias humanas, de forma más intensa durante la ventana de implantación (Lessey *et al.*, 1992, Mirking *et al.*, 2005, Franchi *et al.*, 2011). Un estudio

reciente ha llevado a cabo ensayos *in vitro* que imitan la implantación humana, confirmando lo descrito previamente, que ambas proteínas se expresan en células endometriales y en el trofoblasto (Franchi *et al.*, 2011, Sarhan *et al.*, 2013). Usando anticuerpos específicos, se ha descrito que el bloqueo independiente de lactadherina y su receptor, la integrina  $\alpha\beta 3$ , interfiere en la unión del trofoblasto al epitelio endometrial, aportando una primera evidencia de que la proteína lactadherina participa en la adhesión del trofoblasto al endometrio (Schmitz *et al.*, 2014).

Otro estudio ha demostrado que la proteína lactadherina participa en la unión de los espermatozoides a las células del oviducto para formar el reservorio espermático en el cerdo (Silva *et al.*, 2017). Silva y colaboradores incubaron células de oviducto con lactadherina recombinante. La preincubación con lactadherina redujo la unión de los espermatozoides a las células del oviducto en un 56,6%, lo que respalda la hipótesis de que esta proteína participa en la unión de los espermatozoides al epitelio oviductal. Anteriormente, se había propuesto que la lactadherina facilitaba la unión del espermatozoide a las integrinas en la superficie del oviducto (Petrunkina *et al.*, 2003), pero esta es la primera vez que se observa directamente la participación de lactadherina en la unión de las células oviductales. Este estudio también reconoce que las concentraciones crecientes de lactadherina no fueron suficientes para inhibir por completo la unión de los espermatozoides a los agregados celulares, lo que implicaría la participación de otras proteínas adhesivas (Silva *et al.*, 2017).

El proteoma del plasma seminal del cerdo ha demostrado asociaciones significativas entre proteínas plasmáticas seminales específicas y los parámetros del semen (motilidad, morfología, vitalidad y porcentaje de células con acrosoma intacto). Entre todas las proteínas analizadas, se observó que lactadherina fue la única proteína que mostró una asociación positiva con la motilidad espermática. Además, de acuerdo con esta asociación, también presentaba una relación inversa con el porcentaje de espermatozoides con defectos en la parte media y cola (González-Cadavid *et al.*, 2014). Debido a que la mayoría de los defectos de espermatozoides se originan durante la espermiogénesis y la motilidad de los espermatozoides se define durante el tránsito epididimal, este estudio sugiere que la proteína lactadherina estaría involucrada en modificaciones post-espermatogénicas. Esta relación de lactadherina con los parámetros espermáticos podría servir como base para determinar posibles marcadores moleculares de la función espermática en la especie porcina (González-Cadavid *et al.*, 2014).

## ***IV. Material y Métodos***

---



#### 4.1 Reactivos

Todos los reactivos químicos empleados en esta Tesis Doctoral se han obtenido de Sigma Aldrich Química (Madrid, España) salvo que se indique lo contrario.

El agua ultra pura utilizada para preparar los medios de cultivo fue producida mediante un desionizador MilliQ plus (Milli-Q, Millipore, EEUU), tras alcanzar éste una resistencia de 18.2 MΩ/cm. A su vez, estos medios se filtraron bajo cabina de flujo laminar (Telstar BH-100, Terrasa, Barcelona) utilizando filtros de 0.2 μm de diámetro de poro (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EEUU).

#### 4.2 Obtención del material biológico

##### 4.2.1 Ovarios

###### 4.2.1.1 Obtención y transporte

Los ovarios usados en este estudio fueron obtenidos a partir de hembras prepúberes de la especie porcina (*Sus scrofa domestica*). Éstas eran cerdas híbridas Landrance X Large White de unos 90-100 Kg de peso y fueron sacrificadas en el matadero de “El Pozo Alimentación S.A.” de Alhama de Murcia (Murcia).

Tras el sacrificio de los animales, se recogieron los ovarios y se trasladaron al laboratorio. El material obtenido se transportó en un termo con una 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) entre 38-38.5°C.

###### 4.2.1.2 Lavado

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

Los ovarios se utilizaron para la obtención de ovocitos. Tanto los medios de transporte como los medios de lavado utilizados para el transporte procedente de

matadero se atemperaron a 38.5°C previamente en una estufa (Edelstahl rost Frei, Alemania). Se actuó de igual manera con los tampones de selección y manipulación de ovocitos que se citan a continuación.

#### 4.2.2 Ovocitos

La extracción de los CCOs se hizo mediante aspiración, utilizando jeringa y aguja de 18G. Éstos se extrajeron de folículos antrales con un tamaño comprendido entre 3 y 6 milímetros (mm) de diámetro. El material aspirado se depositó cada 5 minutos en el interior de unos tubos colocados dentro de gradillas, lo que permitía el contacto de los tubos con la placa calefactora. Posteriormente se dejaron sedimentar para la formación de un precipitado de CCOs, se retiró con una pipeta Pasteur el fluido folicular sobrenadante y a continuación se le añadió varios mililitros (ml) de tampón fosfato salino (PBS), suplementado con 1 mg/ml de polivinil alcohol (PVA), con 0.005 mg/ml de rojo fenol (RF) (PBS-PVA-RF). Después de su homogeneización, el contenido de los tubos se fue depositando en placas Petri colocadas en platinas calefactoras y allí se fueron seleccionando los CCOs inmersos en PBS-PVA-RF.

De todos los CCOs obtenidos, se utilizaron aquellos ovocitos que tenían un citoplasma homogéneo y alrededor de 3 o más capas completas de células del cúmulo.

##### 4.2.2.1 Maduración *in vitro*

El medio de maduración utilizado fue el NCSU-37 (Carolina State University solution-37). Este medio se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de 0'22 µm de diámetro de poro (Millipore corporation, Bedford. Massachusetts, EEUU). Además, el medio NCSU-37 se equilibró previamente a su uso, durante 3 horas y a una temperatura de 38'5°C y un 5 % CO<sub>2</sub> en un incubador (Heraeus instrument, Function line, BB16, Alemania).

Los CCOs seleccionados para madurar se lavaron una vez en PBS-PVA-RF y dos veces más en el medio NCSU-37. Los CCOs se pusieron a madurar durante 22 horas en grupos de 50 a una temperatura de 38.5°C, un 5 % de CO<sub>2</sub> y un 95 % de humedad en 500 µl en NCSU-37 suplementado (**Tabla A1**) con 1mM de dibutil 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

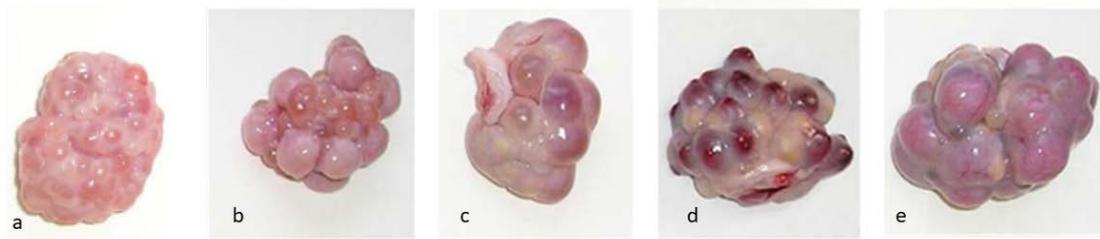
(hCG, Laboratorios Intervet S.A., Salamanca, España). Finalmente los ovocitos se lavaron y se depositaron en un medio de maduración carente de dbAMPc, PMSG y hCG, donde permanecieron durante otras 22 horas más en condiciones similares, como se ha descrito previamente (Funahashi *et al.*, 1993).

#### 4.2.3 Oviductos, fluido oviductal y útero

Se obtuvieron oviductos y úteros porcinos del mismo matadero mencionado anteriormente con diferentes fines. Por un lado, los oviductos se utilizaron con el fin de aislar el ARN total, obtener el ADN complementario (ADNc) correspondiente a las proteínas Hp y lactadherina para analizar su expresión en las diferentes fases del ciclo estral. El tejido uterino se procesó de igual manera para la detección de lactadherina en el mismo, siendo usado como control por haber sido descrito previamente en este tejido (Ensslin *et al.*, 1998). Por otro lado, se utilizaron muestras de oviducto para su inclusión en parafina y su posterior detección de Hp mediante inmunohistoquímica.

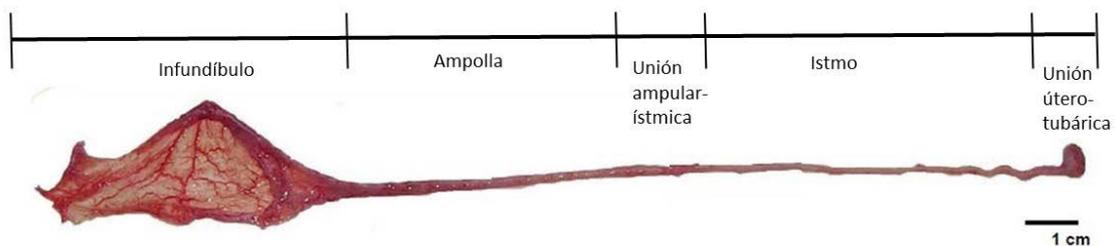
También se utilizaron otros oviductos para extraer el FOP con el fin de detectar en él estas mismas proteínas mediante la electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de Western-blot.

Tras el sacrificio de los animales, los aparatos reproductores porcinos completos de diferentes hembras adultas, se trasladaron al laboratorio mantenidos en frío y allí se procedió a su disección y clasificación según la morfología ovárica en las distintas fases del ciclo estral (Carrasco *et al.*, 2008b). Estas fases son: folicular temprana (ovarios que contienen sólo folículos de 2-5 mm de diámetro), folicular tardía (ovarios con más de 6 folículos de 8-11 mm de diámetro), luteal temprana (ovarios con 6-12 cuerpos hemorrágicos/rojos) y luteal tardía (ovarios con 6-12 cuerpos lúteos). También se seleccionaron 3 cerdas prepúberes, las cuales no habían alcanzado aún la madurez reproductiva, para la extracción de oviductos, la obtención del ARN total y la síntesis del ADNc (**Fig. 10**).



**Figura 10. Clasificación de ovarios de hembra porcina según la morfología ovárica de las fases del ciclo estral. a) Prepúber. b) Fase folicular temprana. c) Fase folicular tardía. d) Fase luteal temprana. e) Fase luteal tardía. Modificado de Carrasco *et al.*, 2008b.**

Una vez clasificados, unos oviductos se utilizaron para la extracción de fragmentos de tejido de ampolla e istmo para aislar el ARN total y la síntesis de ADNc. Otros fragmentos se utilizaron para su estudio inmunohistoquímico. Se diseccionaron dos fragmentos consecutivos de 1 cm de longitud de la porción media de la ampolla del oviducto, de la unión ampular-ístmica y del istmo (**Fig. 11**). Para la obtención de algunas de las muestras también se utilizó RNAlater (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las muestras se sumergieron en esta solución y se trasladaron en hielo al laboratorio, se mantuvieron a 4°C durante toda la noche para que las muestras se impregnasen de RNAlater y después fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento. Otros fragmentos fueron diseccionados y sumergidos en PBS con 4% formaldehído durante 48-72 horas a 4 °C para su posterior inclusión en bloques de parafina. También se utilizaron otros oviductos completos para la extracción de FOP en diferentes fases del ciclo.



**Figura 11. Oviducto porcino diseccionado con sus diferentes regiones. Modificado de Avilés *et al.*, 2010).** Se utilizaron las secciones de ampolla, unión ampular-ístmica e istmo para la extracción de ARN total y la síntesis *in vitro* de ADNc para la detección de la expresión de ARNm de las proteínas Hp y lactadherina.

#### 4.2.3.1 Obtención de fluido oviductal porcino

Una vez clasificados los oviductos se lavaron en frío dos veces en solución salina, teniendo la precaución de que ésta no entrase por el infundíbulo oviductal. Posteriormente se fue diseccionando el oviducto del mesosalpinx sobre una placa de Petri mantenida en hielo.

A continuación, el oviducto se colocó de modo que con la yema de los dedos se pudiera presionar y deslizar su contenido desde la parte del istmo hacia la ampolla para arrastrar el fluido y acumularlo en la luz de la ampolla. Allí se recogió por aspiración con una micropipeta y se depositó en tubos tipo Eppendorf (**Fig. 12**). La recogida de FOP procedente de 10-12 hembras de cada una de las fases del ciclo estral nos permitió obtener muestras representativas de la especie. El FOP extraído de las diferentes cerdas de la misma fase del ciclo se unificó como un lote en un mismo tubo Eppendorf, recogiendo diferentes lotes de cada una de las fases del ciclo.

El FOP obtenido se centrifugó en una centrífuga Beckman (GS-15R, Beckman, Múnich, Alemania) a 7.000g, durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. Se recogió el sobrenadante sin restos celulares, se distribuyó en diferentes alícuotas y se congeló a -20°C hasta el momento de su uso.



**Figura 12. Extracción manual de fluido oviductal porcino mediante aspiración con micropipeta.**

#### 4.2.4 Procesado del semen porcino

A partir de dosis de inseminación de cerdos de fertilidad probada provenientes del Centro de Inseminación La Esperanza - CEFUSA (Pliego, Murcia, España), se obtuvieron las muestras de espermatozoides necesarias.

Para la selección de los espermatozoides, primeramente se descartó el sobrenadante y se depositó 0.5 ml de muestra seminal en un tubo Falcon sobre un gradiente de densidad Percoll (GE Healthcare, Piscataway, EEUU) de 90% y 45% (Parrish *et al.*, 1995). El gradiente al 45% se obtuvo a partir de la dilución 1:1 de la solución de 90% con Beltsville Thawing Solution (BTS) precalentado a 37°C (**Tablas A2 y A3**, respectivamente). A continuación, la muestra se centrifugó a 700g durante 30 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Heraeus modelo Labofuge 400e (Heraeus Holding, Hanau, Alemania). Posteriormente se descartó el sobrenadante, quedando como precipitado los espermatozoides que fueron capaces de atravesar el gradiente de densidad. A continuación, se capacitaron los espermatozoides al resuspender el anterior precipitado en medio TALP (**Tabla A4**), el cual se utiliza además para la FIV. La muestra se volvió a centrifugar a 700g durante 10 minutos en la misma centrífuga Heraeus. La concentración espermática final se calculó mediante un analizador automático Spermacue (Minitüb-Ibérica, Tarragona, España) y finalmente la concentración espermática se ajustó para su uso en FIV.

### **4.2.5 Fecundación *in vitro* porcina en presencia de proteínas oviductales**

#### **4.2.5.1 Fecundación *in vitro* en presencia de haptoglobina**

Los CCOs madurados *in vitro* (MIV) fueron decumulados 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 250  $\mu$ l de medio TALP.

A la microgota de 250  $\mu$ l de TALP que contenía los ovocitos MIV se le añadió la proteína Hp purificada del suero porcino (Purified Pig Haptoglobin protein. HGLB12-N-25. Alfa Diagnostic Internacional, San Antonio, EEUU) a una concentración de 100  $\mu$ g/ml. A continuación, se añadieron 250  $\mu$ l de la solución que contenía los espermatozoides madurados de forma similar a la anteriormente descrita. Quedaba así un volumen final de 500  $\mu$ l, una concentración final de inseminación de 12.500 espermatozoides/ml y una concentración de la proteína Hp purificada del suero de 10  $\mu$ g/ml en el pocillo de FIV.

También se procedió a incubar ovocitos porcinos MIV en grupos de 50 en microgotas en 250  $\mu$ l de TALP sin presencia de proteína purificada Hp, actuando estos

como control. Todo ello se realizó en unas condiciones controladas de 38.5 °C bajo 5% CO<sub>2</sub> y al 95% de humedad.

Dieciocho horas más tarde, los cigotos putativos fueron suavemente pipeteados para eliminar los espermatozoides débilmente adheridos a la ZP y fueron lavados en PBS. Posteriormente fueron fijados y teñidos para evaluar los resultados de la FIV como se describe más adelante.

#### **4.2.5.2 Fecundación *in vitro* en presencia de lactadherina**

##### **4.2.5.2.1 Incubación de ovocitos con lactadherina y fecundación *in vitro***

Los CCOs se MIV y fueron decumulados de forma similar a la descrita anteriormente y depositados 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 50 µl de medio TALP.

A la microgota de 50 µl de TALP que contenía los ovocitos MIV se le añadió la proteína recombinante lactadherina (Recombinant Human MFG-E8/Lactadherin, Sino-Biological Inc. Beijing Shi, China) a una concentración de 100 µg/ml para su incubación previa a la FIV. Esta se realizó durante 60 minutos a 38.5 °C.

Tras la incubación, se añadieron 450 µl de la solución que contenía los espermatozoides a la gota de incubación de 50 µl que contenía los ovocitos MIV, quedando un volumen final de 500 µl, una concentración final de inseminación de 12.500 espermatozoides/ml y una concentración de la proteína recombinante de 10 µg/ml en el pocillo de FIV. También se procedió a incubar ovocitos porcinos MIV en grupos de 50 en microgotas en 50 µl de TALP sin presencia de proteína recombinante, actuando estos como control. La incubación se realizó durante 60 minutos a 38.5°C. Todo ello se realizó en unas condiciones controladas de 38.5°C bajo 5% CO<sub>2</sub> y al 95% de humedad.

Dieciocho horas más tarde, los cigotos putativos fueron suavemente pipeteados para eliminar los espermatozoides débilmente adheridos a la ZP y fueron lavados en PBS. Posteriormente fueron fijados y teñidos para evaluar los resultados de la FIV como se describe más adelante.

##### **4.2.5.2.2 Incubación de espermatozoides con lactadherina y fecundación *in vitro***

Se capacitaron de igual manera las muestras de espermatozoides y se ajustó la concentración de espermatozoides a 12500 spz/ml en 250µl. A continuación, se añadió la

proteína recombinante lactadherina a la suspensión de espermatozoides a una concentración de 20 µg/ml. Se incubó durante 15 minutos a 38.5°C, con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad relativa. También se seleccionaron grupos de ovocitos MIV tratados de forma similar a la anteriormente citada. Se dispusieron en pocillos en grupos de 50 con 250 µl de TALP. A continuación, se procedió a la inseminación de los ovocitos con estos 250 µl de espermatozoides incubados previamente con lactadherina, habiendo un volumen final de 500µl y una concentración de la proteína lactadherina de 10 µg/ml en el pocillo de FIV.

### 4.2.5.3 Evaluación de la fecundación *in vitro*

Para la evaluación de la FIV se fijaron y tiñeron los ovocitos fecundados/cigotos de la siguiente forma: en primer lugar, los cigotos putativos se transfirieron a una placa de pocillos que contenía una mezcla de glutaraldehído al 0.5 % (Serva, Heidelberg, Alemania) para fijarlos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en PBS, y se transfirieron a 500 µl de solución colorante bisbencimida al 1% (Hoechst 33342, Sigma-Aldrich, Madrid, España) en PBS para incubarse en oscuridad a 4°C durante 15 minutos.

A continuación, se lavaron de nuevo los ovocitos en PBS durante 5 minutos para eliminar el exceso de colorante. Se colocó sobre un portaobjetos una gotita de medio de montaje (PBS: glicerol (Sigma 5150, Madrid, España): Hoechst stock, en proporción 1:1:1) y se transfirieron los ovocitos dentro de la gota. Esta se cubrió cuidadosamente con un cubreobjetos y finalmente se selló la preparación con laca de uñas. Las muestras se guardaron a 4°C y en oscuridad para que no perdieran la fluorescencia hasta el momento de su evaluación bajo el microscopio de epifluorescencia Leica, modelo DMLS (Barcelona, España).

Para su evaluación se determinó:

- Penetración (Porcentaje de ovocitos penetrados): el número de ovocitos, por cada 100 ovocitos maduros en metafase II, que presenta al menos un espermatozoide en el interior del ooplasma.
- Monospermia (Porcentaje de monospermia): el número de ovocitos, por cada 100 ovocitos penetrados, que posee un único espermatozoide (en forma descondensada o de pronúcleo) en el citoplasma ovocitario.

- Espermatozoides/ovocito: el número medio de espermatozoides que penetran un ovocito.
- Espermatozoides/ZP: el número medio de espermatozoides adheridos a la ZP del ovocito tras el lavado.
- Pronúcleos: el número medio de pronúcleos formados tras la fecundación.

#### 4.2.5.4 Análisis estadísticos de la fecundación *in vitro*

Se analizaron los datos obtenidos de la FIV con la incubación de las proteínas Hp y lactadherina 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 a  $p < 0.05$  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. Las variables de los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar (SEM).

### 4.3 Obtención de muestras y análisis para biología molecular

#### 4.3.1 Obtención de ARN total de oviducto y útero porcino

Las muestras fueron obtenidas tal y como se especifica en el apartado 4.2.3.

Mediante el kit RNAqueous (Ambion, Huntigton, Reino Unido) y siguiendo las recomendaciones del fabricante, obtuvimos ARN total de diferentes cerdas de la región de la **ampolla** para el análisis de diferentes fases del ciclo estral: folicular temprana (n=4), folicular tardía (n=5), luteal temprana (n=5), luteal tardía (n=7). Se extrajo además muestras de **istmo** de diferentes cerdas en las mismas fases: folicular temprana (n=3), folicular tardía (n=5), luteal temprana (n=5), luteal tardía (n=5). Se obtuvieron también muestras de la **unión ampular-ístmica** en diferentes fases: prepúberes (n=4), folicular tardía (n=4), luteal temprana (n=4), luteal tardía (n=4), además de ARN total de útero de 3 cerdas distintas. A continuación, se describe de manera resumida el proceso. En un primer paso, se disgregaron los tejidos en una solución de tiocianato de guanidinio, el cual actúa como un potente agente caotrópico que lisa las células e inactiva las ribonucleasas endógenas. Después se diluye el lisado en una solución de etanol, para favorecer la unión del ARN a la membrana a la que se transfiere a continuación. Se

realizan tres lavados donde se eliminan las proteínas, ADN y otros contaminantes del lisado obtenido. Finalmente se obtiene el ARN unido a la membrana mediante una elución final con agua para biología molecular libre de RNasas, y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### **4.3.2 Síntesis *in vitro* de ADN complementario de oviducto y útero porcino**

La síntesis *in vitro* de ADNc a partir de ARN total de oviducto y útero de las diferentes cerdas se realizó mediante el uso del kit QuantiTec Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante y como se describe brevemente a continuación.

La cantidad de ARN total de partida fue de microgramo. El procedimiento llevado a cabo consistió en la desnaturalización del ARN molde, durante 2 minutos a  $42^{\circ}\text{C}$  tras añadirle el tampón correspondiente. A continuación, la muestra se enfrió durante un minuto en hielo y se añadió el volumen necesario de tampón y de enzima retrotranscriptasa (a las concentraciones recomendadas por el fabricante) hasta completar 20  $\mu\text{l}$ . La síntesis de ADNc tuvo lugar a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, y posteriormente se incubaron las muestras a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos para desnaturalizar la enzima. El ADN se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior.

#### **4.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos que utiliza polimerasas termoestables donde un ADN o ADNc molde es amplificado millones de veces. Esto permite aislar el gen de interés del resto de secuencias génicas a la vez que se genera suficiente cantidad de material para poder realizar análisis experimentales posteriores (Mullis, 1990).

Para poder aplicar la metodología de PCR al estudio de la expresión de ARN, la muestra ha de ser “retrotranscrita” a ADNc, proporcionando así el sustrato o molde que la polimerasa va a amplificar, lo cual se denomina PCR mediante retrotranscripción (RT-PCR).

Se utilizó esta técnica para amplificar fragmentos del ADNc obtenido a partir del ARN extraído de las diferentes partes del oviducto y útero porcino. El objetivo era

determinar la expresión de Hp y de lactadherina, en base a las secuencias registradas en Pubmed (NM\_214000 y NM\_001122984 respectivamente) y utilizar también como control su expresión en el útero porcino tal y como estaba descrito previamente (Ensslin *et al.*, 1998). El diseño de cebadores se realizó teniendo en cuenta que su longitud fuera de 18 a 25 nucleótidos, un contenido de G y C de 40-60%, una o dos G o C en el extremo 5', que la diferencia de temperatura melting o de fusión (Tm) de los dos cebadores usados no fuese mayor a 5°C (**Tabla 4**). El cálculo de Tm se hizo mediante la siguiente formula:

$$Tm (^{\circ}C) = 2(A+T) + 4(C+G)$$

Como control positivo de la amplificación, se emplearon cebadores diseñados a partir de la secuencia de genes de referencia de expresión estable (housekeeping) como el gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el gen Actina de la especie *Sus Scrofa*. Los cebadores necesarios para realizar todas las amplificaciones por RT-PCR de este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (Madrid, España).

**Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de lactadherina y GAPDH.** En las diferentes columnas podemos ver: nombre del cebador (primera columna), número de pares de bases (**pb**) y si el cebador es directo (**d**) o reverso (**r**) (segunda columna), secuencia en dirección 5' → 3' (tercera columna) y la temperatura de fusión o de melting del cebador (Tm) (última columna)

Nombre	Pb (d/r)	Secuencia	Tm (°C)
PIG-MFGE8-FW2	20 (d)	CAGTCCAACAGTGCCTCTGA	62
PIG-MFGE8-RV1	20 (r)	GGTCAGGAAAGGCGTCTCAA	62
PIG-GAPDH-FW1	20 (d)	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	62
PIG-GAPDH-RV1	20 (r)	AAGCAGGGATGATGTTCTGG	60

Las condiciones empleadas para las amplificaciones por RT-PCR a partir de ADNc fueron las mismas para todos los casos: 2 µl del ADNc, 2.5 µl de cada cebador (10 µM), 5 µl de tampón, 10 µl de Betaina (Betaine Solution 5M, Sigma-Aldrich, EEUU) 1 µl de cada dNTP (10 mM) y 0.5 µl de Dream Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific, EEUU), H<sub>2</sub>O estéril libre de ADNasas y ARNasas hasta completar un volumen final de 50 µL. Las amplificaciones por RT-PCR se llevaron a cabo en el termociclador Mastercycler personal Thermal Cycler (Eppendorf, Foster City, CA, EEUU). Se aplicó una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C. El programa de amplificación consistió

en 30 ciclos y, una vez completados, una extensión final de 15 minutos a 72°C. Cada uno de los 30 ciclos constó de tres pasos (Tabla 5).

**Tabla 5. Condiciones del termociclador usando la enzima Dream Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, EEUU).** Se muestran los distintos pasos realizados, con el número de ciclos, la temperatura y el tiempo.

Pasos	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	1	95	3
Desnaturalización	30	95	1
Alineamiento		Tm	1
Extensión		72	1.5
Extensión final	1	72	15

#### 4.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización del producto amplificado en cada reacción de RT-PCR, se tomaron 4 µl de cada reacción, se añadió 2 µl de tampón de carga 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU) y 6 µl de agua de biología molecular. La mezcla se aplicó en geles de agarosa (Sigma-Aldrich, EEUU) a una concentración del 1.5 %. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de recorrido TAE (Tris Acetate-EDTA buffer, Sigma-Aldrich, EEUU) a 100 voltios, a temperatura ambiente y en soporte horizontal.

El resultado se visualizó añadiendo previamente al gel de agarosa 1,5 µl de GelRed (Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X; Biotium, Hayward, EEUU). Posteriormente los fragmentos se observaron mediante fluorescencia ultravioleta en un transiluminador AlphaImager Mini (Cell Biosciences, Heidelberg, Alemania) y la imagen se obtuvo por medio del software AlphaSnap.

El resto del volumen del producto de cada RT-PCR se purificó con el kit DNA Clean and concentrator-5 (Zymo Research, Irvine, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizó para la posterior secuenciación de los amplicones.

#### 4.3.5 Secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados

La identidad de los productos amplificados se confirmó mediante la secuenciación automática de ambas cadenas, realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Las secuencias fueron comprobadas mediante su alineamiento automático, utilizando el software Chromas Lite versión 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd, Queensland, Australia) junto con la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en la página web del NCBI.

#### 4.3.6 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real o cuantitativa es una variación de la RT-PCR que permite una amplificación y detección simultánea de la cantidad de producto amplificado en cada reacción. Para ello se le acopla a la PCR una señal fluorescente (SYBR green I) cuya emisión será proporcional a la cantidad de producto. El análisis se realiza mediante un software que representa esta fluorescencia en una gráfica que refleja la cinética de la reacción.

La emisión de fluorescencia del SYBR green I es detectada por el sistema al final de la fase de elongación en cada uno de los ciclos de PCR y finalmente se recogen los valores Ct (threshold cycle) que son inversamente proporcionales a la concentración inicial de ADN de la muestra. Los valores de Ct de las muestras de análisis de mensajeros, se normalizaron con respecto a un gen housekeeping que en nuestro caso fue GAPDH para el análisis de lactadherina y el gen de Actina para el análisis de Hp.

Los niveles de expresión relativa de cada gen en el oviducto de cerda se determinaron usando cebadores específicos para lactadherina, Hp, GAPDH y Actina (**Tabla 6**). La RT-PCR en tiempo real se completó en el sistema informático de PCR en tiempo real 7500 (Life Technologies, EEUU.) utilizando un Mix con SYBR Green (Power SYBR Green PCR Master Mix). Se realizó un ciclo inicial de 95°C durante 10 minutos. Después, se siguieron cuarenta ciclos de PCR (95°C durante 15 seg, 60°C durante 1 minuto). Los valores de Cts se obtuvieron del 7500 Software v2.0.6. La contaminación del ADN genómico se evitó utilizando un tratamiento previo de ADNasas y mediante el diseño de cebadores con su secuencia interrumpida por regiones intrónicas.

**Tabla 6. Cebadores utilizados para el análisis de expresión de Hp y lactadherina mediante RT-PCR en tiempo real.** En las diferentes columnas podemos ver: nombre del cebador (primera columna), número de pares de bases (**pb**), si el cebador es directo (**d**) o reverso (**r**) (segunda columna), secuencia en dirección 5' → 3' (tercera columna) y la temperatura de fusión o de melting del cebador (**Tm**) (última columna).

Nombre	Pb (d/r)	Secuencia	Tm (°C)
Lactadh_qPCR-FW	21 (d)	GCAACGAGACTGAGAAAGGTC	64
Lactadh_qPCR-RV	22 (r)	GCAAACCCATGAAACCCAAGTG	66
HP_qPCR-FW	21 (d)	GAGGCATAAAAGCAGGTGCAG	64
HP_qPCR-RV	22 (r)	GCTGTCATCTGTGGCATCTGTG	64
GAPDH_FW	20 (d)	TGTCCCCACCCCAACGTGT	66
GAPDH_RV	20 (r)	GAGGGCAATGCCAGCCCCAG	66
B-ACTINA_FW	20 (d)	CTGGCGCCCAGCACGATGAA	66
B-ACTINA_RV	20 (r)	GACGATGGAGGGGCCGGACT	66

#### 4.3.6.1 Análisis estadísticos de la amplificación por RT-PCR en tiempo real

Los datos obtenidos para la evaluación de la expresión génica (Hp y lactadherina) mediante RT-PCR en tiempo real en las diferentes fases del ciclo estral se examinaron en primer lugar utilizando una prueba para evaluar la distribución de la normalidad (Test de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Test de Levene). En las muestras que presentaban una distribución y homogeneidad de varianzas normal, se realizó a una ANOVA de una vía. Cuando las muestras no cumplían el requisito de normalidad y homogeneidad de varianzas, los datos se analizaron a través de una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor  $p < 0.05$ .

#### 4.3.7 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteína de las muestras de FO se determinó utilizando el método colorimétrico Bradford (Bradford Reagent, B6916, Sigma-Aldrich, SanLouis, EEUU), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este reactivo contiene el colorante

Coomassie Brilliant Blue G-250, el cual se fija a las proteínas en solución y provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm.

La detección colorimétrica de las muestras se midió en un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) a 595 nm de longitud de onda. Los resultados se analizaron en el software Origin versión 5.0. Se realizó una recta patrón de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (Albumin Protein standard, P0914, Sigma-Aldrich, SanLouis, EEUU).

### **4.3.8 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 4-20 % de poliacrilamida de 1 mm (Novex, WedgeWell 4-20% Tris-Glycine Gel. Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). La cantidad de FO que se cargó en cada calle fue entre 0.3-30  $\mu$ g de proteína. Las muestras fueron preparadas en el tampón de carga para electroforesis SDS Sample Buffer (4X) (Novagen. Madison, EEUU). Posteriormente fueron incubadas en un termobloque a 95°C durante 10 minutos 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 200V durante 50 minutos.

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

### **4.3.9 Tinción con azul de coomassie**

A continuación del SDS-PAGE, algunos de los geles se sumergieron en una tinción con azul de coomassie (PageBlue Protein Stainig, Thermo Scientific. Rockford, IL, EEUU) durante 1h en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a lavar los geles con agua ultrapura durante 2h en agitación y a temperatura ambiente, cambiando el agua siempre que fuera necesario. Finalmente se recortaron y analizaron las

bandas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS/MS) para la identificación las proteínas estudiadas tal y como se detalla más adelante.

#### **4.3.10 Western-blot**

##### **4.3.10.1 Transferencia a membrana**

La transferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF (Millipore, Billerica, EUA) se realizó mediante un sistema de transferencia húmedo, según las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron activadas con metanol durante 30 segundos, lavadas en agua y mantenidas en tampón de transferencia (**Tabla A6**). Las condiciones de transferencia fueron 30 voltios durante 60 minutos.

Posteriormente las membranas fueron bloqueadas durante 60 minutos a temperatura ambiente con una solución tamponada de Tris con 0.05 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (TBST) (**Tabla A7**) que contenía un 1 % de BSA.

##### **4.3.10.2 Inmunodetección en membrana**

La membrana bloqueada se incubó con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso (**Tabla A8**), diluido en TBST 1 % BSA y mantenido durante toda la noche a 4°C en agitación. A continuación, se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con TBST antes de incubarse con el correspondiente anticuerpo secundario (**Tabla A8**) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

Finalmente, la visualización de las bandas se llevó a cabo mediante incubación durante 5 minutos de la membrana con el reactivo Pierce ECL Western-blotting Substrate (Polysciences, Eppelheim, Alemania) y su posterior revelado en el equipo ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Buckinghamshire, Reino Unido) del SAI de la Universidad de Murcia. Las imágenes se obtuvieron con el software ImageQuant (GE Healthcare Buckinghamshire, Reino Unido).

La detección de Hp mediante SDS-PAGE y el posterior Western-Blot se realizó en seis grupos de muestras diferentes de FOP para la fase folicular tardía y en tres grupos de muestras distintas para la fase luteal tardía. Cada grupo de muestras lo constituían de 8-10 oviductos de diferentes cerdas. En el caso de la detección de lactadherina en FOP se

realizó en cuatro grupos de muestras diferentes de cada una de las fases del ciclo estudiadas (folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía).

#### **4.4 Inmunohistoquímica para microscopia óptica**

##### **4.4.1 Fijación de las muestras**

Se seleccionaron oviductos de tres cerdas distintas tanto en para la fase folicular tardía como luteal tardía. Se seleccionaron fragmentos de la ampolla y del istmo de cada cerda. Los tejidos tubulares fueron cortados en trozos pequeños e introducidos en PBS con un 4% de formaldehído. Éstas se conservaron a temperatura ambiente toda la noche y posteriormente fueron sumergidas en PBS y mantenidas a 4°C hasta su procesamiento.

##### **4.4.2 Inclusión de tejidos en bloques de parafina**

La inclusión de los tejidos se llevó a cabo de forma automática en un Histoquinete (Shandon Citadel-1000. Thermo Scientific, EEUU), donde los tejidos se deshidrataron gradualmente con etanol desde un 50% hasta llegar al 100% y el medio de aclaramiento de los tejidos se realizó con tolueno. La inclusión se hizo en Paraplast Plus (P3683, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y a continuación los tejidos se montaron en moldes para formar los bloques. Una vez secos, los bloques de parafina fueron cortados (5µm) con un micrótopo de rotación Microm HM 310 (Microm International GmgH, Walldorf, Alemania) y montados en portaobjetos de cristal Superfrost Plus (Thermo Scientific, Menzel, Braunschweig, Alemania).

##### **4.4.3 Inmunohistoquímica en portaobjetos**

Las muestras de tejido colocadas sobre los portaobjetos fueron desparafinadas en xilol y a continuación rehidratadas en soluciones decrecientes de alcoholes.

Los portaobjetos fueron sumergidos en tampón de citrato (Citrato Buffer Antigen Retriever pH 6.0, C9999 Sigma-Aldrich, Madrid, España) y llevados a ebullición en una olla a presión. Esta técnica mejora la accesibilidad de los anticuerpos frente a antígenos

tisulares que quedan enmascarados tras la fijación y su posterior inclusión en parafina. A continuación, se retiró la olla de la fuente de calor y se mantuvo cerrada durante 10 minutos más y se bajó gradualmente la temperatura antes de sacar las muestras de la solución. Posteriormente, los portaobjetos fueron bloqueados con una solución tamponada de TBST durante 5 minutos a temperatura ambiente.

El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó al sumergir los portaobjetos en una solución con un 98% de metanol y un 2% de peróxido de hidrógeno al 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 20 minutos. Posteriormente los portaobjetos se lavaron 3 veces con TBST se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente a en una solución de TBST y de BSA al 6% para eliminar los posibles sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos.

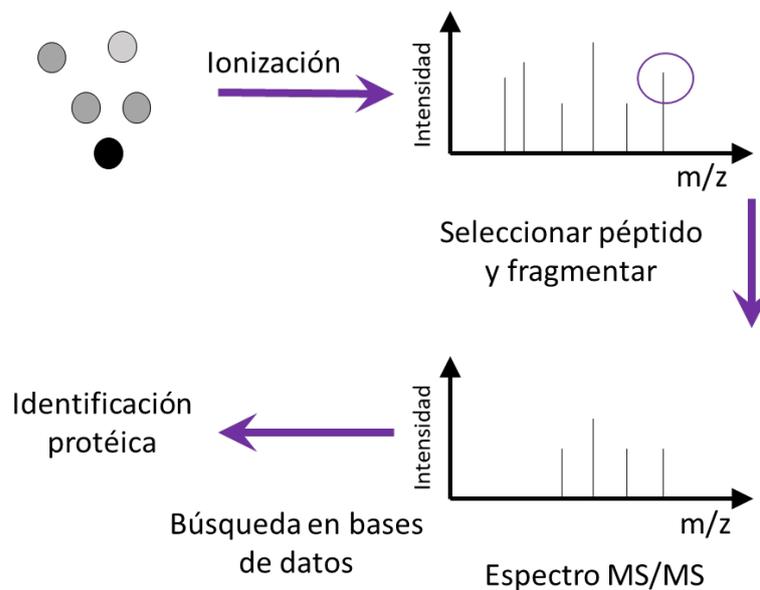
La incubación con el anticuerpo primario (**Tabla A8**), diluido en TBST, se realizó en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Después las muestras se lavaron tres veces con TBST y se procedió a la incubación con anticuerpos secundarios HRP (**Tabla A8**), diluidos también en TBST, durante 1h a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados con TBST y se procedió al revelado. Para ello se utilizó como sustrato la 3.3-diaminobencidina (DAB) (DAB Kit, Abcam Plc, Cambridge, Reino Unido), que al oxidarse por la hidrólisis del agua oxigenada añadida al tampón forma un producto marrón insoluble. El contraste se realizó con hematoxilina durante 2-3 segundos, realizándose a continuación la deshidratación con alcoholes y aclaramiento en xilol. Después se montaron con un medio de montaje anhidro (DPX) (BDH Prolabo, VWR International Ltd., Leicestershire, UK) para su posterior visualización. Los controles se realizaron con el mismo protocolo, pero omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. La visualización fue realizada en microscopio óptico Nikon Eclipse de campo claro y las imágenes capturadas con un microscopio Leica DMRB con cámara digital acoplada (Leica DC 500).

La cuantificación inmunohistoquímica se realizó con el programa Leica QWin Pro. Cada píxel de la imagen digital consistía en un número entre 0 (blanco) y 255 (negro) que representa la intensidad de la luz transmitida o el nivel de gris en un punto. El nivel de gris se relacionó con el contenido de proteína (el más oscuro correspondió al mayor contenido de proteína). De todos los cortes incubados con anticuerpos, se seleccionaron para la cuantificación un total de 14 imágenes para cada fase de tres animales diferentes (folicular tardía y luteal tardía), así como otras 7 imágenes de cada fase como control (sin incubación de anticuerpo primario).

#### 4.5 Análisis proteómico de fluido oviductal mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Proteómica de la Sección de Biología Molecular del SAI de la Universidad de Murcia. La detección e identificación de péptidos de Hp y lactadherina en las muestras de FOP se realizó mediante HPLC-ESI-MS/MS (**Fig. 13**). Esta técnica nos permite identificar las proteínas presentes en una mezcla proteica compleja, mediante la identificación de péptidos obtenidos por digestión dirigida con tripsina a partir de la comparación con bases de datos existentes. Para ello se utilizaron dos tipos de muestras. Por un lado, se analizaron las bandas recortadas del gel de electroforesis de poliacrilamida teñido con azul de coomassie. Fueron bandas de  $\approx 10$  kDa,  $\approx 22$  kDa,  $\approx 45$  kDa,  $\approx 55$  kDa,  $\approx 70$  kDa para Hp; junto con bandas de  $\approx 45$  kDa  $\approx 50$  kDa para lactadherina, según el peso esperado de nuestras proteínas y lo observado mediante Western-blot. Por otro lado, también se analizó el FO completo en diferentes fases del ciclo estral.

La detección e identificación de péptidos se realizó mediante una digestión de la muestra con tripsina. Esta enzima produce fragmentos peptídicos al cortar después de arginina/lisina (Arg/Lys) si no hay prolina (Pro) antes, y estos fragmentos se detectan de forma específica. A continuación, se detallan estos procedimientos.



**Figura 13. Método de identificación proteica mediante espectrometría de masas a través de la fragmentación peptídica con tripsina.**

#### 4.5.1 Digestión de fluido oviductal con tripsina

Las muestras fueron diluidas en 100  $\mu$ l de tampón de bicarbonato de amonio 50 mM pH 8.5 con ProteaseMax al 0.01% (Promega, MI, EEUU). Este compuesto (ProteaseMax) es un surfactante que mejora la eficiencia de digestión de la tripsina. A continuación, las muestras se redujeron mediante la adición de 20 mM ditioneitol (DTT) a 56 °C durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras fueron bloqueadas añadiendo iodoacetamida 100 mM e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se realizó la digestión de las muestras añadiendo 1  $\mu$ g de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade (V5280), Promega, EEUU) durante 3h a 37 °C. La reacción se detuvo con ácido fórmico al 0.1% y se filtró a través de 0.2  $\mu$ m. Finalmente, las muestras se secaron usando un Concentrador de Vacío Eppendorf modelo 5301 (Alemania).

#### 4.5.2 Digestión del gel de electroforesis con tripsina

Después de la electroforesis y análisis de las imágenes, las bandas seleccionadas se recortaron en partes de aproximadamente 2 x 2 mm y se destiñeron. A continuación, las bandas se lavaron dos veces con agua destilada MilliQ y otras dos veces con tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8,5 en acetonitrilo al 50% durante 30 minutos a 37°C. Después de retirar el sobrenadante, las bandas se secaron durante 15 minutos usando un evaporador de vacío Eppendorf 5301. A continuación, se incubaron con 100  $\mu$ l de tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8.5 con DTT 20 mM a 56 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se retiró y las muestras se bloquearon añadiendo 100  $\mu$ l de tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8.5 con iodoacetamida 100 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. El sobrenadante se retiró de nuevo y los fragmentos de gel se lavaron primero con tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8.5 y luego con tampón de bicarbonato de amonio 25 mM pH 8.5 en acetonitrilo al 50% durante 15 minutos a 37°C cada vez. Después del lavado, los fragmentos de gel se secaron de nuevo y luego se incubaron con 50  $\mu$ l de tampón de bicarbonato de amonio 25 mM, pH 8.5 que contenía 0.5  $\mu$ g de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade (V5280), Promega, EEUU) y 0.01% de ProteaseMax (Promega Corporation, MI, EE.UU.) durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, las muestras fueron sometidas a digestión durante al menos 3 h a 37°C. El sobrenadante se recogió en un nuevo tubo y los fragmentos de gel se

lavarón con 100 µl de una solución que contenía acetonitrilo al 50% y trifluoroacético (TFA) al 0.5% y luego con 100 µl de acetonitrilo y TFA al 0.5% durante 30 minutos a 37°C cada vez. Estos lavados aumentaron la extracción de fragmentos digeridos de los fragmentos de gel y ambos sobrenadantes después del lavado se recogieron en el mismo tubo y se secaron usando el evaporador de vacío.

#### 4.5.3 Separación y análisis de las muestras digeridas con tripsina

La separación y análisis de las digestiones trípticas de las muestras se llevó a cabo mediante HPLC-ESI-MS/MS. Para ello, se utilizó un sistema que consiste en un HPLC modelo Serie 1290 Infinity-II de Agilent (Agilent Technologies, EEUU), termostatzado y equipado con un muestreador automático y una bomba de alta velocidad. Este HPLC se conectó a un espectrómetro de masas tipo Q-TOF modelo Agilent 6550 con i-Funnel (Agilent Technologies, EEUU) usando una interfaz electrospray dual tipo Agilent Jet Stream.

Las muestras anteriormente digeridas y evaporadas (tanto de origen soluble como de fragmentos de gel) fueron resuspendidas en 20 µl de tampón A que consistió en una mezcla de agua/acetonitrilo/ácido fórmico (94.9:5:0.1). La muestra fue inyectada en una columna de HPLC para separación y análisis de péptidos tipo Waters XBridge BEH C18 HPLC column (5 µm, 150 × 1 mm, Waters Corporation, EEUU), la cual se encontraba en un compartimiento termostatzado a 40°C, utilizando un flujo de 10 µl/minuto. Después de la inyección, la columna fue lavada con tampón A y los péptidos digeridos se eluyeron usando un gradiente lineal 0-80% de tampón B en 150 minutos. El tampón B consistió en una mezcla agua/acetonitrilo/ácido fórmico (10:89.9:0.1).

El espectrómetro de masas se empleó en modo positivo, con un voltaje en el capilar de 3500 V y con una velocidad de barrido de 8100 (m/z)/s, en el rango de medida desde 200-2200 m/z. La presión del gas de nebulización se mantuvo en 15 psi, mientras que el gas secante se mantuvo a un flujo de 5 l/minuto y a una temperatura de 350 °C. Los datos de HPLC-ESI-MS/MS fueron recogidos de forma automatizada. Los iones más intensos se fragmentaron secuencialmente mediante una disociación inducida por colisión (CID) usando helio como gas de colisión. Estos iones más intensos se aislaron con una ventana de 2 m/z de anchura y se fragmentaron con una energía relativa de colisión del 35%. El procesamiento de los datos se llevó a cabo en el programa de análisis LC/MSD Trap Data Analysis Versión 3.3 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania) y la búsqueda de

coincidencias se llevó a cabo con el motor Spectrum Mill (Rev A.03.02.060B, Agilent Technologies, EEUU).

Esta comparación se hizo utilizando las bases de datos de NBCI. El criterio de selección y descarte de los péptidos identificados se realiza en base a dos puntuaciones que otorga el software Spectrum Mill. El primero de ellos es básicamente la puntuación en base a la intensidad y precisión de la señal (score) y el segundo tiene que ver con el porcentaje de señales detectadas experimentalmente de cada fragmento peptídico respecto al número de señales teóricas que debería producir (SPI). Los péptidos considerados como aceptables son los que poseen un score mayor a 5.0 y un SPI superior al 60%.

## ***V. Resultados***

---

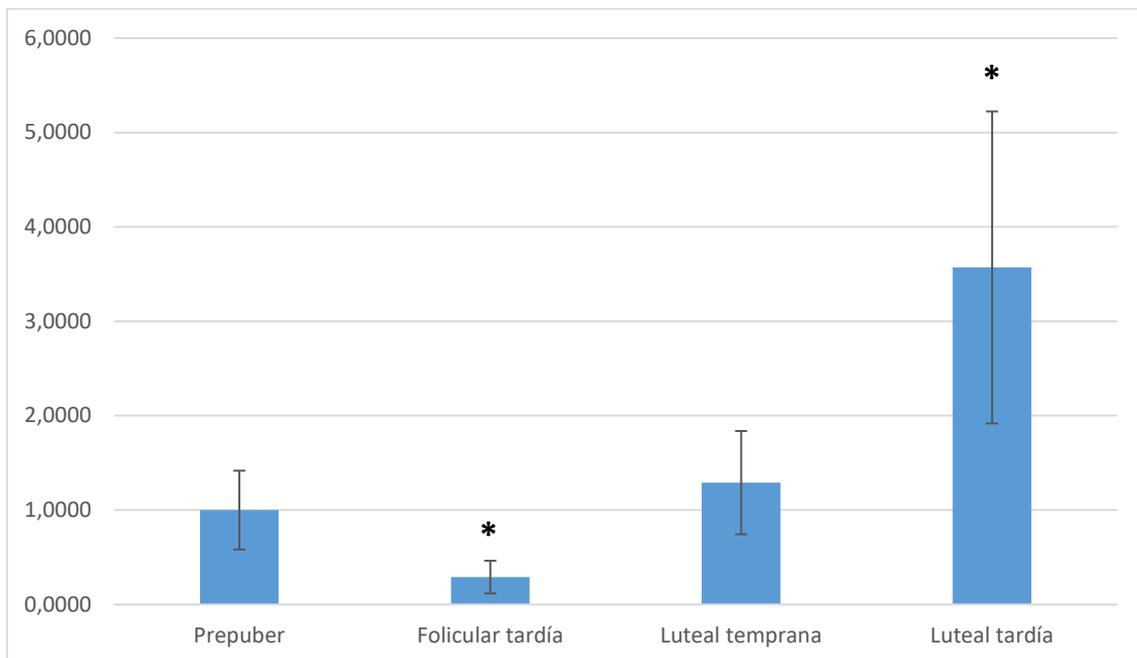


## 5.1 Haptoglobina

### 5.1.1 Abundancia relativa del ARN codificante para haptoglobina en el oviducto porcino

Los niveles de expresión relativa del gen de Hp en la unión ampular-ístmica del oviducto de cerda en diferentes fases del ciclo estral se analizaron mediante RT-PCR en tiempo real, tal y como se ha descrito previamente en el apartado Material y Métodos, detallándose a continuación los resultados obtenidos.

El análisis de los resultados obtenidos muestra que la expresión del ARNm de Hp en el oviducto porcino es continua a lo largo del ciclo estral, encontrando un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la expresión en la fase luteal tardía al compararla con la fase folicular tardía (**Fig. 14**). Esto indica una diferencia clara de expresión entre una fase en la que el oviducto está bajo una influencia predominantemente estrogénica (fase folicular tardía) y una fase de predominio de progesterona (fase luteal tardía).



**Figura 14. Expresión relativa de Hp vs actina en la unión ampular-ístmica en diferentes fases del ciclo estral de la cerda.** La fase prepúber se utiliza como referencia de expresión con valor 1. La fase folicular tardía muestra un marcado descenso respecto a las demás fases, aumentando la expresión en la fase luteal temprana, hasta llegar a la máxima expresión en la fase luteal tardía 3.5 veces más que la fase prepúber. Las diferencias entre las fases estadísticamente significativas se muestran con un asterisco (\*) con  $p = 0.016$ .

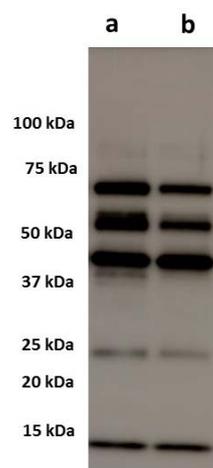
### 5.1.2 Detección de haptoglobina en fluido oviductal porcino

Una vez demostrada la presencia de los transcritos de Hp en el oviducto porcino, nos propusimos estudiar la presencia de esta proteína en el FOP. Para ello, se realizó un análisis proteómico del FOP en las fases del ciclo estral folicular tardía y luteal tardía por ser estas las fases en las que encontrábamos diferencias en el análisis de expresión. También se realizaron ensayos de inmunodetección en estas mismas fases, cuyos resultados se muestran a continuación.

#### 5.1.2.1 Detección de haptoglobina en fluido oviductal porcino mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y Western-blot

En un primer experimento se analizaron las muestras de FOP de las fases del ciclo estral folicular tardía y luteal tardía de manera directa mediante HPLC-ESI-MS/MS. En un principio se detectaron 11 péptidos diferentes en el FOP de la fase folicular tardía. En el análisis del FOP de la fase luteal tardía se detectaron 16 péptidos. Todos estos péptidos presentaban un score superior a 6 y un SPI superior a 60 (**Tabla 7 y Fig. 18**).

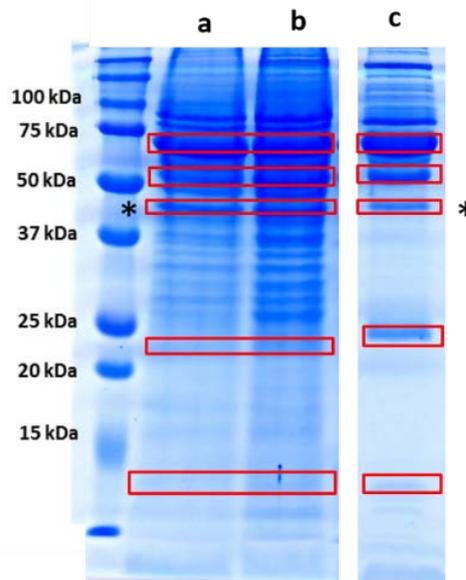
En un siguiente experimento se realizó una electroforesis en un gel SDS-PAGE y posterior Western-blot con FOP en las fases folicular tardía y luteal tardía con la finalidad de localizar y analizar el peso molecular de la proteína Hp. Los resultados de inmunodetección de Hp en el FOP mostraron la detección de cinco bandas con pesos moleculares de  $\approx 10$  kDa,  $\approx 22$  kDa,  $\approx 45$  kDa,  $\approx 55$  kDa,  $\approx 70$  kDa (**Fig. 15**).



**Figura 15. Inmunodetección por Western-Blot de la proteína Hp en membrana en FOP con anticuerpo anti-haptoglobina (1:4000) en dos fases del ciclo estral. Se detectan bandas de  $\approx 10$  kDa,  $\approx 22$  kDa,  $\approx 45$  kDa,  $\approx 55$  kDa,  $\approx 70$  kDa. a) FOP de fase**

folicular tardía (0.3  $\mu\text{g}$  de proteína total de FOP). **b)** FOP de fase luteal tardía (0.3  $\mu\text{g}$  de proteína total de FOP).

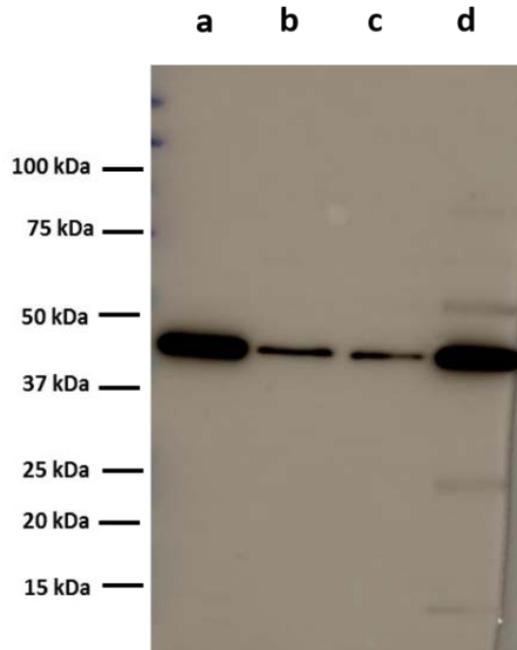
En base a las condiciones reductoras de la electroforesis, el peso esperado de Hp debía estar entre 38-40 kDa. Con el fin de esclarecer cual era la banda exacta donde migraba Hp y si se detectaban bandas inespecíficas, se realizó un segundo experimento en el que se cargaron en un gel SDS-PAGE las mismas muestras de FOP junto con suero sanguíneo porcino como control. A continuación, el gel fue teñido con azul coomassie, se recortaron las bandas cuyo peso coincidía con las detectadas en la membrana del primer experimento y se analizaron mediante HPLC-ESI-MS/MS (**Fig. 16**). En estos análisis solo se detectaron 5 péptidos de la proteína Hp en la banda de  $\approx 45$  kDa, siendo 3 de ellos diferentes entre sí. Todos estos péptidos presentaban un score superior a 6 y un SPI superior a 60. Estos se señalan en la **Tabla 7** con un asterisco (\*). De estos resultados podemos interpretar que la banda específica para Hp es la de 45 kDa, aquella en la que se identifican los péptidos mediante HPLC-ESI-MS/MS.



**Figura 16. Electroforesis en gel SDS-PAGE 12% de FOP y suero sanguíneo porcino teñido con azul coomassie. a)** Fase folicular tardía (50  $\mu\text{g}$ ). **b)** Fase luteal tardía (50  $\mu\text{g}$ ). **c)** Suero sanguíneo porcino (24  $\mu\text{g}$ ). Se recortan y analizan las bandas mediante HPLC-ESI-MS/MS de  $\approx 10$  kDa,  $\approx 22$  kDa,  $\approx 45$  kDa,  $\approx 55$  kDa,  $\approx 70$  kDa, marcadas con un recuadro rojo. Con un asterisco (\*) se muestra la banda donde se detectaron péptidos de Hp.

En un tercer experimento, se realizó una electroforesis con FOP en un gel SDS-PAGE y posterior Western-blot en las mismas condiciones, salvo el tiempo de incubación del anticuerpo primario. En este caso, el anticuerpo primario anti-haptoglobina solo

permaneció en contacto con la membrana durante 10 minutos en comparación con los 60 minutos del ensayo inicial. Como control positivo se utilizó la proteína Hp purificada de suero porcino, con un peso aproximado de  $\approx 45$  kDa, así como suero sanguíneo porcino. El revelado de la membrana mostraba una única banda con un peso  $\approx 45$  kDa. (**Fig. 17**).



**Figura 17. Inmunodetección por Western-Blot de la proteína Hp en membrana en FOP en dos fases del ciclo estral. Incubación con anticuerpo anti-haptoglobina (1:4000) durante 10 minutos. Se detecta una banda de  $\approx 45$  kDa. a) Proteína purificada Hp (0.1  $\mu$ g). b) FOP de fase folicular tardía (0.3  $\mu$ g de proteína total de FOP). c) FOP de fase luteal tardía (0.3  $\mu$ g de proteína total de FOP). d) Suero sanguíneo porcino (0.8  $\mu$ l).**

Estos resultados en conjunto nos mostraban la detección de un total de **17 péptidos diferentes** de la proteína Hp (**Tabla 7**), lo que supone 164aa y un 42.26 % de cobertura de la proteína respecto a la secuencia aminoacídica derivada del gen (NP\_999165) (**Fig. 18**).

**Tabla 7. Péptidos correspondientes a la proteína Hp detectados por HPLC-ESI-MS/MS.** Cuando se detectó el mismo péptido varias veces en la tabla se muestran los datos correspondientes al péptido de mayor score. **z:** representa la carga del ion o fragmento detectado. **m/z:** relación masa/carga (es el valor que directamente detecta el espectrómetro de masas). **Score:** puntuación en base a intensidad de señal. **SPI:** porcentaje de señales detectadas de cada fragmento peptídico respecto al número de señales teóricas que debería producir. **Secuencia:** orden de aparición de aminoácidos en la proteína. **n:** número de veces que se detecta ese péptido. **Fase:** fases del ciclo donde se ha detectado el péptido: folicular tardía (**FT**), luteal tardía (**LT**). Con un asterisco (\*) se marcan los péptidos detectados en la banda recortada del gel teñido con azul de coomassie.

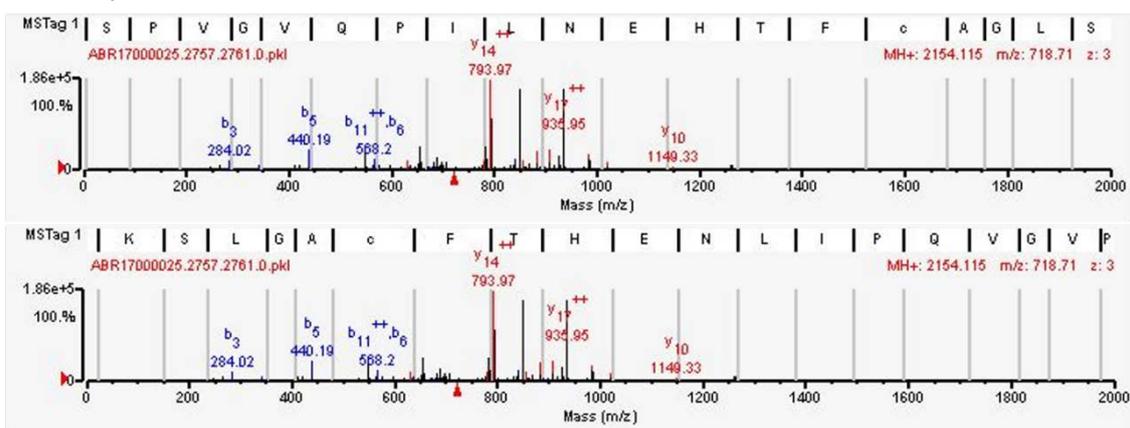
Haptoglobina							
Péptidos	z	Score	SPI	m/z	Secuencia	n	Fase
GYVEHMVR	3	13.64	80.5	3.308	42-49	2	FT/LT
TAGDGVYTLDSNK	2	18.23	96.6	6.708	60-72	2	FT/LT
TAGDGVYTLDSNKQWTNK	3	15.95	85.4	5.666	60-77	2	FT/LT
LPECEAVCGKPK	3	18.49	87.2	4.632	83-94	1	FT
NPVDQVQR	2	9.92	60.2	4.782	95-102	2	FT/LT
GSFPWQAK	2	9.33	69.2	9.551	112-119	1	LT
AKDIAPTLR	2	7.45	100.0	4.927	155-163	1	LT
DIAPTLR	2	7.92	100.0	3.932	157-163	2	FT/LT
KQEVEIEK	3	9.70	82.6	3.348	169-176	2	FT/LT
QEVEIEK	2	13.28	83.7	4.377	170-176	1	LT
VMPICLPSK	2	16.39	85.0	5.227	203-211	1	LT
DYVNVGLVGYVSGWGR	2	17.33	94.1	8.709	212-227	3	FT/LT
YVMLPVADQEK*	2	17.03	92.1	6.547	239-249	2	FT/LT
CVQYYEGSTVPEK	2	14.64	81.3	7.803	250-262	2	FT/LT
SPVGVQPILNEHTFCAGLSK*	3	19.55	94.90	7.187	267-286	4	FT/LT
TAEYGVYVR*	2	16.31	92.4	5.292	324-332	3	FT/LT
VTSILDWIQTTIADN	2	15.71	93.6	8.454	333-347	1	LT

1 MRALGAVVAL LLCGQLFAAE TGNEATDATD DSCPKEPEIP KGYVEHVMVRY HCQTYYKLRIT  
 61 AGDGVYTLDS NKQWTNKVTG EKLPECEAVC GKPKNPVDQV QRIMGGSLDA KGSFPWQAKM  
 121 ISHHNLTSGA TLINEQWLLT TAKNLRLGHK NDTKAKDIAP TLRLYVGGKQ EVEIEKVIHF  
 181 PDNSTVDIGL IKLKQKVPVN ERVMPICLPS KDYVNVGLVG YVSGWGRNAN LNFTEHLKYV  
 241 MLPVADQEK VQYEGSTVP EKKTPKSPVG VQPILNEHTF CAGLSKYQED TCYGDAGSAF  
 301 AVHDKDDDTW YAAGILSFDK SCR~~TAEYGVY~~ VRVTSILDWI QTTIADN

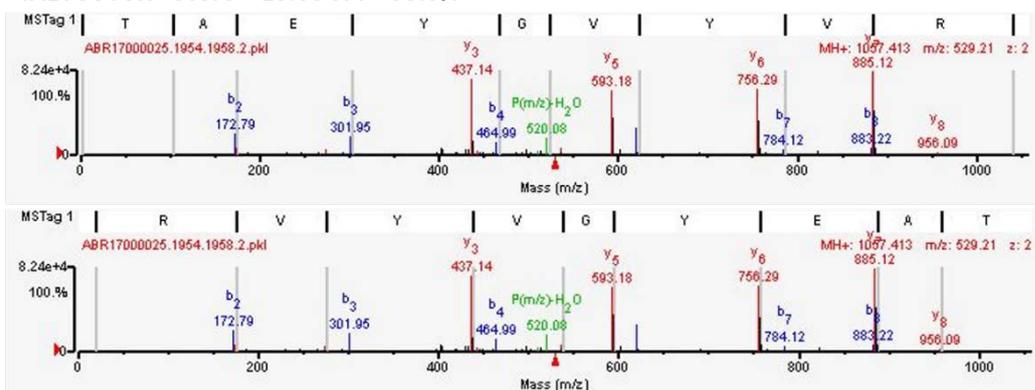
**Figura 18. Péptidos correspondientes a la proteína Hp.** Aparecen subrayados los péptidos detectados mediante HPLC-ESI-MS/MS.

El espectro de masas de algunos péptidos correspondientes a Hp se muestra en la **Figura 19**.

**SPVGVQPILNEHTFcAGLSK- Score = 18.62 SPI = 93.4%**



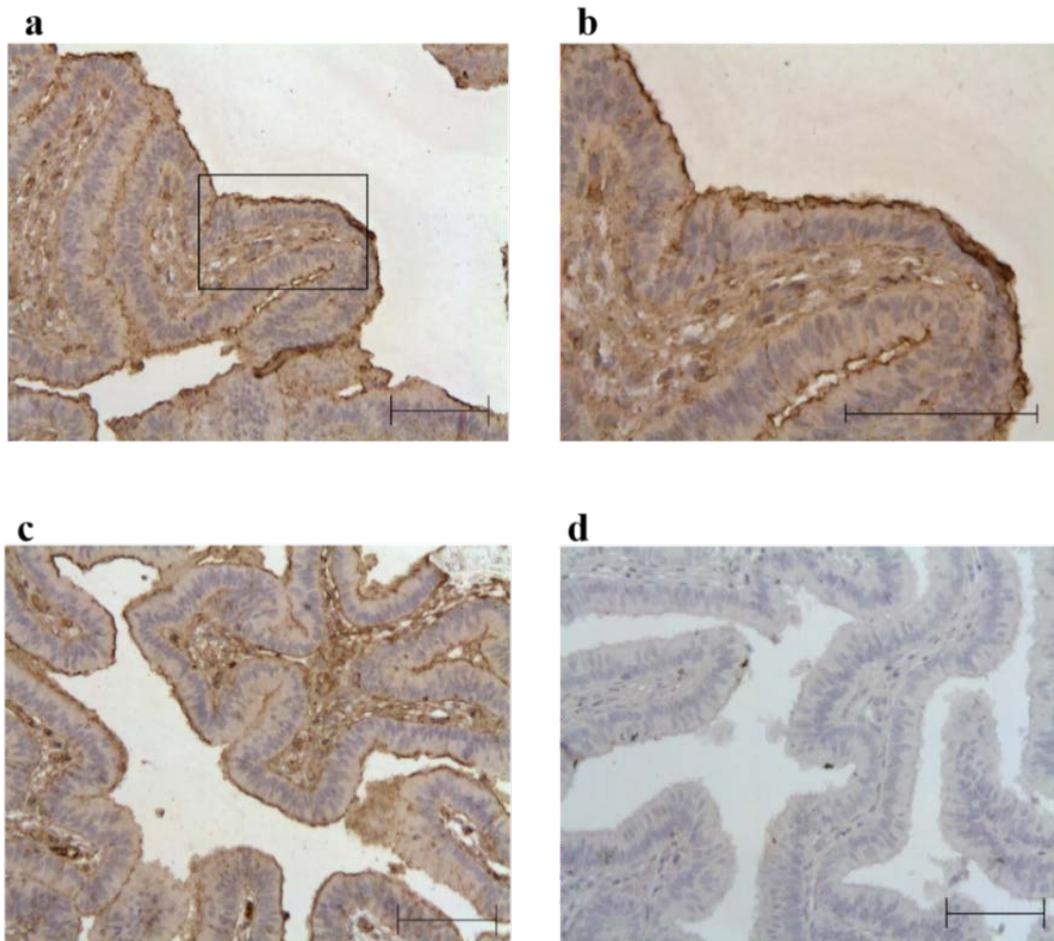
**TAEYGVYVR - Score = 15.66 SPI = 93.0%**



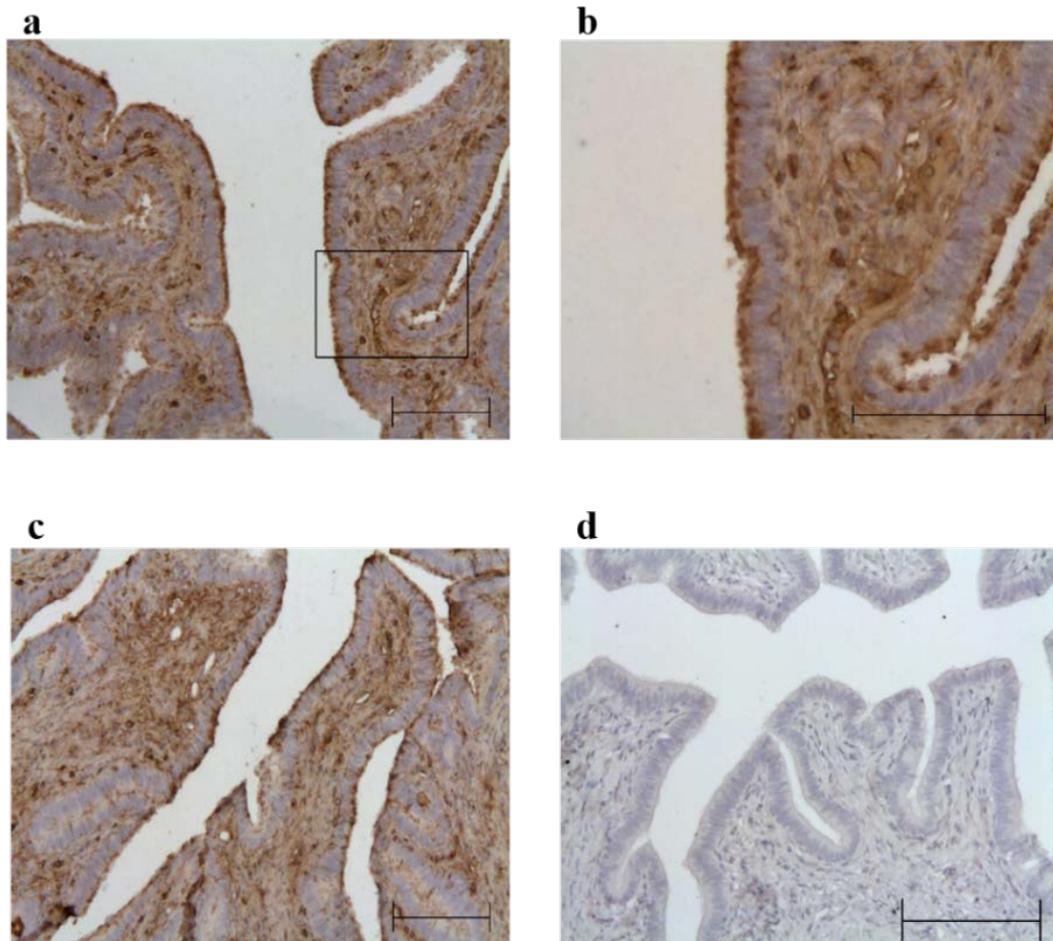
**Figura 19. Espectro de masas de dos péptidos de Hp detectados en FOP.** Espectro de masas del péptido SPVGVQPILNEHTFCAGLSK en panel superior y espectro de masas del péptido TAEYGVYVR en panel inferior. Para cada péptido se muestra el espectro de masas con la secuencia de lectura en ambos sentidos para destacar la identificación de los principales iones detectados de las series “b” e “y”.

### 5.1.3 Detección de haptoglobina en tejido oviductal

Los resultados inmunohistoquímicos para la detección de Hp sobre cortes de tejido oviductal porcino mostraban una reactividad a nivel principalmente de la región apical de las células del epitelio oviductal durante las fases estudiadas: folicular tardía (**Fig. 20**) y luteal tardía (**Fig. 21**).



**Figura 20. Localización inmunohistoquímica de Hp en oviducto porcino en fase folicular tardía.** Se detecta marcaje de Hp a nivel de células epiteliales (tinción intensa). **a)** Sección de istmo. **b)** Imagen a mayor aumento del recuadro marcado en imagen a. **c)** Sección de ampolla. **d)** Control en sección de ampolla (sin anticuerpo primario), donde no se observa tinción. Barra de escala = 100  $\mu$ m.



**Figura 21. Localización inmunohistoquímica de Hp en oviducto porcino en fase luteal tardía.** Se detecta marcaje de Hp a nivel de células epiteliales (tinción intensa). **a)** Sección de ampolla. **b)** Imagen a mayor aumento del recuadro marcado en imagen a. **c)** Sección de istmo. **d)** Control en sección de istmo (sin anticuerpo primario), donde no se observa tinción. Barra de escala = 100  $\mu$ m.

En las muestras analizadas se cuantificó el área reactiva o marcada solo en el epitelio oviductal y el área epitelial total con el programa Leica QWin Pro, tal y como se ha descrito en el apartado 4.4.3 de Material y Métodos. Se evidenció una tinción intensa en el epitelio oviductal en ambas fases (folicular tardía y luteal tardía) respecto al área epitelial total. Esta diferencia confirmó mediante análisis estadístico, el cual mostró diferencias significativas entre cada fase y su control ( $p < 0.05$ ), pero no se observaban al comparar las dos fases entre sí. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

**Tabla 8. Resultados de la cuantificación de la señal inmunohistoquímica de cada muestra obtenidos en presencia o ausencia (grupo control) de anticuerpo primario en fase folicular tardía y luteal tardía.** Diferentes superíndices (<sup>a,b</sup>) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). **N**: número de imágenes analizadas de cada fase.

Muestra/Fase	N	Área marcada epitelio ( $\mu\text{m}^2$ )	Área epitelial total ( $\mu\text{m}^2$ )	Área tejido total ( $\mu\text{m}^2$ )	% (epitelio marcado/tejido epitelial total)
Folicular tardía	14	2789.28	73237.27	139366.15	<b>4.07<sup>a</sup></b>
Folicular tardía/control	7	221.20	78129.63	151401.17	<b>0.31<sup>b</sup></b>
Luteal tardía	14	2983.29	61731.37	146868.77	<b>4.55<sup>a</sup></b>
Luteal tardía/control	7	49.04	71650.80	137016.74	<b>0.09<sup>b</sup></b>

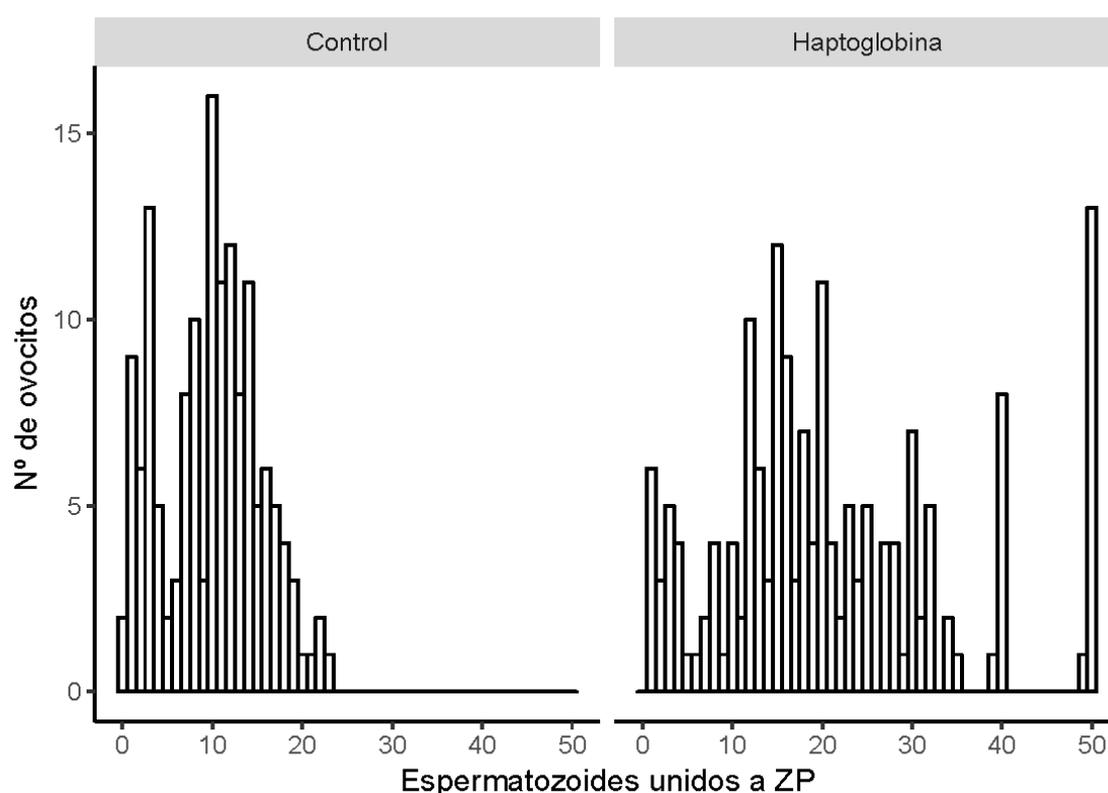
#### 5.1.4 Efecto de la proteína haptoglobina sobre la fecundación *in vitro*

El añadir al medio de FIV la proteína Hp purificada del suero mostró diferencias significativas en diversos parámetros evaluados en comparación con un grupo control (sin la proteína). Se observó una disminución significativa en el porcentaje de penetración ( $79.04 \pm 3.16$  frente a  $89.73 \pm 2.52$ ), en el número medio de espermatozoides unidos a la ZP ( $12.50 \pm 0.67$  frente a  $19.51 \pm 1.11$ ) y en el número medio de pronúcleos por ovocito ( $2.49 \pm 0.13$  frente a  $3.45 \pm 0.18$ ), todo ello a  $p < 0.05$  (**Tabla 9**). Estos resultados muestran que la presencia de Hp en el medio de fecundación puede jugar un papel importante en la interacción entre gametos, ya que disminuye la penetración y la unión a la ZP.

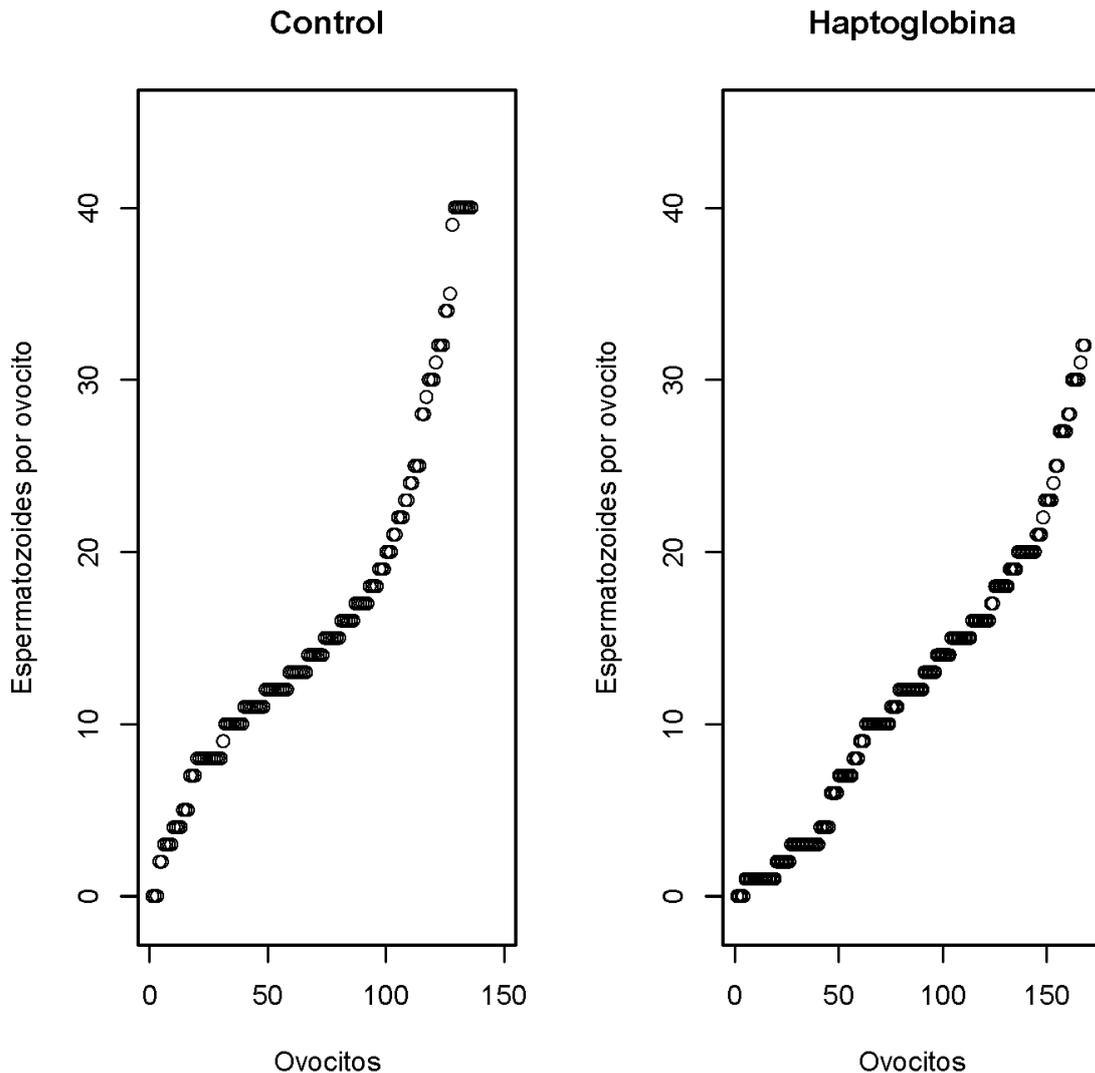
Al estudiar la distribución del número de espermatozoides que se unen a la ZP analizados en la FIV complementada con Hp, se puede observar que el número de espermatozoides que se une a la ZP de cada ovocito con la proteína Hp varía respecto al grupo control, con una distribución menos homogénea, indicando algún tipo de interacción sobre esta unión (**Fig. 22** y **Fig. 23**).

**Tabla 9. Resultados de FIV obtenidos en presencia (grupo Hp) o ausencia (grupo control) de Hp purificada del suero porcino.** Se evalúan los parámetros penetración, monospermia, número de espermatozoides unidos a la ZP y número de pronúcleos en el sistema de FIV porcino. Los experimentos se realizan por cuadruplicado. En cada replicado se utilizan 40-50 ovocitos por grupo. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM (error típico). Diferentes superíndices (<sup>a,b</sup>) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). **N:** número de ovocitos inseminados. **Penetración:** porcentaje de ovocitos penetrados. **Monospermia:** porcentaje de ovocitos fecundados por un solo espermatozoide. **Unión a ZP:** número de espermatozoides unidos a la ZP. **Pronúcleos:** número medio de pronúcleos por ovocito.

Grupo	N	Penetración	Monospermia	Unión a ZP	Pronúcleos
Control	146	89.73 $\pm$ 2.52 <sup>a</sup>	9.92 $\pm$ 2.62	19.51 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	3.45 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
Hp/ovo	167	79.04 $\pm$ 3.16 <sup>b</sup>	5.26 $\pm$ 1.94	12.50 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	2.49 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>



**Figura 22. Espermatozoides unidos a la ZP.** Diagrama de barras donde se representa el número de espermatozoides que se une a la ZP de cada ovocito con la proteína Hp. Se observa que el número de espermatozoides que se adhiere a la ZP de cada ovocito varía en relación al grupo control, con una distribución más variable.



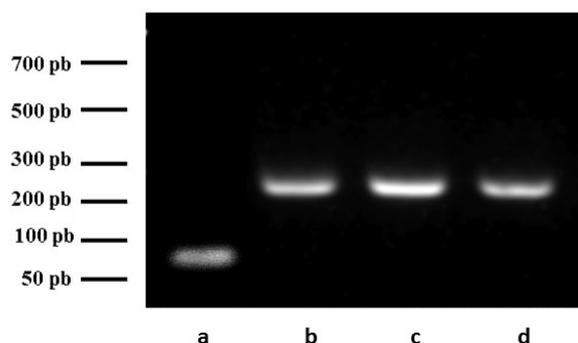
**Figura 23. Distribución del número de espermatozoides que se unen a la ZP.** Diagrama de puntos donde se observa la distribución del número de espermatozoides que se unen a la ZP de cada ovocito utilizado para la FIV con la proteína Hp.

## 5.2 Lactadherina

### 5.2.1 Detección del ARN codificante para lactadherina en el oviducto porcino

Tras obtener el ARN total del oviducto porcino en diferentes fases del ciclo estral, el ADNc que se obtuvo se usó como molde para realizar distintas amplificaciones por RT-PCR. El objetivo fue detectar el ARNm de lactadherina en oviducto (ampolla e istmo). Paralelamente se usó como control su presencia en el útero porcino tal y como se describe en la bibliografía (Ensslin *et al.*, 1998). Para ello, se diseñaron cebadores a partir

de la secuencia NM\_001122984 registrada en Pubmed (ver **tabla 4** de Material y Métodos). En el ensayo de amplificación se obtuvieron diferentes fragmentos correspondientes a un amplicón de 252 pb en útero, ampolla e istmo en diferentes fases del ciclo estral. En la **Figura 24** se puede observar una selección de algunas de las amplificaciones por RT-PCR realizada en este caso en la fase folicular tardía.



**Figura 24. Análisis de la expresión génica de lactadherina mediante RT-PCR en útero y oviducto porcino en fase folicular tardía.** Se muestran los amplicones correspondientes a los fragmentos amplificados de cada transcrito. **a)** Fragmento de control GAPDH (79pb). **b)** Lactadherina en útero (252pb). **c)** Lactadherina en istmo (252pb). **d)** Lactadherina en ampolla (252pb).

La identidad de los productos amplificados fue verificada por secuenciación automática completa de ambas cadenas. La secuenciación automática de los amplicones obtenidos indicaba que se trataba del ARNm que codifica para la proteína lactadherina. El amplicón obtenido fue el mismo para ampolla, istmo y útero. Este fragmento comprendía una región de 252 nucleótidos en el ADNc (**Tabla 10**). Este fragmento codifica desde el aminoácido 308 al 408 de la proteína lactadherina (**Fig. 25**).

**Tabla 10. Secuencia obtenida de lactadherina en oviducto y útero porcino.** Se indica la longitud de nucleótidos (nt) de la secuencia, así como el fragmento que se ha amplificado.

ADNc	Secuencia de ADNc amplificada
Lact. 1296 nt	<p><b>ÚTERO Y OVIDUCTO</b></p> <p><b>973</b></p> <p>CAGTCCAACAGTGCCTCTGAGTGGCTGCAGATTGACCTGGGCTCCCAGAGGC  GAGTAACTGGCATCATCACCCAGGGAGCCCGAGATTTTGGCCACATCCAGTA  TGTGGCAGCCTACAAGGTGGCCTACAGCGACGATGGTGTGAGCTGGACCGA  GTACAGGGACCAGGGGGCCCTGGAAGGCAAGATCTTCCCTGGCAACTTGGA  CAACAATTTCCACAAGAAGAACATGTTTGAGACGCCTTTTCTGACC <b>1224</b></p>

```

1  MPGPRLLTAI  CGALLCASGL  FAFSGDFCDS  SQCLNGGTCL  LDQDPQNPFH  CLCPEGFTGL
61  ICNETEKGPC  FPNPCHNDAE  CEVIDDAHRG  DVFTQYICKC  PHGYTGIHCE  IICNAPLGME
121 TGAIADFQIS  ASSMHLGFMG  LQRWAPELAR  LHRAGIVNAW  TASNYDRNPW  IQVNLLRRMR
181 VTGVVTQGAS  RAGSAEYIKT  FKVAYSSDGR  KFQFIQGAE  SGDKIFMGNL  DNSGLKVNLF
241 EVPLEVQYVR  LVPIICHRGC  TLRFELLGCE  LSGCAEPLGL  KDNTIPNKQI  TASSFYRTWG
301 LSAFSWYPFY  ARLDNQGKFN  AWTQNSNSAS  EWLQIDLGSQ  RRVGTGIITQG  ARDFGHIQYV
361 AAYKVAYSDD  GVSWTEYRDQ  GALEGKIFPG  NLDNNSHKKN  MFETPFLTRF  VRILPVAWHN
421 RITLRVELLG  C

```

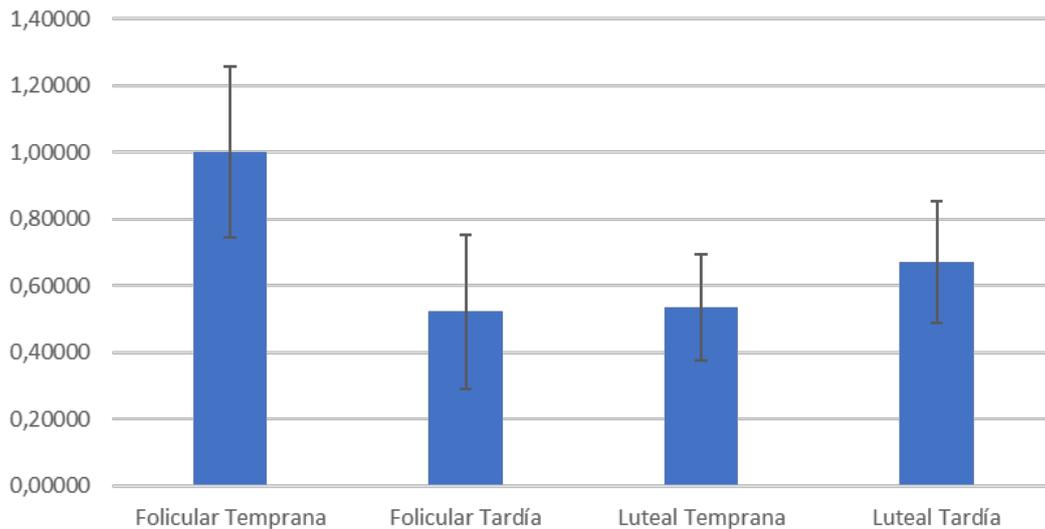
**Figura 25. Secuencia de aminoácidos de lactadherina de cerdo.** Subrayado se muestra la secuencia de aminoácidos amplificada con código de acceso en Pubmed NP\_001116456.

### 5.2.2 Abundancia relativa del ARN codificante para lactadherina en el oviducto porcino

Los niveles de expresión relativa del gen lactadherina en diferentes fases del ciclo estral y en dos localizaciones del oviducto de cerda (ampolla e istmo) se analizaron mediante RT-PCR en tiempo real, tal y como se ha descrito previamente en el apartado Material y Métodos, obteniéndose los siguientes resultados.

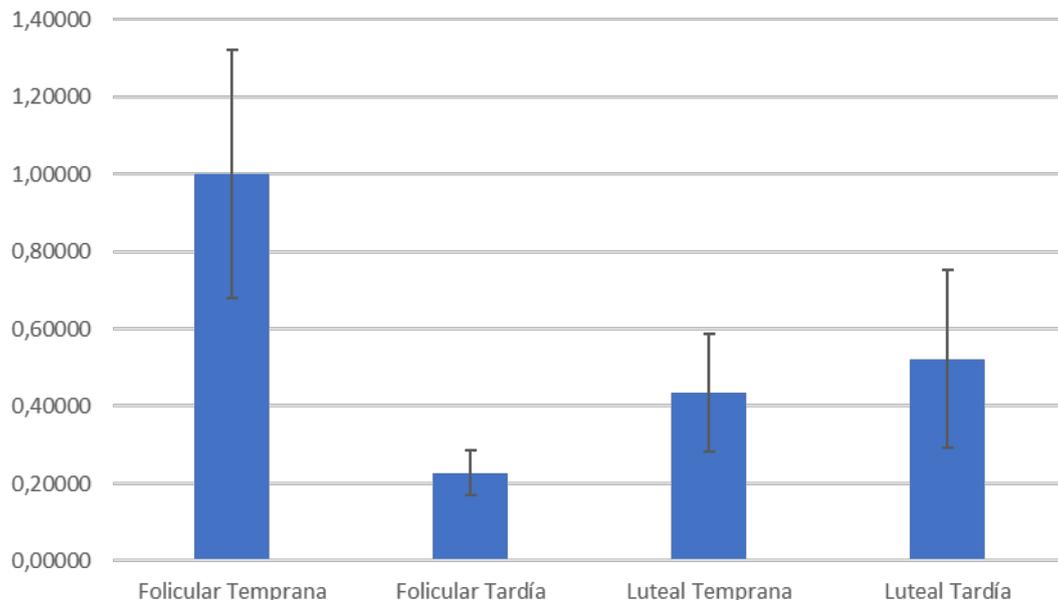
Los análisis comparativos de la expresión entre ampolla e istmo indicaron que no existen diferencias entre los niveles de expresión génica para estas dos localizaciones.

Por otro lado, se determinó la abundancia relativa de la expresión de lactadherina en la ampolla comparando las diferentes fases del ciclo estral: folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía. Se utilizó como referencia la expresión en la fase folicular temprana para comparar con el resto de fases. Estos análisis nos mostraron que existe expresión génica a lo largo del ciclo estral, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre fases. (**Fig. 26**).



**Figura 26. Expresión relativa de lactadherina en ampolla vs GAPDH en diferentes fases del ciclo estral.** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes fases analizadas (follicular temprana, follicular tardía, luteal temprana y luteal tardía).

Seguidamente se realizó el análisis comparativo de la expresión de lactadherina en el istmo porcino entre las mismas fases del ciclo estral. Se utilizó como referencia la expresión en la fase follicular temprana para comparar con el resto de fases. Los resultados nos indican que existe expresión génica a lo largo del ciclo estral, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre fases (**Fig. 27**).



**Figura 27. Expresión relativa de lactadherina en istmo vs GAPDH en diferentes fases del ciclo estral.** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes fases analizadas (follicular temprana, follicular tardía, luteal temprana y luteal tardía).

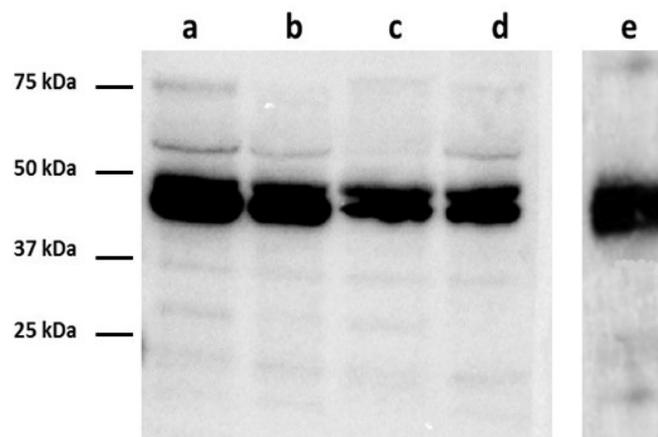
### 5.2.3 Detección de lactadherina en el fluido oviductal porcino

Tras la detección y análisis de la expresión de lactadherina en el oviducto porcino, quisimos analizar la presencia de esta proteína en el FOP. Para ello, se realizó un análisis proteómico de FO de cerdas en las cuatro fases del ciclo estral analizadas por RT-PCR en tiempo real: folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía. También se realizaron ensayos de inmunodetección en estas mismas fases, cuyos resultados se muestran a continuación.

#### 5.2.3.1 Detección de lactadherina en fluido oviductal porcino mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y Western-blot

En un primer experimento se analizaron las muestras de FOP directamente mediante HPLC-ESI-MS/MS en las cuatro fases del ciclo citadas anteriormente. Estos análisis detectaron 1 péptido correspondiente a la proteína lactadherina en el FOP de la fase folicular temprana, no detectándose ningún otro péptido en el resto de las fases analizadas. El péptido presenta un score de 5.15 y un SPI de 67 (**Tabla 11**).

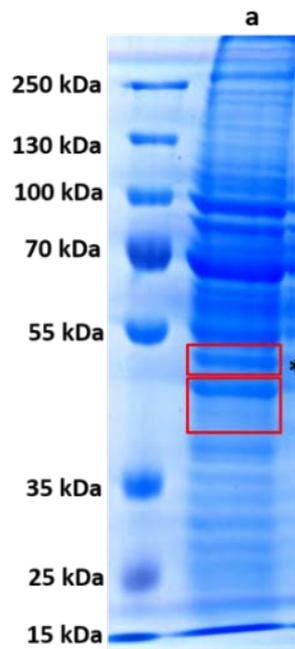
A continuación, se llevó a cabo una electroforesis en un gel SDS-PAGE y posterior Western-blot con FOP en las mismas cuatro fases del ciclo. Los resultados mostraban una doble banda en todas las fases: una con un peso de  $\approx 47$  kDa tal y como estaba descrito en la bibliografía (Ensslin *et al.*, 1998), junto con una segunda banda inespecífica con un peso  $\approx 40$  kDa. Como control positivo se utilizó la proteína recombinante humana lactadherina cuyo peso es  $\approx 45$  kDa (**Fig. 28**).



**Figura 28. Inmunodetección por Western-Blot en membrana en FOP con anticuerpo anti-MFGE-8 en las diferentes fases del ciclo estral.** Se observa señal positiva en una doble banda de  $\approx 47$  kDa y de  $\approx 40$  kDa. Se cargan 30  $\mu$ g de proteína total de FOP en

cada calle. **a)** Fase folicular temprana. **b)** Fase folicular tardía. **c)** Fase luteal temprana. **d)** Fase luteal tardía. **e)** Proteína recombinante lactadherina (0.001  $\mu\text{g}$ ).

En base a las condiciones reductoras de la electroforesis, el peso esperado de lactadherina debía estar entre 40-50 kDa. Con el fin de esclarecer cual era la banda exacta donde migraba la proteína lactadherina, y mostrar la posible banda inespecífica, se realizó un siguiente experimento en el que se cargó en un gel SDS-PAGE la misma muestra de FOP de la fase folicular temprana donde se había detectado el péptido. A continuación, el gel fue teñido con azul coomassie, se recortaron las bandas cuyo peso coincidían con las detectadas en la membrana del anterior experimento y se analizaron mediante HPLC-ESI-MS/MS (**Fig. 29**). En estos análisis se detectó 1 péptido de lactadherina en la banda de  $\approx 47$  kDa con un score de 5.46 y un SPI de 76.9 el cual se señala en la **Tabla 11** con un asterisco (\*).



**Figura 29. Electroforesis en gel SDS-PAGE 12% de FOP en fase folicular temprana teñido con azul coomassie. a)** Fase folicular temprana (60  $\mu\text{g}$ ). Se recortan y analizan las bandas mediante HPLC-ESI-MS/MS de  $\approx 40$ -50 kDa, marcadas con un recuadro rojo. Con un asterisco (\*) se muestra la banda donde se detectó el péptido de lactadherina.

**Tabla 11. Péptidos correspondientes a la proteína lactadherina detectados por HPLC-ESI-MS/MS.** **z:** representa la carga del ion o fragmento detectado. **m/z:** relación masa/carga (es el valor que directamente detecta el espectrómetro de masas). **Score:** puntuación en base a intensidad de señal. **SPI:** porcentaje de señales detectadas de cada fragmento peptídico respecto al número de señales teóricas que debería producir. **Secuencia:** orden de aparición de aminoácidos en la proteína. **n:** número de veces que se detecta ese péptido. **Fase:** fase del ciclo en donde se ha detectado el péptido: folicular temprana (**Ft**). Con un asterisco (\*) se marca el péptido detectado en la banda recortada del gel teñido con azul de coomassie.

Lactadherina							
Péptidos	Z	m/z	Score	SPI	Secuencia	N	Fase
MRVTGVVTQGASRAGSAEYIK*	3	7.597	5.46	76.9	179-199	1	Ft
ILPVAWHNRITLRVELLGC	5	4.528	5.15	67	413-431	1	Ft

Estos 2 péptidos detectados de la proteína lactadherina (40 aa) suponen un 9.28 % de cobertura de la proteína respecto a la secuencia aminoacídica derivada del gen (NP\_001116456) (**Fig. 30**).

```

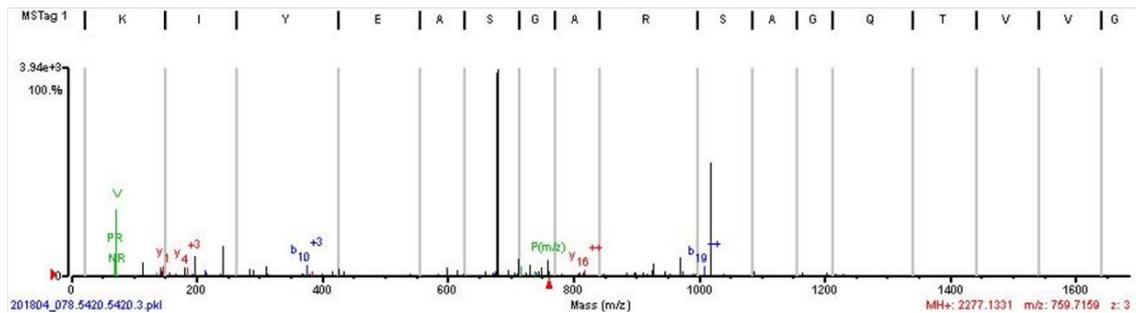
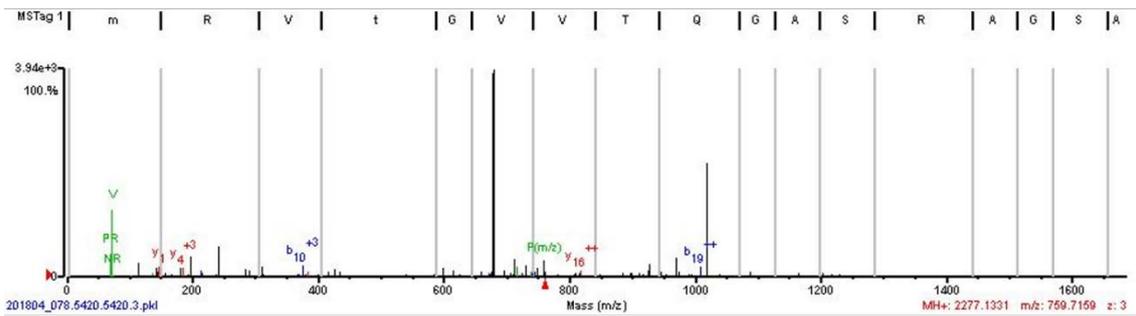
1  MPGPRLLTAI  CGALLCASGL  FAFSGDFCDS  SQCLNGGTCL  LDQDPQNPFH  CLCPEGFTGL
61  ICNETEKGPC  FPNPCHNDAE  CEVIDDAHRG  DVFTQYICKC  PHGYTGIHCE  IICNAPLGME
121  GAIADFQIS  ASSMHLGFMG  LQRWAPELAR  LHRAGIVNAW  TASNYDRNPW  IQVNLLRRMR
181  VTGVVTQGAS  RAGSAEYIKT  FKVAYSSDGR  KFQFIQGAE  SGDKIFMGNL  DNSGLKVNLF
241  EVPLEVQYVR  LVPIIICHRGC  TLRFELLGCE  LSGCAEPLGL  KDNTIPNKQI  TASSFYRTWG
301  LSAFSWYPFY  ARLDNQGFN  AWTAQNSAS  EWLQIDLGSQ  RRVGTGIITQG  ARDFGHIQYV
361  AAYKVAYSDD  GVSWTEYRDQ  GALEGKIFPG  NLDNNSHKKN  MFETPFLTRF  VRILPVAWHN
421  RITLRVELLG  C

```

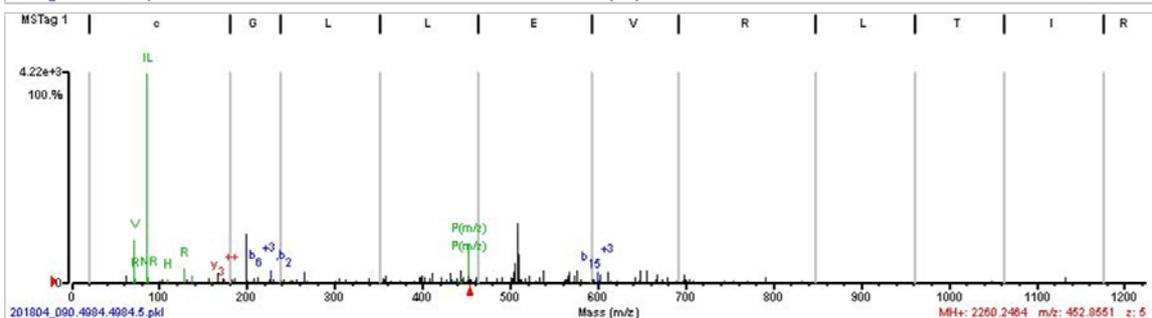
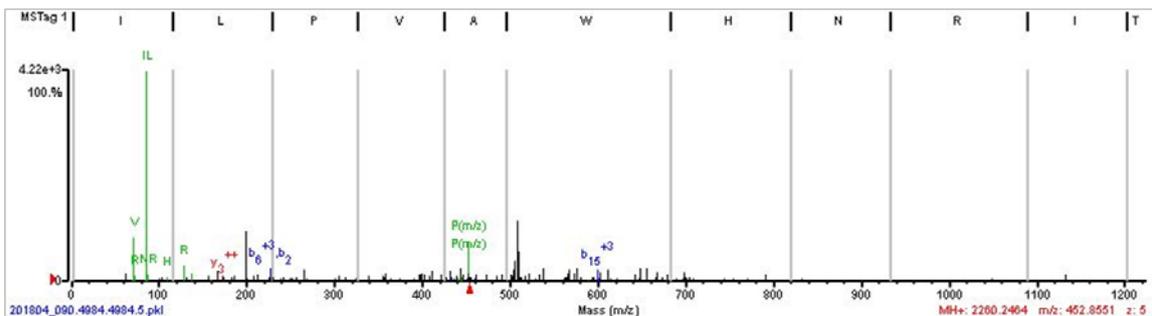
**Figura 30. Péptidos correspondientes a la proteína lactadherina.** Aparecen subrayados los péptidos detectados mediante HPLC-ESI-MS/MS.

A continuación, se muestran los espectros de masas de los dos péptidos detectados de la proteína lactadherina (**Fig. 31**).

## mRVtGVVTQGASRAGSAEYIK - Score = 5.46, SPI = 76.9



## ILPVAWHNRITLRVELLGC - Score = 5.15, SPI = 67.0%



**Figura 31. Espectros de masas de dos péptidos de lactadherina en FOP.** Se presentan los espectros de masas de la detección de los dos péptidos de la proteína lactadherina en FOP: espectro de masas del péptido MRVTGVVTQGASRAGSAEYIK en panel superior y espectro de masas del péptido ILPVAWHNRITLRVELLGC en panel inferior. Para cada péptido se muestra el espectro de masas con la secuencia de lectura en ambos sentidos para destacar la identificación de los principales iones detectados de las series “b” e “y”.

### 5.2.4 Efecto de la proteína lactadherina sobre la fecundación *in vitro*

En un primer experimento se incubaron ovocitos con proteína lactadherina recombinante durante 60 minutos de forma previa a la FIV y se realizó la fecundación con la presencia de la proteína recombinante en el medio. En los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de penetración, en el porcentaje de monospermia ni en el número medio de espermatozoides unidos a la ZP en comparación con un grupo control (sin la proteína). Sin embargo, sí que hubo una disminución significativa en el promedio de espermatozoides que penetran cada ovocito en presencia de la proteína respecto al grupo control:  $3.54 \pm 0.25$  frente a  $4.89 \pm 0.35$ , con  $p < 0.05$  (Tabla 12).

**Tabla 12. Resultados de FIV obtenidos en presencia (grupo lactadherina) o ausencia (grupo control) de lactadherina recombinante durante la incubación con ovocitos.** Se evalúan los parámetros penetración, monospermia, número de espermatozoides dentro de cada ovocito y número de espermatozoides unidos a la ZP en el sistema de FIV porcino. Los experimentos se realizan por triplicado. En cada replicado se utilizan 40-50 ovocitos por grupo. Solamente se observa diferencias significativas en el número medio de espermatozoides que penetra cada ovocito (**spz/ovo**). Diferentes superíndices (<sup>a,b</sup>) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM (error típico). **N**: número de ovocitos inseminados. **Penetración**: porcentaje de ovocitos penetrados. **Monospermia**: Porcentaje de ovocitos fecundados por un solo espermatozoide. **Unión a ZP**: número medio de espermatozoides unidos a la ZP.

Grupo	N	Penetración	Monospermia	spz/ovo	Unión a ZP
Control	136	$88.24 \pm 2.77$	$19.17 \pm 3.61$	$4.89 \pm 0.35^a$	$6.5 \pm 0.58$
Lact/ovo	124	$83.06 \pm 3.38$	$28.16 \pm 4.45$	$3.54 \pm 0.25^b$	$5.31 \pm 0.34$

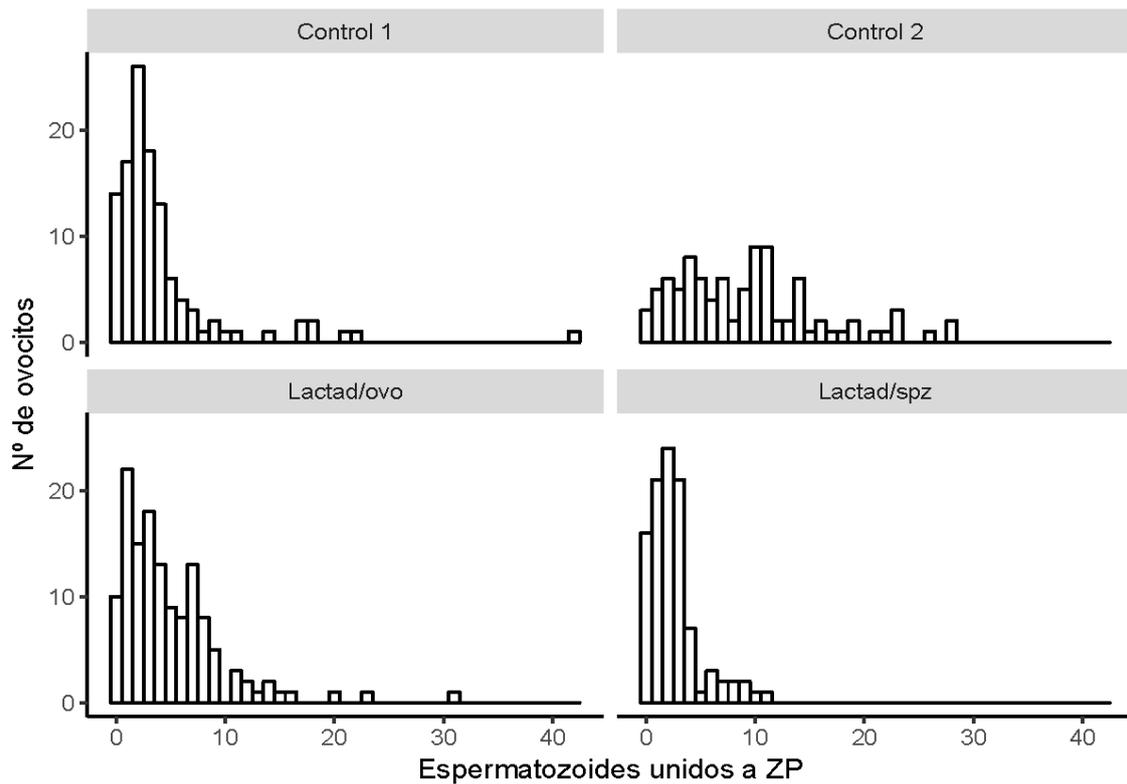
En un segundo ensayo se incubaron los espermatozoides con la proteína recombinante lactadherina durante 15 minutos antes de la FIV y a continuación se realizó la fecundación con la presencia de la proteína recombinante en el medio. Los resultados obtenidos mostraban en el grupo de lactadherina una disminución significativa respecto al grupo control en los porcentajes de penetración ( $37.23 \pm 5.01$  frente a  $67.82 \pm 5.03$ ), en el número medio de espermatozoides por ovocito ( $1.49 \pm 0.12$  frente a  $4.72 \pm 0.52$ ) y

en la unión espermatozoides a la ZP ( $1.92 \pm 0.18$  frente a  $5.41 \pm 0.53$ ) con el correspondiente aumento del porcentaje de monospermia ( $62.86 \pm 8.29$  frente a  $25.42 \pm 5.71$ ), todo ello con una  $p < 0.05$  (**Tabla 13**). Estos resultados sugieren que la presencia de la proteína lactadherina en el oviducto podría estar interactuando en la unión entre gametos y puede contribuir a la eficacia de la fecundación *in vivo*.

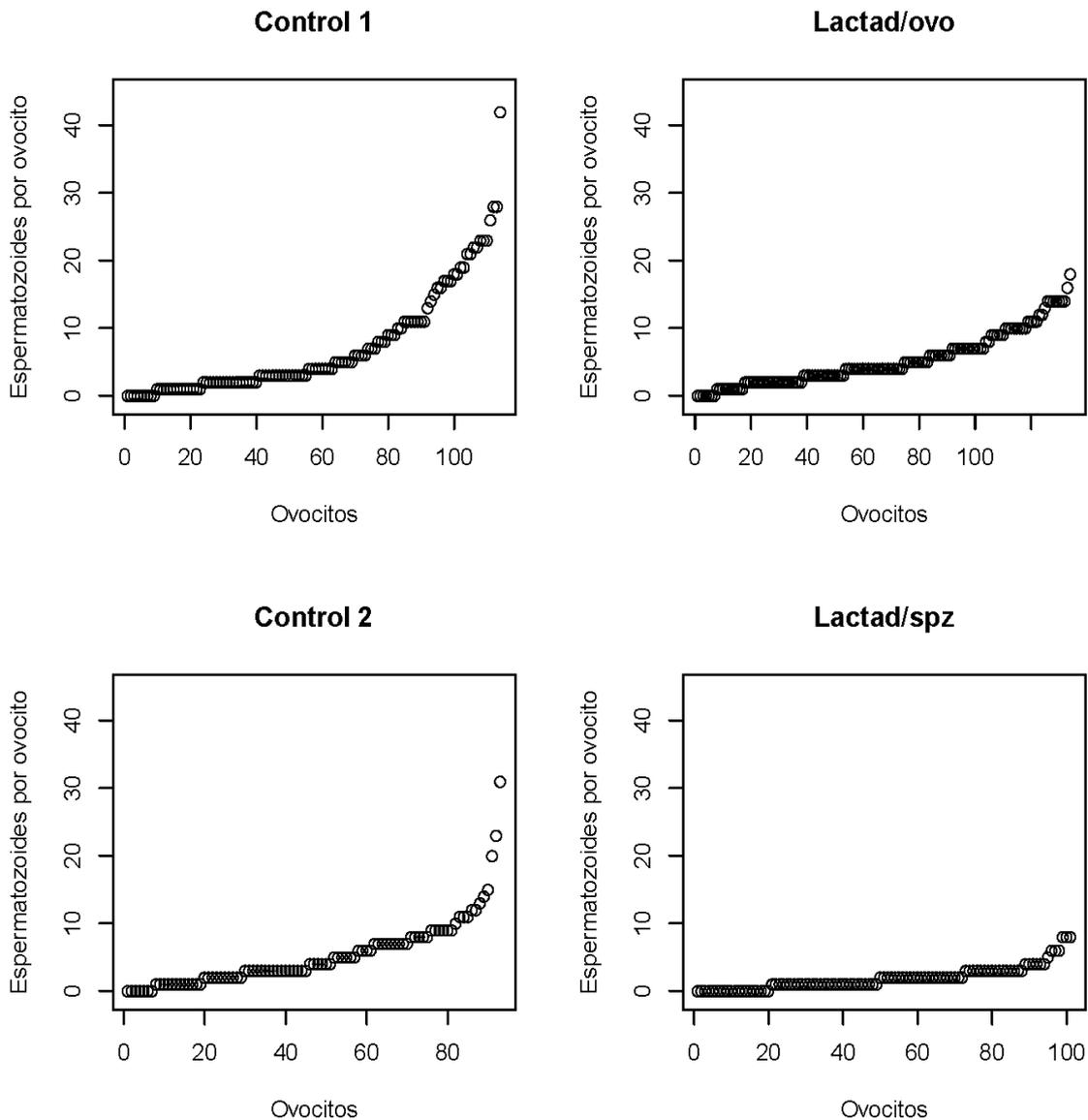
En cuanto a la distribución del número de espermatozoides que se unen a la ZP tras la incubación de ovocitos y espermatozoides con la proteína lactadherina, se puede observar que el número de espermatozoides que se une a la ZP de cada ovocito tras la incubación de los espermatozoides con la proteína lactadherina es menor, aunque con una distribución más homogénea (**Fig. 32** y **Fig. 33**).

**Tabla 13. Resultados de FIV obtenidos en presencia (grupo lactadherina) o ausencia (grupo control) de lactadherina recombinante durante la incubación de espermatozoides.** Se evalúan los parámetros penetración, monospermia, número de espermatozoides dentro de cada ovocito y número de espermatozoides unidos a la ZP en el sistema de FIV porcino. Los experimentos se realizan por duplicado. En cada replicado se utilizan 40-50 ovocitos por grupo. Se observan diferencias significativas en todos los parámetros evaluados. Datos media  $\pm$  SEM (error típico). Diferentes superíndices (<sup>a,b</sup>) en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). **N:** número de ovocitos inseminados. **Penetración:** porcentaje de ovocitos penetrados. **Monospermia:** Porcentaje de ovocitos fecundados por un solo espermatozoide. **spz/ovo:** número medio de espermatozoides unidos a cada ovocito. **Unión a ZP:** número medio de espermatozoides unidos a la ZP.

Grupo	N	Penetración	Monospermia	spz/ovo	Unión a ZP
Control	87	$67.82 \pm 5.03^a$	$25.42 \pm 5.71^a$	$4.72 \pm 0.52^a$	$5.41 \pm 0.53^a$
Lact/spz	94	$37.23 \pm 5.01^b$	$62.86 \pm 8.29^b$	$1.49 \pm 0.12^b$	$1.92 \pm 0.18^b$



**Figura 32. Espermatozoides unidos a la ZP tras la incubación de los gametos con la proteína lactadherina.** Diagrama de barras donde se representa el número de espermatozoides que se unen a la ZP de cada ovocito tras la incubación con la proteína lactadherina. Se observa que el número de espermatozoides que se adhiere a la ZP de cada ovocito varía en relación al grupo control. **Lactad/ovo:** ovocitos incubados con lactadherina y su control sin la proteína (control 1). **Lactad/spz:** espermatozoides incubados con lactadherina y su control sin la proteína (control 2).



**Figura 33. Distribución del número de espermatozoides que se unen a la ZP.** Diagrama de puntos donde se observa la distribución del número de espermatozoides que se unen a la ZP de cada ovocito tras la incubación con la proteína lactadherina. Se observa que el número de espermatozoides que se adhiere a la ZP de cada ovocito varía en relación al grupo control. **Lactad/ovo:** ovocitos incubados con lactadherina y su control sin la proteína (control 1). **Lactad/spz:** espermatozoides incubados con lactadherina y su control sin la proteína (control 2).

## ***VI. Discusión***

---



### 6.1 La proteína haptoglobina y su relación con el proceso reproductivo

La Hp es una glicoproteína cuya función más conocida es la de fijar la hemoglobina liberada de los eritrocitos en el plasma sanguíneo con el fin de inhibir su capacidad oxidante formando el complejo hemoglobina-haptoglobina, el cual es metabolizado por macrófagos (Polonovski *et al.*, 1939, Nagel *et al.*, 1971, Putnam *et al.*, 1975, Nielsen *et al.*, 2007, Andersen *et al.*, 2012). Este complejo también inhibe la peroxidación de lípidos estimulada por la hemoglobina (Lim *et al.*, 1998).

En el ser humano la proteína Hp presenta tres fenotipos mayoritarios: Hp1-1, Hp2-1 y Hp2-2 (Smithies *et al.*, 1955). Este polimorfismo se ha asociado con diferencias en propiedades inmunomoduladoras y anti-inflamatorias (Langlois *et al.*, 1996, Dobryszczycka, 1997), con la susceptibilidad a enfermedades inmunoalérgicas e infecciosas y con los niveles de hierro y de colesterol en sangre (Langlois *et al.*, 1996, Van Vlierberghe *et al.*, 2004, Boettger *et al.*, 2016, Bjornsson *et al.*, 2017). En la especie porcina se ha determinado que el fenotipo de Hp es similar a la Hp1-1 humana (Lockhart *et al.*, 1972, Yang *et al.*, 1999, Yueh *et al.*, 2008).

La Hp también parece tener un importante papel en el proceso reproductivo de los mamíferos. Además de detectar la expresión de Hp en diversos órganos reproductores masculinos y femeninos (O'Bryan *et al.*, 1997, Sharpe-Timms *et al.*, 2000, Berkova *et al.*, 2001, Herrler *et al.*, 2004), se ha descrito que, en comparación con las mujeres normalmente fértiles, las mujeres infértiles tienen un nivel disminuido de anticuerpos anti-haptoglobina en su suero (Berkova *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que el papel que ejerce Hp en el útero es el de "interfaz" entre los inmunosupresores maternos y fetales, ya que el tejido decidual del útero grávido presenta niveles significativamente más altos de Hp que el endometrio normal y se ha detectado la secreción de la proteína antes de la implantación (Beier *et al.*, 1998, Berkova *et al.*, 2001, Herrler *et al.*, 2004). Por otro lado, es conocido que Hp posee propiedades inmunosupresoras e inmunomoduladoras (Kudo *et al.*, 1982, Jue *et al.*, 1983, Oh *et al.*, 1990, Ghmati *et al.*, 1996). Estos dos mecanismos podrían estar modulando la reacción inmunológica materna contra el blastocisto, o incluso atenuando las respuestas inmunológicas maternas provocadas por los antígenos feto-placentarios cuando están en contacto accidentalmente con el sistema inmunológico materno (Berkova *et al.*, 2001).

En esta Tesis Doctoral se ha usado esta especie como modelo animal para estudiar la función de la Hp en el oviducto

### 6.1.1 La proteína haptoglobina en el oviducto de mamíferos

Se van conociendo las diferentes proteínas que conforman el FO de diversos mamíferos, entre las que se encuentra la proteína Hp. En la vaca se ha detectado en la mucosa de la región de la ampolla, pero no en el istmo (Lavery *et al.*, 2003). Anteriormente se había detectado una secreción intermitente de Hp en suero y el FO bovino durante el ciclo estral (Way *et al.*, 1998). Aunque se observa una baja expresión a nivel constitutivo de Hp en el hígado y el oviducto bovino, su expresión se regula positivamente durante la fase peri-estral del ciclo, sugiriendo una secreción modulada por los esteroides ováricos durante el ciclo (Lavery *et al.*, 2004). Esto supone un aumento de la biosíntesis de Hp hepática durante el celo, y a la vez en el oviducto ampular, donde la acumulación de proteína Hp parece acentuada (Lavery *et al.*, 2003). Este sistema regulador garantizaría la concentración necesaria de Hp en el ovario y oviducto durante las etapas finales de desarrollo folicular y durante la capacitación, fecundación o desarrollo embrionario temprano, donde las propiedades inmunomoduladoras de Hp proporcionarían protección frente a la respuesta inmune materna.

En la coneja se ha descrito la expresión de la proteína Hp en el oviducto 3 horas antes de la ovulación, descartando así su origen folicular, con una expresión ligeramente más alta en la ampolla que en el istmo (Herrler *et al.*, 2004). Esta expresión ocurría desde el día 1 hasta el día 3 posfecundación, disminuyendo a niveles indetectables a partir del día 4, cuando la expresión de Hp se localizaba en el endometrio. También se ha descrito la incorporación de Hp a la matriz extraembrionaria, la cual adquiere a su paso por el oviducto ya que el embrión no expresa Hp hasta estadios más avanzados de desarrollo (Herrler *et al.*, 2004). Se hace evidente que parte de la proteína Hp detectada en el FO no se transporta desde el suero, sino que se expresa y segrega por la mucosa oviductal. Su expresión temporal en el oviducto también sugiere que la proteína Hp podría estar participando en procesos como la capacitación espermática, la fecundación del ovocito y el adecuado desarrollo del blastocisto (Herrler *et al.*, 2004).

En la cerda, a través del estudio del proteoma oviductal se ha observado que la proteína Hp se detectaba en el oviducto, pero solo en presencia de ovocitos (Georgiou *et*

*al.*, 2005). Análisis posteriores realizados *in vivo* mostraban que Hp se expresaba también en presencia de espermatozoides, mostrando así que la hembra responde a los gametos dentro de su tracto mediante la modulación del entorno en el que se establece inicialmente la gestación, y que Hp participa en ello (Georgiou *et al.*, 2007).

Posteriormente a estos estudios, nuestro grupo de investigación identificó el ARNm de Hp en el oviducto porcino, hallándose evidencias de la expresión de esta proteína en las células oviductales, lo que indicaba que, además de la proteína filtrada a través del suero sanguíneo, parte de la Hp presente en el FOP sería de origen oviductal (Ramón *et al.*, 2012). Por ello, en los estudios iniciales de esta Tesis Doctoral quisimos conocer cómo se regulaba la expresión de Hp durante el ciclo y confirmar, mediante la detección de la proteína, la presencia de la misma en el oviducto porcino.

Para ello hicimos un análisis de la expresión de Hp en la unión ampular-ístmica en diferentes fases del ciclo estral. Por lo descrito anteriormente en la coneja, donde no se detecta expresión de Hp en el oviducto a partir del día 4 posfecundación (Herrler *et al.*, 2004) y lo observado en la vaca, donde su expresión es durante la fase peri-estral del ciclo, era de esperar una expresión en las fases cercanas a la ovulación (Lavery *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque nuestros resultados mostraron expresión de Hp a lo largo de todo el ciclo estral, la expresión aumenta durante la fase luteal tardía respecto a la fase folicular tardía. En la especie porcina, la fase luteal tardía engloba la etapa de formación de cuerpos lúteos, por lo que la mayor expresión de Hp parece coincidir con una mayor presencia de progesterona secretada por el cuerpo lúteo. Esto está en concordancia con lo recientemente observado en el estudio del transcriptoma porcino a lo largo del ciclo estral (Kim *et al.*, 2018). Kim y colaboradores identificaron los genes expresados diferencialmente durante las diferentes fases del ciclo estral y entre los diferentes tejidos reproductivos (ovario, oviducto y endometrio). Entre los genes que presentan tales diferencias está Hp, mostrando una alta expresión durante la fase luteal tardía (día 12 y día 15) en comparación con la fase folicular tardía (día 0 y día 3). Aunque los análisis realizados en oviducto eran solo en tejido ampular, observaron la expresión de Hp en todos los días del ciclo analizados (entre día 0 y día 18) (Kim *et al.*, 2018).

Posteriormente, nuestros resultados nos llevaron a investigar si el ARNm de Hp detectado en el oviducto porcino se traducía a proteína. En nuestro estudio bioquímico mediante SDS-PAGE y posterior Western-blot identificamos varias bandas con un anticuerpo desarrollado frente a Hp de cerdo. Este resultado es similar al estudio de Lavery en la especie bovina usando un anticuerpo contra la proteína humana. Sin

embargo, en dicho estudio con otro anticuerpo detectaron también una banda de aproximadamente 40 kDa en el FO (Lavery *et al.*, 2003). Nosotros hemos detectado también esta banda además de las otras cuatro bandas mencionadas anteriormente. Por ello, nos planteamos realizar un estudio proteómico para confirmar los resultados obtenidos mediante Western-blot. Nuestros datos nos indicaron que solo la banda de 45 kDa es la que presenta la proteína Hp (solo en esta banda se detectan péptidos). Este peso molecular coincide con lo descrito previamente en el endometrio humano (Berkova *et al.*, 2001) y en el endometrio de coneja (Hoffman *et al.*, 1996, Sharpe-Timms *et al.*, 2000).

En los ensayos realizados mediante inmunohistoquímica detectamos que esta proteína es expresada por las células epiteliales del oviducto porcino. Esto está en concordancia con lo descrito previamente en la coneja, puesto que se observaban altas cantidades de Hp en el microambiente que rodea al ovocito en la etapa periovulatoria, así como dos días posfecundación (Herrler *et al.*, 2004). Esto parece confirmar la presencia de Hp en el entorno que envuelve al ovocito porcino, así como al embrión en los primeros estadios, habiéndose descrito además la incorporación de la proteína Hp a la matriz extraembrionaria, la cual puede provenir de las secreciones oviductales ya que el embrión no expresa Hp (Herrler *et al.*, 2004). Estudios futuros serían necesarios para saber si la proteína Hp atraviesa la ZP y puede pasar a formar parte del embrión y blastocisto como se ha descrito en la coneja.

### **6.1.2 La proteína haptoglobina y el espermatozoide**

Nuestros estudios parecen confirmar que la proteína Hp forma parte del conjunto proteico del FOP y que es secretada por el oviducto además de ser transferida desde el suero sanguíneo. En la coneja se ha descrito una mayor concentración de Hp en el ovario y oviducto durante las etapas finales del desarrollo folicular (Herrler *et al.*, 2004). En nuestros análisis, la detección de la expresión de Hp en el oviducto porcino en la fase folicular tardía, aunque menor que en otras fases, sugiere que su secreción podría tener un efecto sobre el gameto masculino, ya que es el momento en el que el espermatozoide está en el oviducto.

Debemos considerar la capacidad de Hp para actuar como antioxidante, tanto por su unión a hemoglobina en el suero (Putnam *et al.*, 1975), por su participación en la mucosa y en el fluido alveolar del pulmón (Yang *et al.*, 2003), al prevenir la formación

de ROS y reducir el estrés oxidativo celular (Gutteridge, 1987, Dobryszycza, 1997, Miller *et al.*, 1997). La presencia de Hp en el oviducto porcino puede jugar un papel importante como antioxidante.

El estrés oxidativo tiene un papel importante en la funcionalidad de los espermatozoides de mamíferos que precisan de estos ROS, para que se produzcan los cambios fisiológicos asociados a la capacitación de espermatozoides como son la fosforilación de tirosinas y la inducción de oxidación del colesterol con el consiguiente flujo de salida de la membrana plasmática (Aitken, 2017). Los espermatozoides solo generan altos niveles de ROS cerca del momento en que se liberan del epitelio oviductal y la exposición a estos ROS será de corta duración. Los espermatozoides que no alcanzan el lugar de fecundación quedan expuestos a una producción continua de ROS, que dará como resultado una sobrecapacitación y un estado de estrés oxidativo, lo que hará que los espermatozoides inicien la apoptosis. Es por ello que el exceso de ROS puede inducir la peroxidación lipídica, alterando las características de la membrana que son esenciales para el mantenimiento de la función espermática, incluida la capacidad de fecundar el óvulo (Aitken *et al.*, 2015).

El impacto de la peroxidación lipídica sobre la función de los espermatozoides se refleja claramente en la pérdida de motilidad observada después de la criopreservación/descongelación. Diversos estudios han utilizado antioxidantes durante el almacenamiento de espermatozoides para reducir los niveles de estrés oxidativo que experimentan al ser criopreservados. La inclusión de carnitina, melatonina o vitamina E entre otros están mostrando resultados prometedores (Ashrafi *et al.*, 2013, Zhu *et al.*, 2015, Longobardi *et al.*, 2017). Es probable que en el oviducto la Hp también actúe como antioxidante sobre los espermatozoides, por lo que sería interesante en futuros experimentos conocer el efecto de Hp como suplemento en los diluyentes de semen para la reducción de dicho estrés.

Como PFA, la Hp regula la acción de las proteasas tisulares liberadas durante la reacción inflamatoria (Kushner *et al.*, 1993). Una de las funciones observadas de Hp es la de inhibir enzimas proteolíticas, como son las catepsinas L y B en la rata (Snellman *et al.*, 1967, Pagano *et al.*, 1982). Estas enzimas han sido descritas como parte de las proteasas del acrosoma del espermatozoide, necesarias para que penetre a través de las envolturas que rodean al óvulo y lograr la fecundación (Tulsiani *et al.*, 1998). Recientemente se han detectado estas mismas proteínas en el FOP (Acuña *et al.*, 2017),

por lo que es posible que Hp esté ejerciendo una acción reguladora de estas proteasas en el oviducto.

Se ha descrito la interacción entre Hp y apolipoproteínas, como el complejo ApoA1/Hp que se transporta a folículos ováricos humanos (Porta *et al.*, 1999) y que ApoA1 forma complejos que tienen un efecto positivo sobre la motilidad del espermatozoide (Akerlöf *et al.*, 1991). En la especie porcina también se ha descrito la expresión de estas dos proteínas en el oviducto, viéndose que su expresión se regulaba de forma positiva en presencia de ovocitos (Georgiou *et al.*, 2005). Análisis posteriores realizados *in vivo* mostraban que Hp se expresaba también en presencia de espermatozoides, mostrando así que la hembra responde a los gametos dentro de su tracto mediante la modulación del entorno en el que se establece inicialmente la gestación y que Hp participa en ello (Georgiou *et al.*, 2007).

En los siguientes experimentos que se llevaron a cabo se añadió al medio de FIV la proteína Hp purificada del suero, lo que produjo una disminución significativa en el porcentaje de penetración, en el número medio de espermatozoides unidos a la ZP y en el número medio de pronúcleos por ovocito. Estos resultados muestran que la presencia de Hp en el medio de fecundación puede jugar un papel en la interacción entre gametos, uniéndose a alguno de ellos, ya que disminuye la penetración y la unión a la ZP.

Una de estas posibles interacciones puede ser la posible unión de Hp al espermatozoide y su participación en el metabolismo de moléculas de colesterol, ya que se ha descrito esta misma función en otros fluidos (Salvatore *et al.*, 2007, Salvatore *et al.*, 2009, Cigliano *et al.*, 2009, Spagnuolo *et al.*, 2013).

Antes de la capacitación, el colesterol se concentra en la membrana plasmática de los espermatozoides en microdominios especializados conocidos como balsas lipídicas. Estas funcionan como centros de organización que participan en la distribución de proteínas de la membrana, en la activación de receptores y en la activación de cascadas de señalización. Los componentes de los fluidos del tracto genital femenino como el fluido uterino, pero principalmente el FO, son capaces de eliminar el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Visconti *et al.*, 1999). Una proteína que participa en estas modificaciones es la albúmina, la cual actúa durante la capacitación *in vitro* en la eliminación del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Davis *et al.*, 1979). Las proteínas de unión del espermatozoide o “binding sperm proteins” (BSP) están localizadas en la cabeza de los espermatozoides y proceden de las vesículas seminales. Las BSP también interactúan con las lipoproteínas HDL para apoyar

la salida del colesterol desde la membrana de los espermatozoides (Ehrenwald *et al.*, 1990). Trabajos realizados con espermatozoides de toro, demostraron que la incubación de los espermatozoides con FO causaba la transferencia neta de aproximadamente el 25% del colesterol de los espermatozoides a las HDL (Ehrenwald *et al.*, 1990). Por lo tanto, la proteína Hp oviductal podría estar participando en la regulación de la salida del colesterol necesaria en la capacitación espermática.

Nuestra detección de la proteína Hp en el oviducto porcino nos hace pensar en su papel como inmunomoduladora en este conducto, ajustando la respuesta inmune natural a la presencia de cuerpos extraños, como son los espermatozoides y los componentes del plasma seminal. En el plasma sanguíneo se ha observado previamente que la Hp disminuye la producción de prostaglandinas, se une los receptores de los leucocitos CD11b y bloquea la respuesta de los neutrófilos a diversos estímulos (Jue *et al.*, 1983, Ghmati *et al.*, 1996, Oh *et al.*, 1990). El hecho de que se haya descrito previamente la presencia en el oviducto bovino de otra PFA con efectos inmunomoduladores, refuerza esta hipótesis. Es el caso de la glicoproteína alfa 1-ácida, producida principalmente en hígado y tejidos extrahepáticos como el útero y el ovario. Así, se observó que la glicoproteína alfa 1-ácida reducía *in vitro* la fagocitosis de espermatozoides por parte de los neutrófilos polimorfonucleares de forma dosis-dependiente (Liu *et al.*, 2014). Estos hallazgos sugieren que esta proteína puede ayudar a la supervivencia espermática en el oviducto mediante la supresión directa de la actividad fagocítica de los neutrófilos.

Se hace evidente que la Hp está presente en el FOP tras la ovulación, por lo que es posible que también pueda influir en el ovocito. La proteína Hp está presente cuando los espermatozoides se capacitan, en el momento de la fecundación y los primeros estadios embrionarios. En consecuencia, podemos considerar que la Hp puede jugar un papel fundamental en el proceso reproductivo ya que el oviducto expresa y secreta durante el tiempo que ambos gametos y embriones preimplantados están presentes, pero se necesitan ampliar estos estudios para conocer cómo se producen estas interacciones entre la proteína Hp y los gametos/embriones.

## **6.2 La proteína lactadherina y su relación con el proceso reproductivo**

La proteína lactadherina se expresa en diferentes tejidos y se ha descrito su participación en diversas funciones como: facilitar interacciones intercelulares en el epidídimo (Ensslin *et al.*, 2003, Raymond *et al.*, 2009), contribuir a la eliminación

fagocítica de células apoptóticas (Fens *et al.*, 2008, Atabai *et al.*, 2005), funcionar como molécula proangiogénica (Silvestre *et al.*, 2005, Neutzner *et al.*, 2007), participar en el desarrollo de la glándula mamaria (Ensslin *et al.*, 2007) o participar en el mantenimiento de la homeostasis epitelial intestinal (Bu *et al.*, 2007). Sin embargo, es su expresión y funcionalidad en el sistema reproductor de mamíferos lo que ha suscitado el interés en numerosas investigaciones, siendo también uno de los objetos de estudio de esta Tesis Doctoral, concretamente su papel en el oviducto porcino.

En un principio, la proteína lactadherina se identificó como una proteína secretada en el epidídimo porcino, la cual se unía a la membrana plasmática de los espermatozoides y participaba en la unión a la ZP del ovocito (Ensslin *et al.*, 1998). Estos resultados fueron confirmados cuando se utilizaron ratones KO para lactadherina, observándose una fertilidad reducida en la fecundación *in vivo*. Además, los espermatozoides fueron incapaces de unirse a la ZP a pesar de no presentar defectos aparentes en su morfología, en la concentración, en el estado del acrosoma o en la motilidad (Ensslin *et al.*, 2003).

La proteína lactadherina se secreta mediante ‘epididimosomas’ al lumen del conducto epididimario (Oshima *et al.*, 2002, Martin-DeLeon, 2015), localizándose en la especie porcina en espermatozoides en distintos estados funcionales, tanto en el extremo apical del acrosoma como en el acrosoma completo (Petrunkina *et al.*, 2003).

### **La proteína lactadherina en el oviducto de mamíferos**

Recientemente se ha demostrado la secreción de la proteína lactadherina a través de exosomas en el oviducto bovino (Almiñana *et al.*, 2017). Estos exosomas ejercen un papel modulador de las interacciones entre oviducto, gametos y embriones, observado tras la mejora en la calidad de los embriones *in vitro* al absorber estos exosomas, avalando así su participación activa en el oviducto (Almiñana *et al.*, 2017). Anteriormente, también se había identificado la proteína lactadherina en exosomas de células endometriales, los cuales también participan en la modulación de la fisiología endometrial durante la implantación (Mirkin *et al.*, 2005, Franchi *et al.*, 2008, Riggs *et al.*, 2009, Bocca *et al.*, 2010, Franchi *et al.*, 2011, Bocca *et al.*, 2012, Sarhan *et al.*, 2013). En este trabajo hemos demostrado la presencia de lactadherina en el FOP pero que no hemos analizado su presencia en los exosomas. Se hace necesario en un futuro comprobar si esta proteína se encuentra en los exosomas del FOP.

Esta modulación abarca todo el tracto genital femenino, incluido el oviducto. Diversas investigaciones han demostrado el importante papel de dicho tracto en el rescate de la fertilidad de espermatozoides obtenidos a partir de animales modificados genéticamente, donde la ausencia de diversas proteínas generaba machos que no eran fértiles *in vitro*, pero sí *in vivo* (Kawano *et al.*, 2010, Turunen *et al.*, 2012). En el ratón, Kawano y colaboradores describieron la infertilidad *in vitro* de ratones KO para los genes *Acr* -/- y *Prss21* -/-. Sin embargo, cuando estos espermatozoides fueron incubados con fluido uterino, recuperaron la capacidad fecundante *in vitro* hasta en un 20% (Kawano *et al.*, 2010). En esta misma línea, otro estudio en ratones observó una disminución del 80% en la fecundación *in vitro* con espermatozoides KO para *Crisp4* -/- en comparación con el tipo salvaje, aunque los ratones permanecían completamente fértiles tras el apareamiento natural (Turunen *et al.*, 2012). Estos resultados demuestran que el tracto femenino contribuye a mejorar la calidad de los espermatozoides. Estas diferencias parecen estar relacionadas con algunas proteínas descritas inicialmente en el tracto masculino, las cuales participan en diferentes interacciones entre espermatozoides y ovocitos y cuya secreción se ha descrito posteriormente en el útero o el oviducto. El papel de estas proteínas en el tracto femenino podría ser enriquecer o compensar posibles deficiencias de la proteína masculina. Un ejemplo de ello sería la proteína SPAM1, una proteína epididimaria cuyos machos KO son fértiles (Baba *et al.*, 2002) y cuya secreción se ha descrito en tracto femenino de la ratona, con una mayor expresión durante el proestro y el estro, de forma dependiente de la región y disminuyendo desde la vagina hasta el oviducto (Zhang *et al.*, 2003, Griffiths *et al.*, 2008). También se ha descrito su presencia en los exosomas en el FO de la especie bovina (Acuña *et al.*, 2014).

En el estudio sobre la capacidad de lactadherina para funcionar como receptor espermático para la ZP se utilizaron ratones macho KO que no expresaban esta proteína. Se observó que estos ratones eran subfértiles *in vivo*, encontrando algunos machos estériles, con camadas significativamente más pequeñas y con la incapacidad de los espermatozoides para unirse a los ovocitos *in vitro*, aunque las hembras eran fértiles (Ensslin *et al.*, 2003). En base a este resultado, parece lógico sugerir que la proteína lactadherina expresada en el oviducto puede participar de forma compensatoria en espermatozoides que presenten algún defecto, o incluso ante la ausencia de la proteína epididimaria (Kawano *et al.*, 2010, Turunen *et al.*, 2012).

En vista de la presencia en el oviducto de este tipo de proteínas conocidas inicialmente como epididimarias, quisimos estudiar la posible presencia de lactadherina

en el oviducto porcino y su papel en el proceso reproductivo y su posible regulación por el ciclo estral. Nuestras investigaciones iniciales mostraron por primera vez la expresión del ARNm codificante para la proteína lactadherina en el oviducto de esta especie, en ampolla e istmo y en diferentes fases del ciclo estral, habiendo sido descrita anteriormente en el útero porcino (Ensslin *et al.*, 1998).

A continuación, realizamos un análisis comparativo mediante RT-PCR en tiempo real de la expresión de lactadherina en ampolla e istmo porcino, donde se detectaba la expresión del ARNm de lactadherina. Los resultados nos indicaron que no existen diferencias entre los niveles de expresión para estas dos regiones oviductales. Por otro lado, se analizó la abundancia relativa de este ARNm en ambas regiones, ampolla e istmo, comparando las diferentes fases del ciclo estral: folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía. Estos análisis nos mostraron que existe expresión génica a lo largo del ciclo estral, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las distintas fases.

Sin embargo, en el transcriptoma porcino estudiado recientemente se han detectado variaciones en la expresión de lactadherina en el oviducto porcino durante el ciclo estral (Kim *et al.*, 2018). Su expresión se detecta en el oviducto durante todo el ciclo estral, encontrando una expresión mayor durante la ovulación (día 0) respecto a las fases luteal tardía y folicular temprana (días 15 y día 18 respectivamente) (Kim *et al.*, 2018). Esto hace pensar que la proteína expresada por el oviducto estará presente en mayor concentración en el momento de la ovulación y que podría interactuar con el ovocito, e incluso puede sugerir una secreción sujeta a la regulación estrogénica, aunque los datos de este estudio no han sido contrastados con RT-PCR en tiempo real.

Quisimos entonces conocer si la expresión de ARNm de lactadherina en el oviducto se traducía a proteína. El análisis del FOP mediante HPLC-ESI-MS/MS dio como resultado la detección de un péptido en la fase folicular temprana, sin poder detectarla en las demás fases. Este resultado parece indicar que esta proteína no es muy abundante. En estudios posteriores se hace necesario realizar un estudio de la concentración de lactadherina en el FOP.

En los ensayos de inmunodetección mediante SDS-PAGE y posterior Western-blot identificamos, en todas las fases del ciclo, una doble banda con un anticuerpo desarrollado frente a lactadherina humana, una de  $\approx 47$  kDa, que coincide con lo descrito en la bibliografía (Ensslin *et al.*, 1998), y otra de  $\approx 40$  kDa.

El análisis posterior de estas dos bandas mediante HPLC-ESI-MS/MS dio como resultado la detección de un péptido en la banda de  $\approx 47$  kDa diferente al detectado en el análisis del FOP. Sin embargo, otros autores han descrito recientemente la detección de una doble banda de lactadherina mediante Western-blot en espermatozoides porcinos (Silva *et al.*, 2017). Silva y colaboradores detectaban mediante esta misma técnica una proteína de  $\approx 47$  kDa en el espermatozoide epididimal y en el eyaculado porcino junto con otra banda de un peso de  $\approx 37$  kDa, y lo mismo ocurría con los espermatozoides de ratón que usaban como control. Esta proteína de menor peso podría ser un producto proteolítico de la proteína lactadherina de longitud completa o una proteína diferente con reactividad cruzada con el anticuerpo que utilizaron (Silva *et al.*, 2017). Al menos en el tejido epididimal del ratón, se han descrito formas cortas y largas de lactadherina (Raymond *et al.*, 2009) lo que explicaría también la existencia de la banda de menor peso molecular. Se hace necesario el desarrollo de futuros estudios para averiguar el significado biológico de estas dos variantes de la proteína y si se corresponden con diferentes glicofomas. La detección de estos dos péptidos y solo en la fase folicular temprana hace pensar que la proteína secretada por el oviducto es minoritaria, como se ha mencionado anteriormente, pero coincide con la mayor expresión durante la ovulación o el estro, tal y como se ha descrito recientemente en la ampolla de la cerda (Kim *et al.*, 2018).

En los experimentos siguientes se quiso conocer el efecto de lactadherina recombinante sobre la FIV tras la incubación previa con los diferentes gametos. La incubación con ovocitos tuvo una disminución estadísticamente significativa del número medio de espermatozoides que penetraban los ovocitos respecto al grupo sin la proteína. También se aprecia un aumento de la tasa de monospermia, aunque sin diferencias significativas, pero parece que es la tendencia al observar también la disminución de espermatozoides que se unen a la ZP. Es necesario aumentar el número de replicados para ver si se confirma este resultado.

De hecho, en los siguientes ensayos se incubaron los espermatozoides con la proteína recombinante lactadherina antes de la FIV y los resultados mostraron diferencias significativas en diversos parámetros. La disminución en los porcentajes de penetración, en el número medio de espermatozoides por ovocito, en la unión de espermatozoides a la ZP y el aumento del porcentaje de monospermia sugieren que la presencia de la proteína lactadherina en el medio de FIV interactúa con alguno de los gametos. Las diferencias observadas en ambos ensayos también se pueden atribuir a la heterogeneidad de la FIV

en la especie porcina. Por ello, en futuros ensayos sería interesante conocer los resultados de FIV con lactadherina en otras especies como la vaca.

Una de estas hipótesis puede ser que la proteína recombinante usada en estos ensayos se una a los espermatozoides de un modo similar a la proteína epididimal u oviductal. Esta unión impediría o enmascararía el receptor funcional del espermatozoide, y por lo tanto estaría interfiriendo en la unión a la ZP y en el proceso de FIV. Además, este tipo de unión difiere probablemente a la unión de la proteína secretada por el oviducto mediante exosomas.

En este sentido, debemos tener en cuenta otras proteínas descritas anteriormente y cuya liberación se ha demostrado a través de exosomas en el tracto reproductor masculino y femenino. Este es el caso de SPAM1, la cual se une al espermatozoide a través de epididimosomas, pero cuya presencia también se ha detectado en uterosomas y oviductosomas (Griffiths *et al.*, 2008). Se observó que los espermatozoides incubados con ambos tipos de exosomas del tracto femenino, adquirirían la proteína en los lugares donde habitualmente se localizaba la proteína endógena, e incluso que tras la incubación de espermatozoides de ratones KO para SPAM1 con FO, estos adquirieron la proteína (Griffiths *et al.*, 2008). Estudios similares con la proteína lactadherina servirían para conocer si el tipo de unión de la proteína oviductal en el espermatozoide es similar al de la proteína epididimaria y conocer así su posible relación con la unión entre gametos. También es necesario estudiar mediante inmunocitoquímica la unión de la proteína lactadherina al óvulo, a la ZP o al espermatozoide. Estudios futuros son necesarios para conocer si esta proteína participa en el desarrollo embrionario en sus primeros estadios, con la hipótesis de que la proteína fuese adquirida vía exosomas por el embrión y mejorase su desarrollo en las técnicas de FIV, tal y como parece ocurrir en la especie bovina (Almiñana *et al.*, 2017).

## ***VII. Conclusiones***

---



1. El ARNm codificante para la proteína haptoglobina se detecta en el oviducto porcino en diferentes fases del ciclo estral, con una mayor expresión en la fase luteal tardía en comparación con la fase folicular tardía.
2. El análisis mediante Western-blot demuestra la presencia de haptoglobina en el fluido oviductal porcino en las fases folicular tardía y luteal tardía del ciclo estral, con un peso molecular aproximado de 45 kDa.
3. El análisis inmunohistoquímico indica que la proteína haptoglobina se encuentra en el tejido epitelial de la región ampular e ístmica del oviducto porcino.
4. Los ensayos mediante FIV sugieren la participación de la proteína haptoglobina en la fecundación, pudiendo interactuar con ambos gametos.
5. El ARNm codificante para la proteína lactadherina se detecta en ampolla e istmo del oviducto porcino, sin mostrar diferencias de expresión entre las diferentes fases del ciclo estral.
6. El análisis mediante Western-blot demuestra la presencia de lactadherina en el fluido oviductal porcino en todas las fases del ciclo estral, con un peso molecular aproximado de 40 kDa y 47 kDa.
7. Los ensayos mediante FIV sugieren la participación de la proteína lactadherina en la fecundación, pudiendo interactuar con ambos gametos.



## ***VIII. Resumen***

---



El proceso de la fecundación tiene lugar en el oviducto y ha sido objeto de estudio de numerosos investigadores, donde se ha ido documentando la importancia de las secreciones de este conducto para el desarrollo óptimo de dicho proceso. Se ha descrito la implicación de una gran variedad de proteínas y moléculas que interactúan con ambos gametos, demostrando así que el oviducto es una pieza clave en procesos como la capacitación y selección espermática, la maduración de gametos y el desarrollo embrionario temprano.

En la actualidad, se han ido perfeccionando las técnicas de FIV tanto para su utilización en la reproducción del ser humano como de especies animales, pero no se ha logrado una eficiencia óptima ya que en un gran número de especies disminuye la eficiencia *in vitro* en comparación con el modelo *in vivo*. El conocimiento de los aspectos moleculares y fisiológicos que ocurren en el oviducto durante la fecundación podría dar lugar a la creación de nuevos medios de cultivo artificiales con una mayor similitud fisiológica y la mejora de la calidad de embriones producidos *in vitro*.

El objeto de estudio de esta Tesis Doctoral ha sido conocer la presencia en el oviducto porcino y su posible participación en el proceso de fecundación de dos proteínas concretas. Una ha sido la proteína Hp, la cual se expresa en diferentes tejidos con diversas funciones biológicas. Concretamente, en el sistema reproductor de algunos mamíferos se expresa en el endometrio, el ovario y el oviducto. En el caso de la especie porcina sólo se conocía su expresión en el oviducto en presencia de ovocitos, por lo que nos interesó conocer su posible secreción oviductal durante el ciclo estral. La segunda proteína estudiada ha sido la lactadherina, la cual también está presente en diversos tejidos, pero su secreción epididimal y su participación en la unión entre el espermatozoide y el ovocito hicieron que quisiésemos investigarla en el oviducto porcino, junto con su posible efecto sobre el sistema de FIV porcino. Los objetivos de esta Tesis Doctoral implican la utilización de diversas técnicas de biología molecular y proteómica para la detección de ambas proteínas en el FOP, para conocer su expresión en diferentes fases del ciclo estral y su efecto en el sistema de FIV porcino. A continuación, se exponen brevemente los experimentos realizados y los resultados obtenidos diferenciando entre estas dos proteínas.

### 8.1 La proteína haptoglobina en el oviducto porcino

La proteína Hp se ha detectado en el oviducto de vaca, en el FO de conejo, así como en el FOP en presencia de ovocitos. En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, se había identificado el ARNm de Hp en el oviducto porcino a nivel de la unión ampular-ístmica en la fase preovulatoria. A partir de ahí, se quiso analizar la expresión de Hp en diferentes fases del ciclo estral para conocer su posible expresión diferencial en base a la regulación hormonal, utilizándose como control los análisis en cerdas prepúberes.

Mediante RT-PCR en tiempo real observamos que la expresión del ARNm de Hp en el oviducto porcino es continua a lo largo del ciclo estral, encontrando un aumento de la expresión en la fase luteal tardía al compararla con la fase folicular tardía. Esta diferencia indica que la presencia de Hp en el oviducto porcino podría considerarse una transcripción dependiente de la progesterona.

A continuación, quisimos detectar esta proteína en el FOP en las fases del ciclo estral folicular tardía y luteal tardía mediante HPLC-ESI-MS/MS, ya que era en estas fases donde se había observado esta diferencia de expresión. Se detectaron un total de 17 péptidos diferentes en el FOP de las fases folicular tardía y luteal tardía lo que supone un 42.26 % de cobertura de la proteína respecto a la secuencia aminoacídica derivada del gen, y mediante Western-blot se determinó que la proteína migraba a un peso de  $\approx 45$  kDa.

Los ensayos inmunohistoquímicos para la detección de Hp en el oviducto mostraron una tinción intensa en la región apical de las células del epitelio oviductal, hallándose diferencias significativas en la cuantificación de dicha señal respecto al área epitelial total. Esto sugiere la secreción de la proteína Hp se produce en las células epiteliales del oviducto porcino.

Finalmente quisimos conocer el efecto de la proteína en el sistema de FIV, por lo que se añadió la proteína purificada del suero a una concentración de  $10 \mu\text{g/ml}$  al medio de FIV. Los resultados mostraron una disminución significativa en el porcentaje de penetración, en el número medio de espermatozoides unidos a la ZP y en el número medio de pronúcleos por ovocito. Esto podría ser indicador de su posible unión al ovocito o al espermatozoide. Son necesarios futuros experimentos para determinar la viabilidad de añadir al medio de FIV la proteína Hp para la mejora en el rendimiento del sistema

porcino, como aumentar el número de replicados o la incubación de los gametos con esta proteína de forma previa a la FIV.

En conclusión, nuestros resultados mostraron la secreción por parte del oviducto porcino de la proteína Hp, con una mayor expresión en la fase luteal tardía respecto a la folicular tardía, lo que sugiere una posible regulación por progesterona. También pudimos observar algunos efectos interesantes sobre el sistema de FIV porcino cuando se añade la proteína Hp al medio, pero es necesario seguir investigando para determinar una aplicación eficiente de la misma.

## **8.2 La proteína lactadherina en el oviducto porcino**

La proteína lactadherina se identificó inicialmente como un componente de los glóbulos grasos de la leche que se liberaban en la glándula mamaria mediante exosomas. Este mismo sistema de secreción se vio en el epidídimo porcino, donde la proteína se adhiere al espermatozoide y posteriormente participaba en el reconocimiento entre gametos para su unión a la ZP del ovocito. A la vista de esos estudios, quisimos conocer si el oviducto porcino también expresaba la proteína, ya que hasta el momento solo se había descrito su expresión en el útero.

Tras obtener el ARN total de oviducto porcino en diferentes fases del ciclo estral (folicular temprana, folicular tardía, luteal temprana y luteal tardía), detectamos mediante RT-PCR el ARNm para la proteína lactadherina en oviducto (ampolla e istmo), usando de forma paralela su presencia en el útero porcino como control. Estos resultados se confirmaron mediante la secuenciación de los amplificadores.

A continuación, se realizó un análisis comparativo mediante RT-PCR en tiempo real de los niveles de expresión relativa del gen de lactadherina en ampolla e istmo del oviducto de cerda. Estos primeros análisis indicaron que no existen diferencias entre los niveles de expresión génica para la proteína lactadherina en estas dos localizaciones. Por otro lado, se determinó la abundancia relativa de su expresión en la ampolla y en el istmo, comparando las mismas fases del ciclo estral. Se utilizó como referencia la expresión en la fase folicular temprana para comparar con el resto de fases. Estos análisis nos mostraron que existe expresión génica a lo largo del ciclo estral en ambas regiones y en todas las fases, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre fases.

Para poder conocer si esta expresión se traducía a proteína en el FOP, se realizó un análisis proteómico mediante HPLC-ESI-MS/MS en las mismas cuatro fases del ciclo.

Este análisis detectó 1 péptido de la proteína lactadherina en la fase folicular temprana. La inmunodetección de lactadherina en FOP mediante SDS-PAGE y posterior Western-blot mostró una doble banda de  $\approx 47$  kDa y de  $\approx 40$  kDa. Para conocer cuál era la banda exacta donde migraba la proteína se realizó un gel SDS-PAGE con el FOP de la fase folicular temprana, se tiñó con azul de coomassie, se recortaron las dos bandas cuyo peso coincidían con las detectadas en la membrana de Western-blot y se analizaron mediante HPLC-ESI-MS/MS. Los resultados mostraron la detección de 1 péptido en la banda de 47 kDa, tal y como está descrito en la bibliografía, aunque otros autores también detectan una segunda banda de menor peso molecular, pudiendo ser una glicofoma de lactadherina. Estos dos péptidos detectados presentaban un score superior a 5 y un SPI superior a 60 y suponen un 9,28 % de cobertura de la proteína respecto a la secuencia aminoacídica derivada del gen. Esto nos sugiere una presencia minoritaria de la proteína en el oviducto porcino.

Para conocer el efecto de la proteína lactadherina en el sistema de FIV porcino, se diseñaron dos experimentos distintos. Por un lado, se incubaron ovocitos de forma previa a la FIV con la proteína recombinante lactadherina, obteniendo diferencias estadísticamente significativas en el promedio de espermatozoides que penetraban en cada ovocito. En un segundo experimento, se incubaron los espermatozoides de forma previa a la FIV con la misma proteína recombinante. Los resultados mostraron una disminución significativa en los porcentajes de penetración, en el número medio de espermatozoides por ovocito, en la unión de espermatozoides a la ZP y el correspondiente aumento del porcentaje de monospermia. Esto sugiere que la presencia de la proteína lactadherina en el oviducto participa en la interacción entre gametos.

Para concluir, nuestros resultados mostraron por primera vez la presencia en el oviducto porcino de la proteína lactadherina, con una expresión estable a lo largo del ciclo. Los efectos sobre el sistema de FIV porcino son prometedores en vista del aumento de la monospermia, por lo que es necesario seguir investigando para su posible aplicación directa en las TRAs, tal y como ha sido descrito el uso beneficioso de otras glicoproteínas en estas técnicas.

## ***IX. Abreviaturas***

---



<b>aa:</b> aminoácidos	<b>DMBT1:</b> proteína suprimida en tumores cerebrales malignos
<b>ACE:</b> enzima convertidora de angiotensina	<b>dNTPs:</b> desoxinucleótido trifosfato
<b>ADNc:</b> ácido desoxirribonucleico complementario	<b>DTT:</b> ditioneitol
<b>AMPc:</b> adenosín monofosfato cíclico	<b>EGF:</b> factor de crecimiento epidérmico
<b>APOA1:</b> apolipoproteína A1	<b>FIV:</b> fecundación <i>in vitro</i>
<b>APOE:</b> apolipoproteína E	<b>FO:</b> fluido oviductal
<b>ARN:</b> ácido ribonucleico	<b>FOP:</b> fluido oviductal porcino
<b>ARNm:</b> ácido ribonucleico mensajero	<b>GalT:</b> $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa
<b>ARSA:</b> arilsulfatasa A	<b>GPX:</b> Glutación peroxidasas
<b>ATP:</b> adenosín trifosfato	<b>hCG:</b> gonadotropina coriónica humana
<b>ATF4:</b> factor activador de la transcripción 4	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>:</b> ión bicarbonato
<b><math>\alpha</math>-MAN:</b> $\alpha$ -manosidasa	<b>Hp:</b> haptoglobina
<b>AWN:</b> miembro de la familia de espermadhesinas	<b>HPLC-ESI-MS/MS:</b> cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
<b>BSA:</b> albúmina de suero bovino	<b>HRP:</b> peroxidasa de rábano
<b><math>\beta</math>-GAL:</b> $\beta$ -galactosidasa	<b>HSPs:</b> proteínas de choque térmico
<b>BSP:</b> proteínas de unión del espermatozoide	<b>ICSI:</b> inyección intracitoplasmática de espermatozoides
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b> ión calcio	<b>IGF:</b> factor de crecimiento similar a la insulina
<b>CCK:</b> colecistoquinina	<b>K<sup>+</sup>:</b> ión potasio
<b>CCO:</b> complejo cúmulo-ovocito	<b>KO:</b> <i>Knockout</i>
<b>CEP164:</b> Proteína centrosomal de 164 kDa	<b>LDH:</b> lipoproteínas de alta densidad
<b>CETAB:</b> bromuro de hexadecil-trimetilamonio	<b>LDL:</b> lipoproteínas de baja densidad
<b>Cl<sup>-</sup>:</b> ión cloro	<b>L-PGDS:</b> prostaglandina D sintasa tipo lipocalina
<b>CO<sub>2</sub>:</b> dióxido de carbono	<b>LTF:</b> lactoferrina
<b>Ct:</b> threshold cycle	<b>Mg<sup>2+</sup>:</b> ión magnesio
<b>dbAMPc:</b> dibutiril AMP cíclico	<b>MIV:</b> maduración <i>in vitro</i>

<b>ml:</b> mililitros	<b>PVDF:</b> fluoruro de polivinilideno
<b>mm:</b> milímetros	<b>p/v:</b> partes/volumen
<b>MS/MS:</b> espectrometría de masas en tándem	<b>RA:</b> reacción acrosómica
<b>MUC1:</b> mucina 1	<b>RF:</b> rojo fenol
<b>MUC9:</b> mucina9 u oviductina	<b>RGD:</b> arginina-glicina-ácido aspártico
<b>MΩ/cm:</b> mili osmios por centímetro	<b>ROS:</b> especies reactivas de oxígeno
<b>Na<sup>+</sup>:</b> ión sodio	<b>RT-PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa retrotranscrita o a partir de ADNc
<b>NAGASA:</b> β-N-acetyloglucosaminidasa	<b>SDS:</b> dodecil sulfato sódico
<b>NK:</b> células natural killer	<b>SDS-PAGE:</b> electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
<b>nt:</b> nucleótidos	<b>SEM:</b> error estándar
<b>OPN:</b> osteopontina	<b>SPAM1:</b> molécula de adhesión del espermatozoide.
<b>OVGP1:</b> glicoproteína específica del oviducto, Mucina-9 u Oviductina	<b>SSF:</b> solución salina fisiológica
<b>PAEP:</b> glicodelina, proteína placentaria 14 o proteína endometrial asociada a progesterona	<b>TAE:</b> tampón Tris, acetato y EDTA
<b>pb:</b> pares de bases	<b>TAC3</b> taquiquinina 3 o neuroquinina B
<b>PBS:</b> tampón fosfato salino	<b>TBST:</b> tampón Tris, HCl, SDS y Tween 20
<b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa	<b>TFA:</b> trifluoroacético
<b>PDIA6:</b> proteína isomerasa A6	<b>TGF:</b> factor de crecimiento transformante
<b>PEBP4:</b> proteína de unión a fosfatidiletanolamina 4	<b>Tm:</b> Temperatura de melting o de fusión
<b>PFA:</b> proteínas de fase aguda	<b>TRAs:</b> técnicas de reproducción asistida
<b>PMCA4:</b> ATPasa transportadora de calcio de membrana plasmática 4	<b>UI:</b> unidades internacionales
<b>PMSG:</b> gonadotropina sérica de yegua gestante	<b>ZP:</b> zona pelúcida
<b>PVA:</b> polivinil- alcohol	

## ***X. Anexos***

---



**Tabla A1.** Composición del medio de maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos porcinos.

<b>MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS PORCINOS (NCSU 37)</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
<b>Cloruro de sodio</b> (Sigma S-9888)	108,73
<b>Bicarbonato sódico</b> (Sigma S-5761)	25,07
<b>Cloruro potásico</b> (Sigma P-5405)	4,78
<b>Dihidrógeno fosfato de potasio</b> (Sigma P-5655)	1,19
<b>Sulfato de magnesio heptahidratado</b> (Sigma M-1880)	1,19
<b>Cloruro cálcico dihidratado</b> (Sigma C-7902)	1,70
<b>Glucosa</b> (Sigma G-7021)	5,55
<b>Glutamina</b> (Sigma G-8540)	1,00
<b>D- Sorbitol</b> (Sigma S-3889)	12,00
<b>Penicilina G</b> (Sigma P-3032)	0,18
<b>Estreptomicina</b> (Sigma S-9137)	39,00 UI/mL
<b>Suplementos</b>	<b>Concentración</b>
<b>Cisteína</b> (Sigma C-7352)	0,57 mM
<b>β-mercaptoetanol</b> (Sigma M-7154)	50,00 μM
<b>Insulina</b> (Sigma I-6634)	5,00 mg/L
<b>Fluido folicular Porcino</b> (PFF)	10,00 % (v/v)
<b>dbAMPc</b> (Fluka, 34988)	1,00 mM
<b>PMSG</b> (Sincopart TM, Ceva Salud Animal S.A. Barcelona, España)	10,00 UI/mL
<b>hCG</b> (Laboratorios Intervet S.A. Salamanca, España)	10,00 UI/mL
pH 7,4	

**Tabla A2.** Composición y preparación del gradiente de Percoll.

<b>Solución 10x stock</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
NaCl (Sigma S-9888)	799,96
KCl (Sigma S-5405)	30,85
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (Sigma S-9638)	28,98
Hepes (Sigma H-4034)	99,87
<b>Percoll 90 %</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
Solución 10x stock	20 mL
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma S-5761)	25,00
Lactato sódico (Sigma L-7900)	43,57
Percoll®	180,00 mL
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (Sigma M-2393)	0,395
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O (Sigma C-7902)	1,95
<b>Percoll 45 %</b>	
<b>Componente</b>	<b>Volumen (mL)</b>
Percoll 90 %	5,00
BTS	5,00

**Tabla A3.** Composición del diluyente BTS para procesamiento de espermatozoides de verraco (Pursel *et al.*, 1975).

<b>Diluyente BTS</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración (mM)</b>
Glucosa (Sigma G-7021)	0,0002
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O (Sigma S-5761)	36,36
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma S-5761)	15,00
Citrato-Na <sub>3</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Sigma S-4641)	20,00
KCl (Sigma P-5405)	5,00
pH 7,2	

**Tabla A4.** Composición del medio TALP (Tyrode-Albúmina-Lactato-Piruvato, (Rath *et al.*, 1999)

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

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

<b>Tampón de recorrido 10X</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
<b>Tris Base</b>	30,0 g/L
<b>Glicina</b>	144 g/L
<b>SDS</b>	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.

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

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

<b>Tampón TBST 10X</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
<b>Tris Base</b>	24 g/L
<b>NaCl</b>	88 g/L
<b>Tween 20</b>	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 inmunohistoquímica.**

<b>Inmunógeno</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Procedencia</b>
<b>Western-blot</b>				
Rabbit Anti-MFGE8	1:4000	Sigma-Aldrich	HPA002807	San Luis, EEUU
Rabbit Anti- Pig Haptoglobin	1:4000	Creative Diagnostic	DPAB2074	NY, EEUU
Cabra anti-conejo IgG HRP	1:40000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2004	Heidelberg, Alemania
<b>Inmunohistoquímica</b>				
Rabbit Anti-Pig Haptoglobin	1:10	Creative Diagnostic	DPAB2074	NY, EEUU
Cabra anti-conejo IgG HRP	1:50	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2004	Heidelberg, Alemania

## ***XI. Bibliografía***

---



- Abe H. (1996) The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol Histopathol* **11**, 743-768.
- Abe H & Hoshi H. (2007) Regional and cyclic variations in the ultrastructural features of secretory cells in the oviductal epithelium of the Chinese Meishan pig. *Reprod Domest Anim* **42**, 292-298.
- Abe H & Hoshi H. (2008) Morphometric and ultrastructural changes in ciliated cells of the oviductal epithelium in prolific Chinese Meishan and Large White pigs during the oestrous cycle. *Reprod Domest Anim* **43**, 66-73.
- Abe H, Sendai Y, Satoh T & Hoshi H. (1995) Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev* **42**, 226-232.
- Abraham N G & Drummond G. (2006) CD163-Mediated hemoglobin-heme uptake activates macrophage HO-1, providing an antiinflammatory function. *Circ Res* **99**, 911-914.
- Absalón-Medina V A, Butler W R & Gilbert R O. (2014) Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. *J Assist Reprod Genet* **31**, 393-409.
- Acton S, Rigotti A, Landschulz K T, Xu S, Hobbs H H & Krieger M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518-520.
- Acuña O S, Vilella I, Cánovas S, Coy P, Jimenez-Movilla M, & Avilés M. (2014) Detection of Spam1 in exosomes isolated from the bovine oviductal fluid. *Reprod Domest Anim* **49**, 97-98.
- Acuña O S, Avilés M, López-Úbeda R, Guillén-Martínez A, Soriano-Úbeda C, Torrecillas A, Coy P & Izquierdo-Rico M J. (2017) Differential gene expression in porcine oviduct during the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* **29**, 2387-2399.
- Adachi K, Kurachi H, Homma H, Adachi H, Imai T, Sakata M, Higashiguchi O, Yamaguchi M, Morishige K & Sakoyama Y. (1995) Estrogen induces epidermal growth factor (EGF) receptor and its ligands in human fallopian tube: involvement of EGF but not transforming growth factor-alpha in estrogen-induced tubal cell growth in vitro. *Endocrinology* **136**, 2110-2119.
- Aitken R J. (2017) Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev* **84**, 1039-1052.
- Aitken R J, Baker M A & Nixon B. (2015) Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl* **17**, 633-639.

- Aitken R J & Nixon B. (2013) Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol Hum Reprod* **19**, 785-793.
- Akerlöf E, Jörnvall H, Slotte H & Pousette A. (1991) Identification of apolipoprotein A1 and immunoglobulin as components of a serum complex that mediates activation of human sperm motility. *Biochemistry* **30**, 8986-8990.
- Al-Azemi M, Refaat B, Aplin J & Ledger W. (2009) The expression of MUC1 in human Fallopian tube during the menstrual cycle and in ectopic pregnancy. *Hum Reprod* **24**, 2582-2587.
- Al-Dossary A A & Martin-Deleon P A. (2016) Role of exosomes in the reproductive tract Oviductosomes mediate interactions of oviductal secretion with gametes/early embryo. *Front Biosci (Landmark Ed)* **21**, 1278-1285.
- Al-Dossary A A, Strehler E E & Martin-Deleon P A. (2013) Expression and secretion of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PLoS One* **8**, e80181.
- Algarra B, Han L, Soriano-Úbeda C, Avilés M, Coy P, Jovine L & Jiménez-Movilla M. (2016) The C-terminal region of OVGP1 remodels the zona pellucida and modifies fertility parameters. *Sci Rep* **6**, 32556.
- Almiñana C, Caballero I, Heath P R, Maleki-Dizaji S, Parrilla I, Cuello C, Gil M A, Vazquez J L, Vazquez J M, Roca J, Martinez E A, Holt W V & Fazeli A. (2014) The battle of the sexes starts in the oviduct: modulation of oviductal transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa. *BMC Genomics* **15**, 293.
- Almiñana C, Corbin E, Tsikis G, Alcântara-Neto A S, Labas V, Reynaud K, Galio L, Uzbekov R, Garanina A S, Druart X & Mermillod P. (2017) Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction* **154**, 153-168.
- Almiñana C, Heath P R, Wilkinson S, Sanchez-Osorio J, Cuello C, Parrilla I, Gil M A, Vazquez J L, Vazquez J M, Roca J, Martinez E A & Fazeli A. (2012) Early developing pig embryos mediate their own environment in the maternal tract. *PLoS One* **7**, e33625.
- Ambrosi B, Accogli G, Douet C, Canepa S, Pascal G, Monget P, Moros Nicolás C, Holmskov U, Mollenhauer J, Robbe-Masselot C, Vidal O, Desantis S & Goudet G. (2013) Deleted in malignant brain tumor 1 is secreted in the oviduct and involved in the mechanism of fertilization in equine and porcine species. *Reproduction* **146**, 119-133.
- An L P, Maeda T, Sakaue T, Takeuchi K, Yamane T, Du P G, Ohkubo I & Ogita H. (2012) Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **423**, 690-696.

- Andersen C B, Torvund-Jensen M, Nielsen M J, de Oliveira C L, Hersleth H P, Andersen N H, Pedersen J S, Andersen G R & Moestrup S K. (2012) Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex. *Nature* **489**, 456-459.
- Andersen M H, Berglund L, Rasmussen J T & Petersen T E. (1997) Bovine PAS-6/7 binds alpha v beta 5 integrins and anionic phospholipids through two domains. *Biochemistry* **36**, 5441-5446.
- Andersen M H, Graversen H, Fedosov S N, Petersen T E & Rasmussen J T. (2000) Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry* **39**, 6200-6206.
- Anderson D J, Abbott A F & Jack R M. (1993) The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10051-10055.
- Angen O, Thomsen J, Larsen L E, Larsen J, Kokotovic B, Heegaard P M & Enemark J M. (2009) Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet Microbiol* **137**, 165-171.
- Aoki N, Jin-no S, Nakagawa Y, Asai N, Arakawa E, Tamura N, et al. Identification and characterization of micro-vesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone-dependent induction of milk fat globule epidermal growth factor 8-associated micro-vesicles. *Endocrinol* 2007;148:3850e62.
- Apichela S A, Argañaraz M E, Zampini R, Vencato J, Miceli D C & Stelletta C. (2015) Biochemical composition and protein profile of alpaca (*Vicugna pacos*) oviductal fluid. *Anim Reprod Sci* **154**, 79-85.
- Arcelay E, Salicioni A M, Wertheimer E & Visconti P E. (2008) Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* **52**, 463-472.
- Ardon F, Markello R D, Hu L, Deutsch Z I, Tung C K, Wu M & Suarez S S. (2016) Dynamics of Bovine Sperm Interaction with Epithelium Differ Between Oviductal Isthmus and Ampulla. *Biol Reprod* **95**, 90.
- Arias E B, Verhage H G & Jaffe R C. (1994) Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biol Reprod* **51**, 685-694.
- Ashrafi I, Kohram H & Ardabili F F. (2013) Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **139**, 25-30.
- Asleh R, Miller-Lotan R, Aviram M, Hayek T, Yulish M, Levy J E, Miller B, Blum S, Milman U, Shapira C & Levy A P. (2006) Haptoglobin genotype is a regulator of reverse cholesterol transport in diabetes in vitro and in vivo. *Circ Res* **99**, 1419-1425.

- Atabai K, Fernandez R, Huang X, Ueki I, Kline A, Li Y, Sadatmansoori S, Smith-Steinhart C, Zhu W, Pytela R, Werb Z & Sheppard D. (2005) Mfge8 is critical for mammary gland remodeling during involution. *Mol Biol Cell* **16**, 5528-5537.
- Avilés M, Jaber L, Castells M T, Ballesta J & Kan F W. (1997) Modifications of carbohydrate residues and ZP2 and ZP3 glycoproteins in the mouse zona pellucida after fertilization. *Biol Reprod* **57**, 1155-1163.
- Avilés M, Jaber L, Castells M T, Kan F K & Ballesta J. (1996) Modifications of the lectin binding pattern in the rat zona pellucida after in vivo fertilization. *Mol Reprod Dev* **44**, 370-381.
- Avilés M, Gutiérrez-Adán A & Coy P. (2010) Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* **16**, 896-906.
- B**aba, D., Kashiwabara, S. I., Honda, A., Yamagata, K., Wu, Q., Ikawa, M., ... & Baba, T. (2002). Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J Biol Chem*, 277(33), 30310-30314
- Bahat A, Caplan S R & Eisenbach M. (2012) Thermotaxis of human sperm cells in extraordinarily shallow temperature gradients over a wide range. *PLoS One* **7**, e41915.
- Bathala P, Fereshteh Z, Li K, Al-Dossary A A, Galileo D S & Martin-DeLeon P A. (2018) Oviductal extracellular vesicles (oviductosomes, OVS) are conserved in humans: murine OVS play a pivotal role in sperm capacitation and fertility. *Mol Hum Reprod* **24**, 143-157.
- Bauersachs S, Blum H, Mallok S, Wenigerkind H, Rief S, Prella K & Wolf E. (2003) Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. *Biol Reprod* **68**, 1170-1177.
- Bauersachs S, Rehfeld S, Ulbrich S E, Mallok S, Prella K, Wenigerkind H, Einspanier R, Blum H & Wolf E. (2004) Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol* **32**, 449-466.
- Beier H M & Beier-Hellwig K. (1998) Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Hum Reprod Update* **4**, 448-458.
- Bensi G, Raugei G, Klefenz H & Cortese R. (1985) Structure and expression of the human haptoglobin locus. *EMBO J* **4**, 119-126.
- Bergamo P, Balestrieri M, Carratore V & Abrescia P. (1995) Purification of a 240 kDa protein from serum and follicular fluid of water buffalo and its identification as haptoglobin. *J Exp Zool* **271**, 452-461.
- Bergqvist A S, Killian G, Erikson D, Hoshino Y, Båge R, Sato, Rodríguez-Martínez H. (2005) Detection of Fas ligand in the bovine oviduct. *Anim Reprod Sci* **86**,71-88.

- Berker B, Kahraman K, Taskin S, Sukur Y E, Sonmezer M & Atabekoglu C S. (2011) Recombinant FSH versus clomiphene citrate for ovarian stimulation in couples with unexplained infertility and male subfertility undergoing intrauterine insemination: a randomized trial. *Arch Gynecol Obstet* **284**, 1561-1566.
- Berkova N, Lemay A, De Grandpré P, Goupil S & Maheux R. (1997) Immunoblot detection of decreased antibodies to haptoglobin-like protein in the serum of infertile women with or without endometriosis. *Biol Reprod* **57**, 178-185.
- Berkova N, Lemay A, Dresser D W, Fontaine J Y, Kerizit J & Goupil S. (2001) Haptoglobin is present in human endometrium and shows elevated levels in the decidua during pregnancy. *Mol Hum Reprod* **7**, 747-754.
- Bian F, Mao G, Guo M, Wang J, Li J, Han Y, Chen X, Zhang M & Xia G. (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. *J Cell Physiol* **227**, 2230-2239.
- Bianchi E, Doe B, Goulding D & Wright G J. (2014) Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**, 483-487.
- Bidarimath M, Khalaj K, Kridli R T, Kan F W, Koti M & Tayade C. (2017) Extracellular vesicle mediated intercellular communication at the porcine maternal-fetal interface: A new paradigm for conceptus-endometrial cross-talk. *Sci Rep* **7**, 40476.
- Bishop D W. (1956) Active secretion in the rabbit oviduct. *Am J Physiol* **187**, 347-352.
- Bjornsson E, Helgason H, Halldorsson G, Helgadottir A, Gylfason A, Kehr B, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Oddsson A, Thorleifsson G, Magnusson O T, Gretarsdottir S, Zink F, Kristjansson R P, Asgeirsdottir M, Swinkels D W, Kiemenev L, Eyjolfsson G, Sigurdardottir O, Masson G, Olafsson I, Thorgeirsson G, Holm H, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson D F, Sulem P & Stefansson K. (2017) A rare splice donor mutation in the haptoglobin gene associates with blood lipid levels and coronary artery disease. *Hum Mol Genet* **26**, 2364-2376.
- Blandau R J & Stegall H F. (1973) Workshop in instrumentation of the oviduct. *Fertil Steril* **24**, 487-489.
- Blobel C P, Wolfsberg T G, Turck C W, Myles D G, Primakoff P & White J M. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* **356**, 248-252.
- Bocca S, Anderson S & Oehninger S. (2010) Milk fat globule epithelial growth factor 8 (MFG-E8) regulates human endometrial endothelial cell adhesion and proliferation. *Fertil Steril* **94**, S215e6
- Bocca S M, Anderson S, Amaker B, Swanson R J, Franchi A, Lattanzio F & Oehninger S. (2012) Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8): a novel protein in the mammalian endometrium with putative roles in implantation and placentation. *Placenta* **33**, 795-802.

- Boettger L M, Salem R M, Handsaker R E, Peloso G M, Kathiresan S, Hirschhorn J N & McCarroll S A. (2016) Recurring exon deletions in the HP (haptoglobin) gene contribute to lower blood cholesterol levels. *Nat Genet* **48**, 359-366.
- Boilard M, Reyes-Moreno C, Lachance C, Massicotte L, Bailey J L, Sirard M A & Leclerc P. (2004) Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. *Biol Reprod* **71**, 1879-1889.
- Borland R M, Biggers J D, Lechene C P & Taymor M L. (1980) Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube. *J Reprod Fertil* **58**, 479-482.
- Bottini N, Gimelfarb A, Gloria-Bottini F, La Torre M, Lucarelli P & Lucarini N. (1999) Haptoglobin genotype and natural fertility in humans. *Fertil Steril* **72**, 293-296.
- Bowman B H & Kurosky A. (1982) Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Genet* **12**, 189-261, 453-184.
- Brenner R & Slayden O. (1994) Cyclic changes in the primate oviduct and endometrium. In: *Physiology of Reproduction* (eds E Knobil and J D Neill) pp. 541-569. Raven Press, New York,
- Brewis I A, Winston R M & Leese H J. (1992) Energy metabolism of the human fallopian tube. *J Reprod Fertil* **95**, 257-262.
- Bromfield E G, Aitken R J, Anderson A L, McLaughlin E A & Nixon B. (2015) The impact of oxidative stress on chaperone-mediated human sperm-egg interaction. *Hum Reprod* **30**, 2597-2613.
- Bromfield E G, McLaughlin E A, Aitken R J & Nixon B. (2016) Heat Shock Protein member A2 forms a stable complex with angiotensin converting enzyme and protein disulfide isomerase A6 in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **22**, 93-109.
- Bromfield J J. (2014) Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. *J Assist Reprod Genet* **31**, 627-636.
- Bromfield J J, Schjenken J E, Chin P Y, Care A S, Jasper M J & Robertson S A. (2014) Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2200-2205.
- Bu H F, Zuo X L, Wang X, Ensslin M A, Koti V, Hsueh W, Raymond A S, Shur B D & Tan X D. (2007) Milk fat globule-EGF factor 8/lactadherin plays a crucial role in maintenance and repair of murine intestinal epithelium. *J Clin Invest* **117**, 3673-3683.
- Buchanan G R, Holtkamp C A & Johnson A. (1990) Reduced serum haptoglobin values in hemophiliacs receiving monoclonally purified factor VIII concentrates. *Am J Hematol* **33**, 234-237.

- 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 & Simmen F A. (1996) Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biol Reprod* **55**, 1305-1314.
- Buhi W C, Alvarez I M & Kouba A J. (2000) Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues Organs* **166**, 165-179.
- Buhi W C, O'Brien B, Alvarez I M, Erdos G & Dubois D. (1993) Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol Reprod* **48**, 1274-1283.
- Burkart A D, Xiong B, Baibakov B, Jiménez-Movilla M & Dean J. (2012) Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J Cell Biol* **197**, 37-44.
- Burkman L J, Overstreet J W & Katz D F. (1984) A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviducal isthmus. *J Reprod Fertil* **71**, 367-376.
- Burns G, Brooks K, Wildung M, Navakanitworakul R, Christenson L K & Spencer T E. (2014) Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS One* **9**, e90913.
- Burns G W, Brooks K E & Spencer T E. (2016) Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep. *Biol Reprod* **94**, 56.
- Bylander A, Lind K, Goksör M, Billig H & Larsson D G. (2013) The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone. *Reprod Biol Endocrinol* **11**, 33.
- Bylander A, Nutu M, Wellander R, Goksör M, Billig H & Larsson D G. (2010) Rapid effects of progesterone on ciliary beat frequency in the mouse fallopian tube. *Reprod Biol Endocrinol* **8**, 48.
- C**ampanella C, Marino Gammazza A, Nikolic D, Rappa F, David S, Cappello F, Bucchieri F & Fais S (2014) Exosomal Heat Shock Proteins as new players in tumour cell-to-cell communication. *Journal of Circulating Biomarkers* **3**
- Cancel A M, Chapman D A & Killian G J. (1997) Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* **57**, 1293-1301.

- Cánovas S, Ivanova E, Romar R, García-Martínez S, Soriano-Úbeda C, García-Vázquez F A, Saadeh H, Andrews S, Kelsey G & Coy P. (2017) DNA methylation and gene expression changes derived from assisted reproductive technologies can be decreased by reproductive fluids. *Elife* **6**.
- Cárdenas H, Corvalan L & Imarai M. (1998) Is there a mucosal immune system associated with the mammalian oviduct? *Biol Res* **31**, 329-338.
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord J J, Collen D & Mulligan R C. (1994) Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**, 419-424.
- Carrasco L C, Coy P, Avilés M, Gadea J & Romar R. (2008a) Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev* **20**, 808-817.
- Carrasco L C, Romar R, Avilés M, Gadea J & Coy P. (2008b) Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction* **136**, 833-842.
- Carter K & Worwood M. (2007) Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol* **29**, 92-110.
- Cejudo Roman A, Pinto F M, Dorta I, Almeida T A, Hernández M, Illanes M, Tena-Sempere M & Candenas L. (2012) Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract. *Fertil Steril* **97**, 1213-1219.
- Cerny K L, Garrett E, Walton A J, Anderson L H & Bridges P J. (2015) A transcriptomal analysis of bovine oviductal epithelial cells collected during the follicular phase versus the luteal phase of the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* **13**, 84.
- Chang H & Suarez S S. (2010) Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol Reprod* **83**, 507-513.
- Chang H & Suarez S S. (2012) Unexpected flagellar movement patterns and epithelial binding behavior of mouse sperm in the oviduct. *Biol Reprod* **86**, 140, 141-148.
- Chegini N, Kotseos K, Ma C, Williams R S, Diamond M P, Holmdahl L, Skinner K & Group P H a A M S. (2001) Differential expression of integrin alpha v and beta 3 in serosal tissue of human intraperitoneal organs and adhesion. *Fertil Steril* **75**, 791-796.
- Chegini N, Zhao Y & McLean F W. (1994) Expression of messenger ribonucleic acid and presence of immunoreactive proteins for epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGF alpha) and EGF/TGF alpha receptors and 125I-EGF binding sites in human fallopian tube. *Biol Reprod* **50**, 1049-1058.

- Chen S, Einspanier R & Schoen J. (2013) In vitro mimicking of estrous cycle stages in porcine oviduct epithelium cells: estradiol and progesterone regulate differentiation, gene expression, and cellular function. *Biol Reprod* **89**, 54.
- Chiu P C, Chung M K, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Ho P C, Ng E H, Lee K F & Yeung W S. (2007a) Cumulus oophorus-associated glycodelin-C displaces sperm-bound glycodelin-A and -F and stimulates spermatozoa-zona pellucida binding. *J Biol Chem* **282**, 5378-5388.
- Chiu P C, Chung M K, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Ho P C, Ng E H, Lee K F & Yeung W S. (2007b) Glycodelin-A interacts with fucosyltransferase on human sperm plasma membrane to inhibit spermatozoa-zona pellucida binding. *J Cell Sci* **120**, 33-44.
- Chung J J, Navarro B, Krapivinsky G, Krapivinsky L & Clapham D E. (2011) A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* **2**, 153.
- Cid M C, Grant D S, Hoffman G S, Auerbach R, Fauci A S & Kleinman H K. (1993) Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest* **91**, 977-985.
- Cigliano L, Pugliese C R, Spagnuolo M S, Palumbo R & Abrescia P. (2009) Haptoglobin binds the antiatherogenic protein apolipoprotein E - impairment of apolipoprotein E stimulation of both lecithin:cholesterol acyltransferase activity and cholesterol uptake by hepatocytes. *FEBS J* **276**, 6158-6171.
- Clulow J, Trudeau V L & Kouba A J. (2014) Amphibian declines in the twenty-first century: why we need assisted reproductive technologies. *Adv Exp Med Biol* **753**, 275-316.
- Colombo M, Raposo G & Théry C. (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 255-289.
- Comizzoli P. (2015) Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian J Androl* **17**, 640-645.
- Comizzoli P & Holt W V. (2014) Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. *Adv Exp Med Biol* **753**, 331-356.
- Conner J G, Eckersall P D, Wiseman A, Bain R K & Douglas T A. (1989) Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Res Vet Sci* **47**, 203-207.
- Copland S D, Murphy A A & Shur B D. (2009) The mouse gamete adhesin, SED1, is expressed on the surface of acrosome-intact human sperm. *Fertil Steril* **92**, 2014-2019.

- Cortés P P, Orihuela P A, Zúñiga L M, Velásquez L A & Croxatto H B. (2004) Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface. *Biol Reprod* **71**, 1262-1269.
- Costa-Mallen P, Checkoway H, Zabeti A, Edenfield M J, Swanson P D, Longstreth W T, Franklin G M, Smith-Weller T & Sadrzadeh S M. (2008) The functional polymorphism of the hemoglobin-binding protein haptoglobin influences susceptibility to idiopathic Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**, 216-222.
- Couto J R, Taylor M R, Godwin S G, Ceriani R L & Peterson J A. (1996) Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain. *DNA Cell Biol* **15**, 281-286.
- Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Saavedra M D, Romar R, Grullón L, Matás C & Avilés M. (2008) Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15809-15814.
- Coy P, Gadea J, Rath D & Hunter R H. (2009) Differing sperm ability to penetrate the oocyte in vivo and in vitro as revealed using colloidal preparations. *Theriogenology* **72**, 1171-1179.
- Coy P, García-Vázquez F A, Visconti P E & Avilés M. (2012a) Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* **144**, 649-660.
- Coy P, Jiménez-Movilla M, García-Vázquez F A, Mondéjar I, Grullón L & Romar R. (2012b) Oocytes use the plasminogen-plasmin system to remove supernumerary spermatozoa. *Hum Reprod* **27**, 1985-1993.
- Coy P, & 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. (2002) Physiology of gamete and embryo transport through the fallopian tube. *Reprod Biomed Online* **4**, 160-169.
- Croxatto H B & Ortiz M E. (1975) Egg transport in the fallopian tube. *Gynecol Invest* **6**, 215-225.
- Cseh S & Solti L. (2000) Importance of assisted reproductive technologies in the conservation of wild, rare or indigenous ungulates: review article. *Acta Vet Hung* **48**, 313-323.
- D**acheux, J. L., & Dacheux, F. (2014). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, 147(2), R27-R42.

- Davis B K, Byrne R & Hungund B. (1979) Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* **558**, 257-266.
- Defaus S, Avilés M, Andreu D & Gutiérrez-Gallego R. (2018) Lectin-Binding Specificity of the Fertilization-Relevant Protein PDC-109 by Means of Surface Plasmon Resonance and Carbohydrate REcognition Domain EXcision-Mass Spectrometry. *Int J Mol Sci* **19**.
- Denhardt D T & Guo X. (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* **7**, 1475-1482.
- Depypere H T, Langlois M R, Delanghe J R, Temmerman M & Dhont M. (2006) Haptoglobin polymorphism in patients with preeclampsia. *Clin Chem Lab Med* **44**, 924-928.
- Desantis S, Zizza S, Accogli G, Acone F, Rossi R & Resta L. (2011) Morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium during oestrus. *Theriogenology* **75**, 671-678.
- DeSouza M M & Murray M K. (1995) An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* **136**, 2485-2496.
- Dickens C J, Comer M T, Southgate J & Leese H J. (1996) Human Fallopian tubal epithelial cells in vitro: establishment of polarity and potential role of intracellular calcium and extracellular ATP in fluid secretion. *Hum Reprod* **11**, 212-217.
- Dickens C J, Maguiness S D, Comer M T, Palmer A, Rutherford A J & Leese H J. (1995) Human tubal fluid: formation and composition during vascular perfusion of the fallopian tube. *Hum Reprod* **10**, 505-508.
- Dix D J, Allen J W, Collins B W, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding E H & Eddy E M. (1996) Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3264-3268.
- Dobrinski I, Smith T T, Suarez S S & Ball B A. (1997) Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* **56**, 861-869.
- Dobryszczycka W. (1997) Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **35**, 647-654.
- Dovolou E, Samartzi F, Perreau C, Krania F, Cordova A, Vainas E, Amiridis G S, Mermillod P & Tsiligianni T. (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.

- Drevet J R. (2006) The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* **250**, 70-79.
- E**aton J W, Brandt P, Mahoney J R & Lee J T. (1982) Haptoglobin: a natural bacteriostat. *Science* **215**, 691-693.
- Ebersole J L & Cappelli D. (2000) Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol 2000* **23**, 19-49.
- Ebisch I M, Thomas C M, Wetzels A M, Willemsen W N, Sweep F C & Steegers-Theunissen R P. (2008) Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertil Steril* **90**, 2340-2350.
- Eckersall P D & Bell R. (2010) Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* **185**, 23-27.
- Ehrenwald E, Foote R H & Parks J E. (1990) Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev* **25**, 195-204.
- Einspanier R, Lauer B, Gabler C, Kamhuber M & Schams D. (1997) Egg-cumulus-oviduct interactions and fertilization. *Adv Exp Med Biol* **424**, 279-289.
- Eisenbach M & Giojalas L C. (2006) Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 276-285.
- El Ghmati S M, Van Hoeyveld E M, Van Strijp J G, Ceuppens J L & Stevens E A. (1996) Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *J Immunol* **156**, 2542-2552.
- El Hajj N & Haaf T. (2013) Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertil Steril* **99**, 632-641.
- El-Mestrah M & Kan F W. (2001) Distribution of lectin-binding glycosidic residues in the hamster follicular oocytes and their modifications in the zona pellucida after ovulation. *Mol Reprod Dev* **60**, 517-534.
- Ellington J E, Igotz G G, Ball B A, Meyers-Wallen V N & Currie W B. (1993) De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa. *Biol Reprod* **48**, 851-856.
- Elliott R M, Lloyd R E, Fazeli A, Sostaric E, Georgiou A S, Satake N, Watson P F & Holt W V. (2009) Effects of HSPA8, an evolutionarily conserved oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. *Reproduction* **137**, 191-203.
- Ensslin M, Vogel T, Calvete J J, Thole H H, Schmidtke J, Matsuda T & Töpfer-Petersen E. (1998) Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biol Reprod* **58**, 1057-1064.

- Ensslin M A & Shur B D. (2003) Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* **114**, 405-417.
- Ensslin M A & Shur B D. (2007) The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFG-E8, is required for mammary gland branching morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2715-2720.
- Eurell T E, Bane D P, Hall W F & Schaeffer D J. (1992) Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs. *Can J Vet Res* **56**, 6-9.
- Evans A & O'Doherty J. (2001) Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. *Livest. Prod. Sci.* **68**, 1-12. doi:10.1016/S0301-6226(00)00202-5
- Evans J P & Florman H M. (2002) The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat Cell Biol* **4 Suppl**, s57-63.
- Eyestone W H & First N L. (1989) Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil* **85**, 715-720.
- F**agoonee S, Gburek J, Hirsch E, Marro S, Moestrup S K, Laurberg J M, Christensen E I, Silengo L, Altruda F & Tolosano E. (2005) Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading. *Am J Pathol* **166**, 973-983.
- Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell D C, Hyttel P, Ward F A & Boland M P. (2001) Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev* **58**, 186-195.
- Farhi J & Orvieto R. (2010) Cumulative clinical pregnancy rates after COH and IUI in subfertile couples. *Gynecol Endocrinol* **26**, 500-504.
- Fazeli A, Affara N A, Hubank M & Holt W V. (2004) Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice. *Biol Reprod* **71**, 60-65.
- Fazeli A, Elliott R M, Duncan A E, Moore A, Watson P F & 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.
- Fens M H, Mastrobattista E, de Graaff A M, Flesch F M, Ultee A, Rasmussen J T, Molema G, Storm G & Schiffelers R M. (2008) Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells. *Blood* **111**, 4542-4550.
- Fernández-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jiménez A, Pérez-Crespo M, Ramírez M A, Rodríguez De Fonseca F, Pintado B & Gutiérrez-Adán A. (2004) Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5880-5885.

- Fink H, Rex A, Voits M & Voigt J P. (1998) Major biological actions of CCK--a critical evaluation of research findings. *Exp Brain Res* **123**, 77-83.
- Fischer B & Bavister B D. (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* **99**, 673-679.
- Folmes C D & Terzic A. (2014) Metabolic determinants of embryonic development and stem cell fate. *Reprod Fertil Dev* **27**, 82-88.
- Franchi A, Bocca S, Anderson S, Riggs R & Oehninger S. (2011) Expression of milk fat globule EGF-factor 8 (MFG-E8) mRNA and protein in the human endometrium and its regulation by prolactin. *Mol Hum Reprod* **17**, 360-371.
- Franchi A, Zaret J, Zhang X, Bocca S & Oehninger S. (2008) Expression of immunomodulatory genes, their protein products and specific ligands/receptors during the window of implantation in the human endometrium. *Mol Hum Reprod* **14**, 413-421.
- Freeman D A, Woods G L, Vanderwall D K & Weber J A. (1992) Embryo-initiated oviductal transport in mares. *J Reprod Fertil* **95**, 535-538.
- Friedrichs W E, Navarajo-Ashbaugh A L, Bowman B H & Yang F. (1995) Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **209**, 250-256.
- Fuentes-Prior P, Fujikawa K & Pratt K P. (2002) New insights into binding interfaces of coagulation factors V and VIII and their homologues lessons from high resolution crystal structures. *Curr Protein Pept Sci* **3**, 313-339.
- Funahashi H & Day B N. (1993) Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* **98**, 179-185.
- Funahashi H, Ekwall H & Rodriguez-Martinez H. (2000) Zona reaction in porcine oocytes fertilized in vivo and in vitro as seen with scanning electron microscopy. *Biol Reprod* **63**, 1437-1442.
- Fábryová K & Simon M. (2009) Function of the cell surface molecules (CD molecules) in the reproduction processes. *Gen Physiol Biophys* **28**, 1-7.
- G**abler C, Chapman D A & Killian G J. (2003) Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction* **126**, 721-729.
- Gabler C, Oda S, Muller K, Schon J, Bondzio A & Einspanier R. (2008) Exploring cumulus-oocyte-complex-oviductal cell interactions: gene profiling in the bovine oviduct. *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 9**, 29-42.

- Gadella B M. (2017) Reproductive tract modifications of the boar sperm surface. *Mol Reprod Dev* **84**, 822-831.
- Gandolfi F. (1995) Functions of proteins secreted by oviduct epithelial cells. *Microsc Res Tech* **32**, 1-12.
- Gandolfi F, Brevini T A, Richardson L, Brown C R & Moor R M. (1989) Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* **106**, 303-312.
- Gandolfi F & Moor R M. (1987) Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil* **81**, 23-28.
- García-Vázquez F A, Hernández-Caravaca I, Matás C, Soriano-Úbeda C, Abril-Sánchez S & Izquierdo-Rico M J. (2015) Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract. *J Reprod Dev* **61**, 407-413.
- García-Vázquez F A, Hernández-Caravaca I, Yáñez-Quintana W, Matás C, Soriano-Úbeda C & Izquierdo-Rico M J. (2015) Morphometry of boar sperm head and flagellum in semen backflow after insemination. *Theriogenology* **84**, 566-574.
- Gardner D K. (2008) Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev* **20**, 9-18.
- Gardner D K, Lane M, Calderon I & Leeton J. (1996) Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* **65**, 349-353.
- George S H, Greenaway J, Milea A, Clary V, Shaw S, Sharma M, Virtanen C & Shaw P A. (2011) Identification of abrogated pathways in fallopian tube epithelium from BRCA1 mutation carriers. *J Pathol* **225**, 106-117.
- Georgiou A S, Snijders A P, Sostaric E, Aflatoonian R, Vazquez J L, Vazquez J M, Roca J, Martinez E A, Wright P C & Fazeli A. (2007) Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res* **6**, 4656-4666.
- Georgiou A S, Sostaric E, Wong C H, Snijders A P, Wright P C, Moore H D & Fazeli A. (2005) Gametes alter the oviductal secretory proteome. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1785-1796.
- Gerena R L, Irikura D, Urade Y, Eguchi N, Chapman D A & Killian G J. (1998) Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol Reprod* **58**, 826-833.
- Ghosh P, Saha S K, Bhattacharya S, Mukherjee S & Roy S S. (2007) Tachykinin family genes and their receptors are differentially expressed in the hypothyroid ovary and pituitary. *Cell Physiol Biochem* **20**, 357-368.

- Gloria-Bottini F, Magrini A, Amante A, Nicotra M & Bottini E. (2009) Haptoglobin phenotype and reproductive success in repeated spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **144**, 153-156.
- González-Cadavid V, Martins J A, Moreno F B, Andrade T S, Santos A C, Monteiro-Moreira A C, Moreira R A & Moura A A. (2014) Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology* **82**, 697-707.
- Gonçalves R F, Staros A L & Killian G J. (2008) Oviductal fluid proteins associated with the bovine zona pellucida and the effect on in vitro sperm-egg binding, fertilization and embryo development. *Reprod Domest Anim* **43**, 720-729.
- Gott A L, Gray S M, James A F & Leese H J. (1988) The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. *Biol Reprod* **39**, 758-763.
- Goudet G. (2011) Fertilisation in the horse and paracrine signalling in the oviduct. *Reprod Fertil Dev* **23**, 941-951.
- Greening D W, Nguyen H P, Elgass K, Simpson R J & Salamonsen L A. (2016) Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions. *Biol Reprod* **94**, 38.
- Griffiths G S, Miller K A, Galileo D S & Martin-DeLeon P A. (2008) Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. *Reproduction* **135**, 293-301.
- Grinsted J, Kjer J J, Blendstrup K & Pedersen J F. (1985) Is low temperature of the follicular fluid prior to ovulation necessary for normal oocyte development? *Fertil Steril* **43**, 34-39.
- Grippo A A, Henault M A, Anderson S H & Killian G J. (1992) Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J Dairy Sci* **75**, 58-65.
- Gualtieri R, Boni R, Tosti E, Zagami M & 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 & 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.
- Gutiérrez-Adán A, Rizos D, Fair T, Moreira P N, Pintado B, de la Fuente J, Boland M P & Lonergan P. (2004) Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* **68**, 441-448.

- Gutteridge J M. (1987) The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* **917**, 219-223.
- Guérin P, El Mouatassim S & Ménézo Y. (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* **7**, 175-189.
- Gånheim C, Alenius S & Persson Waller K. (2007) Acute phase proteins as indicators of calf herd health. *Vet J* **173**, 645-651.
- H**afez E & Hafez B. (2000) Reproducción e inseminación artificial en animales (7<sup>a</sup> Edición), McGraw-Hill Interamericana.
- Halbert S A, Tam P Y & Blandau R J. (1976) Egg transport in the rabbit oviduct: the roles of cilia and muscle. *Science* **191**, 1052-1053.
- Hancock R J & Faruki S. (1986) Assessment of immune responses to H-Y antigen in naturally inseminated and sperm-injected mice using cell-mediated cytotoxicity assays. *J Reprod Immunol* **9**, 187-194.
- Hannerz J, Greitz D & Ericson K. (1995) Is there a relationship between obesity and intracranial hypertension? *Int J Obes Relat Metab Disord* **19**, 240-244.
- Hao Y, Mathialagan N, Walters E, Mao J, Lai L, Becker D, Li W, Critser J & Prather R S. (2006) Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod* **75**, 726-733.
- Haram K, Augensen K & Elsayed S. (1983) Serum protein pattern in normal pregnancy with special reference to acute-phase reactants. *Br J Obstet Gynaecol* **90**, 139-145.
- Harding J E. (2001) The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* **30**, 15-23.
- Harris S E, Gopichandran N, Picton H M, Leese H J & Orsi N M. (2005) Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* **64**, 992-1006.
- Heegaard P M, Godson D L, Toussaint M J, Tjørnehøj K, Larsen L E, Viuff B & Rønsholt L. (2000) The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol* **77**, 151-159.
- Heinrich P C, Castell J V & Andus T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* **265**, 621-636.
- Heo J, Kattesh H G, Roberts M P, Morrow J L, Dailey J W & Saxton A M. (2005) Hepatic corticosteroid-binding globulin (CBG) messenger RNA expression and plasma CBG concentrations in young pigs in response to heat and social stress. *J Anim Sci* **83**, 208-215.

- Hernández-González E O, Sosnik J, Edwards J, Acevedo J J, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A & Visconti P E. (2006) Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem* **281**, 5623-5633.
- Herrler A, Krusche C A, Müller-Schöttle F & 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. *Hum Reprod* **19**, 2730-2737.
- Hey N A & Aplin J D. (1996) Sialyl-Lewis x and Sialyl-Lewis a are associated with MUC1 in human endometrium. *Glycoconj J* **13**, 769-779.
- Hilkens J, Ligtenberg M J, Vos H L & Litvinov S V. (1992) Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci* **17**, 359-363.
- Hiss S, Knura-Deszczka S, Regula G, Hennies M, Gymnich S, Petersen B & Sauerwein H. (2003) Development of an enzyme immuno assay for the determination of porcine haptoglobin in various body fluids: testing the significance of meat juice measurements for quality monitoring programs. *Vet Immunol Immunopathol* **96**, 73-82.
- Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A & Arima T. (2014) Imprinting methylation errors in ART. *Reprod Med Biol* **13**, 193-202.
- Hoffman L H, Winfrey V P, Blaeuer G L & Olson G E. (1996) A haptoglobin-like glycoprotein is produced by implantation-stage rabbit endometrium. *Biol Reprod* **55**, 176-184.
- Holt W V, Brown J L & Comizzoli P. (2014) Reproductive science as an essential component of conservation biology. *Adv Exp Med Biol* **753**, 3-14.
- Holt W V & Fazeli A. (2010) The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *Mol Reprod Dev* **77**, 934-943.
- Holt W V & Fazeli A. (2015) Do sperm possess a molecular passport? Mechanistic insights into sperm selection in the female reproductive tract. *Mol Hum Reprod* **21**, 491-501.
- Holt W V & Van Look K J. (2004) Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* **127**, 527-535.
- Hugentobler S, Morris D G, Kane M T & Sreenan J M. (2004) In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology* **61**, 1419-1427

- Hugentobler S A, Sreenan J M, Humpherson P G, Leese H J, Diskin M G & 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. *Reprod Fertil Dev* **22**, 684-694.
- Hultén C, Johansson E, Fossum C & Wallgren P. (2003) Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* **95**, 75-89.
- Hung P H & Suarez S S. (2010) Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. *Soc Reprod Fertil Suppl* **67**, 257-266.
- Hunter R H (1972). Fertilization in pig - sequence of nuclear and cytoplasmic events. *J Reprod Fertil* **29**, 395-406
- Hunter R H. (1980). Physiology and technology of reproduction in female domestic animals. *Academic Press*, London ; New York
- Hunter R H. (1981) Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* **63**, 109-117.
- Hunter R H. (1991) Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* **29**, 385-391.
- Hunter R H. (1994) Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. *Mol Reprod Dev* **39**, 176-181.
- Hunter R.H. (1995) Ovarian endocrine control of sperm progression in the fallopian tubes. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology* (ed H M Charlton), pp:85-124. Oxford University Press
- Hunter R H. (1998) Have the Fallopian tubes a vital rôle in promoting fertility? *Acta Obstet Gynecol Scand* **77**, 475-486.
- Hunter R H. (2002) Vital aspects of Fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Domest Anim* **37**, 186-190.
- Hunter R H. (2005) The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev* **45**, 281-290.
- Hunter R H. (2012a) Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* **87**, 244-255.
- Hunter R H. (2012b) Temperature gradients in female reproductive tissues. *Reprod Biomed Online* **24**, 377-380.
- Hunter R H, Cicinelli E & Einer-Jensen N. (2007) Peritoneal fluid as an unrecognised vector between female reproductive tissues. *Acta Obstet Gynecol Scand* **86**, 260-265.

- Hunter R H, Coy P, Gadea J & Rath D. (2011) Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *J Assist Reprod Genet* **28**, 191-197.
- Hunter R H, Fléchon B & Fléchon J E. (1991) Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell* **23**, 641-656.
- Hunter R H & Nichol R. (1983) Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool* **228**, 121-128.
- Hunter R H & Wilmut I. (1984) Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev* **24**, 597-608.
- Ignatz G G, Cho M Y & Suarez S S. (2007) Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biol Reprod* **77**, 906-913.
- Iritani A, Sato E & Nishikawa Y. (1974) Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *J Anim Sci* **39**, 582-588.
- Ishikawa Y, Usui T, Yamashita M, Kanemori Y & Baba T. (2016) Surfing and Swimming of Ejaculated Sperm in the Mouse Oviduct. *Biol Reprod* **94**, 89.
- Izquierdo-Rico, M. J., Gimeno, L., Jiménez-Cervantes, C., Ballesta, J., & Avilés, M. (2011). Biosynthesis of hamster zona pellucida is restricted to the oocyte. *Theriogenology*, 75, 463-472.
- Jankovic S M, Protic B A & Jankovic S V. (2004) Contractile effect of acetylcholine on isolated isthmus segment of fallopian tubes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **26**, 87-91.
- Javid J. (1965) The effect of haptoglobin polymer size on hemoglobin binding capacity. *Vox Sang* **10**, 320-325.
- Jentoft N. (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* **15**, 291-294.
- Jeoung M & Bridges P J. (2011) Cyclic regulation of apoptotic gene expression in the mouse oviduct. *Reprod Fertil Dev* **23**, 638-644.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba S A, Chiba K & Hirohashi N. (2011) Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4892-4896.
- Jones G M, Cram D S, Song B, Magli M C, Gianaroli L, Lacham-Kaplan O, Findlay J K, Jenkin G & Trounson A O. (2008) Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Hum Reprod* **23**, 1138-1144.

- Jue D M, Shim B S & Kang Y S. (1983) Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin. *Mol Cell Biochem* **51**, 141-147.
- K**an F W & Esperanzate P W. (2006) Surface mapping of binding of oviductin to the plasma membrane of golden hamster spermatozoa during in vitro capacitation and acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* **73**, 756-766.
- Kanai Y, Kanai-Azuma M, Tajima Y, Birk O S, Hayashi Y & Sanai Y. (2000) Identification of a stromal cell type characterized by the secretion of a soluble integrin-binding protein, MFG-E8, in mouse early gonadogenesis. *Mech Dev* **96**, 223-227.
- Kane M T, Morgan P M & Coonan C. (1997) Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum Reprod Update* **3**, 137-157.
- Kapelnikov A, Zelinger E, Gottlieb Y, Rhrissorrakrai K, Gunsalus K C & Heifetz Y. (2008) Mating induces an immune response and developmental switch in the *Drosophila* oviduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13912-13917.
- Katarzyna S M, Wiesław B & Anna R. (2010) The tunica mucosa of the oviduct in case of ovarian cysts presence in sows. *Folia Histochem Cytobiol*, 148-156.
- Katnik I & Dobryszczyka W. (1990) Enzyme immunoassay to measure low levels of haptoglobin in biological fluids. *J Immunoassay* **11**, 503-517.
- Kawano N, Kang W, Yamashita M, Koga Y, Yamazaki T, Hata T, Miyado K & Baba T. (2010) Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile in vitro. *Biol Reprod* **83**, 359-369.
- Keefer C L. (2015) Artificial cloning of domestic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 8874-8878.
- Khosla S, Dean W, Reik W & Feil R. (2001) Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update* **7**, 419-427.
- Killian G. (2011) Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock. *J Anim Sci* **89**, 1315-1322.
- Killian G J. (2004) Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim Reprod Sci* **82-83**, 141-153.
- Killian G J, Chapman D A, Kavanaugh J F, Deaver D R & Wiggin H B. (1989) Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil* **86**, 419-426.

- Kim J M, Park J E, Yoo I, Han J, Kim N, Lim W J, Cho E S, Choi B, Choi S, Kim T H, Te Pas M F W, Ka H & Lee K T. (2018) Integrated transcriptomes throughout swine oestrous cycle reveal dynamic changes in reproductive tissues interacting networks. *Sci Rep* **8**, 5436.
- Kim N H, Funahashi H, Abeydeera L R, Moon S J, Prather R S & Day B N. (1996) Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* **107**, 79-86.
- King R S, Anderson S H & Killian G J. (1994) Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* **15**, 468-478.
- Kirchhoff C & Hale G. (1996) Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol Hum Reprod* **2**, 177-184.
- Kissin D M, Jamieson D J & Barfield W D. (2014) Monitoring health outcomes of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* **371**, 91-93.
- Kleijkers S H, Eijssen L M, Coonen E, Derhaag J G, Mantikou E, Jonker M J, Mastenbroek S, Repping S, Evers J L, Dumoulin J C & van Montfoort A P. (2015) Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media. *Hum Reprod* **30**, 2303-2311.
- Koj A. (1974) Acute-phase reactants. In: *Structure and function of plasma proteins* (eds A C Allison) pp. 73-131. Plenum Press. London
- Konar S, Singha K B, Mondal M K. & 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.
- Krapf D, Arcelay E, Wertheimer E V, Sanjay A, Pilder S H, Salicioni A M & Visconti P E. (2010) Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem* **285**, 7977-7985.
- Kudo J, Okubo H, Ikuta T. (1982) Interaction of acute phase reactive (APR) proteins with lectins: its relationship to lymphocyte transformation. *Biomed. Res.* **3** 417-421
- Kumaresan A, Ansari M R, Garg A & Kataria M. (2006) Effect of oviductal proteins on sperm functions and lipid peroxidation levels during cryopreservation in buffaloes. *Anim Reprod Sci* **93**, 246-257.
- Kunitake S T, Carilli C T, Lau K, Protter A A, Naya-Vigne J & Kane J P. (1994) Identification of proteins associated with apolipoprotein A-I-containing lipoproteins purified by selected-affinity immunosorption. *Biochemistry* **33**, 1988-1993.

- Kushner I & Mackiewicz, A. (1993). The acute phase response: an overview. In: *Acute phase protein, molecular biology, biochemistry and clinical applications*, (eds A Mackiewicz, I Kushner & H Baumawn), pp. 3-19 CDC Press. London.
- Kölle S, Dubielzig S, Reese S, König P & Kummer W. (2009) Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biol Reprod* **81**, 267-274.
- L**a Spina F A, Puga Molina L C, Romarowski A, Vitale A M, Falzone T L, Krapf D, Hirohashi N & Buffone M G. (2016) Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev Biol* **411**, 172-182.
- Lachance C, Bailey J L & Leclerc P. (2007) Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Hum Reprod* **22**, 2606-2614.
- Lamblin G & Roussel P. (1993) Airway mucins and their role in defence against microorganisms. *Respir Med* **87**, 421-426.
- Lamy J, Labas V, Harichaux G, Tsikis G, Mermillod P & Saint-Dizier M. (2016) Regulation of the bovine oviductal fluid proteome. *Reproduction* **152**, 629-644.
- Lamy J, Nogues P, Combes-Soia L, Tsikis G, Labas V, Mermillod P, Druart X & Saint-Dizier M. (2018) Identification by proteomics of oviductal sperm-interacting proteins. *Reproduction* **155**, 457-466.
- Langlois M R & Delanghe J R. (1996) Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* **42**, 1589-1600.
- Lapensée L, Paquette Y & Bleau G. (1997) Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9). *Fertil Steril* **68**, 702-708.
- Lapointe J & Bilodeau J F. (2003) Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *Biol Reprod* **68**, 1157-1164.
- Lapointe S & Sirard M A. (1996) Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **44**, 234-240.
- Lavery K, Gabler C, Day J & Killian G. (2004) Expression of haptoglobin mRNA in the liver and oviduct during the oestrous cycle of cows (*Bos taurus*). *Anim Reprod Sci* **84**, 13-26.
- Lavery K, Way A & 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, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H & Galli C. (2002) Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod* **67**, 767-775.
- Le Floch N, Jondreville C, Matte J J & Seve B. (2006) Importance of sanitary environment for growth performance and plasma nutrient homeostasis during the post-weaning period in piglets. *Arch Anim Nutr* **60**, 23-34.
- Le Goff D. (1994) Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid. *Biochim Biophys Acta* **1210**, 226-232.
- Lee C L, Lam K K, Koistinen H, Seppala M, Kurpisz M, Fernandez N, Pang R T, Yeung W S & Chiu P C. (2011) Glycodelin-A as a paracrine regulator in early pregnancy. *J Reprod Immunol* **90**, 29-34.
- Lee K F, Yao Y Q, Kwok K L, Xu J S & Yeung W S. (2002) Early developing embryos affect the gene expression patterns in the mouse oviduct. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 564-570.
- Lee K F & Yeung W S. (2006) Gamete/embryo - oviduct interactions: implications on in vitro culture. *Hum Fertil (Camb)* **9**, 137-143.
- Lee Y L, Cheong A W, Chow W N, Lee K F & Yeung W S. (2009) Regulation of complement-3 protein expression in human and mouse oviducts. *Mol Reprod Dev* **76**, 301-308.
- Leese H J. (1988) The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* **82**, 843-856.
- Leese H J. (1995) Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Hum Reprod Update* **1**, 63-72.
- Leese H J, Conaghan J, Martin K L & Hardy K. (1993) Early human embryo metabolism. *Bioessays* **15**, 259-264.
- Leese H J & Gray S M. (1985) Vascular perfusion: a novel means of studying oviduct function. *Am J Physiol* **248**, E624-632.
- Leese H J, Hugentobler S A, Gray S M, Morris D G, Sturmey R G, Whitear S L & Sreenan J M. (2008) Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Dev* **20**, 1-8.
- Leese H J, Tay J I, Reischl J & Downing S J. (2001) Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* **121**, 339-346.
- Lefebvre R & Suarez S S. (1996) Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol Reprod* **54**, 575-582.

- Lessey B A, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda S M & Buck C A. (1992) Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* **90**, 188-195.
- Li S & Winuthayanon W. (2017) Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J Endocrinol* **232**, R1-R26.
- Lim S K. (2001) Consequences of haemolysis without haptoglobin. *Redox Rep* **6**, 375-378.
- Lim S K, Kim H, bin Ali A, Lim Y K, Wang Y, Chong S M, Costantini F & Baumman H. (1998) Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis. *Blood* **92**, 1870-1877.
- Lin P, Chen F, Yang Y, Song Y, Li X, Lan X, Jin Y & Wang A. (2012) GRP78 expression and immunohistochemical localization in the female reproductive tract of mice. *Theriogenology* **78**, 1824-1829.
- Liu J, Marey M A, Kowsar R, Hambruch N, Shimizu T, Haneda S, Matsui M, Sasaki M, Hayakawa H, Pfarrer C & Miyamoto A. (2014) An acute-phase protein as a regulator of sperm survival in the bovine oviduct: alpha 1-acid-glycoprotein impairs neutrophil phagocytosis of sperm in vitro. *J Reprod Dev* **60**, 342-348.
- Liu Q, Xie Q Z, Zhou Y & Yang J. (2015) Osteopontin is expressed in the oviduct and promotes fertilization and preimplantation embryo development of mouse. *Zygote* **23**, 622-630.
- Lloyd R E, Elliott R M, Fazeli A, Watson P F & 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. *Reprod Fertil Dev* **21**, 408-418.
- Lloyd R E, Fazeli A, Watson P F & Holt W V. (2012) The oviductal protein, heat-shock 70-kDa protein 8, improves the long-term survival of ram spermatozoa during storage at 17°C in a commercial extender. *Reprod Fertil Dev* **24**, 543-549.
- Lloyd R E, Romar R, Matás C, Gutiérrez-Adán A, Holt W V & Coy P. (2009b) Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction* **137**, 679-687.
- Lockhart W L, Chung W P & Smith D B. (1972) Studies on the dissociation of porcine haptoglobin. *Can J Biochem* **50**, 775-781.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D & Evans A C. (2006) Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* **65**, 137-152.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adán A, Moreira P M, Pintado B, de la Fuente J & 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. *Biol Reprod* **69**, 1424-1431.

- Longobardi V, Salzano A, Campanile G, Marrone R, Palumbo F, Vitiello M, Zullo G & Gasparri B. (2017) Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology* **88**, 236-243.
- Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Maillo V, Lloreda V, Coy P, Gutierrez-Adan A, Bermejo-Alvarez P & Rizos D. (2017) Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* **29**, 621-629.
- Lopera-Vásquez R, Hamdi M, Fernandez-Fuertes B, Maillo V, Beltrán-Breña P, Calle A, Redruello A, López-Martín S, Gutierrez-Adán A, Yañez-Mó M, Ramirez M & Rizos D. (2016) Extracellular Vesicles from BOEC in In Vitro Embryo Development and Quality. *PLoS One* **11**, e0148083.
- Lucas E. (2013) Epigenetic effects on the embryo as a result of periconceptual environment and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* **27**, 477-485.
- Lyng R & Shur B D. (2009) Mouse oviduct-specific glycoprotein is an egg-associated ZP3-independent sperm-adhesion ligand. *J Cell Sci* **122**, 3894-3906.
- Lyons R A, Saridogan E & Djahanbakhch O. (2006) The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update* **12**, 363-372.
- López-Úbeda R & Matás C. (2015a) An Approach to the Factors Related to Sperm Capacitation Process. *Andrology* **4**, 128
- López-Úbeda R, García-Vázquez F A, Romar R, Gadea J, Muñoz M, Hunter R H & Coy P. (2015b) Oviductal Transcriptome Is Modified after Insemination during Spontaneous Ovulation in the Sow. *PLoS One* **10**, e0130128.
- M**aas D H, Storey B T & Mastroianni L. (1977) Hydrogen ion and carbon dioxide content of the oviductal fluid of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* **28**, 981-985.
- Maeda N, Yang F, Barnett D R, Bowman B H & Smithies O. (1984) Duplication within the haptoglobin Hp2 gene. *Nature* **309**, 131-135.
- Maillo V, Gaora P, Forde N, Besenfelder U, Havlicek V, Burns G W, Spencer T E, Gutierrez-Adan A, Lonergan P & Rizos D. (2015) Oviduct-Embryo Interactions in Cattle: Two-Way Traffic or a One-Way Street? *Biol Reprod* **92**, 144.
- Maillo V, Sánchez-Calabuig M J, Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Gutierrez-Adan A, Lonergan P & Rizos D. (2016) Oviductal response to gametes and early embryos in mammals. *Reproduction* **152**, R127-141.
- Malayer J R, Hansen P J & Buhi W C. (1988) Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J Exp Zool* **248**, 345-353.

- Malette B, Paquette Y, Merlen Y & Bleau G. (1995) Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev* **41**, 384-397.
- Maresh G A, Timmons T M & Dunbar B S. (1990) Effects of extracellular matrix on the expression of specific ovarian proteins. *Biol Reprod* **43**, 965-976.
- Marey M A, Liu J, Kowsar R, Haneda S, Matsui M, Sasaki M, Takashi S, Hayakawa H, Wijayagunawardane M P, Hussein F M & Miyamoto A. (2014) Bovine oviduct epithelial cells downregulate phagocytosis of sperm by neutrophils: prostaglandin E2 as a major physiological regulator. *Reproduction* **147**, 211-219.
- Marey M A, Yousef M S, Kowsar R, Hambruch N, Shimizu T, Pfarrer C & Miyamoto A. (2016) Local immune system in oviduct physiology and pathophysiology: attack or tolerance? *Domest Anim Endocrinol* **56 Suppl**, S204-211.
- Margis R, Dunand C, Teixeira F K & Margis-Pinheiro M. (2008) Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J* **275**, 3959-3970.
- Martin-DeLeon P A. (2015) Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface. *Asian J Androl* **17**, 720-725.
- Mastroianni L, Beer F, Shah U & Clewe T H. (1961) Endocrine regulation of oviduct secretions in the rabbit. *Endocrinology* **68**, 92-100.
- McCauley T C, Buhi W C, Wu G M, Mao J, Caamano J N, Didion B A & Day B N. (2003) Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod* **69**, 828-834.
- McEvoy T G, Sinclair K D, Young L E, Wilmut I & Robinson J J. (2000) Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum Fertil (Camb)* **3**, 238-246.
- Menezo Y & Guerin P. (1997) The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **73**, 99-104.
- Miki K & Clapham D E. (2013) Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol* **23**, 443-452.
- Miller D J, Macek M B & Shur B D. (1992) Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* **357**, 589-593.
- Miller Y I, Altamentova S M & Shaklai N. (1997) Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiated globin radical: antioxidant role of haptoglobin. *Biochemistry* **36**, 12189-12198.
- Millet S, Cox E, Buyse J, Goddeeris B M & Janssens G P. (2005) Immunocompetence of fattening pigs fed organic versus conventional diets in organic versus conventional housing. *Vet J* **169**, 293-299.

- Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz J I, Williams S, Bocca S & Oehninger S. (2005) In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod* **20**, 2104-2117.
- Moein-Vaziri N, Phillips I, Smith S, Almiñana C, Maside C, Gil M A, Roca J, Martinez E A, Holt W V, Pockley A G & Fazeli A. (2014) Heat-shock protein A8 restores sperm membrane integrity by increasing plasma membrane fluidity. *Reproduction* **147**, 719-732.
- Mondéjar I, Acuña O S, Izquierdo-Rico M J, Coy P & Avilés M. (2012) The oviduct: functional genomic and proteomic approach. *Reprod Domest Anim* **47 Suppl 3**, 22-29.
- Moral Castrillo, P. (1986) Estudio antropogenético de diversos polimorfismos hematológicos en la isla de Menorca *Universidad de Barcelona*. Facultad de Biología.. Tesis Doctoral
- Morales P, Palma V, Salgado A M & Villalon M. (1996) Sperm interaction with human oviductal cells in vitro. *Hum Reprod* **11**, 1504-1509.
- Mugnier S, Kervella M, Douet C, Canepa S, Pascal G, Deleuze S, Duchamp G, Monget P & Goudet G. (2009) The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reprod Biol Endocrinol* **7**, 129.
- Mullis K B. (1990) Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* **48**, 579-582.
- Murata H, Shimada N & Yoshioka M. (2004) Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* **168**, 28-40.
- Muro Y, Hasuwa H, Isotani A, Miyata H, Yamagata K, Ikawa M, Yanagimachi R & Okabe M. (2016) Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biol Reprod* **94**, 80.
- Mustafa S, Vukovich T, Prikoszovich T, Winzer C, Schneider B, Esterbauer H, Wagner O & Kautzky-Willer A. (2004) Haptoglobin phenotype and gestational diabetes. *Diabetes Care* **27**, 2103-2107.
- N**agel R L & Gibson Q H. (1971) The binding of hemoglobin to haptoglobin and its relation to subunit dissociation of hemoglobin. *J Biol Chem* **246**, 69-73.
- Nakanishi T, Isotani A, Yamaguchi R, Ikawa M, Baba T, Suarez S S & 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. *Biol Reprod* **71**, 959-965.
- Nandrot E F & Finnemann S C. (2008) Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Res* **40**, 120-123.

- Neuer A, Spandorfer S D, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z & Witkin S S. (2000) The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update* **6**, 149-159.
- Neutzner M, Lopez T, Feng X, Bergmann-Leitner E S, Leitner W W & Udey M C. (2007) MFG-E8/lactadherin promotes tumor growth in an angiogenesis-dependent transgenic mouse model of multistage carcinogenesis. *Cancer Res* **67**, 6777-6785.
- Newburg D S, Peterson J A, Ruiz-Palacios G M, Matson D O, Morrow A L, Shults J, Guerrero M L, Chaturvedi P, Newburg S O, Scallan C D, Taylor M R, Ceriani R L & Pickering L K. (1998) Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* **351**, 1160-1164.
- Ng Y H, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks C L & Salamonsen L A. (2013) Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PLoS One* **8**, e58502.
- Nichol R, Hunter R H, Gardner D K, Leese H J & Cooke G M. (1992) Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil* **96**, 699-707.
- Nichol R, Hunter R H, Gardner D K, Partridge R, Leese H J & Cooke G M. (1998) Concentrations of energy substrates in oviduct fluid in unilaterally ovariectomised pigs. *Res Vet Sci* **65**, 263-264.
- Nieder G L & Corder C N. (1983) Pyruvate and lactate levels in oviducts of cycling, pregnant, and pseudopregnant mice. *Biol Reprod* **28**, 566-574.
- Nielsen M J & Moestrup S K. (2009) Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. *Blood* **114**, 764-771.
- Nielsen M J, Petersen S V, Jacobsen C, Thirup S, Enghild J J, Graversen J H & Moestrup S K. (2007) A unique loop extension in the serine protease domain of haptoglobin is essential for CD163 recognition of the haptoglobin-hemoglobin complex. *J Biol Chem* **282**, 1072-1079.
- Nixon B, Bielanowicz A, McLaughlin E A, Tanphaichitr N, Ensslin M A & Aitken R J. (2009) Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *J Cell Physiol* **218**, 122-134.
- Norman R J & Clark A M. (1998) Obesity and reproductive disorders: a review. *Reprod Fertil Dev* **10**, 55-63.
- Nutu M, Weijdegård B, Thomas P, Thurin-Kjellberg A, Billig H & Larsson D G. (2009) Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors beta and gamma in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. *Reprod Biol Endocrinol* **7**, 89.

- O'Bryan M K, Grima J, Mruk D & Cheng C Y. (1997) Haptoglobin is a Sertoli cell product in the rat seminiferous epithelium: its purification and regulation. *J Androl* **18**, 637-645.
- O'Day-Bowman M B, Mavrogianis P A, Minshall R D & Verhage H G. (2002) In vivo versus in vitro oviductal glycoprotein (OGP) association with the zona pellucida (ZP) in the hamster and baboon. *Mol Reprod Dev* **62**, 248-256.
- O'Day-Bowman M B, Mavrogianis P A, Reuter L M, Johnson D E, Fazleabas A T & Verhage H G. (1996) Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following in vitro incubation. *Biol Reprod* **54**, 60-69.
- Odor D L, Gaddum-Rosse P & Rumery R E. (1983) Secretory cells of the oviduct of the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*, during the menstrual cycle and after estrogen treatment. *Am J Anat* **166**, 149-172.
- Odor D L, Gaddum-Rosse P, Rumery R E & Blandau R J. (1980) Cyclic variations in the oviuductal ciliated cells during the menstrual cycle and after estrogen treatment in the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*. *Anat Rec* **198**, 35-57.
- Ogura K, Nara K, Watanabe Y, Kohno K, Tai T & Sanai Y. (1996) Cloning and expression of cDNA for O-acetylation of GD3 ganglioside. *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 932-938.
- Oh S K, Pavlotsky N & Tauber A I. (1990) Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J Leukoc Biol* **47**, 142-148.
- Oikawa T, Sendai Y, Kurata S & Yanagimachi R. (1988) A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete Res* **19**, 113-122.
- Okabe M. (2014) Mechanism of fertilization: a modern view. *Exp Anim* **63**, 357-365.
- Oliphant G, Bowling A, Eng L A, Keen S & Randall P A. (1978) The permeability of rabbit oviduct to proteins present in the serum. *Biol Reprod* **18**, 516-520.
- Oliphant G, Reynolds A B, Smith P F, Ross P R & Marta J S. (1984) Immunocytochemical localization and determination of hormone-induced synthesis of the sulfated oviductal glycoproteins. *Biol Reprod* **31**, 165-174.
- Olson G E, Winfrey V P, Matrisian P E, Melner M H & Hoffman L H. (1997) Specific expression of haptoglobin mRNA in implantation-stage rabbit uterine epithelium. *J Endocrinol* **152**, 69-80.
- Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky A, Pinchasov M & Eisenbach M. (2008) The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod* **23**, 2339-2345.

- Oshima K, Aoki N, Kato T, Kitajima K & Matsuda T. (2002) Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles. *Eur J Biochem* **269**, 1209-1218.
- Ostman S, Taube M & Telemo E. (2005) Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology* **116**, 464-476.
- P**agano M, Nicola M A & Engler R. (1982) Inhibition of cathepsin L and B by haptoglobin, the haptoglobin-hemoglobin complex, and asialohaptoglobin. "In vitro" studies in the rat. *Can J Biochem* **60**, 631-637.
- Parada-Bustamante A, Orihuela P A, Ríos M, Navarrete-Gómez P A, Cuevas C A, Velasquez L A, Villalón M J & Croxatto H B. (2007) Catechol-o-methyltransferase and methoxyestradiols participate in the intraoviductal nongenomic pathway through which estradiol accelerates egg transport in cycling rats. *Biol Reprod* **77**, 934-941.
- Parada-Bustamante A, Oróstica M L, Reuquen P, Zuñiga L M, Cardenas H & Orihuela P A. (2016) The role of mating in oviduct biology. *Mol Reprod Dev* **83**, 875-883.
- Parrish J J, Krogenaes A & Susko-Parrish 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.
- Peacock A C, Bunting S L & Queen K G. (1965) Serum protein electrophoresis in acrylamide gel: patterns from normal human subjects. *Science* **147**, 1451-1453.
- Persson H, Rehfeld J F, Ericsson A, Schalling M, Pelto-Huikko M & Hökfelt T. (1989) Transient expression of the cholecystokinin gene in male germ cells and accumulation of the peptide in the acrosomal granule: possible role of cholecystokinin in fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6166-6170.
- Petersen H H, Nielsen J P & Heegaard P M. (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* **35**, 163-187.
- Peterson J A, Zava D T, Duwe A K, Blank E W, Battifora H & Ceriani R L. (1990) Biochemical and histological characterization of antigens preferentially expressed on the surface and cytoplasm of breast carcinoma cells identified by monoclonal antibodies against the human milk fat globule. *Hybridoma* **9**, 221-235.
- Petrunkina A M, Läkamp A, Gentzel M, Ekhlasi-Hundrieser M & Töpfer-Petersen E. (2003) Fate of lactadherin P47 during post-testicular maturation and capacitation of boar spermatozoa. *Reproduction* **125**, 377-387.
- Pfeifer T L & Chegini N. (1994) Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor (IGF-I), IGF-I receptor, and IGF binding proteins 1-4 in human fallopian tube at various reproductive stages. *Biol Reprod* **50**, 281-289.

- Pinto F M, Ravina C G, Subiran N, Cejudo-Román A, Fernández-Sánchez M, Irazusta J, Garrido N & Candenas L. (2010) Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. *Reprod Biol Endocrinol* **8**, 104.
- Pirnazar P, Wolinsky L, Nachnani S, Haake S, Pilloni A & Bernard G W. (1999) Bacteriostatic effects of hyaluronic acid. *J Periodontol* **70**, 370-374.
- Piñeiro M, Piñeiro C, Carpintero R, Morales J, Campbell F M, Eckersall P D, Toussaint M J & Lampreave F. (2007) Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet J* **173**, 669-674.
- Podlaha O, Webb D M & Zhang J. (2006) Accelerated evolution and loss of a domain of the sperm-egg-binding protein SED1 in ancestral primates. *Mol Biol Evol* **23**, 1828-1831.
- Pollard J W, Plante C, King W A, Hansen P J, Betteridge K J & Suarez S S. (1991) Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* **44**, 102-107.
- Polonovski M & Jayle M F. (1939) Peroxidases animales. Leur spécificité et leur rôle biologique. *Bull Chim. Biol.* 66-91
- Polticelli F, Bocedi A, Minervini G & Ascenzi P. (2008) Human haptoglobin structure and function--a molecular modelling study. *FEBS J* **275**, 5648-5656.
- Porta A, Cassano E, Balestrieri M, Bianco M, Picone R, De Stefano C & Abrescia P. (1999) Haptoglobin transport into human ovarian follicles and its binding to apolipoprotein A-1. *Zygote* **7**, 67-77.
- Pursel V G & Johnson L A. (1975) Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci* **40**, 99-102.
- Putnam F W. (1975) Haptoglobin. In: *The plasma proteins* (ed F W Putnam), Academic Press.
- Pérez-Cerezales S, Boryshpolets S, Afanzar O, Brandis A, Nevo R, Kiss V & Eisenbach M. (2015) Involvement of opsins in mammalian sperm thermotaxis. *Sci Rep* **5**, 16146.
- Pérez-Cerezales S, López-Cardona A P & Gutiérrez-Adán A. (2016) Progesterone effects on mouse sperm kinetics in conditions of viscosity. *Reproduction* **151**, 501-507.
- Pérez-Cerezales S, Ramos-Ibeas P, Acuña O S, Avilés M, Coy P, Rizos D & Gutiérrez-Adán A. (2018) The oviduct: from sperm selection to the epigenetic landscape of the embryo. *Biol Reprod* **98**, 262-276.

- Quinn P, Kerin J F & Warnes G M. (1985) Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* **44**, 493-498.
- Rademacher B E & Steele W J. (1987) A general method for the isolation of haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 from human plasma. *Anal Biochem* **160**, 119-126.
- Ramji D P, Cortese R & Ciliberto G. (1993) Regulation of C-reactive protein, haptoglobin and hemopexin gene expression. In: *Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry and Clinical Applications* (eds A Mackiewicz, I Kushner & H Baumann), pp. 162-242. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Ramón M C, Acuña O S, Ruano M J, Avilés M & Izquierdo-Rico M J. (2012) Expression of haptoglobin mRNA in the oviduct during the oestrus cycle of sows. *Reprod Fertil Dev.* **25**, 248.
- Rath D, Long C R, Dobrinsky J R, Welch G R, Schreier L L & Johnson L A. (1999) In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* **77**, 3346-3352.
- Ravina C G, Seda M, Pinto F M, Orea A, Fernández-Sánchez M, Pintado C O & Candenas M L. (2007) A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Hum Reprod* **22**, 1617-1625.
- Raymond A, Ensslin M A & Shur B D. (2009) SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. *J Cell Biochem* **106**, 957-966.
- Redgrove K A, Anderson A L, McLaughlin E A, O'Bryan M K, Aitken R J & Nixon B. (2013) Investigation of the mechanisms by which the molecular chaperone HSPA2 regulates the expression of sperm surface receptors involved in human sperm-oocyte recognition. *Mol Hum Reprod* **19**, 120-135.
- Redgrove K A, Nixon B, Baker M A, Hetherington L, Baker G, Liu D Y & Aitken R J. (2012) The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. *PLoS One* **7**, e50851.
- Reik W, Dean W & Walter J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093.
- Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson A C, Hsu S, Shi Q, Tilly J L & Clapham D E. (2001) A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**, 603-609.

- Reynolds T L, Khan M A, van der Linden S & Cleveland R P. (1991) Differences in HLA-B27 positive and negative patients with ankylosing spondylitis: study of clinical disease activity and concentrations of serum IgA, C reactive protein, and haptoglobin. *Ann Rheum Dis* **50**, 154-157.
- Riggs R M, Franchi A, Oehninger S C & Bocca S. (2009) Regulation of milk fat globule epithelial growth factor eight (MFG-E8) by human chorionic gonadotropin (HCG) in the human endometrium. *Fertil Steril* **92**, S121
- Rittling S R, Matsumoto H N, McKee M D, Nanci A, An X R, Novick K E, Kowalski A J, Noda M & Denhardt D T. (1998) Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* **13**, 1101-1111.
- Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland M P & Lonergan P. (2002) Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol Reprod Dev* **62**, 320-327.
- Rizos D, Pintado B, de la Fuente J, Lonergan P & Gutiérrez-Adán A. (2007) Development and pattern of mRNA relative abundance of bovine embryos cultured in the isolated mouse oviduct in organ culture. *Mol Reprod Dev* **74**, 716-723.
- Rizos D, Ramirez M A, Pintado B, Lonergan P & Gutierrez-Adan A. (2010) Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology* **73**, 777-785.
- 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
- Robertson S A. (2007) Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci* **85**, E36-44.
- Roblero L, Biggers J D & Lechene C P. (1976) Electron probe analysis of the elemental microenvironment of oviducal mouse embryos. *J Reprod Fertil* **46**, 431-434.
- Roblero L S & Riffo M D. (1986) High potassium concentration improves preimplantation development of mouse embryos in vitro. *Fertil Steril* **45**, 412-416.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez J M, Martínez E, Roca J, Sanz L & Calvete J J. (2005) Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* **63**, 514-535.
- Rodríguez-Valentín R, López-González I, Jorquera R, Labarca P, Zurita M & Reynaud E. (2006) Oviduct contraction in *Drosophila* is modulated by a neural network that is both, octopaminergic and glutamatergic. *J Cell Physiol* **209**, 183-198.
- Rottmayer R, Ulbrich S E, Kölle S, Prella K, Neumueller C, Sinowatz F, Meyer H H, Wolf E & Hiendleder S. (2006) A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction* **132**, 637-648.

- Rubens C E, Sadovsky Y, Muglia L, Gravett M G, Lackritz E & Gravett C. (2014) Prevention of preterm birth: harnessing science to address the global epidemic. *Sci Transl Med* **6**, 262sr265.
- Ríos M, Hermoso M, Sánchez T M, Croxatto H B & Villalón 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. *Reprod Fertil Dev* **19**, 634-640.
- S**aco Rodríguez Y. (2013) Proteínas de fase aguda como biomarcadores en medicina y producción porcina. Facultad de Veterinaria. *Universidad Autónoma de Barcelona*. Tesis Doctoral
- Sakkas D & Trounson A O. (1990) Co-culture of mouse embryos with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy. *J Reprod Fertil* **90**, 109-118.
- Saling P M, Storey B T & Wolf D P. (1978) Calcium-dependent binding of mouse epididymal spermatozoa to the zona pellucida. *Dev Biol* **65**, 515-525.
- Salvatore A, Cigliano L, Bucci E M, Corpillo D, Velasco S, Carlucci A, Pedone C & Abrescia P. (2007) Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyl-transferase. *Biochemistry* **46**, 11158-11168.
- Salvatore A, Cigliano L, Carlucci A, Bucci E M & Abrescia P. (2009) Haptoglobin binds apolipoprotein E and influences cholesterol esterification in the cerebrospinal fluid. *J Neurochem* **110**, 255-263.
- Sarhan A, Bocca S, Yu L, Anderson S, Jacot T, Burch T., Nyalwidhe J O, Sullivan C, Kaur M, Bajic V B & Oehninger S. (2013) Human endometrial milk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFGE8) is up regulated by estradiol at the transcriptional level, and its secretion via microvesicles is stimulated by human chorionic gonadotropin (hCG). *Cell Signal Traffic*, **1**, 1-10
- Sasse M, Lengwinat T, Henklein P, Hlinak A & Schade R. (2000) Replacement of fetal calf serum in cell cultures by an egg yolk factor with cholecystokinin/gastrin-like immunoreactivity. *Altern Lab Anim* **28**, 815-831.
- Savaris R F, da Silva L C, Moraes G a S & Edelweiss M I. (2008) Expression of MUC1 in tubal pregnancy. *Fertil Steril* **89**, 1015-1017.
- Schmaltz-Panneau B, Cordova A, Dhorne-Pollet S, Hennequet-Antier C, Uzbekova S, Martinot E, Doret S, Martin P, Mermillod P & Locatelli Y. (2014) Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during in vitro co-culture. *Anim Reprod Sci* **149**, 103-116.

- Schmitz C, Yu L, Bocca S, Anderson S, Cunha-Filho J S, Rhavi B S & Oehninger S. (2014) Role for the endometrial epithelial protein MFG-E8 and its receptor integrin  $\alpha v \beta 3$  in human implantation: results of an in vitro trophoblast attachment study using established human cell lines. *Fertil Steril* **101**, 874-882.
- Schweigert F J, Gericke B, Wolfram W, Kaisers U & Dudenhausen J W. (2006) Peptide and protein profiles in serum and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum Reprod* **21**, 2960-2968.
- Seytanoglu A, Georgiou A S, Sostaric E, Watson P F, Holt W V & Fazeli A. (2008) Oviductal cell proteome alterations during the reproductive cycle in pigs. *J Proteome Res* **7**, 2825-2833.
- Shahriar F, Ngeleka M, Gordon J R & Simko E. (2006) Identification by mass spectroscopy of F4ac-fimbrial-binding proteins in porcine milk and characterization of lactadherin as an inhibitor of F4ac-positive Escherichia coli attachment to intestinal villi in vitro. *Dev Comp Immunol* **30**, 723-734.
- Shalgi R, Smith T T & Yanagimachi R. (1992) A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biol Reprod* **46**, 419-424.
- Sharpe-Timms K L, Ricke E A, Piva M & Horowitz G M. (2000) Differential expression and localization of de-novo synthesized endometriotic haptoglobin in endometrium and endometriotic lesions. *Hum Reprod* **15**, 2180-2185.
- Shi D, Komatsu K, Uemura T & Fujimori T. (2011) Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct. *Genes Cells* **16**, 282-290.
- Shindo S. (1990) Haptoglobin subtyping with anti-haptoglobin alpha chain antibodies. *Electrophoresis* **11**, 483-488.
- Shirley B & Reeder R L. (1996) Cyclic changes in the ampulla of the rat oviduct. *J Exp Zool* **276**, 164-173.
- Shur B D, Ensslin M A & Rodeheffer C. (2004) SED1 function during mammalian sperm-egg adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 477-485.
- Shur B D, Rodeheffer C, Ensslin M A, Lyng R & Raymond A. (2006) Identification of novel gamete receptors that mediate sperm adhesion to the egg coat. *Mol Cell Endocrinol* **250**, 137-148.
- Siller S S, Sharma H, Li S, Yang J, Zhang Y, Holtzman M J, Winuthayanon W, Colognato H, Holdener B C, Li F Q & Takemaru K I. (2017) Conditional knockout mice for the distal appendage protein CEP164 reveal its essential roles in airway multiciliated cell differentiation. *PLoS Genet* **13**, e1007128.
- Silva E, Kadirvel G, Jiang R, Bovin N & Miller D. (2014) Multiple proteins from ejaculated and epididymal porcine spermatozoa bind glycan motifs found in the oviduct. *Andrology* **2**, 763-771.

- Silva E, Frost D, Li L, Bovin N & Miller D J. (2017) Lactadherin is a candidate oviduct Lewis X trisaccharide receptor on porcine spermatozoa. *Andrology* **5**, 589-597.
- Silvestre J S, Théry C, Hamard G, Boddaert J, Aguilar B, Delcayre A, Houbron C, Tamarat R, Blanc-Brude O, Heeneman S, Clergue M, Duriez M, Merval R, Lévy B, Tedgui A, Amigorena S & Mallat Z. (2005) Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med* **11**, 499-506.
- Sinowatz F, Kölle S & Töpfer-Petersen E. (2001) Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs* **168**, 24-35.
- Slavík T & Fulka J. (1999) Oviduct secretion contributes to the establishment of species specific barrier preventing penetration of oocytes with foreign spermatozoa. *Folia Biol (Praha)* **45**, 53-58.
- Smith T T & Nothnick W B. (1997) Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability. *Biol Reprod* **56**, 83-89.
- Smith T T & Yanagimachi R. (1991) Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* **91**, 567-573.
- Smithies O, Connell G E & Dixon G H. (1962) Inheritance of haptoglobin subtypes. *Am J Hum Genet* **14**, 14-21.
- Smithies O & Walker N F. (1955) Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature* **176**, 1265-1266.
- Smits K, De Coninck D I, Van Nieuwerburgh F, Govaere J, Van Poucke M, Peelman L, Deforce D & Van Soom A. (2016) The Equine Embryo Influences Immune-Related Gene Expression in the Oviduct. *Biol Reprod* **94**, 36.
- Smits K, Nelis H, Van Steendam K, Govaere J, Roels K, Ververs C, Leemans B, Wydooghe E, Deforce D & Van Soom A. (2017) Proteome of equine oviducal fluid: effects of ovulation and pregnancy. *Reprod Fertil Dev* **29**, 1085-1095.
- Snell W J & White J M. (1996) The molecules of mammalian fertilization. *Cell* **85**, 629-637.
- Snellman O & Sylvén B. (1967) Haptoglobin acting as a natural inhibitor of cathepsin B activity. *Nature* **216**, 1033.
- Soleilhavoup C, Riou C, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Kohnke P, Reynaud K, de Graaf S P, Gerard N & Druart X. (2016) Proteomes of the Female Genital Tract During the Oestrous Cycle. *Mol Cell Proteomics* **15**, 93-108.
- Song S, Ghosh J, Mainigi M, Turan N, Weinerman R, Truongcao M, Coutifaris C & Sapienza C. (2015) DNA methylation differences between in vitro- and in vivo-conceived children are associated with ART procedures rather than infertility. *Clin Epigenetics* **7**, 41.

- Soriano-Úbeda C, Matás C & García-Vázquez F. (2013) An overview of swine artificial insemination: Retrospective, current and prospective aspects. *Journal of Experimental and Applied Animal Sciences* **1**, 67-97
- Souza C, Moura A & Killian G J. (2008) Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci* **105**, 72-89.
- Spagnuolo M S, Di Stasi R, De Rosa L, Maresca B, Cigliano L & D'Andrea L D. (2013) Analysis of the haptoglobin binding region on the apolipoprotein A-I-derived P2a peptide. *J Pept Sci* **19**, 220-226.
- Spassky N & Meunier A. (2017) The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 423-436.
- Stambaugh R, Noriega C & Mastroianni L. (1969) Bicarbonate ion; the corona cell dispersing factor of rabbit tubal fluid. *J Reprod Fertil* **18**, 51-58.
- Stubbs J D, Lekutis C, Singer K L, Bui A, Yuzuki D, Srinivasan U & Parry G. (1990) cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8417-8421.
- Styrna J, Bilińska B & Krzanowskaa H. (2002) The effect of a partial Y chromosome deletion in B10.BR-Ydel mice on testis morphology, sperm quality and efficiency of fertilization. *Reprod Fertil Dev* **14**, 101-108.
- Suarez S S. (1998) The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biol Reprod* **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. (2002) Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* **37**, 140-143.
- Suarez S S. (2007) Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev* **19**, 103-110.
- Suarez S S. (2008) Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* **52**, 455-462.
- Suarez S S. (2015) Gamete and zygote transport. In: *Physiology of Reproduction* (eds E Knobil and J D Neill), pp. 197-232. Raven Press, New York
- Suarez S S. (2016) Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* **363**, 185-194.
- Suarez S S & Dai X. (1992) Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* **46**, 686-691.

- Szulańczyk K. (2009) Histological changes within ovarian cortex, oviductal and uterine mucosa in case of ovarian cysts presence in sows. *Folia Histochem Cytobiol* **47**, 99-103.
- Szöllösi D & Hunter R H. (1978) The nature and occurrence of the acrosome reaction in spermatozoa of the domestic pig, *Sus scrofa*. *J Anat* **127**, 33-41.
- T**alevi R, Barbato V, De Iorio S, Mollo V, Capriglione T, Ricchiari L, Samo A & Gualtieri R. (2010b) Is there a role for endocannabinoids in sperm-oviduct interaction? *Reproduction* **140**, 247-257.
- Talevi R & Gualtieri R. (2010a) Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* **73**, 796-801.
- Tanphaichitr N, Kongmanas K, Kruevaisayawan H, Saewu A, Sugeng C, Fernandes J, Souda P, Angel J B, Faull K F, Aitken R J, Whitelegge J, Hardy D, Berger T & Baker M. (2015) Remodeling of the plasma membrane in preparation for sperm-egg recognition: roles of acrosomal proteins. *Asian J Androl* **17**, 574-582.
- Tay J I, Rutherford A J, Killick S R, Maguiness S D, Partridge R J & Leese H J. (1997) Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents. *Hum Reprod* **12**, 2451-2456.
- Taylor M R, Couto J R, Scallan C D, Ceriani R L & Peterson J A. (1997) Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg-Gly-Asp (RGD)-dependent cell adhesion. *DNA Cell Biol* **16**, 861-869.
- Teijeiro J M & Marini P E. (2012) The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro-AKAP4 phosphorylation. *Reproduction* **143**, 773-785.
- Teng C T, Beard C & Gladwell W. (2002) Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat, and hamster. *Biol Reprod* **67**, 1439-1449.
- Tesfaye D, Lonergan P, Hoelker M, Rings F, Nganvongpanit K, Havlicek V, Besenfelder U, Jennen D, Tholen E & Schellander K. (2007) Suppression of connexin 43 and E-cadherin transcripts in in vitro derived bovine embryos following culture in vitro or in vivo in the homologous bovine oviduct. *Mol Reprod Dev* **74**, 978-988.
- Teves M E, Barbano F, Guidobaldi H A, Sanchez R, Miska W & Giojalas L C. (2006) Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril* **86**, 745-749.
- Tian X, Pascal G, Fouchécourt S, Pontarotti P & Monget P. (2009) Gene birth, death, and divergence: the different scenarios of reproduction-related gene evolution. *Biol Reprod* **80**, 616-621.

- Tienthai P, Sajjarengpong K & Techakumphu M. (2009) Light and scanning electron microscopic studies of oviductal epithelium in Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) at the follicular and luteal phases. *Reprod Domest Anim* **44**, 450-455.
- Tokuhiro K, Ikawa M, Benham A M & Okabe M. (2012) Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male fertility [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3850-3855.
- Tone A A, Begley H, Sharma M, Murphy J, Rosen B, Brown T J & Shaw P A. (2008) Gene expression profiles of luteal phase fallopian tube epithelium from BRCA mutation carriers resemble high-grade serous carcinoma. *Clin Cancer Res* **14**, 4067-4078.
- Tosti E & Ménéz Y. (2016) Gamete activation: basic knowledge and clinical applications. *Hum Reprod Update* **22**, 420-439.
- Tramer F, Rocco F, Micali F, Sandri G & Panfili E. (1998) Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* **59**, 753-758.
- Trounson A O, Willadsen S M & Rowson L E. (1977) Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows. *J Reprod Fertil* **51**, 321-327.
- Tulsiani D R & Abou-Haila A. (2012) Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientifica (Cairo)* **2012**, 607427.
- Tulsiani D R, Abou-Haila A, Loeser C R & Pereira B M. (1998) The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* **240**, 151-164.
- Tung C K, Hu L, Fiore A G, Ardon F, Hickman D G, Gilbert R O, Suarez S S & Wu M. (2015) Microgrooves and fluid flows provide preferential passageways for sperm over pathogen *Trichomonas foetus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5431-5436.
- Turunen H T, Sipilä P, Krutskikh A, Toivanen J, Mankonen H, Hämäläinen V, Björkgren I, Huhtaniemi I & Poutanen M. (2012) Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice. *Biol Reprod* **86**, 1-8.
- Tynan S, Pacia E, Haynes-Johnson D, Lawrence D, D'Andrea M R, Guo J Z, Lundeen S & Allan G. (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.
- Töpfer-Petersen E, Cechová D, Henschen A, Steinberger M, Friess A E & Zucker A. (1990) Cell biology of acrosomal proteins. *Andrologia* **22 Suppl 1**, 110-121.

Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela P F, Ekhlasi-Hundrieser M, Dostàlovà Z, Sanz L & Calvete J J. (1998) Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**, 217-224.

Töpfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundrieser M, Waberski D & Drommer W. (2002) Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *J Exp Zool* **292**, 210-215.

**U**lbrich S E, Kettler A & Einspanier R. (2003) Expression and localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**, 279-289.

Umezu T & Tomooka Y. (2004) An evidence of stromal cell populations functionally linked with epithelial cell populations in the mouse oviduct. *Zoolog Sci* **21**, 319-326.

**V**an Gestel R A, Brewis I A, Ashton P R, Brouwers J F & Gadella B M. (2007) Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte. *Mol Hum Reprod* **13**, 445-454.

Van Vlierberghe H, Langlois M & Delanghe J. (2004) Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta* **345**, 35-42.

Van Winkle L J, Campione A L & Kester S E. (1985) A possible effect of the Na<sup>+</sup> concentration in oviductal fluid on amino acid uptake by cleavage-stage mouse embryos. *J Exp Zool* **235**, 141-145.

Vilella F, Moreno-Moya J M, Balaguer N, Grasso A, Herrero M, Martínez S, Marcilla A & Simón C. (2015) Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development* **142**, 3210-3221.

Virant-Klun I, Knez K, Tomazevic T & Skutella T. (2013) Gene expression profiling of human oocytes developed and matured in vivo or in vitro. *Biomed Res Int* **2013**, 879489.

Visconti P E, Bailey J L, Moore G D, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf G S. (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**, 1129-1137.

Visconti P E & Florman H M. (2010) Mechanisms of sperm-egg interactions: between sugars and broken bonds. *Sci Signal* **3**, pe35.

Visconti P E, Krapf D, de la Vega-Beltrán J L, Acevedo J J & Darszon A. (2011) Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl* **13**, 395-405.

- Visconti P E, Ning X, Fornés M W, Alvarez J G, Stein P, Connors S A & Kopf G S. (1999) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* **214**, 429-443.
- W**ang C, Liu Y, Chang C, Wu S, Gao J, Zhang Y, Chen Y, Zhong F & Deng G. (2016) Human fallopian tube proteome shows high coverage of mesenchymal stem cells associated proteins. *Biosci Rep* **36**, e00297.
- Wang S & Larina I V. (2018) three-dimensional tracking of sperm behaviors in the mouse oviduct. *Development* **145**.
- Wang W H, Abeydeera L R, Prather R S & Day B N. (1998) Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* **49**, 308-316.
- Ward P P, Mendoza-Meneses M, Cunningham G A & Conneely O M. (2003) Iron status in mice carrying a targeted disruption of lactoferrin. *Mol Cell Biol* **23**, 178-185.
- Ward P P, Paz E & Conneely O M. (2005) Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2540-2548.
- Wassarman P M. (1988) Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **57**, 415-442
- Way A, Hoffman L, Shope N, Miller M & Killian G. (1998) Immunodetection of a 40 kDa haptoglobin-like protein in bovine oviductal fluid (ODF) and reproductive tract tissues. *Biol Reprod.* **58**, 86
- Wejman J C, Hovsepian D, Wall J S, Hainfeld J F & Greer J. (1984) Structure and assembly of haptoglobin polymers by electron microscopy. *J Mol Biol* **174**, 343-368.
- Welsch U & Sobotta, J. (2008) Histología (2nd Edition), Ed. Médica Panamericana.
- Wertheimer E V, Salicioni A M, Liu W, Trevino C L, Chavez J, Hernández-González E O, Darszon A & Visconti P E. (2008) Chloride Is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **283**, 35539-35550.
- White C R, Denomme M M, Tekpetey F R, Feyles V, Power S G & Mann M R. (2015b) High Frequency of Imprinted Methylation Errors in Human Preimplantation Embryos. *Sci Rep* **5**, 17311.
- White K L, Hehnke K, Rickords L F, Southern L L, Thompson D L & Wood T C. (1989) Early embryonic development in vitro by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol Reprod* **41**, 425-430.

- White R R, Brady M, Capper J L, McNamara J P & Johnson K A. (2015a) Cow-calf reproductive, genetic, and nutritional management to improve the sustainability of whole beef production systems. *J Anim Sci* **93**, 3197-3211.
- Winuthayanon W, Bernhardt M L, Padilla-Banks E, Myers P H, Edin M L, Lih F B, Hewitt S C, Korach K S & Williams C J. (2015) Oviductal estrogen receptor  $\alpha$  signaling prevents protease-mediated embryo death. *Elife* **4**, e10453.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E & Niemann H. (2005) Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod Fertil Dev* **17**, 23-35.
- Wrobel K H & Kujat R. (1993) The bovine tubouterine junction: general innervation pattern and distribution of adrenergic, cholinergic, and peptidergic nerve fibers. *Cell Tissue Res* **274**, 493-501.
- X**u J S, Lee Y L, Lee K F, Kwok K L, Lee W M, Luk J M & Yeung W S. (2004) Embryotrophic factor-3 from human oviductal cells enhances proliferation, suppresses apoptosis and stimulates the expression of the beta1 subunit of sodium-potassium ATPase in mouse embryos. *Hum Reprod* **19**, 2919-2926.
- Y**amaguchi H, Takagi J, Miyamae T, Yokota S, Fujimoto T, Nakamura S, Ohshima S, Naka T & Nagata S. (2008) Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol* **83**, 1300-1307.
- Yamanouchi H, Umezu T & Tomooka Y. (2010) Reconstruction of oviduct and demonstration of epithelial fate determination in mice. *Biol Reprod* **82**, 528-533.
- Yamaoka S. (1987) [Cilium movement of human oviduct]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* **39**, 777-784.
- Yanagimachi R & Chang M C. (1963) Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature* **200**, 281-282
- Yanagimachi R. (1994) Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction* (eds. E Knobil & J D Neill), pp. 189–317. Raven Press, New York.
- Yanagimachi R. (2009) Germ cell research: a personal perspective. *Biol Reprod* **80**, 204-218.
- Yang F, Haile D J, Berger F G, Herbert D C, Van Beveren E & Ghio A J. (2003) Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, L402-409.
- Yang S J & Mao S J. (1999) Simple high-performance liquid chromatographic purification procedure for porcine plasma haptoglobin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **731**, 395-402.

- Yaniz J L, Lopez-Gatius F, Santolaria P & Mullins K J. (2000) Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat Rec* **260**, 268-278.
- Yaniz J L, Lopez-Gatius F & Hunter R H. (2006) Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. *Anat Histol Embryol* **35**, 28-34.
- Ye J, Coleman J, Hunter M G, Craigon J, Campbell K H & Luck M R. (2007) Physiological temperature variants and culture media modify meiotic progression and developmental potential of pig oocytes in vitro. *Reproduction* **133**, 877-886.
- Yeung W S, Ho P C, Lau E Y & Chan S T. (1992) Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Human Reproduction* **7**, 1144–1149.
- Yeung W S, Lee K F, Koistinen R, Koistinen H, Seppälä M & Chiu P C. (2009) Effects of glycodelins on functional competence of spermatozoa. *J Reprod Immunol* **83**, 26-30.
- Yin L, Chung C M, Huo R, Liu H, Zhou C, J & Chan H C. (2009) A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cell Mol Life Sci* **66**, 900-908.
- Young L E, Sinclair K D & Wilmut I. (1998) Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* **3**, 155-163.
- Yu H, Reiser J, Besenfelder U, Razzazi-Fazeli E, Bergquist J & Mayrhofer C. (2016) Exploring the oviductal fluid proteome by a lectin-based affinity approach. *Proteomics* **16**, 2962-2966.
- Yueh S C, Wang Y H, Lin K Y, Tseng C F, Chu H P, Lai I H & Mao S J. (2008) Low levels of haptoglobin and putative amino acid sequence in Taiwanese Lanyu miniature pigs. *J Vet Med Sci* **70**, 379-387.
- Z**andieh Z, Ashrafi M, Jameie B, Amanpour S, Mosaffa N, Salman Yazdi R, Pacey A & Aflatoonian R. (2015) Evaluation of immunological interaction between spermatozoa and fallopian tube epithelial cells. *Andrologia* **47**, 1120-1130.
- Zhang H & Martin-DeLeon P A. (2003) Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: evidence for its expression in the female reproductive tract. *Biol Reprod* **69**, 446-454.
- Zhang Z, Liu J, Meriano J, Ru C, Xie S, Luo J & Sun Y. (2016) Human sperm rheotaxis: a passive physical process. *Sci Rep* **6**, 23553.
- Zhu J, Li M, Chen L, Liu P & Qiao J. (2014) The protein source in embryo culture media influences birthweight: a comparative study between G1 v5 and G1-PLUS v5. *Hum Reprod* **29**, 1387-1392.

Zhu Z, Fan X, Lv Y, Zhang N, Fan C, Zhang P & Zeng W. (2015) Vitamin E Analogue Improves Rabbit Sperm Quality during the Process of Cryopreservation through Its Antioxidative Action. *PLoS One* **10**, e0145383.

Zumoffen C M, Gil R, Caille A M, Morente C, Munuce M J & Ghersevich S A. (2013) A protein isolated from human oviductal tissue in vitro secretion, identified as human lactoferrin, interacts with spermatozoa and oocytes and modulates gamete interaction. *Hum Reprod* **28**, 1297-1308.