



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Análisis Molecular, Proteómico y Filogenético de la
Zona Pelúcida de Mamíferos

D^a. Carla Moros Nicolás

2015

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada durante el periodo de disfrute de una beca-contrato predoctoral de la Universidad de Murcia y ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2012-40180-C03-02). Así mismo, se ha desarrollado en el marco del Programa de Ayudas a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia de la Fundación Séneca, 04542/GERM/06

Esta Tesis Doctoral ha sido propuesta para Mención de Doctorado Internacional en virtud de las siguientes Estancias de Investigación:

Estancias de Investigación:

Institute National de la Reserche Agronomique. Tours (France). 2012. Estudio del efecto del fluido oviductal y de DMBT1 sobre la fecundación *in vitro* de las especies porcina y equina (3 meses).

Department of Animal Science. Okayama University (Japan) 2013. Estudio de la expresión génica de las células del cúmulo y de ovocitos porcinos procedentes de folículos pequeños y medianos (2 meses).

Department of Animal Science. Okayama University (Japan) 2014. Estudio de la expresión génica de ovocitos porcinos procedentes de folículos pequeños y medianos (1 mes).

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

ARTÍCULOS:

Moros C, Chevret P, Holt WV, Esteban-Díaz D, López-Bejar M, Martínez-Nevado E, Ballesta J, Janke AL, Nilsson-Janke M, Izquierdo-Rico MJ, Avilés M. **Composition of marsupial zona pellucida: a molecular and phylogenetic approach.** (En preparación).

Moros C, Izquierdo-Rico MJ, Chevret P, Leza A, Boué F, Ballesta J, Avilés M. **Molecular characterization and evolutionary analysis of carnivore zona pellucida.** (En preparación).

Izquierdo-Rico MJ, Chevret P, Moros C, Pérez-Crespo M, Stetson I, Gutiérrez-Adán A, Gutiérrez-Gallego R, Veyrunes F, Ballesta J, Laudet V, Avilés M. **Murine zona pellucida is formed by four glycoproteins: the house mouse is the exception.** (En preparación).

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

Avilés M, Stetson I, Moros C, Jiménez-Movilla M, Ballesta J, Izquierdo-Rico MJ. **Analysis of the zona pellucida protein composition in the mammalian oocyte.** Comunicación oral. International Congress on Analytical Proteomics (ICAP). Orense (España). Julio 2011.

Moros C, Izquierdo-Rico MJ, Esteban-Díaz D, Alicchio M, Ballesta J, Holt WV, Avilés M. **Molecular evidence of the presence of ZP1 and ZP4 in Bennett's wallaby (*Macropus rufogriseus rufogriseus*).** Póster. European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR). Dublin (Irlanda). Agosto 2012.

Avilés M, Jiménez-Movilla M, Moros C, Stetson I, Acuña OS, Algarra B, Guillen-Martínez A, Gómez E, Torres I, Ballesta J, Izquierdo-Rico MJ. **Composition and maturation of the zona pellucida.** Comunicación oral. Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular (SEHIT). Logroño (España). Septiembre 2013.

Moros C, Guillén-Martínez A, Chevret P, Gutierrez-Adán A, Izquierdo-Rico MJ, Avilés M. **Identification of the mRNA coding for ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4 in *Mastomys natalensis*.** Póster. 1st Mediterranean Interdisciplinary Forum on Social Sciences and Humanities. Murcia (España). Octubre 2013.

Moros C, Izquierdo-Rico MJ, Holt WV Chevret P, López-Bejar M, Martínez-Nevado E, Ballesta J, Avilés M. **Analysis of marsupial ZP: molecular and phylogenetic approach.** World Congress of Reproductive Biology (WCRB). Edimburgo (Reino Unido). Septiembre 2014.

Leza A, Moros C, Avilés M, Ballesta J, Izquierdo-Rico MJ. **Molecular evidences of the presence of ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4 in ferret (*Mustela putorius*).** Póster. Asociación Española de Reproducción Animal (AERA). Alicante (España). Octubre 2014.

AGRADECIMIENTOS

A Manuel Avilés Sánchez, mi Director de Tesis porque transmites pasión por tu trabajo, por animarme cuando lo he necesitado, por preocuparte de nosotros como si de un padre se tratara y un especial gracias por lo que para mí es tu mayor virtud, felicitar a la gente por su trabajo.

A María José Izquierdo Rico, mi Directora de Tesis, por haberme enseñado tanto, por tus ánimos y consejos, por ayudarme siempre, por ser mi compañera de aventuras en Japón y porque sé que siempre podré contar contigo. Por todo ello muchísimas gracias.

A Pascale Chevret, mi Directora de Tesis, gracias por toda tu ayuda e implicación en la realización de esta Tesis Doctoral.

A Ghylène Goudet, por abrirme las puertas de tu Laboratorio y por confiar en mí desde el primer momento. A Cécile Douet por haberme tratado como a una amiga. Muchas gracias a las dos por el café de las 10:00 y por ser tan pacientes con mi francés.

A William V. Holt, muchas gracias por recibirme en el Zoo de Londres, por estar siempre dispuesto a ayudarme y por tu gran colaboración a esta Tesis Doctoral. Gracias a Daniela por la ayuda con las necropsias y por haber aportado muestras para la realización de este trabajo.

A Hiroaki Funahashi por permitirme realizar dos estancias en el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Okayama, gracias por tu generosidad y amabilidad.

A Pepe, Olalla y Celina, por haberme abierto las puertas de la Clínica Veterinaria La Alcayna en aquellos años de estudiante y por haber colaborado con la donación de muestras en la realización de esta Tesis Doctoral.

A Axel Janke, Maria Nilsson, Franck Boué, Frédéric Veyrunes, Manel López y Eva Martínez por la donación de muestras biológicas utilizadas para la realización de este trabajo.

A todos los profesores del Departamento de Biología Celular e Histología, a Concha Ferrer, Emilio Gómez, Emma Martínez, Esther Beltrán, Francisco Hernández, José Ballesta, José Ángel Martínez, Juan Francisco Madrid, Luis Miguel Pastor y María Teresa Castells, gracias por vuestra ayuda en uno u otro momento. Gracias a María Jiménez por tu ayuda y consejos. Y gracias también a Mari Carmen y a Ángel.

A todos mis compañeros del Departamento de Biología Celular e Histología que en algún momento habéis compartido este largo camino conmigo, a Tere, Luis Miguel, Irene, Wilson, Lili, Sara, Salva, Narci, Vicente, Blanca, Ascen, Lourdes y Andrea, por los buenos momentos compartidos y porque nadie mejor que vosotros sabe lo que se disfruta y se sufre realizando el Doctorado. Un especial gracias a Salva por su ayuda con todo lo referente a la informática y a Andrea por iniciar el trabajo de los carnívoros.

A Pilar Coy y al resto de profesores de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria por haberme permitido trabajar en vuestro Laboratorio. A Irene por enseñarme durante mis inicios y a Fran por “su santa paciencia” en Escocia.

A todos los compañeros del Departamento de Fisiología Animal de Veterinaria, en especial a Jon, Rebeca y Cristina por compartir con nosotros vuestras muestras siempre que lo hemos necesitado. Gracias a Sole y a Juan.

A Alejandro Torrecillas y a César Flores del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia por sus aportaciones a este trabajo.

A mis amigos del “Erasmus Liège”, porque compartimos el mejor año de nuestras vidas, muchas gracias a Lore, Bea, Patri, Laura, Rocío, Natalia, Laura, Fran y Adri.

A mis amigas de Veterinaria, Lore, Mery, Yoeli, Babs, Esther, Patri, Elena, y Pauli y también a los chicos, Richi y Quero. Porque pese a las largas horas de estudio volvería a empezar la carrera sólo por compartir todos esos años con vosotros.

A mis amigos Maríah, Marina, Darío, Víctor y Mado, porque aunque cada uno estemos en puntos diferentes de España y del extranjero, cada vez que nos vemos parece que fue ayer la última vez que lo hicimos. A Isa, mi compañera de running. A Nacho, Kuko y Cris por vuestro apoyo durante estos cuatro años.

A toda mi familia, porque vosotros sois mi mayor tesoro. A mis tías, mis primas, mi primo y mis sobrinos. A mis primas Patri y Cris, “mis hermanitas pequeñas” porque siempre habéis estado ahí cuando os he necesitado.

A los que ya no estáis aquí, porque no me puedo sentir más afortunada por haberos tenido conmigo. A mi abuelito Vicente, a mi bisabuela Ina, a mi abuela Amor y a mi abuelo Juan.

A mi abuela Até, porque eres una luchadora y la persona más fuerte que conozco.

A mis sobrinos Alba y Gonzalo, porque siempre me arrancáis una sonrisa. A mi cuñado Gonzalo por cuidar de todos nosotros.

A mi padre Pascual, por inculcarme que sin esfuerzo y sacrificio no hay recompensa y porque nos enseñaste que los estudios eran lo primero. Sin tu ayuda todo esto no habría sido posible.

A mi madre Cristina, por inculcarme la constancia en el estudio, por las largas horas de tortura que soportaste ayudándome con las tablas de multiplicar, los ríos y provincias, el catecismo y una lista infinita de deberes. Gracias por toda tu ayuda y porque sin ti no lo habría logrado.

A mi hermana Laura, por ser mi mayor apoyo durante toda mi vida, a veces madre, hermana mayor, mejor amiga y confidente. Porque siempre has estado cuando te he necesitado.

A mi abuelo Juan

Por enseñarnos a disfrutar de la vida

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	7
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 LA ZONA PELÚCIDA	13
3.1.1 Composición de la zona pelúcida	13
3.1.2 Funciones de la zona pelúcida	19
3.1.3 Origen celular y síntesis de la zona pelúcida	23
3.1.3.1 Aves	23
3.1.3.2 Peces	23
3.1.3.3 Mamíferos	24
3.1.4 Estructura de la zona pelúcida	30
3.1.4.1 Características de las proteínas de la zona pelúcida	33
3.1.4.2 Aspecto morfológico de la zona pelúcida	37
3.2 EVOLUCIÓN MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS REPRODUCTORAS	39
3.2.1 Evolución molecular de las proteínas reproductoras	39
3.2.2 Evolución molecular de las glicoproteínas de la zona pelúcida	41
3.2.3 Evolución del gen <i>ZP4</i> en el género <i>Mus</i>	46
3.3 LA ZONA PELÚCIDA EN MARSUPIALES	49
3.3.1 Envolturas del ovocito en marsupiales	49
3.3.2 Filogenia de los marsupiales	51
3.4 LA ZONA PELÚCIDA EN CARNÍVOROS	55
4. MATERIAL Y MÉTODOS	59
4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	61
4.1.1 Ovarios	61
4.1.1.1 Ovarios de wallaby de Bennett	61
4.1.1.2 Ovarios de ratona	61
4.1.1.3 Ovarios de hurona	62
4.1.1.4 Ovarios de zorra	62
4.1.1.5 Ovarios de perra	63
4.1.2 Ovocitos	63
4.1.2.1 Ovocitos de ratona	63
4.2 OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO	64
4.2.1 Obtención de ARN total de ovarios	64
4.2.2 Síntesis <i>in vitro</i> de ADN complementario	65
4.2.3 Obtención de ADN genómico de tejidos de marsupiales	66
4.2.4 Obtención de ADN genómico de tejido de zorra	67
4.2.5 Obtención de ADN genómico de tejido de perra	67

4.3 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	67
4.3.1 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADNc de ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c y ZP4 del wallaby de Bennett	67
4.3.2 Amplificación mediante PCR de los exones 1 y 2 de ZP4 de marsupiales	72
4.3.3 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADNc de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en roedores	74
4.3.4 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADNc de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de hurona	75
4.3.5 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADNc de ZP2, ZP3, y ZP4 de zorra. Amplificación mediante PCR de regiones de interés del gen <i>ZP1</i> de zorra	77
4.3.6 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADNc y ADNg de <i>ZP1</i> de perra	78
4.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	79
4.5 SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS	79
4.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES DE LA FAMILIA ZP	80
4.7 ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA ZONA PELÚCIDA DE ROEDORES	82
4.7.1 Aislamiento de la zona pelúcida de ovarios de roedores mediante solubilización por calor	82
4.7.2 Obtención de zonas pelúcidas aisladas de <i>Mastomys coucha</i>	83
4.7.3 Análisis mediante HPLC/MS	84
4.8 ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA DE RATONA A LA DIGESTIÓN CON TRIPSINA	85
4.9 FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> EN ROEDORES	86
4.10 ESQUEMA DEL MATERIAL Y MÉTODOS	88
5. RESULTADOS	89
5.1 ANÁLISIS DE LA ZONA PELÚCIDA EN MARSUPIALES	91
5.1.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ZONA PELÚCIDA DEL WALLABY DE BENNETT	91
5.1.1.1 Análisis de las secuencias de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en el wallaby de Bennett	91
5.1.1.1.1 Caracterización de ZP1 del wallaby de Bennett	92
5.1.1.1.2 Caracterización de ZP4 del wallaby de Bennett	94

5.1.1.1.3 Comparación de las secuencias de ZP1 y ZP4 del wallaby de Bennett con las secuencias de ZP1 y ZP4 de otros mamíferos	97
5.1.1.1.4 Amplificación total de ZP2 y parcial de ZP3 del wallaby de Bennett	100
5.1.2 DUPLICACIONES DEL GEN ZP3 EN MARSUPIALES	103
5.1.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ZP4 EN MARSUPIALES	108
5.2 ANÁLISIS DE LA ZONA PELÚCIDA EN ROEDORES	113
5.2.1 Caracterización molecular de la zona pelúcida en roedores de la subfamilia Murinae	113
5.2.1.1 Análisis de las secuencias de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en roedores	113
5.2.1.1.1 Secuencias de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 amplificadas en <i>Mastomys coucha</i>	115
5.2.1.1.2 Caracterización de ZP1 en <i>Mus mattheyi</i> y <i>Mus pahari</i>	116
5.2.1.1.2.1 Comparación de las secuencias de ZP1 de <i>Mus mattheyi</i> y <i>Mus pahari</i> con las secuencias de ZP1 de otros mamíferos	120
5.2.1.1.3 Caracterización de ZP4 en <i>Mus mattheyi</i> y <i>Mus pahari</i>	122
5.2.1.1.3.1 Comparación de las secuencias de ZP4 de <i>Mus mattheyi</i> y <i>Mus pahari</i> con las secuencias de ZP4 de otros mamíferos	127
5.2.1.2 Análisis filogenético del gen ZP4 en roedores	128
5.2.2 Proteómica de las glicoproteínas de la zona pelúcida en roedores	131
5.2.2.1 Péptidos de ZP1 y ZP4 detectados en <i>Mus mattheyi</i>	131
5.2.2.2 Péptidos de ZP1 y ZP4 detectados en <i>Mus pahari</i>	133
5.2.2.3 Péptidos de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 detectados en <i>Mastomys coucha</i>	134
5.2.3 Estudio de la resistencia de la zona pelúcida de ratona a la digestión con tripsina	136
5.2.4 Fecundación <i>in vitro</i> en roedores	136
5.3 ANÁLISIS DE LA ZONA PELÚCIDA EN CARNÍVOROS	138
5.3.1 Caracterización molecular de la zona pelúcida de carnívoros	138
5.3.1.1 Secuencias de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 amplificadas en la hurona	138
5.3.1.2 Secuencias de ZP2, ZP3 y ZP4 amplificadas en la zorra	139
5.3.1.2.1 Caracterización de ZP4 de zorra	140
5.3.1.2.1.1 Comparación de las secuencias de ZP4 de zorra con las secuencias de ZP4 de otros carnívoros	143
5.3.1.3 Análisis del gen ZP1 en carnívoros	144
5.3.1.3.1 Análisis del gen ZP1 en la perra y la zorra	147
6. DISCUSIÓN	151
6.1. LA ZONA PELÚCIDA EN MARSUPIALES	153

6.1.1 Composición de la zona pelúcida de marsupiales	153
6.1.1.1 Composición de la zona pelúcida del wallaby de Bennett	156
6.1.1.1.1 Dominios proteicos	156
6.1.1.1.2 Glicosilación	157
6.1.2 Pseudogenización de <i>ZP4</i>	159
6.1.3 Duplicación génica de <i>ZP3</i> en marsupiales	160
6.1.4 Propiedades biológicas de la ZP de marsupiales relacionadas con su composición	162
6.1.4.1 Implicación de las diferentes proteínas en la anticoncepción	163
6.1.5 Nuevos modelos de composición de la zona pelúcida	165
6.2 LA ZONA PELÚCIDA EN ROEDORES	167
6.2.1 Composición de la zona pelúcida de roedores de la subfamilia Murinae	167
6.2.2 Análisis de la proteína ZP1 en <i>Mus mattheyi</i> y <i>Mus pahari</i>	171
6.2.3 Análisis de la proteína ZP4 en <i>Mus mattheyi</i> y <i>Mus pahari</i>	172
6.2.4 Análisis filogenético del gen <i>ZP4</i> en roedores de la subfamilia Murinae	174
6.3 LA ZONA PELÚCIDA EN CARNÍVOROS	177
6.3.1 Composición de la zona pelúcida de carnívoros	177
6.3.2 Composición de la zona pelúcida de hurona	178
6.3.3 Composición de la zona pelúcida de zorra	179
6.3.3.1 Pseudogenización de <i>ZP1</i> en la zorra	180
7. CONCLUSIONES	183
8. CONCLUSIONS	189
9. RESUMEN	193
10. SUMMARY	203
11. ABREVIATURAS	211
12. ANEXOS	215
13. BIBLIOGRAFÍA	219

1. INTRODUCCIÓN

Durante la fecundación, el gameto femenino y masculino interactúan dando lugar a la formación del cigoto. En este proceso, el espermatozoide debe interactuar y atravesar las distintas cubiertas extracelulares que rodean al ovocito. Una de estas cubiertas, la zona pelúcida (ZP) ha sido intensamente estudiada en mamíferos, demostrándose que juega un papel importante en el proceso de la fecundación; interviene en la interacción especie-específica entre gametos, en la inducción de la reacción acrosómica, en el bloqueo a la polispermia, así como en la protección del embrión preimplantado (Yanagimachi, 1994; Dean, 2007; Wassarman y Litscher, 2009).

La ZP es una matriz extracelular formada por unas pocas glicoproteínas que rodean al ovocito, óvulo y al embrión en los primeros días de desarrollo en mamíferos. Se ha demostrado que los genes de la familia ZP se pueden clasificar en 6 subfamilias: *ZP1*, *ZP2/ZPA*, *ZP3/ZPC*, *ZP4/ZPB*, *ZPAX* y *ZPD* (Goudet *et al.*, 2008). Sin embargo, no todos estos genes están presentes en todas las especies. La ZP o las cubiertas extracelulares equivalentes en vertebrados pueden estar formadas por 3 a 6 glicoproteínas (Bausek *et al.*, 2000; Goudet *et al.*, 2008). Estudios filogenéticos y el hallazgo de diferentes pseudogenes sugieren que la evolución de los genes de la ZP se produce principalmente por duplicación y muerte génica (Spargo y Hope, 2003; Goudet *et al.*, 2008).

Estudios previos han demostrado que según la especie de mamífero a la que nos refiramos, la ZP puede estar formada por 3 o 4 proteínas, denominadas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4. La identificación de las distintas proteínas que componen la ZP en las distintas especies es importante para dilucidar la actividad biológica llevada a cabo por esta cubierta extracelular durante los distintos procesos comentados anteriormente.

Durante los últimos años, ha existido cierta controversia en relación a la composición de la ZP de los mamíferos. La causa principal ha sido la escasez de material para realizar los ensayos biológicos, así como la heterogeneidad de la glicosilación de las proteínas de la ZP haciendo muy difícil la separación de las mismas mediante técnicas analíticas. No obstante, gracias al desarrollo de técnicas como la espectrometría de masas, una técnica muy específica y sensible se ha podido esclarecer la composición de la ZP en distintas especies.

Por tanto, hasta la fecha podemos decir que los mamíferos se pueden clasificar en tres categorías de acuerdo a la composición proteica de la ZP:

1. Presencia de **ZP1, ZP2 y ZP3** (siendo *ZP4* un pseudogén), hasta la fecha únicamente el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) (Bleil y Wassarman, 1980a, Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008).

2. Presencia de **ZP2, ZP3 y ZP4** (donde *ZP1* es un pseudogén), como en la cerda, la vaca, la perra, el delfín, el tarsero filipino y el tití común (Hedrick y Wardrip 1987; Noguchi *et al.*, 1994; Goudet *et al.*, 2008; Stetson *et al.*, 2012).

3. Presencia de 4 proteínas: **ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4**, como se ha descrito en la mujer, la rata, el macaco coronado, el hámster, la coneja y la gata (Hughes y Barratt, 1999; Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Izquierdo-Rico *et al.*, 2009, Stetson *et al.*, 2012, 2013)

Dentro del segundo grupo podríamos incluir a los marsupiales, cuya ZP no ha sido tan estudiada como la de euterios. En marsupiales, hasta el momento se ha creído que la ZP estaba formada por tres glicoproteínas (ZP2, ZP3 y ZP4) (McCartney and Mate, 1999; Selwood, 2000; Mate *et al.*, 2003), aunque debido a cierta confusión en la nomenclatura ciertos autores se refieren a ZP4 como ZP1. Únicamente en tres especies los genes o proteínas han sido caracterizados. En primer lugar, en la zarigüeya australiana

(*Trichosurus vulpecula*), donde el ADNc de ZP2, ZP3 y ZP4 ha sido clonado y secuenciado (Mate y McCartney, 1998; Voyle *et al.*, 1999; McCartney y Mate, 1999; Haines *et al.*, 1999; Mate *et al.*, 2003). En segundo y tercer lugar, en la zarigüeya de cola gruesa (*Sminthopsis crassicaudata*) (Voyle *et al.*, 1999) y en la zarigüeya de cara rayada (*Sminthopsis macroura*) (Au *et al.*, 2008) donde el ADNc de ZP2 ha sido parcialmente amplificado. Por tanto, la ZP de marsupiales parece estar formada por tres glicoproteínas, ya que ZP1 no ha sido descrita hasta el momento (McCartney y Mate, 1999; Selwood, 2000; Mate *et al.*, 2003).

En este grupo también podemos incluir a la mayoría de carnívoros estudiados hasta la fecha. Los estudios realizados indicarían que la ZP está formada por tres glicoproteínas: ZP2, ZP3 y ZP4, donde ZP1 sería un pseudogén como sucede en la perra (Goudet *et al.*, 2008). Diferentes autores han depositado secuencias de estas tres glicoproteínas, pero nunca de ZP1; como en el armiño, el hurón doméstico, la perra y la zorra (Harris *et al.*, 1994; Okazaki *et al.*, 1995; Okazaki y Sugimoto, 1995; Blackmore *et al.*, 2004; Jackson y Beaton, 2004; McLaughlin *et al.*, 2004; Reubel *et al.*, 2005).

En la gata, las secuencias depositadas hasta 2013, habían sido como en el resto de carnívoros las de ZP2, ZP3 y ZP4 (Harris *et al.*, 1994, 1995; Okazaki y Sugimoto, 1995; Jewgenow y Fickel, 1999; Okazaki *et al.*, 2007; Eade *et al.*, 2009); y fue en ese año cuando por primera vez se describió la presencia de ZP1 en un carnívoro (Stetson *et al.*, 2013).

De esta clasificación, en cuanto a composición proteica de la ZP, se desprende que el ratón de laboratorio (*Mus musculus*), empleado como modelo de estudio de la ZP durante las últimas décadas presenta una composición diferente al resto de mamíferos descritos hasta la fecha, con ZP1, ZP2 y ZP3, siendo ZP4 un pseudogén (Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que ZP4 es una proteína funcional en el genoma de la rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005), se puede decir que la

pseudogenización de *ZP4* tuvo lugar tras la divergencia evolutiva de la rata y el ratón hace unos 12 Ma (Jaeger *et al.*, 1986; Jacobs *et al.*, 1989, 1990; Goudet *et al.*, 2008).

Sin embargo, los análisis realizados en la Tesis Doctoral de Izquierdo-Rico en 2009, muestran que algunas especies de roedores del género *Mus* presentan en su genoma un gen *ZP4* funcional. Por lo que, la pseudogenización de *ZP4* tuvo lugar recientemente en la evolución del género *Mus*.

En esta Tesis Doctoral, estudiamos la composición de la ZP en diferentes grupos de mamíferos: marsupiales, roedores y carnívoros. Demostrando que la composición de la ZP es más variable de lo que se había pensado hasta el momento; además mostramos un análisis de los distintos fenómenos de pseudogenización que han afectado a las glicoproteínas de la familia ZP.

2. OBJETIVOS

Por todo lo expuesto anteriormente, en la presente Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes objetivos:

1. MARSUPIALES

1.1 Análisis de la presencia del ARNm de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en el ovario del wallaby de Bennett.

1.2 Análisis de la presencia de duplicaciones del gen *ZP3* en marsupiales.

1.3 Análisis filogenético del gen *ZP4* en marsupiales australianos y sudamericanos.

2. ROEDORES

2.1 Análisis de la presencia del ARNm de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en el ovario de *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*.

2.2 Identificación por proteómica de las proteínas de la ZP de *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*.

2.3 Análisis filogenético del gen *ZP4* en la subfamilia Murinae.

2.4 Estudio de la digestión de la ZP de ratonas mediante el uso de tripsina.

2.5 Estudio del efecto de la presencia de una ZP de 3 o 4 proteínas sobre la fecundación *in vitro*.

3. CARNÍVOROS

3.1 Análisis *in silico* del gen *ZP1* en la foca de Wedell, el hurón, la morsa, el tigre, el oso panda y el oso polar.

3.2 Análisis de la presencia del ARNm de *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* en el ovario de hurona.

3.3 Análisis de la presencia del ARNm de *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* en el ovario de zorra.

3.4 Análisis filogenético del gen *ZP1* en la carnívoros.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 LA ZONA PELÚCIDA

La zona pelúcida (ZP) es una matriz translúcida, glicoproteica y acelular que rodea los ovocitos de los mamíferos y está involucrada en diferentes procesos durante la foliculogénesis, fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Fig. 1). Otros vertebrados presentan una estructura similar en cuanto a estructura y función que se conoce como envoltura vitelina en anfibios, corion en peces y envoltura perivitelina en aves (Wassarman, 1988; Tian *et al.*, 1997; Hyllner *et al.*, 2001; Sasanami *et al.*, 2002; Spargo y Hope, 2003; Monné y Jovine, 2011).

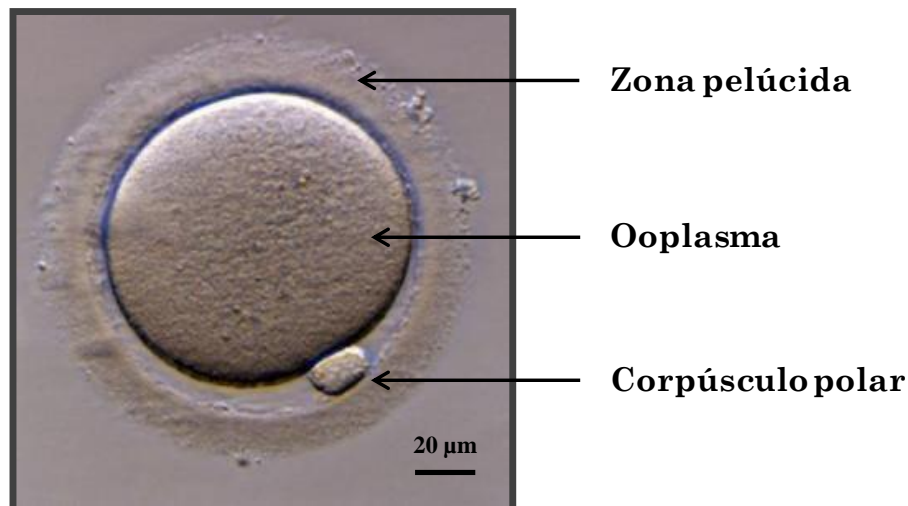


Figura 1. Imagen de campo claro de un ovocito de mujer en metafase II. Las flechas indican el ovocito, la zona pelúcida (ZP) y el primer corpúsculo polar.

3.1.1 Composición de la zona pelúcida

La nomenclatura de las diferentes glicoproteínas que componen la ZP es algo confusa. En un principio teniendo en cuenta los genes detectados en el ratón, las glicoproteínas se clasificaron atendiendo a su peso molecular de acuerdo a la migración en un gel SDS-PAGE, denominándose ZP1, ZP2 y ZP3, siendo ZP1 la de mayor peso molecular (menor movilidad

electroforética) con 200 kDa, ZP2 con 120 kDa y ZP3 la de menor peso molecular (mayor movilidad electroforética) con 83 kDa (Bleil y Wassarman, 1980a; Wassarman, 1988). Sin embargo, el descubrimiento de que no todas las especies presentan las mismas glicoproteínas en su ZP llevó a revisar la nomenclatura.

En 2003, Spargo y Hope, proponen unificar el sistema de nomenclatura tras realizar un estudio filogenético. Donde las 3 subfamilias *ZPA*, *ZPB* y *ZPC* serían identificadas numéricamente como *ZP2*, *ZP1* y *ZP3*. Desafortunadamente, en este trabajo no consideraron la existencia de especies con más de tres genes codificantes para proteínas de la ZP lo que hace que la terminología usada todavía en nuestros días sea confusa.

En 2008, Goudet *et al.*, proponen clasificar los genes que codifican para las glicoproteínas de la ZP en seis subfamilias: *ZP1*, *ZP2/ZPA*, *ZP3/ZPC*, *ZP4/ZPB*, *ZPAX* y *ZPD*. Sin embargo, no todos los genes están presentes en todas las especies, por ejemplo, en el genoma de mamíferos podemos encontrar 3 ó 4 genes, en el genoma de anfibios (*Xenopus*) 5 genes, y en el genoma de aves, como la gallina 6 genes (Goudet *et al.*, 2008).

Además, algunos de estos genes pueden estar duplicados. Como sucede con *ZPAX* y/o *ZP3* en algunos peces como la carpa (*Cyprinus carpio*), el pez espinoso (*Gasterosteus aculeatus*), el pez arroz japonés o medaka común (*Oryzias latipes*), el pez cebra (*Danio rerio*), el pez globo moteado (*Tetraodon nigroviridis*) y el pez globo japonés (*Takifugu rubripes*) (Chang *et al.*, 1996; Conner y Hughes, 2003; Meslin *et al.*, 2012). También encontramos duplicación de *ZP3* en un marsupial como la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*) (Meslin *et al.*, 2012), aves como el diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*) y la gallina y en anfibios como la rana (Meslin *et al.*, 2012). Además, en el ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*), aparte de encontrarse *ZP3* duplicada también lo está *ZP2* (Meslin *et al.*, 2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Genes duplicados de diferentes glicoproteínas de la zona pelúcida en distintas especies (Modificado de Meslin *et al.*, 2012).

Clase vertebrados	Especies	ZP2	ZP3	ZPAX
ANFIBIOS	Rana		X	
AVES	Diamante mandarín		X	
	Gallina		X	
MAMÍFEROS	Ornitorrinco	X	X	
	Zarigüeya		X	
PECES	Medaka común		X	X
	Pez espinoso		X	X
	Pez cebra		X	X
	Pez globo japonés		X	X
	Pez globo moteado		X	X

En mamíferos, la composición glicoproteica de la ZP ha sido intensamente estudiada en las últimas décadas. Tradicionalmente, teniendo en cuenta el modelo del ratón, se ha considerado que la ZP de mamíferos estaba constituida por tres glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3) (Bleil y Wassarman, 1980a). Estudios posteriores demostraron que la ZP de cerda (Hedrick y Wardrip 1987, Lefièvre *et al.*, 2003) y de vaca (Noguchi *et al.*, 1994) también presentaba tres glicoproteínas, siendo en este caso ZP2, ZP3 y ZP4. Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que muchos mamíferos presentan cuatro glicoproteínas en su ZP. En 1999, el grupo del Dr. Barratt, demostró la existencia de cuatro genes en la mujer (Hughes y Barratt, 1999) y en 2004 se identificaron por proteómica cuatro proteínas en la ZP de la mujer (Lefièvre *et al.*, 2004). Posteriores análisis filogenéticos detectan cuatro genes en el chimpancé, en el macaco de Rhesus (Goudet *et al.*, 2008) y en la yegua (Mugnier *et al.*, 2009). Mientras que, se demuestra la presencia de cuatro glicoproteínas en la rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005), en el macaco coronado (*Macaca radiata*)

(Ganguly *et al.*, 2008), el hámster (Izquierdo-Rico *et al.*, 2009a, Jiménez-Movilla *et al.*, 2009), la coneja (Stetson *et al.*, 2012) y la gata (Stetson *et al.*, 2013).

Si estudiamos los marsupiales, la ZP está formada exclusivamente por tres glicoproteínas (McCartney y Mate, 1999; Selwood, 2000; Mate *et al.*, 2003). Además, son muy pocas las especies en las que los genes o proteínas se han caracterizado, por ejemplo, en la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*) el ADNc codificante para tres ZPs ha sido clonado y secuenciado: ZP2, ZP3 y ZP4 (Mate y McCartney, 1998; Voyle *et al.*, 1999; McCartney y Mate, 1999; Haines *et al.*, 1999; Mate *et al.*, 2003). En el ratón marsupial de cola gruesa (*Sminthopsis crassicaudata*) (Voyle *et al.*, 1999) y en el ratón marsupial de cara rayada (*Sminthopsis macroura*) (Au *et al.*, 2008) sólo ZP2 ha sido parcialmente amplificada (Fig. 2).

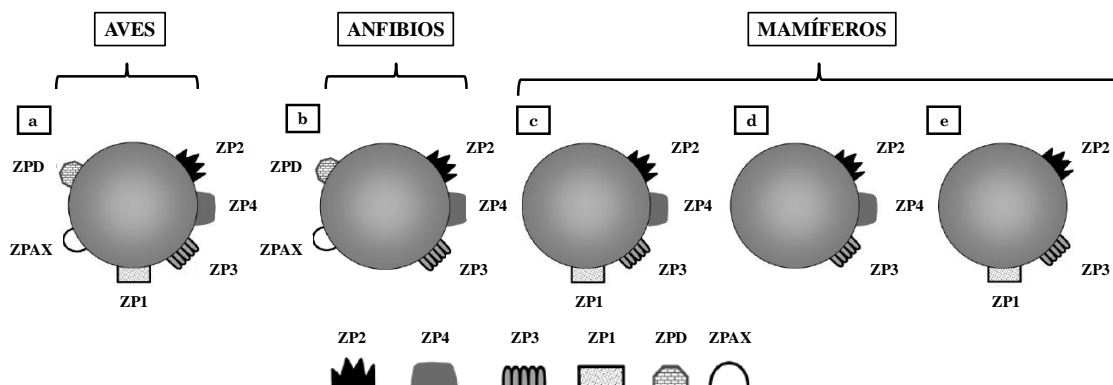


Figura 2. Composición de la zona pelúcida en vertebrados. a) Presencia de ZP1, ZP2, ZP3, ZP4, ZPAX y ZPD, como por ejemplo en la gallina. b) Presencia de ZP2, ZP3, ZP4, ZPAX y ZPD como ejemplo *Xenopus*. c) ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 como en el chimpancé, coneja, gata, hámster, macaco, mujer y rata). d) ZP2, ZP3 y ZP4 en la cerda, delfín, perra, tarsero, tití y vaca. e) ZP1, ZP2 y ZP3 solamente descrito en la ratona (Modificado de Goudet *et al.*, 2008)

Por tanto, podemos clasificar a los mamíferos en tres categorías:

1- Especies con **ZP1, ZP2 y ZP3**, hasta la fecha exclusivamente la ratona (Bleil y Wassarman, 1980a; Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008).

2- Especies con **ZP2, ZP3 y ZP4**, donde ZP1 no está presente, como en la cerda, la vaca, la perra, el delfín, el tarsero y el tití (Hedrick y Wardrip 1987, Noguchi *et al.*, 1994; Goudet *et al.*, 2008; Stetson *et al.*, 2012).

3- Especies con 4 proteínas en su ZP: **ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4**, como en la mujer, la rata, el macaco coronado, el hámster, la coneja y la gata (Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Izquierdo-Rico *et al.*, 2009a, Jiménez-Movilla *et al.*, 2009; Stetson *et al.*, 2012, 2013).

En la Tabla 2, se muestran las glicoproteínas de la ZP descritas en diferentes especies de mamíferos.

Tabla 2. Glicoproteínas de la zona pelúcida descritas en mamíferos.

Especie	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4	Referencias
Armiño (<i>Mustela erminea</i>)		X	X	X	Jackson y Beaton, 2004
Cabra (<i>Capra hircus</i>)		X	X		Chen <i>et al.</i> , 2010
Cerda (<i>Sus scrofa domestica</i>)		X	X	X	Hedrick y Wardrip, 1984; Yurewicz <i>et al.</i> , 1992, 1993; Harris <i>et al.</i> , 1994; Hasegawa <i>et al.</i> , 1994; Gupta <i>et al.</i> , 1995; Taya <i>et al.</i> , 1995; Kudo <i>et al.</i> , 1998; Lefièvre <i>et al.</i> , 2003; Yonezawa <i>et al.</i> , 2005
Coneja (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	X	X	X	X	Schoebel <i>et al.</i> , 1991; Lee <i>et al.</i> , 1993; Harris <i>et al.</i> , 1994; Stetson <i>et al.</i> , 2012
Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>)	X	X	X	X	Goudet <i>et al.</i> , 2008

Gata (<i>Felis catus</i>)	X	X	X	X	Harris <i>et al.</i> , 1994, 1995; Okazaki y Sugimoto, 1995; Jewgenow y Fickel, 1999; Okazaki <i>et al.</i> , 2007; Eade <i>et al.</i> , 2009; Stetson <i>et al.</i> , 2013.
Hámster dorado (<i>Mesocricetus auratus</i>)	X	X	X	X	Kinloch <i>et al.</i> , 1990; Koyama <i>et al.</i> , 2005; Izquierdo-Rico <i>et al.</i> , 2009
Hurona (<i>Mustela putorius furo</i>)			X		Jackson y Beaton, 2004
Macaco cangrejero (<i>Macaca fascicularis</i>)		X	X	X	Harris y Piersen, 2003
Macaco coronado (<i>Macaca radiata</i>)	X	X	X	X	Gupta, 1994; Kolluri <i>et al.</i> , 1995; Jethanandani <i>et al.</i> , 1998; Ganguly <i>et al.</i> , 2008
Macaco de Rhesus (<i>Macaca mulata</i>)	X	X	X	X	Goudet <i>et al.</i> , 2008
Mono tití (<i>Callithrix jacchus</i>)		X			Kerr <i>et al.</i> , 1997
Mujer (<i>Homo sapiens</i>)	X	X	X	X	Hughes y Barrat, 1999; Lefèvre <i>et al.</i> , 2004
Oveja (<i>Ovis aries</i>)		X	X		Pariset <i>et al.</i> , 2006; Chen <i>et al.</i> , 2010
Papión amarillo (<i>Papio cynocephalus</i>)				X	Harris y Piersen, 2003
Perra (<i>Canis lupus familiaris</i>)		X	X	X	Harris <i>et al.</i> , 1994; Okazaki <i>et al.</i> , 1995; Okazaki y Sugimoto, 1995; Blackmore <i>et al.</i> , 2004; McLaughlin <i>et al.</i> , 2004
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	X	X	X	X	Hoodbhoy <i>et al.</i> , 2005
Ratona (<i>Mus musculus</i>)	X	X	X		Bleil y Wassarman, 1980a
Ratona de los Llanos (<i>Pseudomys australis</i>)			X		Swann <i>et al.</i> , 2007
Ratón marsupial de cola gruesa (<i>Sminthopsis crassicaudata</i>)		X			Voyle <i>et al.</i> , 1999
Ratón marsupial de cara rayada (<i>Sminthopsis macroura</i>)		X			Au <i>et al.</i> , 2008
Topillo de Brandt (<i>Microtus brandti</i>)			X		Li <i>et al.</i> , 2000
Vaca (<i>Bos taurus</i>)		X	X	X	Harris <i>et al.</i> , 1994; Noguchi <i>et al.</i> , 1994; Yonezawa <i>et al.</i> , 2001; Ikeda <i>et al.</i> , 2002
Yegua (<i>Equus ferus caballus</i>)	X	X	X	X	Mugnier <i>et al.</i> , 2009
Zarigüeya australiana (<i>Trichosurus vulpecula</i>)		X	X	X	Mate y McCartney, 1998; Voyle <i>et al.</i> , 1999; McCartney y Mate, 1999; Haines <i>et al.</i> , 1999; Mate <i>et al.</i> , 2003
Zorra (<i>Vulpes vulpes</i>)		X	X		Reubel <i>et al.</i> , 2005

3.1.2 Funciones de la zona pelúcida

Las funciones de la ZP están relacionadas con importantes eventos que implican la formación del ovocito y diferentes etapas durante la fecundación y el desarrollo embrionario temprano. Así, interviene en la foliculogénesis, la organización y diferenciación de las células de la granulosa, el reconocimiento y unión del espermatozoide, la inducción de la reacción acrosómica (RA), el bloqueo a la polispermia y la protección del embrión preimplantado (Modlinski, 1970; Bleil y Wassarman, 1980; Florman y Storey, 1982; Berger *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 1996, 1999, 2001; Benoff, 1997; Fazeli *et al.*, 1997; Kölle *et al.*, 1998; Dean, 2004; Gupta *et al.*, 2011, 2012; Tanihara *et al.*, 2013).

Sin embargo, en otros mamíferos como los marsupiales, las funciones de la ZP no están claramente definidas, existiendo algunas diferencias entre euterios y metaterios; por ejemplo, el bloqueo a la polispermia parece ser debido en gran parte a la capa mucosa que envuelve a la ZP en marsupiales (Rodger y Bedford, 1982; Selwood, 2000; Breed *et al.*, 2002; Au *et al.*, 2008), mientras que en euterios se produce el endurecimiento de la ZP tras la entrada del primer espermatozoide, con algunas excepciones como la coneja, la cerda y la vaca (Ducibella *et al.*, 1990, 1993; Yanagimachi, 1994; Coy *et al.*, 2008; Cánovas *et al.*, 2009; Coy y Avilés, 2010). También se ha visto que, en metaterios, la ZP interviene en la adhesión célula-zona dando lugar a la formación del blastocisto sin pasar por el estadio de mórula (Frankenberg y Selwood, 1998; Selwood, 2000; Breed *et al.*, 2002; Au *et al.*, 2008).

Según la especie a la que nos refiramos, las distintas funciones de la ZP son atribuidas a una u otra glicoproteína, por ejemplo:

Cerda:

Se ha descrito una acción conjunta de ZP3-ZP4 como receptor primario. Estudios realizados con proteína recombinante (r) producidas en

baculovirus y proteína nativa (n), muestran que heterodímeros formados por ZP3r/ZP4r o ZP3n/ZP4r son incapaces de unirse al espermatozoide porcino, mientras que si hay presencia de ZP4 nativa si se produce la unión. Este hecho demuestra que ZP4 es esencial para la unión del espermatozoide (Yonezawa *et al.*, 1997; Yurewicz *et al.*, 1998; Yonezawa *et al.*, 2001, 2012). Otros autores señalan que la actividad conjunta ZP3/ZP4 sería necesaria porque ZP3 podría inducir un cambio conformacional en la proteína ZP4 exponiendo los sitios de unión al espermatozoide (Töpfer-Petersen *et al.*, 2008).

Mujer:

Estudios con proteína recombinante humana y nativa indican que ZP1, ZP3 y ZP4 se unen al espermatozoide capacitado e inducen RA (Caballero-Campo *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2010a, 2010b; Gupta *et al.*, 2012). Además, se ha observado que las glicoproteínas recombinantes ZP2, ZP3 y ZP4 expresadas en baculovirus inducen cambios en el patrón de motilidad espermática (Caballero-Campo *et al.*, 2006).

ZP1: Ha sido clonada y expresada en sistemas procariotas (*E. coli*) y eucariotas (baculovirus), en ambos casos se produce la unión del espermatozoide capacitado no reaccionado a esta glicoproteína recombinante, pero únicamente cuando es expresada en un sistema eucariota se ha visto inducción de la RA, siendo el dominio ZP de ZP1 el responsable de esta acción (Ganguly *et al.*, 2010a, 2010b).

Un estudio de este mismo año, detecta una mutación homocigótica de ZP1 en mujeres de la misma familia responsable de alteraciones ovocitarias. En algunas de ellas no se observó ningún ovocito, mientras que en otras, los ovocitos no se encontraban rodeados por la ZP y como resultado estas mujeres son infértiles (Huang *et al.*, 2014). Este estudio muestra una diferencia entre la función de ZP1 en la ratona y la mujer; puesto que, en ratonas KO

para ZP1 los ovocitos están rodeados por la ZP aunque esta es más delgada de lo normal, además estas ratonas no son estériles (Rankin *et al.*, 1999).

ZP2: La glicoproteína ZP2 nativa y recombinante (expresada en *E.coli* y baculovirus) hasta hace poco era considerada receptor secundario, por presentar únicamente unión al espermatozoide capacitado reaccionado (Tsubamoto *et al.*, 1999; Chakravarty *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2008b). Estudios recientes empleando ratones transgénicos con ZP humanizada indican que el espermatozoide humano únicamente se une a la ZP, cuando ésta expresa ZP2, ya sea sola o coexpresada con otras glicoproteínas de la ZP. Esta unión se produce con dominio N-terminal de la proteína, tras la cual se induce el bloqueo a la polispermia (Baibakov *et al.*, 2012; Avella *et al.*, 2014).

ZP3: La glicoproteína ZP3 ha sido la más estudiada hasta el momento; tanto ZP3 nativa purificada (Chiu *et al.*, 2008a) como ZP3 recombinante, expresada en: *E. coli*, baculovirus o células de mamífero (CHO, células de teratocarcinoma ovárico humano (PA-1)) (van Duin *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2001, Chakravarty *et al.*, 2005, 2008; Caballero-Campo *et al.*, 2006; José *et al.*, 2010). Esta glicoproteína muestra diferencias en cuanto a su capacidad de inducción de la RA según sea expresada en uno u otro sistema. Cuando ha sido expresada en sistemas procariotas no se produce la inducción; sin embargo, en sistemas eucariotas si hay inducción de RA, y su efecto se potencia cuando se trata de ZP3 nativa purificada (Chiu *et al.*, 2008a). Esto demuestra que la glicosilación de la proteína es importante para poder desarrollar esta función (Chakravarty *et al.*, 2005, 2008).

ZP4: Esta glicoproteína, al igual que ZP3 es capaz de inducir RA cuando es expresada en sistemas eucariotas, no así en procariotas (Chakravarty *et al.*, 2005, 2008; Caballero-Campo *et al.*, 2006), siendo su efecto mayor cuando se trata de proteína nativa purificada (Chiu *et al.*, 2008a). Estudios en ratones transgénicos expresando ZP4 humana indican que el espermatozoide humano no es capaz de unirse a esta ZP humanizada, por lo

que son necesarias otras glicoproteínas; en particular ZP2, para que se produzca el reconocimiento y la unión por parte del espermatozoide humano (Yauger *et al.*, 2011; Baibakov *et al.*, 2012; Avella *et al.*, 2014).

Ratona:

ZP1: Esta glicoproteína ofrece estabilidad e integridad estructural a la matriz (Greve y Wassarman, 1985; Rankin *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2012).

ZP2: Tradicionalmente se ha considerado que ZP2 es el receptor secundario; es decir, se une al espermatozoide capacitado ya reaccionado (Bleil *et al.*, 1988; Gupta *et al.*, 2012). Sin embargo, artículos recientes señalan a esta glicoproteína como el receptor primario; de modo que, el espermatozoide se uniría a un dominio de la glicoproteína ZP2 próximo a la región N-terminal, siendo el responsable del reconocimiento entre gametos tanto en la especie murina como en la humana. Tras la unión del espermatozoide al dominio N-terminal de esta glicoproteína; se produce la extrusión de los gránulos corticales, descargando una proteasa llamada ovastacina, que induce un cambio en la estructura del dominio N-terminal de ZP2, de modo que perdería su capacidad de unión al espermatozoide induciendo el bloqueo definitivo a la polispermia (Burkart *et al.*, 2012).

Además, se demuestra que ratones transgénicos presentando ZP4 humanizada y en ausencia de ZP2 humana o murina presentan ZP, sin embargo no se produce la unión espermática a la misma y estas ratonas son estériles, presentándose el mismo fenotipo para ratonas con ZP2 truncada (Avella *et al.*, 2014).

ZP3: Se ha considerado como receptor primario, uniéndose al espermatozoide capacitado no reaccionado (Bleil y Wassarman, 1980b; Bleil y Wassarman, 1983; Wassarman, 1990; Gupta *et al.*, 2012). Además es un agonista natural de la RA (Bleil y Wassarman, 1983; Wassarman, 1988, 2008).

Vaca:

ZP2 se considera el receptor secundario, mientras que existe una acción conjunta entre ZP3-ZP4 como receptor primario, siendo ZP4 la que juega un papel más importante en la unión al espermatozoide (Yonezawa *et al.*, 2001; Yonezawa *et al.*, 2012).

3.1.3 Origen celular y síntesis de la zona pelúcida

Las proteínas de la envoltura vitelina de anfibios, envoltura perivitelina de aves, corion de peces y de la ZP de mamíferos, están altamente conservadas entre grupos. Sin embargo, el lugar de síntesis de las mismas varía entre las distintas especies.

3.1.3.1 Aves

En las aves, las proteínas de la envoltura perivitelina pueden ser sintetizadas por el hígado, el ovario o ambos (Bausek *et al.*, 2000; Litscher y Wassarman, 2007). Como por ejemplo, la codorniz japonesa (*Coturnix japonica*) donde la proteína ZP1 es sintetizada en el hígado, mientras que el resto de proteínas son sintetizadas en el ovario. ZP3 y ZPD se detectan en las células de la granulosa, mientras que la síntesis de ZP2 y ZP4 tiene lugar en ovocitos de folículos inmaduros (Sasanami *et al.*, 2003; Serizawa *et al.*, 2011).

3.1.3.2 Peces

Al igual que en las aves, las proteínas del corion de los peces pueden ser sintetizadas en el hígado, el ovario o en ambos. Un ejemplo sería la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en la que ZP1, ZP2 y ZP3 son sintetizadas en el hígado bajo control hormonal y vía sanguínea llegan a los ovocitos en desarrollo del ovario, además también se ha detectado síntesis

de ZP3 en el ovario (Hyllner y Haux, 1992; Hyllner *et al.*, 2001; Litscher y Wassarman, 2007). Pese a las diferencias en el lugar de síntesis y al tipo de fecundación, como por ejemplo entre la trucha arcoíris (fecundación externa) y la ratona (fecundación interna) y a que evolutivamente se separaron hace unos 400 millones de años, estas glicoproteínas comparten muchas características estructurales (Litscher y Wassarman, 2007).

3.1.3.3 Mamíferos

En los mamíferos, la ZP es formada durante el crecimiento folicular y su síntesis tiene lugar exclusivamente en el ovario. Pueden intervenir el ovocito o el ovocito junto a las células de la granulosa (Wassarman, 1988, 2008; Maresh *et al.*, 1990; Sinowatz *et al.*, 2001; Wassarman y Litscher, 2013).

Tradicionalmente, tomando como referencia el modelo del ratón (*Mus musculus*), se consideraba que la ZP de mamíferos era únicamente sintetizada por el ovocito (Haddad y Nagai, 1977; Bleil y Wassarman, 1980a; Wassarman, 1988; Epifano *et al.*, 1995). Sin embargo, en pocas especies: ratón (Haddad y Nagai, 1977; Epifano *et al.*, 1995; Eberspaecher *et al.*, 2001; Wassarman, 2008), rata (Akatsuka *et al.*, 1998; Scobie *et al.*, 1999), hámster (Bousquet *et al.*, 1981; Izquierdo-Rico *et al.*, 2011), ratón marsupial de cara rayada (Au *et al.*, 2008) y zarigüeya australiana (Voyle *et al.*, 1999), se señala a esta célula como la única responsable de su síntesis. En el resto de mamíferos estudiados habría una intervención conjunta del ovocito y las células de la granulosa (Tabla 3).

Por tanto, en relación al lugar de la síntesis de las glicoproteínas de la ZP podemos encontrar dos tipos de modelo y dentro de cada especie una cinética de expresión propia (Maresh *et al.*, 1990; Kölle *et al.*, 1996, 1998; Konrad *et al.*, 2012).

1- **Síntesis exclusiva por el ovocito:** como se ha descrito en algunos roedores y marsupiales.

Roedores:

En el **hámster dorado** (*Mesocricetus auratus*) estudios de hibridación *in situ* (HIS) indican una mayor expresión de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en folículos primordiales y primarios, disminuyendo la expresión a medida que aumenta el desarrollo folicular (Izquierdo-Rico *et al.*, 2011).

En la **ratona** (*Mus musculus*): Se observa expresión coordinada de los distintos genes (Epifano *et al.*, 1995; Wassarman, 2008). La expresión de los mismos aumenta a medida que el ovocito comienza a crecer disminuyendo en los últimos estadios de desarrollo. ZP1 y ZP3 se detectan en ovocitos de folículos primarios y secundarios, mientras que ZP2 se detecta además en los ovocitos de folículos primordiales (Epifano *et al.*, 1995).

Hasta el momento únicamente se había descrito síntesis de la ZP por parte del ovocito, sin embargo estudios más recientes llevados a cabo estudiando la expresión de ZP2 mediante RT-PCR e HIS, demuestran que en su síntesis intervienen también las células de la granulosa y las células del cúmulo, habiendo incluso una mayor participación por parte de estas células que del ovocito (Xie *et al.*, 2010).

En la **rata** (*Rattus norvegicus*) se detecta la glicoproteína ZP3 en los ovocitos de folículos en crecimiento pero no se detecta en folículos primordiales (Scobie *et al.*, 1999).

Marsupiales:

En el **ratón marsupial de cara rayada** (*Sminthopsis macroura*) estudios realizados con RT-PCR e HIS indican expresión de ZP2 en el citoplasma de ovocitos de folículos primordiales, primarios y secundarios, alcanzando la máxima expresión en folículos primarios (Au *et al.*, 2008).

En la **zarigüeya australiana** (*Trichosurus vulpecula*), ZP2 y ZP4 se detectan en ovocitos de folículos primordiales, siendo la expresión máxima en folículos primarios y disminuyendo la expresión en folículos con un mayor grado de desarrollo (Mate, 1998; Haines *et al.*, 1999; Voyle *et al.*, 1999).

2- Síntesis por el ovocito y las células de la granulosa: como se ha descrito en la mayoría de mamíferos.

Carnívoros:

En la **gata** (*Felis catus*), estudios realizados por Jewgenow y Rudolph en el año 2001 indicaban que en la síntesis de las diferentes glicoproteínas únicamente intervenían las células de la granulosa; sin embargo, estudios de ese mismo año realizados por Barber y colaboradores indican que en la síntesis interviene también el ovocito. Se describe una síntesis secuencial, primero se detecta ZP4 en folículos primarios en crecimiento y secundarios y posteriormente se detectan ZP2 y ZP3 únicamente en folículos secundarios (Jewgenow y Fickel, 1999).

En la **perra** (*Canis familiaris*), la glicoproteína ZP2 es sintetizada por el ovocito y ha sido localizada en folículos primordiales, primarios y secundarios tempranos, mientras que ZP3 y ZP4 son sintetizadas por las células de la granulosa en folículos primarios y secundarios (Blackmore *et al.*, 2004).

Lagomorfos:

En la **coneja** (*Oryctolagus cuniculus*), ZP2 se detecta en el ovocito de folículos primordiales, primarios y secundarios tempranos, habiendo una mayor expresión en ovarios inmaduros (2-6 semanas de edad) que en ovarios maduros (8-12 semanas de edad) (Lee *et al.*, 1993). El ARNm de ZP3 se detecta por Northern-Blot en mayor proporción (600 veces) en ovarios sexualmente inmaduros (animales de 6 semanas), es decir con una mayor proporción de folículos primordiales, aunque también presentan folículos primarios y secundarios tempranos y en menor proporción en ovarios sexualmente maduros (animales de más de 6 meses) (Schwoebel *et al.*, 1991; Grootenhuis *et al.*, 1996). ZP4 se expresa en folículos primordiales primarios y secundarios tempranos (Lee, 2000).

Marsupiales:

En el **wallaby de Tammar** (*Macropus eugenii*) se detecta expresión de distintas proteínas de la ZP en ovocitos de folículos primordiales, primarios y secundarios. En folículos primarios también se detecta su presencia en algunas células de la granulosa (Mate, 1998).

Primates:

En el **macaco de Rhesus** (*Macaca mulatta*), se ha visto expresión de ZP3 en folículos primordiales y primarios. Observándose expresión en todos los ovocitos de folículos primordiales además de en algunas células de la granulosa de folículos primarios (Grootenhuis *et al.*, 1996).

En el **macaco cangrejero** (*Macaca fascicularis*), el ovocito y las células de la granulosa podrían intervenir en la síntesis de ZP2 y ZP3, mientras que para ZP4 sólo intervendría el ovocito (Martínez *et al.*, 1996); aunque según otros autores únicamente interviene el ovocito en la síntesis

de las tres proteínas (Eberspaecher *et al.*, 2001). ZP2 y ZP3 se detectan en folículos primordiales, primarios y secundarios y ZP4 en folículos secundarios y en un bajo nivel en folículos terciarios (Martínez *et al.*, 1996).

En la **mujer** (*Homo sapiens*), ZP1 se detecta en folículos secundarios y terciarios (Ganguly *et al.*, 2010a), ZP2, ZP3 y ZP4 se detectan en folículos en todos los estadios de desarrollo (Eberspaecher *et al.*, 2001; Gook *et al.*, 2008). ZP3 y ZP4 se observan en el 95% y 93% de los folículos primordiales examinados respectivamente, mientras que ZP2 sólo en el 32% de los mismos (Gook *et al.*, 2008). Existe cierta controversia respecto al lugar de síntesis de la ZP en la mujer, ya que algunos autores señalan tanto al ovocito como a las células de la granulosa como responsables de su síntesis (Grootenhuis *et al.*, 1996; Gook *et al.*, 2008), mientras que otros autores indican que en la síntesis de la ZP únicamente interviene el ovocito (Bousquet *et al.*, 1981; Eberspaecher *et al.*, 2001).

En el **tití común** (*Callithrix jacchus*), ZP2 y ZP3 se detectan en folículos en cualquier estadio de desarrollo, tanto en el ovocito como en las células de la granulosa, con la excepción de ZP2 que no se localiza en folículos primordiales (Grootenhuis *et al.*, 1996; Bogner *et al.*, 2004). Estudios realizados por otro grupo con PCR en tiempo real (RT-qPCR), indican que la expresión de ZP2, ZP3 y ZP4 es mayor en folículos secundarios y va disminuyendo conforme los folículos aumentan de tamaño (Konrad *et al.*, 2012).

Ungulados:

En la **cerda** (*Sus scrofa*), ZP4 se localiza en ovocitos de folículos primordiales y primarios. En folículos secundarios se observa tanto en ovocito como en células de la granulosa y en estadios más avanzados se pierde la señal en el ovocito (Kölle *et al.*, 1996).

En la **vaca** (*Bos taurus*) mediante HIS se observa expresión de la glicoproteína ZP3 en ovocitos de folículos primordiales y primarios, mientras

que en folículos secundarios y terciarios hay expresión tanto en el ovocito como en las células de la granulosa (Kölle *et al.*, 1998; Totzahuer *et al.*, 1998).

En la **yegua** (*Equus ferus caballus*), ZP3 y ZP4 se localizan en ovocitos de folículos primordiales y primarios, mientras que en folículos secundarios se localizan tanto en ovocito como en células de la granulosa. Una vez el ovocito está maduro, la síntesis se detiene en el ovocito, observándose exclusivamente síntesis en las células del cúmulo (Kölle *et al.*, 2007).

Tabla 3. Lugar de síntesis de la ZP en mamíferos y técnicas utilizadas para su detección. O (ovocito), CG (células de la granulosa), HIS (hibridación *in situ*).

ESPECIE		TÉCNICA	REFERENCIAS
SÍNTESIS POR EL OVOCITO			
Hámster dorado	ZP1: Fol. primordiales, 1º y 2º	HIS	Izquierdo-Rico <i>et al.</i> , 2009
	ZP2: Fol. 1º y 2º		
	ZP3: Fol. primordiales, 1º y 2º		
	ZP4: Fol. primordiales, 1º y 2º		
Rata	ZP3: Fol 1º	HIS	Scobbie <i>et al.</i> , 2009
Ratón	ZP1: Fol. 1º y 2º	Northern blot	Epifano <i>et al.</i> , 1995
	ZP2: Fol. primordiales, 1º y 2º	RT-PCR, HIS	Wassarman, 2008
	ZP3: Fol. 1º y 2º		
Ratón marsupial de cara rayada	ZP2: Fol. primordiales, 1º y 2º	RT-PCR, HIS	Au <i>et al.</i> , 2008
Zarigüeya australiana	ZP2: Fol. Primordiales, 1º y 2º	RT-PCR, HIS	Voyle <i>et al.</i> , 1999
	ZP4: Fol. primordiales, 1º y 2º		Haines <i>et al.</i> , 1999
SÍNTESIS POR EL OVOCITO Y LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA			
Coneja	ZP2: Fol. Primordiales y 1º	Northern blot,	Lee <i>et al.</i> , 1993; 2000
	ZP3: Fol. Primordiales y 1º	HIS	Schwoebel <i>et al.</i> , 1991
	ZP4: Fol. primordiales, 1º y 2º		Grootenhuis <i>et al.</i> , 1996
Cerda	ZP4: O: Fol. primordiales y 1º	HIS	Kölle <i>et al.</i> , 1996
	ZP4: O+CG: Fol. 2º		
Gata	ZP2: Fol. 2º	RT-PCR, HIS	Jewgenow y Fickel, 1999

	ZP3: Fol. 2° ZP4: Fol. 1° y 2°		
Macaco de Rhesus	ZP3: O: Fol. primordiales ZP3: CG: Fol. 1°	HIS	Grootenhuis <i>et al.</i> , 1996
Macaco cangrejero	ZP2: Fol. primordiales, 1° y 2° ZP3: Fol. primordiales, 1° y 2° ZP4: Fol. 2°, 3°	RT-qPCR, HIS	Martínez <i>et al.</i> , 1996
Mujer	ZP1: Fol. 2° y 3° ZP2: Fol. Primordiales, 1°, 2° y 3° ZP3: Fol. Primordiales, 1°, 2° y 3° ZP4: Fol. Primordiales, 1°, 2° y 3°	HIS	Grootenhuis <i>et al.</i> , 1996 Eberspaecher <i>et al.</i> , 2001 Gook <i>et al.</i> , 2008 Ganguly <i>et al.</i> , 2010a
Perra	ZP2: O: Fol. primordiales, 1° y 2° ZP3: CG: Fol. 1°, 2° ZP4: CG: Fol. 1°, 2°	HIS	Blackmore <i>et al.</i> , 2004
Tití común	ZP2: Fol. 1°, 2°, 3°. ZP3: Fol. primordiales, 1°, 2° y 3° ZP4: Fol. 1°, 2° y 3°	RT-PCR, HIS, qPCR	Grootenhuis <i>et al.</i> , 1996 Bogner <i>et al.</i> , 2004 Konrad <i>et al.</i> , 2012
Vaca	ZP3: O: Fol. primordiales y 1° ZP3: O+CG: Fol. 2° y 3°	HIS	Kölle <i>et al.</i> , 1998
Yegua	ZP3: O: Fol. primordiales y 1° ZP3: O+CG: Fol. 2° ZP4: O: Fol. primordiales y 1° ZP4: O+CG: Fol. 2°	HIS	Kölle <i>et al.</i> , 2007
Wallaby de Tammar	ZP: O: Fol. primordiales, 1° y 2° ZP: O+CG: Fol. 1°	HIS	Mate, 1998

3.1.4 Estructura de la zona pelúcida

Hasta 2004, se pensaba que la ZP de la ratona era un entramado fibrilar formado por largos filamentos de ZP2-ZP3, interconectados entre sí mediante la glicoproteína de ZP1, dando lugar a una estructura tridimensional (Greve y Wassarman, 1985).

El modelo de estructura de la ZP descrito por Greve y Wassarman en 1985, fue cuestionado por el equipo del Dr. Dean en 2004, los cuales describen una ZP formada por repeticiones de heterodímeros de ZP3-ZP2 y

ZP3-ZP1 que forman la estructura fibrilar principal, estando unidos a través de las glicoproteínas ZP1 y ZP2 (Dean, 2004) (Fig. 3). Además, se ha demostrado que la ZP de ratón se puede formar exclusivamente con 2 glicoproteínas (ZP1-ZP3 ó ZP2-ZP3), siendo siempre necesaria la presencia de ZP3 para su formación (Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 1996, 1999, 2001; Dean, 2004).

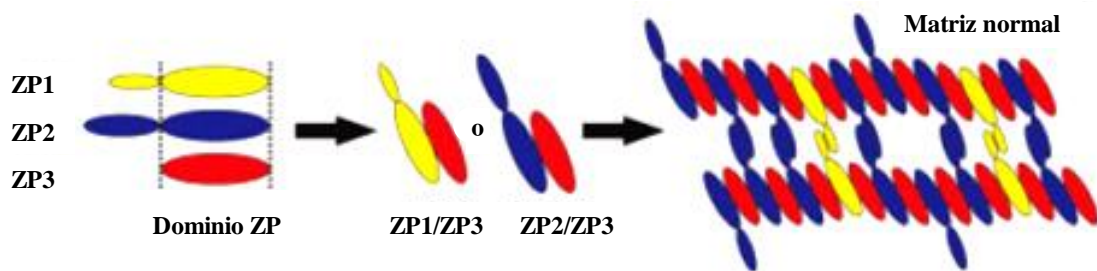


Figura 3. Modelo de la estructura de la zona pelúcida de ratón. (Modificado de Dean, 2004).

El último modelo propuesto es una variación del modelo de Greeve y Wassarman de 1985, de modo que, la glicoproteína ZP1 se incorpora a los largos filamentos a través de su dominio ZP; por tanto en la ratón, la ZP estaría formada por un entramado fibrilar constituido por largos polímeros de ZP1-ZP2-ZP3 los cuales se unen entre sí mediante homodímeros de ZP1 a través de enlaces disulfuro formando una estructura tridimensional (Fig. 4) (Monné y Jovine, 2011).

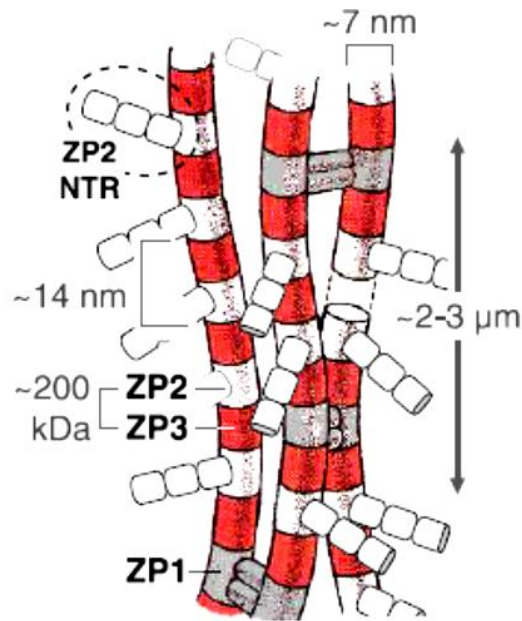


Figura 4. Modelo de la arquitectura de la zona pelúcida de la ratona. ZP1 se incorpora a los filamentos de la ZP a partir de su dominio ZP (Tomado de Monné y Jovine 2011).

En el caso de especies de mamíferos con otra composición glicoproteica como aquellas que presentan ZP2, ZP3 y ZP4 o 4 glicoproteínas posiblemente sea una estructura similar a la descrita anteriormente. Algunos autores proponen que el modelo de cuatro proteínas estaría constituido por largos filamentos formados por las glicoproteínas ZP2 y ZP3 que estarían entrelazados por distintos tipos de filamentos: homodímeros de ZP1, homodímeros de ZP4 y heterodímeros de ZP1-ZP4 (Florman y Ducibella, 2006).

En la ratona, las glicoproteínas ZP2 y ZP3 representan aproximadamente el 80% del total de las proteínas de la ZP, encontrándose en cantidades similares, mientras que ZP1, representa aproximadamente el restante 20% (Wassarman y Litscher, 2012). Pese a que ZP1 es la glicoproteína minoritaria proporciona integridad estructural a la matriz y ratonas *knock out* (KO) para ZP1 tienen ZPs anormales, siendo más porosas y delgadas de

lo normal (Rankin *et al.*, 1999). La ausencia de las otras glicoproteínas inducen cambios de mayor importancia, por ejemplo la ausencia de ZP2 da lugar a una ZP delgada que se pierde al final de la foliculogénesis (Rankin *et al.*, 2001), mientras que la ausencia de ZP3 impide la formación de la ZP (Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 1996).

3.1.4.1 Características de las proteínas de la zona pelúcida

Las glicoproteínas de la ZP presentan una estructura común, constituida por distintos dominios: un péptido señal, el dominio ZP, el dominio trefoil (únicamente presente en ZP1 y ZP4), el sitio consenso para corte de furina, el dominio transmembrana y un tallo citoplasmático (Fig. 5).

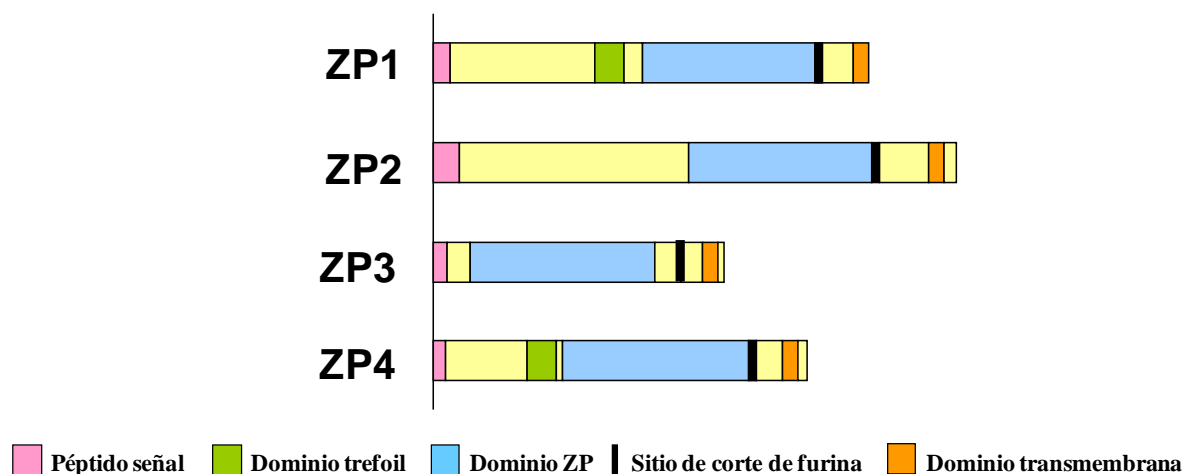


Figura 5. Descripción esquemática de los diferentes dominios presentes en las glicoproteínas de la ZP (Modificado de Conner *et al.*, 2005).

En la Tabla 4 se muestra la longitud aminoacídica de los distintos dominios en la mujer.

Tabla 4. Longitud aminoacídica de los distintos dominios de las glicoproteínas de la ZP en la mujer (Modificado de Gupta *et al.*, 2012).

	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4
Longitud polipéptido	638	745	424	540
Péptido señal	1-25	1-38	1-22	1-18
Dominio trefoil	234-274			141-183
Dominio ZP	279-551	372-637	45-303	188-460
Sitio de corte de furina	552-555	639-642	349-352	463-466*
Dominio transmembrana	602-622	717-736	388-408	506-526

*El sitio de corte de furina para ZP4 es SRRR, mientras que para ZP1, ZP2 y ZP3 es RXRR.

Péptido señal: Es un dominio hidrofóbico localizado en el extremo N-terminal de la proteína, que la dirige hacia la vía secretora y no está presente en la proteína madura (Boja *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2012).

Dominio ZP (ZPD): El dominio ZP, típico de las glicoproteínas de la ZP, podemos encontrarlo en gran variedad de proteínas secretoras que juegan un papel importante en el desarrollo, en la audición, en la inmunidad y en el cáncer (Bork y Sander, 1992; Jovine *et al.*, 2004, 2006). En el caso de la ZP, se ha visto que participa en la polimerización de la matriz extracelular de las proteínas (Jovine *et al.*, 2002, 2004, 2006). Por otro lado, experimentos realizados con ZP1 recombinante humana indican que ZPD es capaz de unirse al espermatozoide intacto e inducir RA (Ganguly *et al.*, 2010b).

ZPD es una secuencia de unos 260 aminoácidos que presenta de 8 (ZP3) a 10 (ZP1, ZP2 y ZP4) residuos de cisteína conservados (Jovine *et al.*, 2006; Wassarman, 2008; Monné y Jovine, 2011). ZPD está formado por dos subdominios, el subdominio C-terminal (ZP-C) y el subdominio N-terminal (ZP-N) (Jovine *et al.*, 2004), pudiendo haber varias copias del subdominio ZP-N, con la excepción de la glicoproteína ZP3 (Callebaut *et al.*, 2007) (Fig. 6). Estas

copias podrían participar en la especificidad de unión al espermatozoide de ZP1, ZP2 y ZP4 (Callebaut *et al.*, 2007).

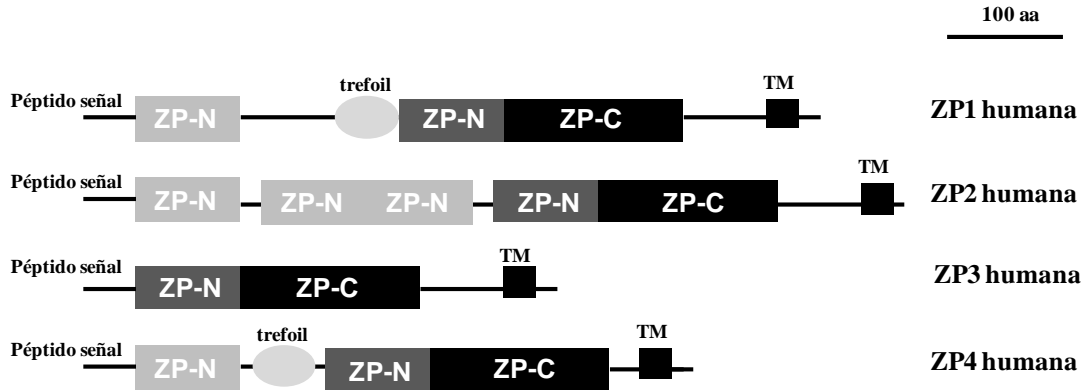


Figura 6. Subdominios ZP-C y ZP-N del dominio ZP en ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 humana. ZP3 no presenta copias de estos subdominios. ZP1 y ZP4 presentan una copia de ZP-N y ZP2 presenta tres copias de ZP-N (Modificado de Callebaut *et al.*, 2007).

Algunos autores consideran que ZP-N debería ser considerado un dominio por sí solo, ya que se ha visto que puede inducir la polimerización individualmente (Jovine *et al.*, 2006). Además, estudios recientes, detectan dos péptidos en el dominio ZP-N de ZP1 humana con propiedades amiloideas, induciendo el depósito de material fibroso insoluble, siendo los responsables de la polimerización de la matriz (Louros *et al.*, 2013).

Dominio trefoil (TFD) o dominio P: ha sido identificado en las glicoproteínas ZP1 y ZP4 exclusivamente. Este dominio se localiza en diversas proteínas con diferente actividad biológica, como polipéptidos espasmolíticos, factor trefoil intestinal, pS2, etc... (Bork, 1993). Se trata de una región de 42 aminoácidos rica en cisteínas, que forma una estructura de tres bucles unidos por puentes disulfuro (Braun *et al.*, 2009). Se le han atribuido funciones estructurales dada la estabilidad de los péptidos trefoil gastrointestinales a la digestión por proteasas, lo que ha sido probado mediante ensayos de digestión con tripsina (Braun *et al.*, 2009).

Sitio de corte de furina: Algunas proteínas son inactivas cuando son sintetizadas y es necesaria su escisión proteolítica mediante furina para su activación (Tian *et al.*, 2011). Se ha observado que las glicoproteínas de la ZP presentan un dominio localizado antes del dominio transmembrana, se trata del sitio de corte de furina, descrito como una secuencia de 4 aminoácidos RX(K/R)R, donde tendría lugar la escisión proteolítica de las distintas ZPs y su liberación a la vía secretora (Kiefer y Sailing, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Tian *et al.*, 2011). Este dominio no está perfectamente conservado en todas las especies, como sucede en ZP4 de la mujer y la gata (Zhao *et al.*, 2003).

Algunas cuestiones permanecen todavía sin resolver, como el tipo de convertasa, la localización celular y la ruta de secreción (Kiefer y Sailing, 2002; Zhao *et al.*, 2003).

Dominios hidrofóbicos: Se han identificado dos motivos hidrofóbicos duplicados: el dominio hidrofóbico interno (IHP), localizado a nivel del dominio ZP y el dominio hidrofóbico externo (EHP), localizado entre el sitio consenso de corte de furina y el dominio transmembrana. Juntos evitan la polimerización de la proteína en el citoplasma celular e intervienen en la secreción e incorporación de las glicoproteínas a la ZP (Zhao *et al.*, 2003; Jovine *et al.*, 2004; Monné y Jovine, 2011).

Dominio transmembrana: se trata de un dominio hidrofóbico localizado en el extremo C-terminal de la proteína. El dominio transmembrana de ZP2 y ZP3 es requerido para la localización de estas glicoproteínas en la membrana del ovocito, donde se procederá al procesamiento del extremo carboxilo terminal y la incorporación de las glicoproteínas a la ZP (Hoodbhoy *et al.*, 2006).

Tallo citoplasmático: El dominio transmembrana se continúa con un tallo citoplasmático hidrofílico que también evita la polimerización

intracelular de las proteínas y asegura su correcta incorporación a la matriz (Jiménez-Movilla y Dean, 2011).

3.1.4.2 Aspecto morfológico de la zona pelúcida

El grosor de la ZP varía entre los distintos mamíferos, pudiendo encontrarse entre 1-25 μm . Por ejemplo, en la ratona el grosor de la ZP es de unos 6.2 μm , mientras que en la mujer el grosor varía entre 15-20 μm (Wassarman, 1988; 2008; Pelletier *et al.*, 2004). En general, en los marsupiales se ha observado una ZP más fina que en euterios (Bedford, 1996); sin embargo, el grosor varía considerablemente entre unas especies y otras, pudiendo variar desde 1 a 8.6 μm (Selwood, 2000). Este diferente grosor podría implicar que la cantidad proteica varía de una especie a otra. Así, el contenido proteico oscila entre 1 y 30 ng. Por ejemplo, en la ratona la ZP contiene alrededor de 3.5 ng de proteína, en la cerda se estima que habría unos 30 ng y en la mujer, se ha estimado la cantidad de proteína en unos 32 ng (18 ng de ZP2, 8 ng de ZP3 y 6 ng de ZP4 y ZP1) (Wassarman, 1988, 2008; Chiu *et al.*, 2008b).

La ZP es porosa y permeable a macromoléculas relativamente grandes, así como a pequeños virus (Wassarman y Litscher, 2012). Cuando la ZP es observada mediante microscopía electrónica de barrido, se observan diferencias entre su superficie externa e interna. En la ratona, se observan fenestraciones en la superficie externa que le dan una apariencia esponjosa, mientras que la superficie interna es más regular y compacta (Phillips y Shalgi, 1980; Familiari *et al.*, 1992; 2006, 2008) (Fig. 7). Además, se ha descrito una correlación entre el grado de madurez del ovocito y la estructura de la ZP tanto en la ratona (Calafell *et al.*, 1992), como en la mujer (Familiari *et al.*, 1988), describiéndose en esta última una ZP homogénea y compacta en ovocitos en Metafase I y mucho más porosa en ovocitos en metafase II (Tesarík *et al.*, 1988).

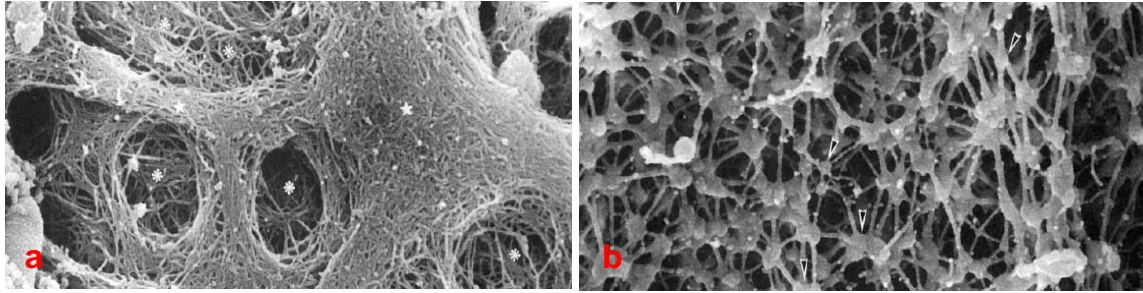


Figura 7. Imagen de la zona pelúcida de mujer mediante microscopía electrónica de barrido. a) Zona externa de la ZP. b) Zona interna de la ZP (Tomada de Familiari *et al.*, 1992).

Cuando la ZP se observa con PolScope se pueden visualizar tres capas: una interna, siendo la más birrefringente, brillante y gruesa, una media, la de menor grosor, que se observa oscura y con poca birrefringencia y una externa con mayor grosor y birrefringencia que la anterior (Fig. 8). La apariencia de las mismas se emplea como marcador de calidad ovocitaria y desarrollo embrionario (Pelletier *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Rama Raju *et al.*, 2007).

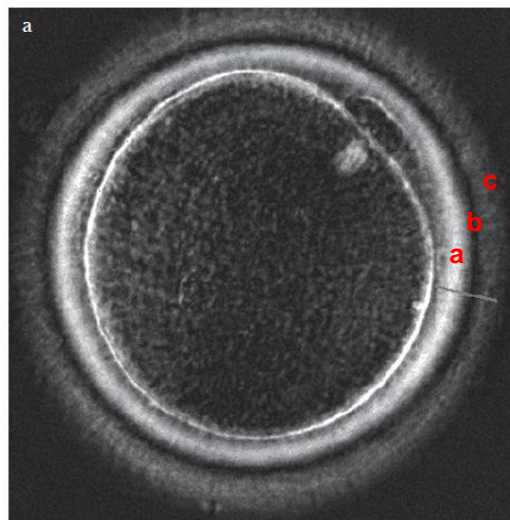


Figura 8. Imagen de un ovocito mediante PolScope. Se observan las tres capas que constituyen la ZP señaladas con a, b y c (Tomado de Rama Raju *et al.*, 2007).

3.2 EVOLUCIÓN MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS REPRODUCTORAS

3.2.1 Evolución molecular de las proteínas reproductoras

La comparación de las secuencias génicas entre especies filogenéticamente cercanas ha demostrado que los genes relacionados con la reproducción evolucionan de forma más rápida que aquellos genes expresados en otro tipo de tejidos (Vacquier, 1998; Singh y Kulathinal, 2000; Swanson y Vacquier, 2002; Turner y Hoekstra, 2008). Así, se ha documentado en *Drosophila* que la evolución de las proteínas reproductoras es el doble de rápida que la que presentan las proteínas no relacionadas con la reproducción (Civetta y Singh, 1995). Además, se observa una evolución más rápida de las proteínas reproductoras masculinas que de las femeninas (Haerty *et al.*, 2007).

Los genes de evolución rápida son aquellos que muestran entre especies un amplio porcentaje de sustituciones de aminoácidos. Estudios realizados por Makalowski y Boguski en 1998, demostraron que muchos de estos genes estaban relacionados con la respuesta inmune, sin embargo destacaron algunos genes relacionados con la reproducción, como ZP2, ZP3 y acrosina (ACR) los cuales están directamente relacionados con la interacción espermatozoide-ovocito.

La evolución rápida puede deberse a una falta de funcionalidad como sucede con los pseudogenes en comparación a su gen ancestral y con los intrones en relación a los exones (Li *et al.*, 1981; Bodmer y Ashburner, 1982; Hellberg y Vacquier, 1999); o puede deberse a una evolución adaptativa inducida por la selección natural (Swanson y Vacquier, 2002). Para diferenciar entre ambas debemos comparar secuencias de ADN de las regiones codificantes y tener en cuenta si al cambiar un nucleótido se produce a su vez un cambio

aminoacídico (sustitución no sinónima) o si, por el contrario no se produce cambio de aminoácido (sustitución sinónima o silente) (Yang y Bielawski, 2000; Swanson y Vacquier, 2002). El ratio d_N/d_S (número de sustituciones no sinónimas entre número de sustituciones sinónimas) nos indica el tipo de evolución; así, si el ratio es inferior a 1 sería una evolución negativa o purificante, si es igual a 1 sería una evolución neutral y si es superior a 1 sería indicio de selección positiva darwiniana. Este cambio aminoacídico se suele relacionar con una ventaja adaptativa y se emplea para identificar regiones génicas funcionalmente importantes, como por ejemplo lugares de unión espermatozoide-ovocito (Swanson *et al.*, 2001a, 2001b; Swanson y Vacquier, 2002).

En mamíferos, han sido identificadas distintas proteínas reproductivas sometidas a evolución rápida. Algunos ejemplos del sistema reproductor femenino serían la oviductina (OVGP1) y glicoproteínas de la ZP (ZP2 y ZP3) y en relación al sistema reproductor masculino, proteínas detectadas en la superficie del espermatozoide como la molécula de adhesión espermática (SPAM-1), β -fertilina, zonadhesina y el complejo t asociado a la expresión testicular 1 (TCTE1) (Swanson y Vacquier, 2002). Recientemente, se han evaluado múltiples genes en el ratón relacionados con distintos procesos en los que interviene el espermatozoide y se ha visto que aquellos relacionados con la motilidad espermática y la interacción con el ovocito están sujetos a un proceso más rápido de evolución; como por ejemplo, ADAM32 o proteínas estructurales de los microtúbulos del flagelo del espermatozoide (Tekt4) (Vicens *et al.*, 2014).

Esta evolución rápida está asociada a la especie-especificidad y en ocasiones este fenómeno puede dar lugar a la aparición de nuevas especies. Así, tanto las proteínas masculinas como las femeninas tienen que evolucionar simultáneamente, dándose una coevolución para que la reproducción sea efectiva, como por ejemplo se ha descrito la coevolución de la proteína CD9 del ovocito y la proteína IZUMO1 del espermatozoide en primates (Claw *et al.*, 2014). Otro ejemplo de coevolución adaptativa se ha

encontrado en la oreja de mar, donde se ha visto que la lisina (proteína acrosomal) y su receptor VERL en la envoltura vitelina han sufrido un proceso de evolución positiva y ambos han coevolucionado simultáneamente (Swanson y Vacquier, 2002; Galindo *et al.*, 2003). Swanson y Vacquier, proponen como posibles causas de evolución rápida de las proteínas reproductoras, la competencia espermática, la selección sexual y el conflicto sexual.

3.2.2 Evolución molecular de las glicoproteínas de la zona pelúcida

Como se ha dicho anteriormente, algunas de las glicoproteínas de la ZP han sido objeto de estudio por estar sometidas a una evolución rápida como resultado de una selección positiva, este estudio ha ayudado a entender mejor las diferencias especie-específicas en la composición de la ZP.

En especial se han estudiado las glicoproteínas ZP2 y ZP3 y son muchos los autores que apoyan su evolución positiva (Makalowski y Boguski, 1998; Swanson *et al.*, 2001a; Swanson y Vacquier, 2002; Turner y Hoekstra, 2006, 2008). Regiones concretas de estas glicoproteínas han sido señaladas por estar sometidas a esta selección positiva, por ejemplo en ZP3 se detectaron múltiples regiones bajo selección positiva, la mayoría de las cuales se encontraban entre los aminoácidos 331 y 373 (Swanson *et al.*, 2001a).

Además, varios estudios detectan regiones sometidas a selección positiva en ZP3 de varios roedores de Australia y Nueva Guinea; sin embargo, cuando se consideraron únicamente los roedores australianos, los resultados no fueron significativos (Swann *et al.*, 2007). En concreto, se ha descrito en la ratona que los aminoácidos 324, 325 y 341 del exón 7 son sometidos a esta selección; región que se ha descrito como esencial en la interacción con el espermatozoide (Rosiere y Wassarman, 1992; Kinloch *et al.*, 1995; Wassarman y Litscher, 2009).

Recientemente, otros autores descartan esta selección positiva (Berlin y Smith, 2005; Chen *et al.*, 2011; Meslin *et al.*, 2012). En 2005, Berlin y Smith reanalizaron los datos de Swanson, estudiando 15 especies de mamíferos, 11 de aves y 6 de peces y no encontraron indicios de selección positiva para la glicoproteína ZP3 y atribuyen los resultados anteriores a falsos positivos originados por el método usado de análisis M7-M8 LRT. Del mismo modo, los resultados propuestos por Jansa y colaboradores en 2003, donde señalan la presencia de selección positiva en ZP3 en varias especies del género *Mus*, son descartados cuando Turner y Hoekstra en 2006 reanalizan los resultados en ausencia del grupo externo empleado por los primeros autores.

En 2011, los análisis realizados por Chen y colaboradores en 7 especies de bóvidos, no encuentran indicios de selección positiva en ZP3, mientras que si detectan indicios, aunque débiles en ZP2 (aminoácidos 38, 117, 174 y 342). Lo que podría indicar que la ZP2 de mamíferos podría jugar un papel en la interacción con el espermatozoide más importante que el que se había pensado hasta el momento (Chen *et al.*, 2011) hecho que está siendo considerado a la vista de los estudios realizados por el grupo del Dr. Dean (Burkart *et al.*, 2012; Avella *et al.*, 2014).

Estudios más recientes de Meslin *et al.* (2012) encuentran indicios de selección positiva para ZP2 y ZP4 en la rana y para ZP4 en el macaco de Rhesus. Además, estudian otros genes sometidos a selección positiva y concluyen que los aminoácidos bajo esta selección no se encuentran localizados en el dominio relacionado con la función principal de la proteína, por lo que estos residuos podrían intervenir en funciones secundarias. Por otro lado, muestran que los aminoácidos sometidos a selección positiva presentan una localización diferente según la especie analizada (Meslin *et al.*, 2012).

Centrándonos en la familia ZP, el primer evento en la evolución de esta familia fue una duplicación génica, que dio lugar al gen ancestral de la

subfamilia *ZPC/ZP3* y al precursor de las subfamilias del resto de genes *ZP2/ZPA*, *ZPB*, *ZPD* y *ZPAX* (Spargo y Hope, 2003). Tras esta primera duplicación, este gen precursor dio lugar a *ZPD*, *ZPAX* y a un gen del cual surgirían *ZP2* y *ZPB*. Este gen *ZPB* se duplicó posteriormente originándose los genes *ZP1* y *ZP4*. Así que, *ZP1* y *ZP4*, previamente considerados genes ortólogos, son en realidad parálogos (Hughes *et al.*, 1999; Bausek *et al.*, 2000; Goudet *et al.*, 2008) y puesto que el genoma de la gallina presenta *ZP1*, la duplicación del gen ancestral puede ser datado antes de la divergencia entre aves y mamíferos hace 300 Ma (Goudet *et al.*, 2008).

Algunas especies presentan dos copias del gen ancestral *ZP1* y *ZP4* (modelo de 4 proteínas) y en otras especies sólo se conserva una, ya sea *ZP1* o *ZP4* (modelo de tres proteínas). En este caso, una de las copias (*ZP1* o *ZP4*) se ha perdido tras la duplicación debido a la pseudogenización o muerte génica (Goudet *et al.*, 2008; Stetson *et al.*, 2012).

Además de esta pseudogenización, hay varios ejemplos de pérdida de glicoproteínas de la ZP durante la evolución de los vertebrados, por ejemplo, los genes *ZPAX* y *ZPD*, presentes en las aves no se encuentran en mamíferos (Goudet *et al.*, 2008).

En el ratón (*Mus musculus*), el gen *ZP4* ha sido identificado como un pseudogén (Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008). Mientras que, en otras especies ha sido el gen *ZP1* identificado como un pseudogén, como en la perra (*Canis familiaris*) y la vaca (*Bos taurus*), encontrándose en el cromosoma 18 y 29 respectivamente (Goudet *et al.*, 2008); más recientemente, se han descrito pseudogenes para *ZP1* en otras especies como el tití (Género *Callithrix*), el tarsero (Género *Tarsius*), el delfín (Género *Tursiops*) y el cerdo (Género *Sus*) (Stetson *et al.*, 2012) (Fig. 9).

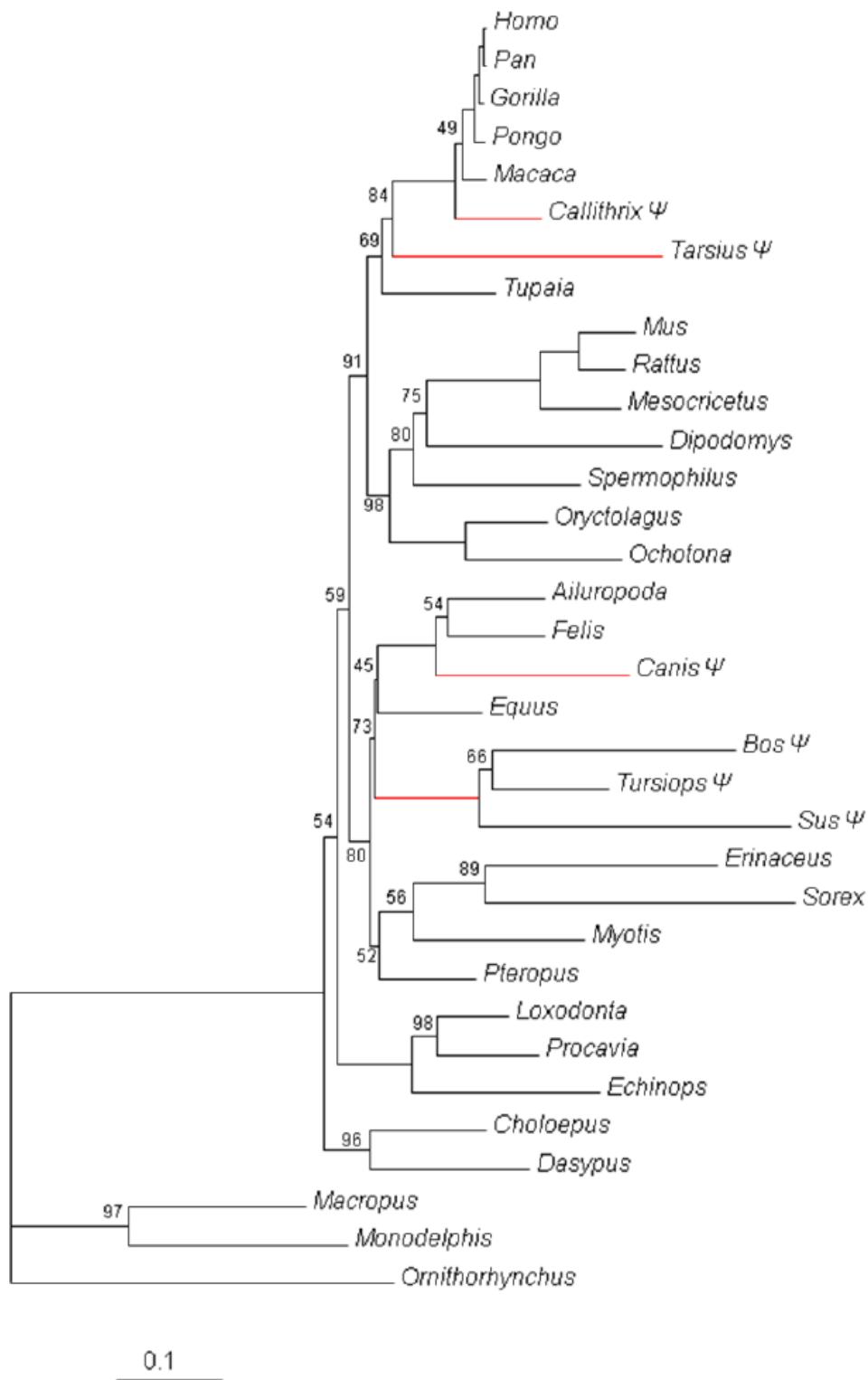


Figura 9. Relación filogenética de ZP1 de diferentes especies de mamíferos. A nivel de cada rama se indica el valor de bootstrap (porcentaje de bootstrap) del nodo al que se dirige la rama (sólo valores < 99 son mostrados). El símbolo Ψ y las ramas en rojo indican pseudogenización (Tomado de Stetson *et al.*, 2012).

Por tanto, encontramos especies donde *ZP1* o *ZP4* han sido identificados como pseudogenes (Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008; Stetson *et al.*, 2012), mientras que *ZP2* y *ZP3* siempre están presentes en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha sugiriéndose su importancia funcional.

Además, se ha detectado duplicación génica para algunos de los genes de la ZP (*ZP2*, *ZP3*, *ZPAX*). Meslin y colaboradores en 2012, realizan un estudio en distintos mamíferos (euterios y metaterios), aves, peces y anfibios donde detectan duplicaciones e indicios de selección positiva en varios de estos genes (Fig. 10).

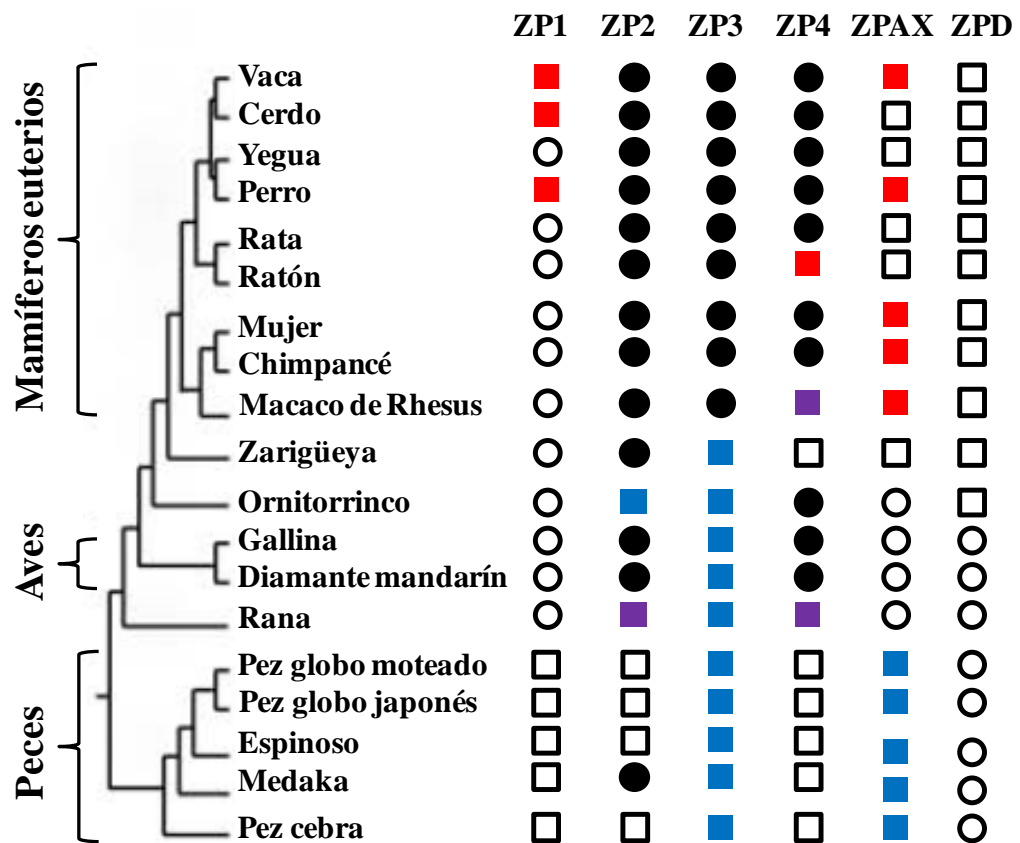


Figura 10. Evolución de los genes de la zona pelúcida. Cuadrado blanco: gen no encontrado. Cuadrado azul: duplicación. Cuadrado morado: selección positiva. Cuadrado rojo: pseudogén. Círculo negro: no se detecta evento. Círculo blanco: no hay cálculo de selección positiva. (Modificado de Meslin *et al.*, 2012).

3.2.3 Evolución del gen *ZP4* en el género *Mus*

Sorprendentemente, la pseudogenización de *ZP4*, únicamente ha sido descrita en el ratón común (*Mus musculus*), de modo que la ZP del ratón está formada por tres glicoproteínas: ZP1, ZP2 y ZP3. El transcrito de *ZP4* ha sido descrito en ovocitos de ratón pero la síntesis de la proteína se ve impedida debido a la presencia de numerosos codones de stop en el marco abierto de lectura del ARNm (Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008) (Fig. 11). Además, los análisis realizados mediante espectrometría de masas revelan la presencia de ZP1, ZP2 y ZP3 pero no se ha podido identificar ningún péptido de *ZP4* (Boja *et al.*, 2003).

```

1  atggctaagcaggctctaaggagtactctgtggcttctgccaagcatcttactgtgtttc
1  M A K Q A L R S T L W L L P S I L L C F
61  ccattctgtcctcccttgagtggccagggtgtgtctccactgtgggttacagagcttccagt
21  P F C P P L S G Q V C S T V G Y R A S S
121  ttactgtgaacctcagcctggaggcagagagtcccatgctaacagcttgggatagccaag
41  L L - T S A W R Q R V P C - Q L G I A K
181  ggctgccacacaggttaagaatgactctgactggtacatgggtgatggacagaactgat
61  G C H T G L R M T L T G T W V M D R T D
241  ggatttttggatttgaagccaccacaatgtcactctggaaggctcccattatgtcatg
81  G F L V L E A T H N V T L E G S H Y V M
301  atggtcggcggtgcaagaggtagatgtagctggaaatagagagggacaagagagactgct
101  M V G V Q E V D V A G N M R G T R E T A
361  taagtgccctttggatcttcacacccgaaatacagcaagtgtgaagtgtgcagctcctgt
121  - V P F G S S H P K Y S K C - S V Q S C
421  gtcctcgcgccatctccagaggaactgtgaagaggtggtctgctgctacagctctgaa
141  A P S P I S R G N C E E V V C C Y S S E
481  gagaaaaggcaggttctctgttactatggaaacacagtgacctcccgttgtaccaggaa
161  E E K A G S C Y Y G N T V T S R C T R E
541  ggctgcttttccattgctgtgttcaggaatgcaacctcgccaccctacgcttggattcc
181  G C F S I A V F R N A T S P P L R L D S
601  ctatccttggcttccaggaacagcagtggtggtgatcctgtgatgatgacatccaccttt
201  L S L V F R N S S G C D P V M M T S T F
661  gtcctgttccaatttccacttacttctctgtgggaccacacggcagatcactggagaccag
221  V L F Q F P L T S C G T T R Q I T G D Q
721  tccgtgtacaaaaatgagctagtagtcattcgggatgtgcaagcttggggcagaagctct
241  S V Y K N E L V V I R D V Q A W G R S S
781  attaccgcgatacagcaacttcagtccttaggctcatccttgcattgagagcct
261  I T R Y S N F S P R L I L A L R A

```

Figura 11. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de *ZP4* de ratona. En rojo se muestran los codones de stop. En rosa se muestra el atg inicial. Número de acceso del GenBank: NR_027813.1.

Por otro lado, la detección de la proteína ZP4 en el genoma de la rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005), especie filogenéticamente emparentada con el ratón indicaría que la pseudogenización de este gen se produciría tras la divergencia de estas dos especies, hecho que se produjo hace aproximadamente 12 Ma (Jaeger *et al.*, 1986; Jacobs *et al.*, 1989, 1990; Goudet *et al.*, 2008).

El género *Mus* abarca alrededor de 40 especies y está dividido en cuatro subgéneros: *Mus*, *Pyromys*, *Nannomys* y *Coelomys* (Musser y Carleton, 2005). De los cuales, el subgénero *Mus* ha sido el más extensamente estudiado. Este subgénero está formado por 11 especies, siendo el ratón común o de laboratorio (*Mus musculus*), la especie utilizada como modelo para el estudio de la ZP y la interacción entre gametos desde hace más de 30 años. De los otros subgéneros, uno procede de África: el subgénero *Nannomys* (19 especies reconocidas); y los otros dos subgéneros proceden del Sudeste asiático: el subgénero *Coelomys* (4 especies) y *Pyromys* (5 especies) (Musser y Carleton, 2005).

Estudios anteriores realizados por miembros de nuestro grupo de investigación (Tesis Doctoral de Izquierdo-Rico, 2009), demostraron la presencia de 4 genes de la familia ZP en algunas especies del género *Mus*. Para ello, se realizó el análisis del ADNg en 25 especies pertenecientes a diferentes roedores de la subfamilia Murinae. Únicamente se detectaron codones de stop en la secuencia de ZP4 de 6 especies pertenecientes al subgénero *Mus* (*Mus caroli*, *Mus cypriacus*, *Mus macedonicus*, *Mus musculus*, *Mus spicilegus* y *Mus spretus*) mientras que no se observaban dichos codones de stop en el resto de especies analizadas pertenecientes a los otros subgéneros (Fig. 12).

Por tanto, los análisis realizados en la Tesis Doctoral de Izquierdo-Rico en 2009, muestran que la pseudogenización de ZP4 tuvo lugar recientemente en la evolución del género *Mus*. La divergencia de los 4

subgéneros del género *Mus* se produce hace 6-7 Ma (Lecompte *et al.*, 2008, Pagès *et al.*, 2012); dentro del subgénero *Mus* la primera rama divergente se calcula alrededor de 5 Ma (Pagès *et al.*, 2012), indicando que la pseudogenización de *ZP4* tuvo lugar hace 5-7 Ma.

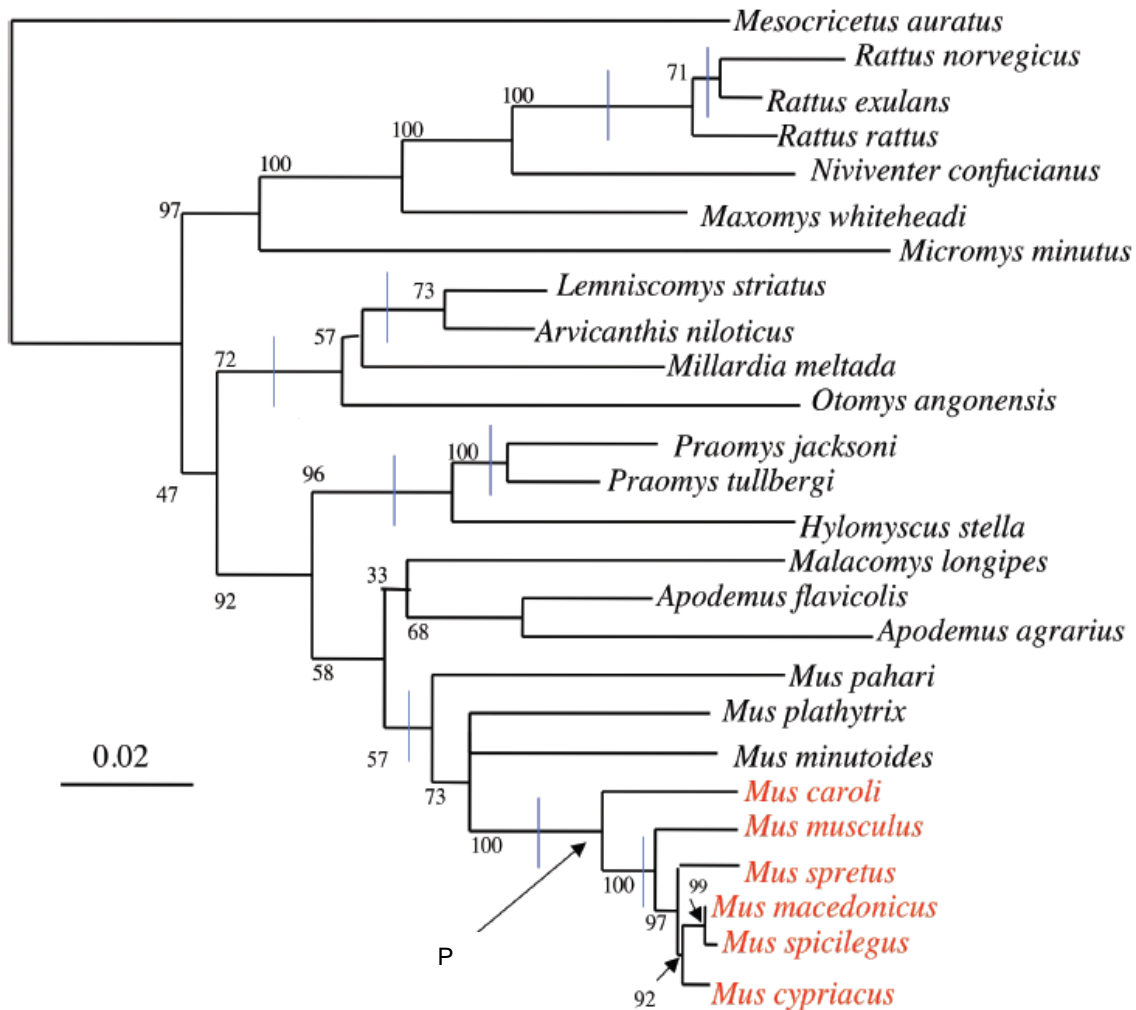


Figura 12. Filogenia molecular del gen *ZP4* en la subfamilia Murinae obtenida por el método de máxima verosimilitud. La escala indica el número de sustituciones por sitio. A nivel de cada rama se indica el valor de bootstrap (bp: porcentaje de bootstrap) del nodo al que se dirige la rama. Las especies en las cuales hemos observado un fenómeno de pseudogenización se encuentran coloreadas en rojo (todas ellas correspondientes al subgénero *Mus*, dentro del género *Mus*). Las barras verticales azules representan la presencia de indels (inserciones/delecciones) en los taxones situados a la derecha de cada barra. Se señala con una P el punto donde ha tenido lugar la pseudogenización (Modificado de la Tesis Doctoral de Izquierdo-Rico, 2009).

3.3 LA ZONA PELÚCIDA EN MARSUPIALES

3.3.1 Envolturas del ovocito en marsupiales

El ovocito de los marsupiales se encuentra rodeado por tres envolturas acelulares: la zona pelúcida (ZP), una capa mucosa y una capa externa de revestimiento. La ZP es secretada por el ovocito, mientras que la capa mucosa y la capa externa de revestimiento son secretadas por el tracto genital femenino. Además, en algunos marsupiales existe una matriz extracelular (MEC) (Selwood, 2000) (Fig. 13).

La MEC es secretada por el ovocito o por el embrión temprano y se ha descrito en especies como, el antequino de Stuart (*Antechinus stuartii*), el ratón marsupial de cara rayada (*Sminthopsis macroura*), el wallaby de Tammar (*Macropus eugenii*), la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*), la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*) y la zarigüeya de Virginia (*Didelphis virginiana*) (Talbot y Dicarlantonio, 1984; Selwood *et al.*, 1997; Frankenberg y Selwood, 1998; Kress y Selwood, 2003).

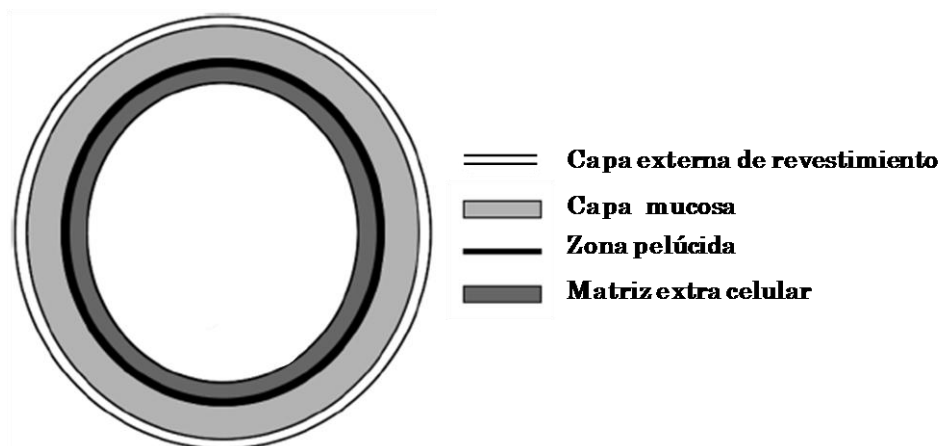


Figura 13. Representación de las envolturas del ovocito de la zarigüeya australiana (Modificado de Selwood, 2000).

La capa mucosa está relacionada con diferentes procesos como el bloqueo de la polispermia, la nutrición del embrión y proporciona un microambiente adecuado para el mismo (Selwood, 2000). La capa externa de revestimiento está relacionada con el mantenimiento de un ambiente adecuado para el embrión (Menkhorst *et al.*, 2009) y la matriz extracelular juega un papel importante en la formación del blastocisto (Selwood, 2000).

La composición y función de la ZP de marsupiales es menos conocida que la de euterios; sin embargo, se sabe que existen algunas diferencias entre euterios y metaterios. Por ejemplo, parece que la prevención de la polispermia en todos los marsupiales no se debe a la ZP, sino que puede deberse a la capa mucosa (Rodger y Bedford, 1982; Selwood, 2000; Breed *et al.*, 2002, Au *et al.*, 2008). Por otro lado, la ZP en los marsupiales parece participar en la adhesión entre la ZP y las células embrionarias, evitando la formación de la mórula; de modo que, en las primeras divisiones embrionarias, las blastómeras se unen a la ZP rodeándola por completo y dando lugar a un blastocisto unilaminar (Selwood, 1994; Frankenberg y Selwood, 1998; Selwood, 2000; Breed *et al.*, 2002, Au *et al.*, 2008; Frankenberg *et al.*, 2013). Además presenta características físicas diferentes, siendo más fácilmente solubilizada por proteasas (Rodger y Bedford, 1982; Bedford y Breed, 1994; Bedford, 2004).

Hay descritas alrededor de 300 especies de marsupiales (Wilson y Reeder, 2005) pero, únicamente el genoma de tres marsupiales está disponible en bases de datos como Ensembl y GenBank: el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisii*), el wallaby de Tammar (*Macropus eugenii*) y la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*).

En relación a la composición de la ZP, en marsupiales está formada por tres glicoproteínas: ZP2, ZP3 y ZP4 (McCartney y Mate, 1999; Selwood, 2000; Mate *et al.*; 2003), donde ZP1 no está presente, aunque debido a cierta confusión en la nomenclatura de las glicoproteínas, algunos autores se refieren a ZP4 como ZP1 (Haines *et al.*, 1999; Mate *et al.*, 2003).

En pocas especies los genes o proteínas han sido caracterizados. Por ejemplo, en la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*) el ADNc de tres glicoproteínas ha sido clonado y secuenciado: ZP2, ZP3 y ZP4 (Mate y McCartney, 1998; Voyle *et al.*, 1999; McCartney y Mate, 1999; Haines *et al.*, 1999; Mate *et al.*, 2003). En otras especies como el ratón marsupial de cola gruesa (*Sminthopsis crassicaudata*) (Voyle *et al.*, 1999) y el ratón marsupial de cara rayada (*Sminthopsis macroura*) (Au *et al.*, 2008) sólo se ha amplificado de forma parcial ZP2. Los números de acceso se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Números de acceso para las distintas secuencias de ZPs en marsupiales.

	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4
Ratón marsupial de cara rayada (<i>Sminthopsis macroura</i>)		EF093503		
Ratón marsupial de cola gruesa (<i>Sminthopsis crassicaudata</i>)		AF263015		
Zarigüeya australiana (<i>Trichosurus vulpecula</i>)		AF079525 AF263014	AF079524	AF263013

Sin embargo, a raíz de unos resultados muy recientes, parece que la ZP de marsupiales puede tener una composición y complejidad diferente a la descrita hasta la fecha en otros mamíferos. Así, el estudio realizado por Meslin y colaboradores en 2012, indica que existe una duplicación de ZP3 en la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*).

3.3.2 Filogenia de los marsupiales

Los marsupiales y mamíferos placentarios comparten un ancestro común datado hace unos 143-178 Ma (Warren *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2011).

Hay siete órdenes de marsupiales, cuatro australianos: Notoryctemorphia, Dasyuromorphia, Peramelemorphia y Diprotodontia y tres sudamericanos: Didelphimorphia, Paucituberculata y Microbiotheria. La divergencia entre los marsupiales australianos y sudamericanos se produjo hace unos 80 Ma (Beck, 2008; Meredith *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2014).

En los últimos años ha existido cierta controversia en la clasificación de algunas especies de marsupiales; por ejemplo, monito del monte (*Dromiciops gliroides*) perteneciente al orden Microbiotheria; esta especie fue reclasificada recientemente tras la realización de un estudio morfológico, que situaba a esta especie más próxima a los marsupiales australianos que a los sudamericanos a pesar de vivir en el continente Americano (Szalay, 1982); pasando del orden Didelphimorphia a formar un nuevo orden (Microbiotheria) dentro de la cohorte Australidelphia. Sin embargo, estudios recientes realizados por Nilsson *et al.*, en 2010 estudiando genes nucleares y retroposones, han identificado la posición correcta del orden Microbiotheria, contribuyendo de forma importante a la clasificación de los marsupiales (Fig. 14). Sin embargo, estos autores destacan que el estudio de otros marcadores podría ser interesante para clarificar la filogenia de algunas especies.

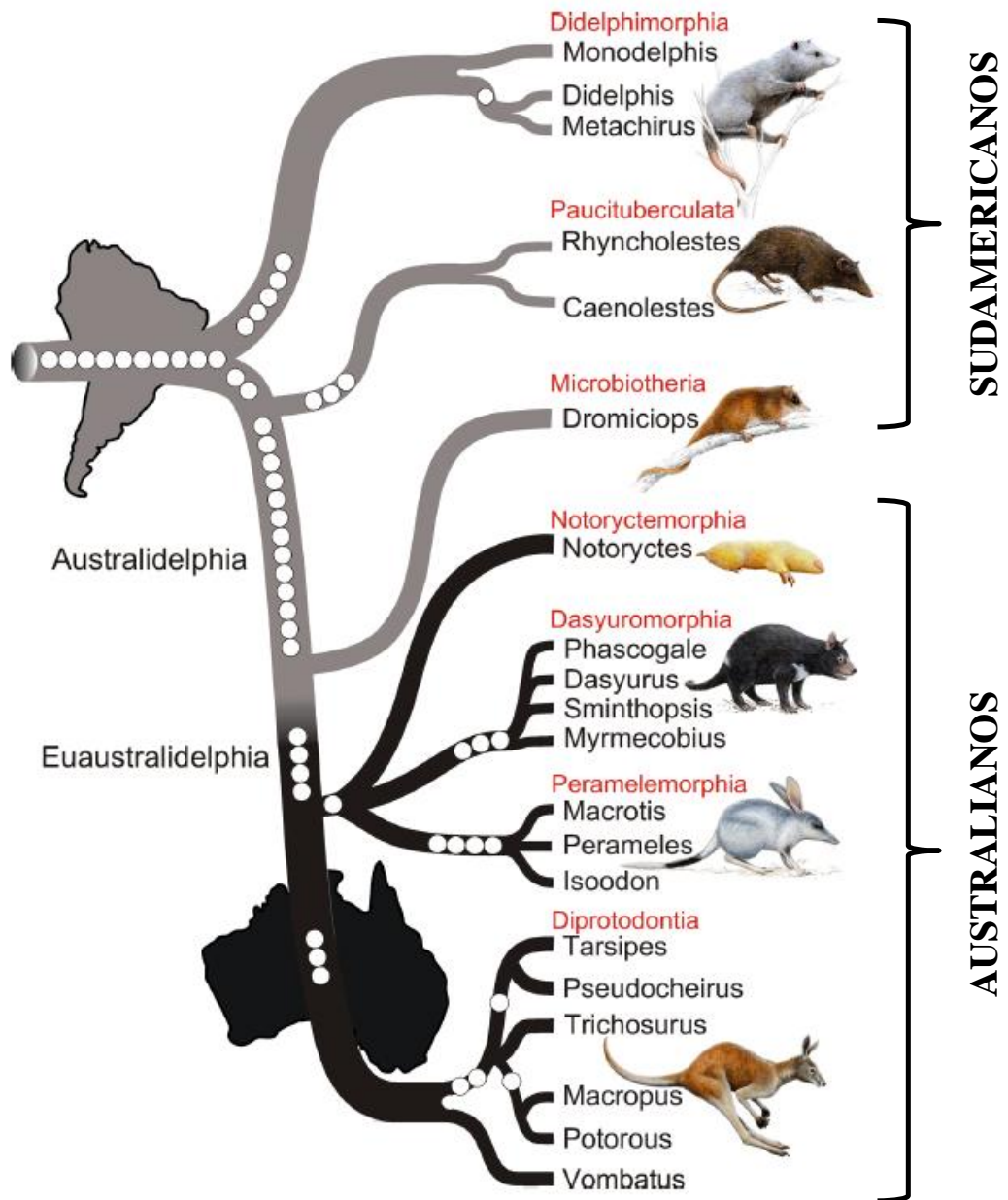


Figura 14. Árbol filogenético de los marsupiales derivado de datos de retroposones. La topología del árbol se basa en la presencia/ausencia de retroposones. Los nombres de los siete órdenes de marsupiales se muestran en rojo. Los iconos son representativos de cada orden: Didelphimorphia (zarigüeya de Virginia), Paucituberculata (musaraña marsupial), Microbiotheria (monito del monte), Notoryctemorphia (topo marsupial), Dasyuromorphia (demonio de Tasmania), Peramelemorphia (bilby), Diprotodontia (canguro). La inserción de retroposones es mostrada mediante un círculo negro. Las líneas grises señalan las especies sudamericanas y las líneas negras las especies australianas. La cohorte Australidelphia está indicada, así como el nuevo nombre propuesto (Euaustralidelphia) para los cuatro órdenes australianos “verdaderos” (Tomado de Nilsson *et al.*, 2010).

Pese a que el árbol presentado por Nilsson *et al.*, en 2010 es muy reciente, un nuevo árbol de marsupiales publicado este mismo año lo reemplazaría (Mitchell *et al.*, 2014). Para realizarlo se han empleado 101 genomas mitocondriales e información de 26 genes nucleares, que sumado a los datos publicados previamente por otros autores incluiría a 193 especies de marsupiales, frente a las 21 especies analizadas por Nilsson *et al.*, 2010. Este árbol mucho más robusto, viene a decirnos que la divergencia de los 4 órdenes australianos se produce en un estrecho periodo de tiempo hace unos 67-64 Ma, mientras que la divergencia entre los órdenes australianos y el orden Microbiotheria supera ligeramente este periodo en unos 2-5 Ma (Mitchell *et al.*, 2014).

3.4 LA ZONA PELÚCIDA EN CARNÍVOROS

Los carnívoros representan uno de los órdenes de mayor tamaño de los mamíferos, incluyendo desde la comadreja común (*Mustela nivalis*) con un peso de 35 a 250 gramos hasta los grandes carnívoros, como el elefante marino del sur (*Mirounga leonina*) que puede pesar de 2200 a 5000 kilogramos.

El árbol filogenético de carnívoros considerado válido hasta el momento (Wozencraft, 1993) incluía 273 especies, sin embargo el número de especies reconocidas ha aumentado a 286, debido a nuevas especies descubiertas y a cambios en su clasificación taxonómica (Nyakatura *et al.*, 2012) (Fig. 15). La cantidad de secuencias de ADN disponibles en el GenBank ha aumentado considerablemente en los últimos años, pasando de tener secuencias de 48 especies en 1996 a contener secuencias de 248 especies en 2007 (Nyakatura *et al.*, 2012). El genoma de varias especies de carnívoros se encuentra disponible, entre ellos: la foca de Wedell (*Leptonychotes weddellii*), el gato (*Felis catus*), el hurón doméstico (*Mustela putorius furo*), la morsa (*Odobenus rosmarus*), el oso panda (*Ailuropoda melanoleuca*), el oso polar (*Ursus maritimus*), el perro (*Canis lupus familiaris*) y el tigre (*Panthera tigris altaica*).

En relación a las glicoproteínas de la ZP; en el GenBank hay secuencias depositadas de cinco especies de carnívoros (Tabla 6):

El armiño (*Mustela erminea*): en la que han sido depositadas la secuencia parcial de ZP2 y las secuencias completas de ZP3 y ZP4 (Jackson y Beaton, 2004).

La gata (*Felis catus*): las secuencias de todas sus glicoproteínas han sido depositadas; ZP1 (Stetson *et al.*, 2013), ZP2 (Harris *et al.*, 1994; Jewgenow y

Fickel, 1999; Okazaki *et al.*, 2007; Eade *et al.*, 2009), ZP3 (Harris *et al.*, 1994, 1995; Okazaki y Sugimoto, 1995; Jewgenow y Fickel, 1999; Eade *et al.*, 2009) y ZP4 (Harris *et al.*, 1994; Jewgenow y Fickel, 1999; Eade *et al.*, 2009).

La hurona (*Mustela putorius furo*): únicamente ZP3 ha sido depositada (Jackson y Beaton, 2004).

La perra (*Canis lupus familiaris*): se han depositado las secuencias de ZP2 (Harris *et al.*, 1994; Okazaki *et al.*, 1995) y ZP3 (Harris *et al.*, 1994; Okazaki y Sugimoto, 1995) y ZP4 de manera parcial (Blackmore *et al.*, 2004; McLaughlin *et al.*, 2004).

La zorra (*Vulpes vulpes*): las secuencias de ZP2 y ZP3 están disponibles (Reubel *et al.*, 2005).

Tabla 6. Números de acceso para las distintas secuencias de ZPs de carnívoros depositadas por distintos autores.

	ZP1	ZP2	ZP3	ZP4
Armiño		AY779765	AY648050	AY779766
Gata	HQ702466	U05776 D45067 NM_001009875	U05778 NM_001009330 D45068	U05777 NM_001009260
Hurón			AY702973	
Perra		U05779 NM_001003304 D45069	U05780 NM_001003224 D45070	AY573930
Zorra		AY598031	AY598032	

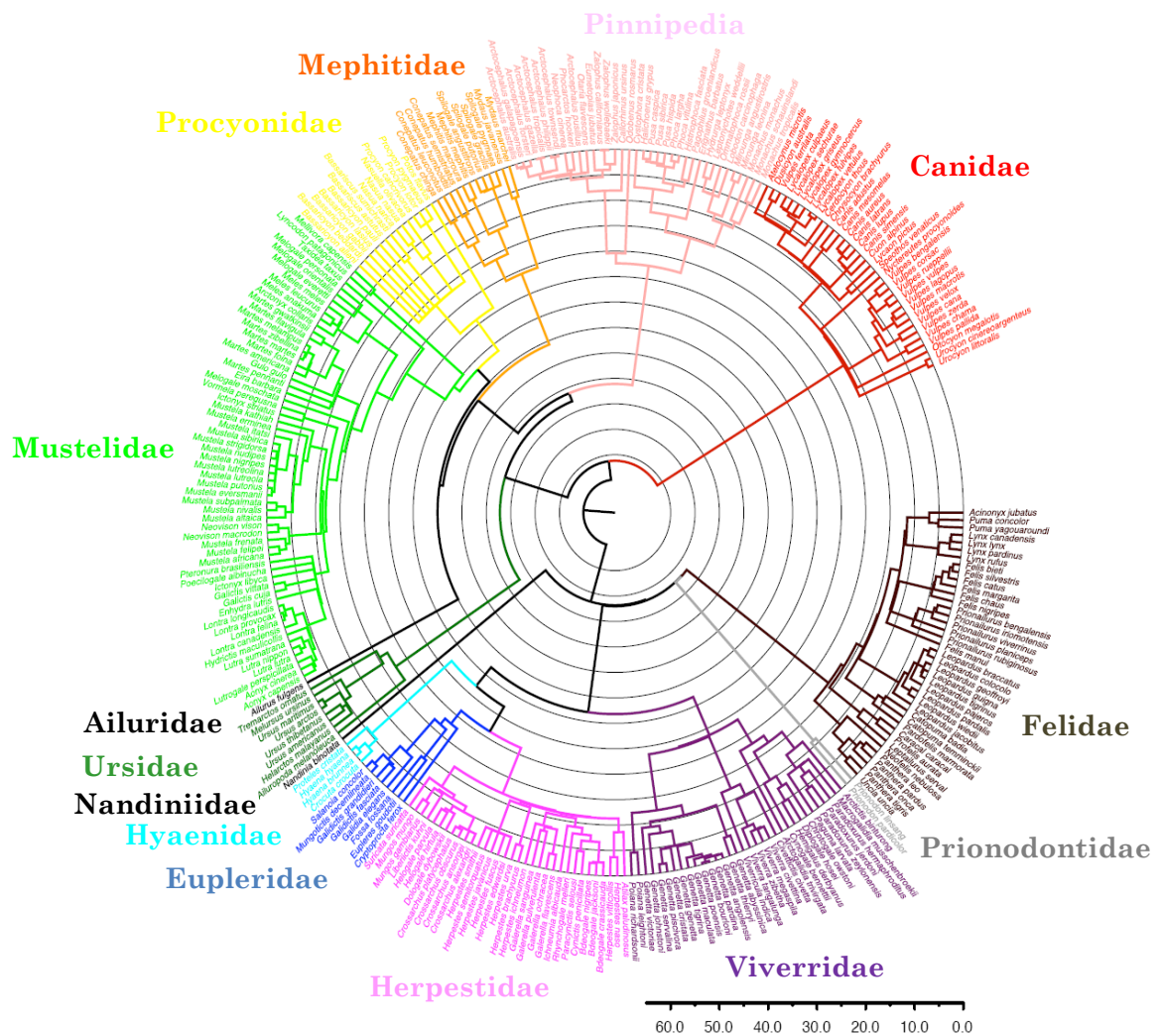


Figura 15. Árbol filogenético de los carnívoros. Los principales linajes mostrados de derecha a izquierda son: Canidae (rojo), Pinnipedia (rosa), Mephitidae (naranja), Procyonidae (amarillo), Mustelidae (verde claro), Ailuridae (negro), Ursidae (verde oscuro) Nandiniidae (negro), Hyaenidae (azul claro), Eupleridae (azul oscuro), Herpestidae (violeta), Viverridae (morado), Prionodontidae (gris) y Felidae (marrón). Los intervalos de tiempo están en unidades de 5 Ma (Modificado de Nyakatura *et al.*, 2012).

Por tanto, en la bibliografía disponible de carnívoros, podemos observar que existen dos modelos de composición de la ZP:

- 1) Carnívoros con 4 glicoproteínas en su ZP: ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4, como ha sido descrito en la gata (Stetson *et al.*, 2013).

2) Carnívoros con 3 glicoproteínas en su ZP: ZP2, ZP3 y ZP4, como el armiño y como se ha descrito en la perra, donde *ZP1* es un pseudogén (Goudet *et al.*, 2008).

Sin embargo, hasta hace poco se había considerado que la ZP de la gata estaba formada por tres glicoproteínas (ZP2, ZP3 y ZP4) (Harris *et al.*, 1994). En la perra, *ZP1* es un pseudogén (Goudet *et al.*, 2008) y debido a la proximidad filogenética de la gata y la perra se había asumido que posiblemente el gen *ZP1* también estaba pseudogenizado en la gata (Meslin *et al.*, 2012). Sin embargo, en 2013 nuestro grupo de investigación describió la presencia de *ZP1* en la gata tras realizar un análisis mediante técnicas de biología molecular y espectrometría de masas (MS/MS), detectándose péptidos de las 4 proteínas en los ovarios y ovocitos de gata (Stetson *et al.*, 2013).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

4.1.1 Ovarios

4.1.1.1 Ovarios de wallaby de Bennett.

Para realizar este estudio se obtuvieron ovarios de cinco hembras adultas de wallaby de Bennett (*Macropus rufogriseus*) procedentes del zoo de Whipsnade (Dunstable, Bedfordshire, Reino Unido). Los animales fueron sacrificados con el objetivo de estabilizar la población del zoo y su uso fue autorizado por el Presidente del Comité Ético de la Sociedad Zoológica de Londres.

Los ovarios se sumergieron en RNA later® (Sigma-Aldrich, EE.UU) para su transporte, evitando así la degradación del ARN y se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

4.1.1.2 Ovarios de ratona

Para este estudio hemos utilizado ovarios de ratonas adultas de diferentes especies:

- Ratón multimama del sur (*Mastomys coucha*), se adquirieron parejas de esta especie en Hobbyzoo (Pinto, Madrid). La especie fue verificada mediante amplificación por PCR y secuenciación del gen citocromo b en el Laboratorio de Biometría y Biología Evolutiva de la Universidad Claude Bernard de Lyon 1, Francia. Los animales se mantuvieron en el Servicio de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (Madrid, España).

- Ratón de Matthey (*Mus mattheyi* (subgénero *Nannomys*)), cedidos por el Dr. Frédéric Veyrunes del Instituto de Ciencias de la Evolución de Montpellier, Universidad de Montpellier 2, Francia.

- Ratón común (*Mus musculus*), cepa C57 procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia.

- Musaraña de Gairdner (*Mus pahari* (subgénero *Coelomys*)) procedentes de la plataforma "Conservatoire Génétique de Souris Sauvages" del Instituto de Ciencias de la Evolución de Montpellier, Universidad de Montpellier 2, Francia.

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de CO₂, a continuación se realizó una incisión abdominal, se expuso el aparato reproductor y se realizó la disección de los ovarios. Los ovarios se mantuvieron en RNA later[®] (Sigma-Aldrich, EE.UU) a -80 °C hasta su utilización.

4.1.1.3 Ovarios de hurona

Los ovarios de hurona (*Mustela putorius furo*) empleados en este estudio proceden de dos hembras que fueron sometidas a ovariectomía. Tras la obtención de los mismos, los ovarios se sumergieron en ARN later[®] (Sigma-Aldrich, EE.UU) y se congelaron a -80 °C.

4.1.1.4 Ovarios de zorra

Los ovarios de las dos zorras (*Vulpes vulpes*) usados en este estudio fueron donados por el Dr. Franck Boué, jefe de la Unidad de Patología de Animales Salvajes del Laboratorio de la Rabia y de la Fauna Salvaje de Nancy, Francia. Fueron sumergidos en RNA later[®] (Sigma-Aldrich, EE.UU)

para el transporte de los mismos y se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

4.1.1.5 Ovarios de perra

Los ovarios de las dos perras (*Canis lupus familiaris*) empleados en esta Tesis Doctoral fueron donados por José Navarro Hernández, Olalla Manzanera Díaz y Celina Alves García, veterinarios de la Clínica Veterinaria La Alcayna (Murcia, España). Los ovarios procedían de perras sometidas a una ovariectomía. Tras la obtención de los mismos se sumergieron en RNA later[®] (Sigma-Aldrich, EE.UU) para el transporte y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

4.1.2 Ovocitos

4.1.2.1 Ovocitos de ratona

Se obtuvieron ovocitos de ratonas de diferentes especies: *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi*, *Mus musculus* y *Mus pahari*. Para ello, los animales fueron superovulados. La foliculogénesis fue estimulada mediante una inyección intraperitoneal de gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG) (Sigma-Aldrich, EE.UU) y la ovulación inducida 48 horas después mediante inyección intraperitoneal de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Veterin Corion[®], Divasa, España). Las UI utilizadas se indican en la Tabla 7.

Los animales se sacrificaron 16 horas después de la inyección de hCG por dislocación cervical. A continuación, se realizó una incisión abdominal y se obtuvieron los oviductos, se rasgó la ampolla oviductal y se obtuvieron los complejos cúmulo ovocito (CCOs) en una gota de tampón fosfato salino (PBS), donde fueron decumulados con hialuronidasa al 0.5% (Sigma-Aldrich, EE.UU).

Tabla 7. Hormonas empleadas en la estimulación de la foliculogénesis e inducción de la ovulación en los diferentes roedores. Se indican las UI de gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG) y de gonadotropina coriónica humana (hCG) empleadas en los distintos roedores.

Especie	PMSG (UI)	hCG (UI)
<i>Mastomys coucha</i>	15	15
<i>Mus mattheyi</i>	5	10
<i>Mus musculus</i>	5	5
<i>Mus pahari</i>	5	5

4.2 OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

4.2.1 Obtención de ARN total de ovarios

Se obtuvo el ARN total de ovarios de distintas especies utilizando el RNAqueus® Total RNA Isolation Kit (Ambion, EE.UU) según las recomendaciones del fabricante. El número de ovarios empleado para cada una de las especies se expone a continuación:

- Wallaby de Bennett (*Macropus rufogriseus*): se emplearon los ovarios de 5 hembras de wallaby de Bennett.

- *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*: se utilizaron los ovarios de 4 ratonas de la especie *Mastomys coucha*, 3 ratonas de la especie *Mus mattheyi* y 9 ratonas de la especie *Mus pahari*.

- Hurona (*Mustela putorius furo*): se obtuvo el ARN total de ovarios de 2 huronas.

- Zorra (*Vulpes vulpes*): Se obtuvo el ARN total de ovarios procedentes de 2 zorras.

- Perra (*Canis lupus familiaris*): Se obtuvo el ARN total de ovarios procedentes de 2 perras.

El proceso se describe de forma resumida a continuación. En primer lugar, el tejido fue disgregado y homogeneizado en una solución de tiocianato de guanidinio; potente agente caotrópico que lisa las células e inactiva las ribonucleasas endógenas. El lisado es transferido a una columna con una membrana tras haber sido diluido en una solución de etanol para permitir la unión del ARN a la membrana. Las proteínas, ADN y otros contaminantes son eliminados del lisado mediante tres lavados y el ARN es obtenido en un último paso.

4.2.2 Síntesis *in vitro* de ADN complementario

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

La cantidad de ARN total de partida osciló entre 1 pg-5 µg. Brevemente, el procedimiento consistió en la desnaturalización del ARN molde, durante 5 min a 65 °C y en presencia de oligo (dT)₁₂₋₁₈ y dNTPs (desoxirribonucleótidos-trifosfato). La muestra se enfrió durante un minuto en hielo y se añadió el volumen necesario de tampón, DTT (ditiotreitól), RNase OUT (inhibidor de las RNasas), MgCl₂ y enzima retrotranscriptasa (a las concentraciones recomendadas por el fabricante) hasta completar 20 µl. La síntesis de ADNc tuvo lugar a 50 °C durante 50 min, y se terminó incubando las muestras a

85 °C durante 5 min para desnaturalizar la enzima. Para hidrolizar el ARN molde se utilizó RNasa H y se incubó a 37 °C durante 20 min.

4.2.3 Obtención de ADN genómico de tejidos de marsupiales

Para la obtención de ADN genómico (ADNg), las muestras de partida fueron tejido conservado en etanol al 95% o sangre con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Por un lado, se obtuvo el ADNg de un marsupial perteneciente al orden Didelphimorphia: la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*). La muestra fue donada por la Dra. Pascale Chevret del Laboratorio de Biometría y Biología Evolutiva de la Universidad Claude Bernard de Lyon 1 (Lyon, Francia).

El procedimiento se llevó a cabo mediante el uso del kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania). De forma abreviada, el proceso es el siguiente. En primer lugar los tejidos se disgregaron mecánicamente y se sumergieron en un tampón de lisis junto con proteinasa K (40 mAU/mg) durante toda la noche en un incubador orbital a 56 °C. La solución obtenida se transfirió a una columna con membrana tras haber sido mezclada con etanol para favorecer la unión del ADN a la misma; mientras que, las proteínas y otros contaminantes se eliminan mediante dos lavados. El ADN ADNg unido a la membrana se obtiene en un último paso de elución.

Por otro lado, se obtuvo ADNg a partir de sangre de 2 koalas (*Phascolarctos cinereus*). Las muestras fueron donadas por Eva Martínez Nevado veterinaria del Zoo de Madrid. La sangre se extrajo en un tubo con EDTA y fue enviada refrigerada a nuestro laboratorio. Una vez recibida se obtuvo el ADNg mediante el uso del kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemania). El protocolo es similar al descrito anteriormente, a excepción de

que se utilizan 200 µl de sangre y la incubación con el tampón de lisis y proteinasa K a 56 °C se realiza sólo durante 10 minutos.

4.2.4 Obtención de ADN genómico de tejido de zorra

Se obtuvo ADNg de ovarios procedentes de 2 zorras. La obtención del mismo se realizó como se ha explicado anteriormente (apartado 4.2.3).

4.2.5 Obtención de ADN genómico de tejido de perra

Se obtuvo ADNg de ovarios procedentes de 2 perras. La obtención del mismo se realizó como se ha explicado en el apartado 4.2.3.

4.3 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA ZONA PELÚCIDA MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.3.1 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADNc de ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c y ZP4 del wallaby de Bennett

Para detectar y analizar los distintos ARNm de la ZP del wallaby de Bennet (*Macropus rufogriseus*) se realizaron amplificaciones por PCR utilizando como molde el ADNc obtenido. Los cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias de ADNc de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 del wallaby de Tammar (*Macropus eugenii*) presentes en el Ensembl, siendo los códigos de acceso los siguientes: ENSMEUT00000000742 para ZP1, ENSMEUT00000013237 para ZP2, ENSMEUT00000000436 para ZP3 y ENSMEUT00000012954 para ZP4. Además, también se diseñaron cebadores para las copias de ZP3 a partir de las secuencias del wallaby de

Tammar. Como control positivo, se emplearon cebadores diseñados a partir de la secuencia de glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) de *Macropus eugenii* con código de acceso EF654515. En algunos casos se emplearon cebadores degenerados; es decir una mezcla de cebadores, donde cada cebador presenta una secuencia nucleotídica básica común pero que difiere en ciertas posiciones (Tabla 8).

Tabla 8. Cebadores utilizados para la amplificación del ADNc de ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c y ZP4 del wallaby de Bennett. 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)
ZP1			
ZP1wallabyRV1	20 (r)	ACATGGAACCTTTCTGTGGT	58
ZP1wallabyFW2	19 (d)	GAAACAGTGCCAGGTCACC	60
ZP1wallabyRV2	20 (r)	ATTCGCAGCTCAAGATGCAA	58
ZP1wallabyFW3	19 (d)	CATCTACAATGCAAGCAGC	56
ZP1wallabyRV3	19 (r)	CCTGCAAGTCTCTGTCTCA	58
ZP1wallabyFW4	19 (d)	TCAATGAGCTGGGGAACCT	58
ZP1wallabyRV4	22 (r)	TCTTCATCACATGACAACCATT	60
ZP1wallabyFW5	19 (d)	CCACCATCTTCTCTGCAGG	60
ZP1wallabyRV6	20 (r)	TGGCAGGAACACCTCTAGAT	60
ZP1wallabyFW7	20 (d)	TATCACTCGGGAAAGCACCT	60
ZP1wallabyRV7	22 (r)	CAATGAAACGCTGATAATGAGT	60
ZP1wallabyFW8	20 (d)	TTACAAGACCCAGCTCGCAT	60
ZP1wallabyRV8	21 (r)	CCACAATATCTTGACTCCTT	60
ZP1wallabyRV9	18 (r)	CTTTGCCACACTCCCTG	58
ZP1wallabyRV10	20 (r)	TTATTGGCTTTGCCACACT	58
ZP2			
ZP2wallabyFW1	20 (d)	GATGACGAAATGAAGATTGG	56
ZP2wallabyRV1	20 (r)	TCTACAGCAATGCCACTGAT	58

ZP2wallabyRV2	20 (r)	GCTGGTATAGTAGCATCTCA	58
ZP2wallabyFW3	20 (d)	ACGAAATCCATGCTCTTTGG	56
ZP2wallabyRV4	20 (r)	AGATGATCCAGGACAAGTCA	58
60-ZP2wallabyRV5	18 (r)	GGAGAAGGAGGACTGCTG	60
61-ZP2wallabyRV6	22 (r)	CTTTTCATCCTAGATGATCCAG	60
84-ZP2wallabyFW	21 (d)	CTCAGTAGTTTGTGCTGTG	60
86-ZP2wallabyRV	21 (r)	GCAGCTCATTTGTAACTCAC	58
ZP3-a			
49-ZP3-3wallabyF1	19 (d)	ATGACACTGGGAGCTAGGC	60
50-ZP3-3wallabyR1	20 (r)	CCTGAATGTGGATCAAGTCC	60
51-ZP3-3wallabyF2	19 (d)	GACAATGTGAGCAGCAGAG	58
52-ZP3-3wallabyR2	20 (r)	CAGGTACAGATGTCACTAGG	60
56-ZP3-3wallabyF3	20 (d)	CGTCTGTTCTCCTACTATGG	60
57-ZP3-3wallabyR3	19 (r)	GCAGCGATCAACAAAGAGC	58
58-ZP3-3wallabyR4	20 (r)	CTAGACATTCCTGGAGCAAG	60
ZP3-b			
45-ZP3-2wallabyF1	19 (d)	GTGACCACAGACTTGCTGG	60
47-ZP3-2wallabyF2	20 (d)	GTCTAGTTGATGGTCAGTCA	58
48-ZP3-2wallabyR2	21 (r)	CATATCTTCCCATGTGAGTAG	60
54-ZP3-2wallabyF3	20 (d)	CAACTGATGACTGATGACTG	58
55-ZP3-2wallabyR3	19 (r)	GTCCAACCTACCACATCAGC	58
81-ZP3-2wallabyF4	20 (d)	ATGGGGCAARGAGGTCWART*	58-62
82-ZP3-2wallabyR4	21 (r)	GCATCAACTATAAACTGAAGG	58
83-ZP3-2wallabyR5	20 (r)	TGACTGACCATCAACTAGAC	58
88-ZP3-2wallabyR4	21 (r)	CTATAAACCCAGCAAGTCTGTG	58
ZP3-c			
ZP3wallabyFW1	20 (d)	ATGGTAGTCAGTGTTCAAAG	56
ZP3wallabyRV1	20 (r)	CACTGTGAATTGGAGAGTAT	56
62-ZP3wallabyFW2	19 (d)	CCTGATGAATGATGACTGG	56
63-ZP3wallabyRV2	21 (r)	CAGTTTCCGAGAATCATTGAC	58
78-ZP3wallabyF3	19 (d)	ATGGCTGAGGGAGGCTGTT	60
79-ZP3wallabyR3	20 (r)	TAGAGCCATGATGACTAAGG	58
89-ZP3wallabyRV6	20 (r)	CTTTGAACACTGACTACCAT	56
ZP4			
ZP4wallabyFW1	20 (d)	ATGCTGTGGATTTTCTTTCT	54

ZP4wallabyRV1	20 (r)	GTAGCAAGGATTTACTTCAT	54
ZP4wallabyFW2	19 (d)	ATCACTAAAGGAGACTGTG	54
ZP4wallabyRV2	20 (r)	GAATGCAAAGGATTGGTATT	54
ZP4wallabyFW3	19 (d)	TCGAATCCTACGAAGAACA	54
ZP4wallabyRV3	19 (r)	CTCAGTGCTAGGAAGGATA	56
ZP4wallabyRV4	20 (r)	TTCTGTAGTGAGTGTAGCAT	56
ZP4wallabyFW5	19 (d)	ACTCTGGCATATCTTGTCT	54
ZP4wallabyRV5	21 (r)	TTATTTTCAGTTTTRCTCAGTGC	56-58
ZP4wallabyRV6	20 (r)	TTATTTTCAGTTTCTCAGTGC	54
GAPDH			
GAPDHwallabyFW1	19 (d)	ATGCCCAATGTTCGTGAT	56
GAPDHwallabyRV1	20 (r)	ACAACAGATACATTGGGAGT	56
*R=A+G * W=A+T			

Las condiciones empleadas para las amplificaciones por PCR a partir de ADNc fueron las mismas para todos los casos: 2 µl del ADNc, 2.5 µl de cada cebador (10 µM), MgCl₂ 2 mM, 1 µl de cada dNTP (10 mM) y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific, EE.UU), en un volumen final de 50 µl. Los cebadores necesarios para realizar todas las amplificaciones por PCR de este trabajo fueron sintetizados por Sigma-Aldrich (EE.UU).

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en el termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania). En todos los casos, se aplicó una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, el programa de amplificación consistió en 30 ciclos y, una vez completados, una extensión final de 10 min a 72 °C. Cada uno de los 30 ciclos constó de tres pasos (Tabla 9):

1) Desnaturalización: se realizó durante 1 minuto a 95 °C.

2) Hibridación de los cebadores con el molde: 1 min a la temperatura de fusión o temperatura de melting (T_m). La T_m se calculó para cada oligonucleótido empleando la fórmula: T_m (°C) = 2(A+T) + 4(C+G). Se eligió

la menor de las dos temperaturas calculadas para cada reacción de amplificación. En la medida de lo posible se emplearon cebadores con una T_m similar.

3) Extensión de la cadena naciente: 1 min a 72 °C.

Tabla 9. Condiciones del termociclador usando la enzima Taq DNA polymerase (Thermo Scientific). Se muestran los distintos pasos realizados, con el número de ciclos, la temperatura y el tiempo.

Pasos	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	1	95	3
Desnaturalización		95	1
Alineamiento	30	T_m	1
Extensión		72	1
Extensión final	1	72	10

Cuando los resultados de la amplificación no fueron óptimos con la polimerasa anterior, se emplearon otras ADN polimerasas: la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, EE.UU), siguiendo el protocolo mostrado en la Tabla 10 y la enzima Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, EE.UU), cuyo protocolo se muestra en la Tabla 11.

Tabla 10. Condiciones del termociclador usando la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, EE.UU). Se muestran los distintos pasos realizados, con el número de ciclos, la temperatura y el tiempo.

Pasos	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg/min)
Desnaturalización inicial	1	98	30 s
Desnaturalización		98	10 s
Alineamiento	35	T _m	30 s
Extensión		72	15 s
Extensión final	1	72	10 m

Tabla 11. Condiciones del termociclador usando la enzima Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, EE.UU). Se muestran los distintos pasos realizados, con el número de ciclos, la temperatura y el tiempo.

Pasos	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización		94	1
Alineamiento	30	T _m	2
Extensión		72	3

4.3.2 Amplificación mediante PCR de los exones 1 y 2 de ZP4 de marsupiales

Para amplificar el extremo 5' de ZP4 (exones 1 y 2) de la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*), los cebadores utilizados se diseñaron a partir de la secuencia del gen *ZP4* de la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*) (Tabla 12).

Tabla 12. Cebadores utilizados para la amplificación del extremo 5' del gen ZP4 en la zarigüeya común. 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)
92-ZP4monodelphisF3	19 (d)	GTACAGTGCCCATGTCAAA	56
93-ZP4monodelphisF4	19 (d)	GAAGTTTGAAGAGTGAGGA	56
ZP4monodelphisF1	22 (d)	AAGCTGTGGATTTTATTTCTTA	56
ZP4monodelphisR1	19 (r)	CTTCAAGCTGAATGGACTC	56
ZP4monodelphisR2	20 (r)	CATTTGGTAACATAACATCC	54

Por último, para amplificar el extremo 5' del gen ZP4 (exones 1 y 2) del koala (*Phascolarctos cinereus*), los cebadores utilizados se diseñaron a partir de la secuencia putativa de ZP4 de un marsupial que se encuentra más próximo filogenéticamente que la zarigüeya de cola corta; el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisii*) que se encuentra depositada en el GenBank con número de acceso XM_003767794 (Tabla 13).

Tabla 13. Cebadores utilizados para la amplificación del extremo 5' del gen ZP4 en el koala. 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)
ZP4sarcophilusF1	22 (d)	AAATGCTGTGGCTTTTACTTTT	58
ZP4sarcophilusR1	19 (r)	GGTGATCCAAGTCCCACAG	60
ZP4sarcophilusF2	22 (d)	AAATGCTGTGGMTTTTMCTTYT*	56-62
ZP4sarcophilusR2	20 (r)	CATCCAGAATAGGAAGCTTC	58
		*M=A+C *Y=C+T	

La cantidad de ADN_g utilizado en la amplificación por PCR osciló entre los 100-500 ng. Las condiciones y los protocolos empleados en la amplificación por PCR han sido explicados en el apartado 4.3.1.

4.3.3 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADN_c de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de roedores

Para amplificar regiones de interés del ADN_c de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de los diferentes roedores de la subfamilia Murinae (*Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*), tomamos como molde el ADN_c obtenido y utilizamos cebadores diseñados a partir de las secuencias de ZP1, ZP2 y ZP3 de *Mus musculus* con números de acceso NM_009580, NM_011775, y NM_011776 para ZP1, ZP2 y ZP3 respectivamente. Para ZP4, se diseñaron cebadores específicos según secuencias conservadas en ZP4 de *Mus musculus* (NR_027813) y *Rattus norvegicus* (NM_172330) (Tabla 14).

Tabla 14. Cebadores utilizados para amplificar regiones de interés de ADN_c de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*. 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 (T_m) (última columna).

Nombre	Pb (d/r)	Secuencia	T _m (°C)
ZP1			
ZP1musRV0	21 (r)	AGTCATAGCTGTATTCAAAGC	58
ZP1nannomyFW2	19 (d)	ATCATGGCCTGGGGTTGTT	58
ZP1nannomyRV2	20 (r)	TCCATGTGTCAAGGCTGTTT	58
ZP1nannomyFW3	20 (d)	AGAAGACAAGTGCTTTTGTG	56
ZP1nannomyRV3	18 (r)	GGCCAGATCAGACCCAC	60
ZP1nannomyFW4	20 (d)	GTGGCTACTTTACCTTGGTC	60
ZP1nannomyRV4	20 (r)	TAGATGAGTTGTTCCGCCGAC	60

ZP1pahariFW5	19 (d)	GACATTGTGAGCTCTCCAG	58
ZP1nannomyRV5	21 (r)	TTTAATATCTGATGCCTTCCC	58
ZP1musFW6	19 (d)	ACTCCAGCTCAAGAATGCT	56
ZP2			
FW1ZP2MUS	20 (d)	CTTTGAGGTCTACAGCCACC	62
RV1ZP2MUS	20 (r)	TGTAAGGCCGTTGGTAGGAT	60
FW2ZP2MUS	20 (d)	GCCAGCCAATCTACATGGAA	60
RV2ZP2MUS	20 (r)	GGCAAGTCACAGAGCACAGA	62
ZP3			
FW1ZP3MUS	19 (d)	ACCTCACCTTGGCTCAGA	60
RV1ZP3MUS	19 (r)	ACCTCACCTTGGCTCAGA	58
FW2ZP3MUS	21 (d)	TACATCACCTGCCATCTCAA	60
RV2ZP3MUS	19 (r)	CAGGGTCAGGAATGCCACT	60
ZP4			
ZP4RNA-F2	22 (d)	GCTAGGCTAGTGAAGGAGAAAG	66
ZP4RNA-R1	23 (r)	TGCAGTCAGTTTTATTGAGACTC	64
ZP4RNA-F3	20 (d)	GCTTAAGTGTCCCTTTGGATC	58
ZP4RNA-R2	19 (r)	GAGCCCCAATGCTTTCTAC	58
ZP4RNA-R3	21 (r)	GGGATTCATCTCAATTTTCTG	58
ZP4coelomyFW1	20 (d)	TATCAGACCAAAAAGGATCCC	58
ZP4coelomyRV1	23 (r)	NNNATTCATCTCAATTTTCTGAT*	56-62
ZP4nannomyRV2	21 (r)	NNNTCATCTCWRTTTYCTGRT*	56-62
*N=A+C+G+T *W=A+T *R=A+G *Y=C+T			

4.3.4 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADNc de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de hurona

Se amplificaron regiones parciales del ADNc de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de hurona. Los cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias de ADNc de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de hurona presentes en el GenBank, siendo los códigos de acceso los siguientes: XM_004822649 para ZP1, XM_004827330 para ZP2, XM_004822868 para ZP3 y XM_004818356 para ZP4. Como control positivo se emplearon cebadores diseñados a partir de la

secuencia de β -actina, cuyo número de acceso es: AF038150 (Tabla 15). Las condiciones y los protocolos empleados en la amplificación por PCR han sido ya descritos en el apartado 4.3.1.

Tabla 15. Cebadores utilizados para amplificar regiones de interés de ADNc de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de hurona. 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' \rightarrow 3' (tercera columna) y la temperatura de fusión o de melting del cebador (T_m) (última columna).

Nombre	Pb (d/r)	Secuencia	T_m (°C)
ZP1			
ZP1 MUSTELA FW2	20 (d)	CGCCAAAGATGAGACTTTCC	60
ZP1 MUSTELA FW2	20 (r)	AGGACACCCTTCAGACAGAA	60
ZP2			
ZP2 MUSTELA FW2	20 (d)	ACCGGAGTTTCCTTGGAAGT	60
ZP2 MUSTELA FW2	20 (r)	CACGTTTGAAGGTGAAGGTC	60
ZP3			
ZP3 MUSTELA FW2	19 (d)	TGGAGGATGTGGTCAGGT T	58
ZP3 MUSTELA RV2	19 (r)	GAGGGAGAAAACCAGCTT C	58
ZP4			
ZP4 MUSTELA FW2	19 (d)	TGTTCCCTCCAGCACTGTTG	58
ZP4 MUSTELA FW2	19 (r)	AACGCTGGTAGTGAGATGG	58
β-actina			
β -Actina Mustela FW	19 (d)	ACACTGTGCCCATCTACGA	58
β -Actina Mustela RV	19 (r)	TTGCCGATGGTGATGACCT	58

4.3.5 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADNc de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de zorra. Amplificación mediante PCR de regiones de interés del gen *ZP1* de zorra

Para amplificar regiones de interés del ADNc de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de la zorra, se empleó como molde el ADNc obtenido a partir de ovarios de zorra. Los cebadores para ZP2 y ZP3 fueron diseñados a partir de las secuencias de ZP2 y ZP3 de zorra depositadas en el GenBank con número de acceso AY598031 y AY598032 respectivamente. Para amplificar ZP1 y ZP4 se diseñaron cebadores a partir de la secuencia de perra con número de acceso NC_006600 y XM_536329 respectivamente (Tabla 16). Como control de la eficacia de los cebadores usados en la amplificación del ADNc de ZP1 de zorra, se realizaron amplificaciones empleando ADNg de la misma especie. En estos casos, la cantidad de ADNg utilizada fue de 100 ng. Las condiciones y los protocolos empleados en la amplificación por PCR han sido explicados en el apartado 4.3.1.

Tabla 16. Cebadores utilizados para la amplificación de regiones de interés de ADNc y/o ADNg de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de zorra. 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)
ZP1			
21-ZP1perraF1	20 (d)	TTTGTCTAAACCTGGCCAC	60
22-ZP1perraR1	19 (r)	GTGGGGTAGCTTGTCACC	60
94-ZP1perroF4	19 (d)	GCTTCACCTGTGCTGCATC	60
94-ZP1perroR4	19 (r)	GTTTCTCCGTCTCCTGAG	60
ZP2			
ZP2vulpesF1	20 (d)	CTCAGTGTCCAAGTGTCATT	58

ZP2vulpesR1	19 (r)	GCTGTAGACCTTGACATCC	58
ZP3			
ZP3vulpesF1	19 (d)	GGTCCAGAGAACTGTGAGC	60
ZP3vulpesR1	19 (r)	CGATCTGGTATCAGCGTGG	60
ZP3vulpesF2	20 (d)	GTGGATGGTCTCTACAATGC	60
ZP3vulpesR2	19 (r)	GCAGTGCTATGTCTCTTGG	58
ZP4			
ZP4carnívorosF0	17 (d)	ATGCGGCAGCTGCAGAT	54
ZP4carnívorosR1	19 (r)	AGGTCACTGTGTTCCATA	54
ZP4carnívorosF4	19 (d)	GTGTTCCCTCACCCATCAC	58
ZP4carnívorosR2	19 (r)	AACCATGGCTCCAAGTTCT	56
ZP4carnívoro F3	19 (d)	GACCAGGCAGTATATGAAA	54
ZP4carnívorosR4	20 (r)	CTATTTCTGATAGCTAAGT	54
GAPDH			
GAPDHcanislupus F1	19 (d)	GATGCTGGTGCTGAGTATG	58
GAPDHcanislupus R1	19 (r)	CAGAAGGAGCAGAGATGAT	56

4.3.6 Amplificación mediante PCR de regiones de interés de ADNc y ADNg de *ZP1* de perra

Con el objetivo de comprobar los resultados obtenidos en la amplificación del gen *ZP1* en la zorra, se realizó el mismo ensayo en la perra. Los cebadores y las condiciones empleadas para las amplificaciones por PCR fueron idénticas a las realizados en la zorra.

4.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para poder visualizar el resultado de las amplificaciones por PCR, se realizaron electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se tomaron 4 µl de cada reacción, y se añadió tampón de carga de muestras de ADN (Fermentas, EE.UU). La mezcla se aplicó en geles de agarosa (Sigma-Aldrich, EE.UU) a una concentración de 1.5%. La electroforesis se llevó a cabo en tampón de recorrido Tris-Acetato-EDTA (TAE) (Sigma-Aldrich, EE.UU) a 90 V, a temperatura ambiente y en soporte horizontal.

El resultado se visualizó mediante tinción del gel en un baño de 2 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, EE.UU). Cuando el resultado de la PCR fue un solo amplicón del peso esperado, el volumen restante de la PCR se purificó directamente mediante el uso del kit DNA Clean & Concentrator™-5® (Zymo Research, EE.UU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando se obtuvieron varias bandas en la amplificación por PCR, la banda con el peso esperado se purificó del gel de agarosa, para ello el resto del volumen conteniendo el producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa y la banda de interés se recortó y purificó con el kit QIAquick® Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen, Alemania) según las instrucciones del proveedor.

4.5 SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS.

La identidad de todos los productos amplificados fue verificada por secuenciación automática completa de ambas cadenas en el Laboratorio de Biología Molecular (CAID) de la Universidad de Murcia.

Las secuencias obtenidas se analizaron para determinar su homología con otras secuencias conocidas usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Los alineamientos múltiples se llevaron a cabo con el programa Clustal Omega (Sievers y Higgins, 2014) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Las secuencias de aminoácidos fueron deducidas de la secuencias de nucleótidos usando el programa "Translate" disponible en (<http://web.expasy.org/translate/>). El programa Smart Genome (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) se utilizó para determinar el péptido señal y los dominios proteicos cuando se analizaron secuencias aminoacídicas. Los programas NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>) (Hansen *et al.*, 1998) y NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) (Gupta y Brunak, 2002) se utilizaron para la predicción de sitios potenciales de N- y O-glicosilación. El peso molecular teórico de la proteína así como el peso molecular de la proteína madura fueron calculados con la herramienta PeptideMass de ExPASy (http://web.expasy.org/peptide_mass/).

4.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES DE LA FAMILIA ZP

Para estudiar la historia evolutiva los genes de la familia ZP es necesario construir árboles filogenéticos. La construcción de un árbol se efectúa en cuatro etapas:

- 1) Alineamiento múltiple de las secuencias empleando MUSCLE a través del programa SEAVIEW (Gouy *et al.*, 2010). Los alineamientos son modificados manualmente cuando es necesario.

2) Elección del modelo de evolución. Con el fin de corregir la diferencia entre el número de sustituciones observadas y el número de sustituciones reales, son propuestos diferentes modelos de evolución. Todos los sitios de un alineamiento no evolucionan a la misma velocidad; esta heterogeneidad en el ritmo o tasa de sustitución puede ser incorporada en el modelo de evolución. Para determinar el modelo de evolución y los parámetros que mejor se adaptan a nuestras secuencias utilizamos el programa iMODELTEST (Darriba *et al.*, 2012). Este programa determina la verosimilitud del árbol según el alineamiento y el modelo de evolución. Un total de 14 modelos de evolución son testados, cada uno de ellos cuatro veces (un total de 56 posibilidades). El programa calcula según un Criterio de Información de Akaike (AIC) el modelo de evolución más adecuado.

3) Construcción del árbol. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el método de máxima verosimilitud mediante el programa PHYLM (Guindon y Gascuel, 2003). Son necesarias dos etapas para obtener el árbol final utilizando este programa:

3.1. El programa determina la topología del árbol inicial y la longitud de las ramas utilizando el método de “Neighbor Joining” (NJ) (Saitou y Nei, 1987). PHYML utiliza BioNJ que es una variante de NJ.

3.2. Una vez que el árbol está determinado, el programa PHYLM optimiza la longitud de las ramas y la topología calculando según el método de máxima verosimilitud para cada sitio del alineamiento la tasa de sustituciones entre los diferentes taxones (en función del modelo elegido). NJPLOT fue utilizado para el visualizado de los árboles.

4) Verificación de la robustez de los árboles obtenidos utilizando el método de “bootstrap”. Con este método estimamos el nivel de confianza (robustez estadística de las hipótesis filogenéticas). En otros casos se ha empleado la inferencia bayesiana usando el programa MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012).

4.7 ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LA ZONA PELÚCIDA DE ROEDORES

El análisis por espectrometría de masas nos permite identificar las proteínas presentes en una mezcla proteica compleja gracias a la identificación de péptidos obtenidos por comparación con bases de datos existentes. Nuestro ensayo tenía como objetivo encontrar péptidos pertenecientes a ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 pertenecientes a la ZP de *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*.

4.7.1 Aislamiento de la zona pelúcida de ovarios de roedores mediante solubilización por calor

Para el análisis mediante espectrometría de masas se procedió, en primer lugar, al aislamiento de la ZP de ovarios de roedores mediante solubilización por calor siguiendo el protocolo descrito previamente (Izquierdo-Rico *et al.*, 2009; Jiménez-Movilla *et al.*, 2009).

Se realizaron 5 experimentos para *Mus mattheyi* y *Mus pahari* y 2 experimentos para *Mastomys coucha*. En cada experimento se emplearon 10 ovarios. Los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de CO₂ y los ovarios se obtuvieron mediante la realización de una incisión abdominal; una vez obtenidos se lavaron con PBS y se procedió a la disección de los mismos, eliminando la grasa y tejido conectivo adherido que rodea al ovario.

Los ovarios se homogeneizaron utilizando un homogeneizador (Polytron®). La homogeneización se realizó a 4°C para evitar el calentamiento de la muestra por fricción. Los ovarios fueron diluidos en 2 ml de tampón de homogeneización: tampón TEA (25 mM trietanolamina HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O y 1 mM CaCl₂·2H₂O, pH 8.5) mezclado con 1 pastilla inhibidora de tripsina (Sigma-Aldrich, EE.UU), 4 mg de

hialuronidasa bovina testicular (Sigma-Aldrich, EE.UU), 4 mg de DNasa (Sigma-Aldrich, EE.UU) y 1% del detergente NP-40 (Sigma-Aldrich, EE.UU) y homogeneizados durante tres periodos de 5 segundos con intervalos de reposo de 1 minuto. A continuación, se añadieron 0.4 ml de una solución de ácido deoxicólico 100 mg (Sigma-Aldrich, EE.UU) en 1 ml de TEA y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos. Esta solución fue de nuevo homogeneizada en un homogeneizador de cristal.

Obtuvimos unos 4 ml de homogeneizado que fueron repartidos en 4 viales y centrifugados a 13.000 rpm durante 8 minutos a 4 °C. Descartamos el sobrenadante y resuspendimos en tampón TEA pasando a dos viales. A continuación, realizamos tres lavados en tampón TEA y otros tres en PBS 10 mM suplementado con 1M de NaCl, pH 7.0. Las muestras fueron lavadas en 1 ml de tampón fosfato (PB) 10 mM pH 7.0 y tras este lavado se resuspendieron en 1 ml de PB 10 mM y se solubilizaron por calor en un baño a 65 °C durante 45 minutos en agitación continua. Una vez terminado este proceso, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y recogimos aproximadamente 800 µl de sobrenadante. El sobrenadante que contiene la ZP solubilizada fue guardado a -20 °C hasta su utilización.

4.7.2 Obtención de zonas pelúcidas aisladas de *Mastomys coucha*

Para la obtención de ZPs aisladas, se procedió a la estimulación ovárica de los animales (Tabla 7). Los ovocitos se obtuvieron como se ha explicado anteriormente (Apartado 4.1.2.1) y el aislamiento de la ZPs se realizó mediante pipeteado continuo de los ovocitos en una gota de PBS observando bajo la lupa binocular (Motic® STB24-12A). Las ZPs aisladas se recogieron del medio y se procedió a su solubilización por calor a 65 °C durante 30 minutos en termobloque (Accu Block™, Labnet, EE.UU). Las ZPs solubilizadas se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

4.7.3 Análisis mediante HPLC/MS

Este análisis fue realizado en el laboratorio de proteómica de la sección de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

La separación y análisis de las digestiones tripticas de las muestras se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS). Para ello, se utilizó un sistema que consiste en un HPLC modelo Serie 1100 de Agilent (Agilent Technologies, EE.UU), termostatzado y equipado con un muestreador automático y una bomba capilar. Este HPLC se conectó a un espectrómetro de masas tipo trampa de iones modelo Agilent XCT Plus (Agilent Technologies, EE.UU) usando una interfase tipo electrospray (ESI).

Las muestras fueron diluidas en tampón de bicarbonato amónico 25 mM, pH 8.5 hasta un volumen de 100 μ l e incubadas con Tris (2-carboxyethyl) fosfina 50 mM a 60 °C durante 10 min. A continuación, las muestras fueron alcalinizadas añadiendo iodoacetamida 100 mM e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se añadieron 0.3 μ g de tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade (V5280). Promega, EE.UU) a cada muestra para una digestión de 16 horas a 37 °C. Tras la incubación, la digestión con tripsina se paró con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.5% y las muestras se secaron usando un concentrador-evaporador por vacío modelo Eppendorf 5301 (Alemania).

Las muestras evaporadas fueron resuspendidas en 10 μ l 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 tipo Zorbax SB-C₁₈ (5 μ m, 150 \times 0.5 mm, Agilent Technologies, EE.UU), la cual se

encontraba en un compartimiento termostatzado a 40 °C, utilizando un flujo de 10 µl/min. 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 120 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) segundo, en el rango de medida desde 300-2200 m/z . La presión del gas de nebulización (Helio) se mantuvo en 15 psi, mientras que el gas secante se mantuvo a un flujo de 5 l/min y a una temperatura de 350 °C. Los datos de 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 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania) y la búsqueda de coincidencias se llevó a cabo con el motor Spectrum Mill (Agilent Technologies, EE.UU).

4.8 ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA DE RATONA A LA DIGESTIÓN CON TRIPSINA

Para analizar la resistencia de la ZP a la digestión con tripsina los animales se superovularon con PMSG y la ovulación fue inducida con hCG (la dosis utilizada para cada roedor ha sido indicada anteriormente en la Tabla 7). Al cabo de 16 horas de la inyección de hCG, los animales se sacrificaron mediante sobredosis de CO₂. Se realizó una incisión abdominal para obtener los oviductos y se obtuvieron los CCOs mediante rasgado de la ampolla oviductal en una gota de PBS. Los ovocitos fueron decumulados

mediante el uso de hialuronidasa al 0.5% (Sigma-Aldrich, EE.UU). A continuación, se evaluó la resistencia de la ZP poniendo los ovocitos en una gota de tripsina (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich, EE.UU) en una placa de Petri sobre placa calefactora a 37 °C, midiéndose el tiempo que tardaba cada una de las ZP en ser digerida por completo mediante visualización directa usando una lupa binocular (Motic® STB24-12A)

4.9 FECUNDACIÓN *IN VITRO* (FIV) EN ROEDORES

Roedores de las especies *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi*, *Mus musculus* (cepa C57) y *Mus pahari*, fueron superovulados mediante una inyección intraperitoneal de PMSG (7.5 UI), seguida de una inyección de hCG (5 UI) 48 horas después para estimular la ovulación.

A las 14 horas post-estimulación, las ratonas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y se obtuvieron los oviductos tras una incisión peritoneal. A continuación, se obtuvieron los CCOs tras rasgado de la ampolla oviductal y se disgregaron con hialuronidasa (300 µg/ml, en medio M2. Anexo 1). Los CCOs se lavaron en medio HTF (Human Tubal Fluid. Anexo 2) y se pusieron en este mismo medio en placas de 4 pocillos (Nunc®, Thermo Scientific, EE.UU) en grupos de 20-30 ovocitos por pocillo.

Una hora y media antes del sacrificio de las hembras, se sacrifican a los machos de la especie homóloga y/o heteróloga mediante dislocación cervical y se aíslan los conductos deferentes junto a los epidídimos. Se ponen en PBS y se limpian de grasa y tejido conectivo adherido. El espermatozoide se extrae en una gota de 500µl de HTF previamente equilibrada en el incubador (37 °C, 5% de CO₂), obteniéndose presionando desde la cola del epidídimo hacia el conducto deferente. Los espermatozoides fueron

incubados en medio HTF suplementado con BSA, durante 30 min a 37 °C con 5% de CO₂.

Tras la incubación, se cogió una alícuota de la suspensión espermática de la parte periférica de la gota de capacitación usando una punta de pipeta de 10 µl. Esta suspensión se transfirió a la gota de fecundación y se incubó con los ovocitos en medio HTF (8×10^5 espermatozoides móviles/ml). Transcurrido un periodo de 5 horas, los ovocitos fueron lavados tres veces en medio KSOM (Zenith Biotech. EE.UU) y se pusieron en una gota de cultivo durante 24 horas, tras las cuales se evaluó la tasa de fecundación.

4.10 ESQUEMA DEL MATERIAL Y MÉTODOS

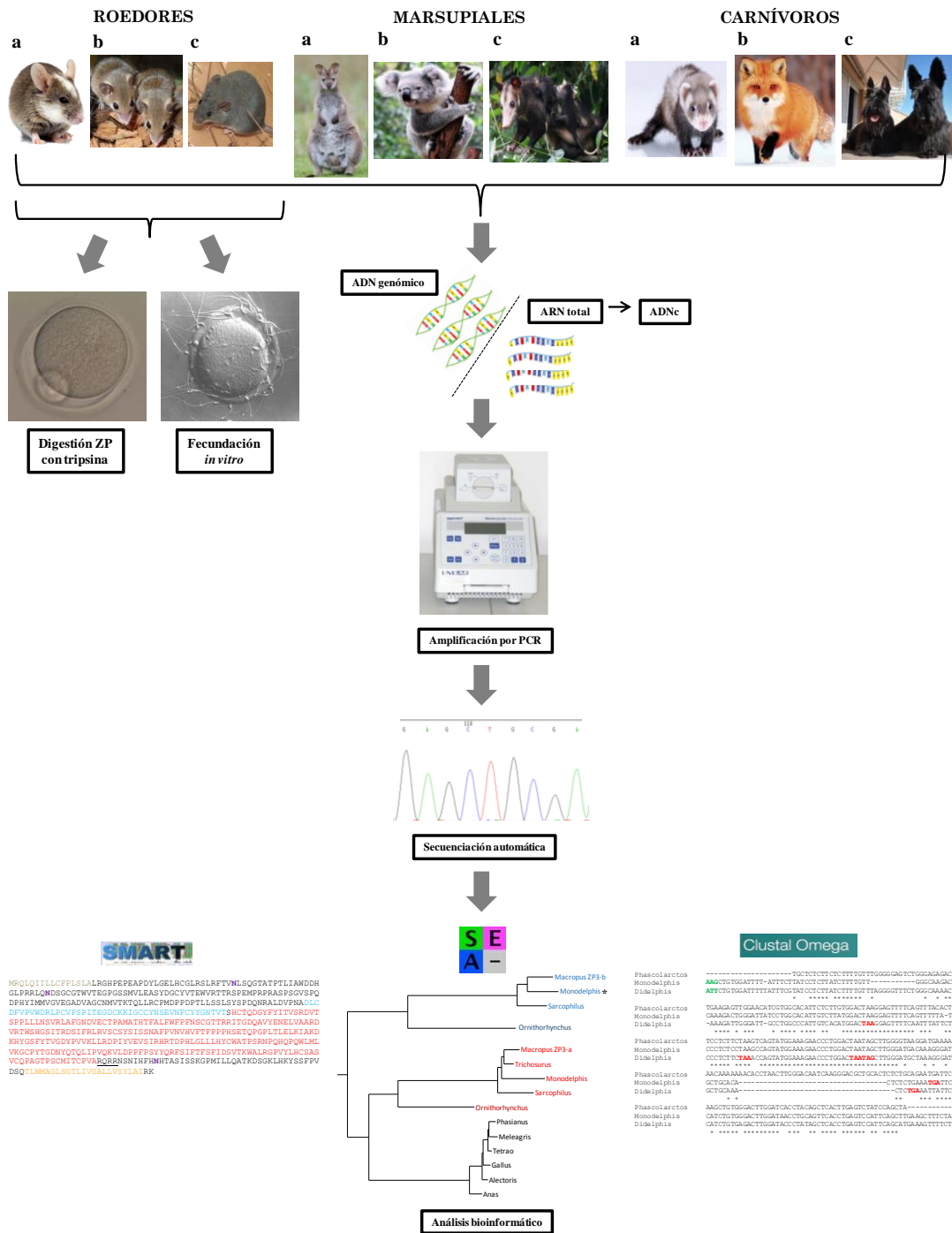


Figura 16. Esquema del material y métodos realizado. Las especies analizadas son las siguientes: ROEDORES: a) *Mastomys coucha* b) *Mus mattheyi*. c) *Mus pahari*. MARSUPIALES: a) Wallaby de Bennett (*Macropus rufogriseus*). b) Koala (*Phascolarctos cinereus*). c) Zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*). CARNÍVOROS: a) Hurona (*Mustela putorius furo*). b) Zorra (*Vulpes vulpes*). c) Perra (*Canis lupus familiaris*).

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS DE LA ZONA PELÚCIDA EN MARSUPIALES

5.1.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ZONA PELÚCIDA DEL WALLABY DE BENNETT

5.1.1.1 Análisis de las secuencias de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en el wallaby de Bennett

Una vez obtenido el ARN total de ovarios de wallaby, el ADNc que se obtuvo se utilizó como molde para realizar distintas amplificaciones por PCR con el objetivo de amplificar el marco abierto de lectura completo de ZP1 y ZP4, así como fragmentos de ZP2 y ZP3. Para ello se diseñaron cebadores (ver Tabla 8 de Material y métodos) a partir de las secuencias depositadas en la base de datos Ensembl del wallaby de Tammar, una especie cercana filogenéticamente.

Se consiguió amplificar por fragmentos el marco abierto de lectura completo de ZP1 y ZP4, así como fragmentos de ZP2 y ZP3 (Fig 17).

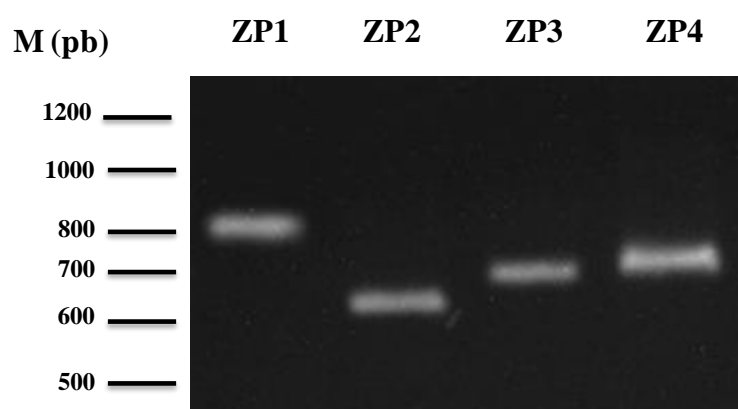


Figura 17. Análisis de la expresión génica de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en el ovario del wallaby de Bennett mediante RT-PCR. Se muestran los amplicones correspondientes a fragmentos amplificados de cada transcrito.

5.1.1.1.1 Caracterización de ZP1 del wallaby de Bennett

El ADNc de ZP1 contiene una secuencia codificante de 1848 nucleótidos (Fig. 18). Esta secuencia fue depositada en el GenBank con número de acceso KC954398. El ATG inicial fue predicho con el algoritmo de Pedersen y Nielsen (1997) y se encuentra asociado con el entorno Kozak (Kozak, 1991). La secuencia depositada contiene un codón de stop (TAA) en las posiciones 1849-1851.

El marco abierto de lectura de ZP1, codifica un polipéptido de 616 aminoácidos (Figs. 18 y 19) con un peso molecular teórico de 69.16 kDa. Se observa un péptido señal de 27 aminoácidos según el algoritmo de Bendtsen *et al.* (2004), con corte entre Gly27 y Leu28. Por tanto, la proteína secretada madura comenzaría en Leu28 y terminaría en Arg509 ya que es ahí donde se encuentra el sitio consenso para corte de proteasas tipo furina Arg508-Arg-Arg-Phe511 (Boja *et al.*, 2003, 2005; Duckert *et al.*, 2004). Este sitio se ha relacionado con la escisión proteolítica de las distintas ZPs y su liberación a la vía secretora. Estos datos sugieren que el patrón de secreción de ZP1 sería similar al de otras proteínas de la familia ZP. El peso molecular de la proteína madura (sin el péptido señal y con corte en Arg509) fue calculado y corresponde a 54.03 kDa.

ZP1 presenta al igual que el resto de glicoproteínas de la ZP, un dominio ZP, que se corresponde con 273 aminoácidos (Gln232-Gly504). Este dominio es rico en cisteínas, presentando 10 residuos cisteína. También encontramos un dominio transmembrana localizado entre Pro578 y Glu600, seguido de un tallo citoplasmático.

En la proteína madura encontramos 80 posibles sitios de O-glicosilación (Thr o Ser) y tres sitios putativos de N-glicosilación (Asn-X-S/T) en posiciones Asn67, Asn246 y Asn332.

1 atgagctggggaacctatttggagctcgggctcctcctggttctgggactctgcttgagt
 1 M S W G T Y L E L G L L L V L G L C L S
 61 cagagacctggaacctggggcttgcaactcagggatgaatgtggctcctacggcatgcag
 21 Q R P G T W G L Q L R H E C G S Y G M Q
 121 ctgctggcttcccaaagccagaacaagtgatccgcttcaaggtgggagatgagtttggc
 41 L L V F P K P E Q V I R F K V V D E F G
 181 acccactttgaagtgaccaattgctccatctgtctgcactggatcacctcagagccccag
 61 T H F E V T N C S I C L H W I T S E P Q
 241 ggccccaccatcttctctgcaggttacaatggctgtcatgtgatgaagaaggatggtaa
 81 G P T I F S A G Y N G C H V M K K D G Q
 301 taccacttacgagatatttgtagaagagatattgggactcggcttgatggagctcaagat
 101 Y H L R V F V E E I L G T R L D G A Q D
 361 ataacttgatctgccccagacctgagcatcccaagagccctggcactcctcttctcat
 121 I T L I C P R P E H P K S P G T P L S H
 421 cctgtcttccacccttctccctcctctgcccggctccatccttatcttctcctcactt
 141 P V F H P S P S S A G L H P Y L P P H L
 481 cgcccttttactcggactcaaaacactcgtctctctcactggttgccaatcgcaacat
 161 R P F H S D S K H S S L S P V A N R N H
 541 cgacctgccatattccacccacctggcttcttctcctcctcgggccagtcactttagta
 181 R P A H I H P T W S S P S S G P V T L V
 601 caccagatctcacctatcacacaggtgaccctctgagccggaacagtgccaggtcacc
 201 H Q I S P Y H T G D P L S R K Q C Q V T
 661 tctagccgtgtcccctgtgtggaagccactgtccagtggttccaagatggccaatttgtc
 221 S S R V P C V E A T V Q C F E D G Q F V
 721 ctgggtgctctccagaatatcacctctgagaagcaggtcagcctcaagagcctcaggcta
 241 L V V S Q N I T S E K Q V S L K S L R L
 781 ggctatgcctcagggggctgcaccccaaccagaggacagaaaacattgtggcttccat
 261 G Y A S G G C T P T Q R T E N I V V F H
 841 tttccagtcaccagtggtgaccaccatccagctggccaacaaccagctcatctatgag
 281 F P V T Q C G T T I Q L V N N Q L I Y E
 901 aaccaactggatcagacattgacatacagacggggccagaaggcgctatcactcgggag
 301 N Q L V S D I D I Q T G P E G A I T R E
 961 agcaccttcttctccatgcacgctgcatctacaatgcaagcagcttctcctgccctccat
 321 S T F L L H A R C I Y N A S S F L P L H
 1021 ctagaggtgttctgcccaccaccaccagctcctgtgctcaggtctggcccattgcatctt
 341 L E V F L P P P P A P V L R S G P L H L
 1081 gagctgcgaattgcaaagatcagaaatacagctcctactaccatgtggaggacttcccc
 361 E L R I A K D Q K Y S S Y Y H V E D F P
 1141 atcttcaagatgctccggcaacctgtctatgtagaagtgcgactcctcaggaggacagac
 381 I F K M L R Q P V Y V E V R L L R R T D
 1201 cccagcctgggtgctgtctctgcatcactgctgggctacccccagcaccaacccttcaag
 401 P S L V L S L H H C W A T P S T N P F K
 1261 gaacccagtgccctcttctatttggatggatgcccattttctgggtgatggttacaagacc
 421 E P Q W P L L F D G C P F S G D G Y K T
 1321 cagctcgcatccaagaagggaatgtcagagctccttttcccgactcattatcagcgtttc
 441 Q L A S K K G M S E L L F P T H Y Q R F
 1381 attgtctctacctttacatttctcagctcggctcctccagagggctctcagtgaccggtt
 461 I V S T F T F V D S V S Q R A L S G P V
 1441 tacttcttctgtagcgtttctgcctggtatgcatctgagacagagacttgaggactgtg
 481 Y F F C S V S A C Y A S E T E T C R T V
 1501 tgtcaccacggggctacaaagcggcgggcgtttttagatcaccacaattatattggaagga
 501 C H H G A T K R R R F V D H H N Y M E G
 1561 gtccaggatattgtgggttctccaggaccagtgggatttggggattccagagaacagaag
 521 V Q D I V G S P G P V G F G D S R E Q K
 1621 gtttaatttacagaataaagagcctgatttcaaggaaagatctgttgggttggtggccaac
 541 V N L Q N K E P D F K E R S V V L W P N
 1681 gtctcggagccccgtcttctggaagatcctcctggagcacgaccttgaagcctttgctg
 561 V S E P R L L E R S S W S T T L K P L L
 1741 tggttgacctctccctgggtggatcactgtcctgctgggtggcagctctcctcgaa
 581 W L T L S L V V I T V L L V V A A L L E

```
1801 aggagccagaaacttcaagagcagagcagggagtggtgggcaaagccaataa
601 R S Q K L Q E Q S R E C G Q S Q -
```

Figura 18. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZP1 del wallaby de Bennett. Los codones de inicio y de terminación se muestran en rosa. El péptido señal se muestra en verde y el dominio ZP se señala en rojo. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en naranja.

```
1 MSWGTYLELG LLLVLGLCLS QRPGTWGLQL RHECGSYGMQ LLVFPKPEQV IRFKVVDEFG
61 THFEVTNCSI CLHWITSEPQ GPTIFSAGYN GCHVMKKDGQ YHLRVFVEEI LGTRLDGAQD
121 ITLICPRPEH PKSPGTPLSH PVFHPSPSSA GLHPYLPPHL RPFHSDSKHS SLSPVANRNH
181 RPAHIHPTWS SPSSGPVTLV HQISPYHTGD PLSRKQCQVT SSRVPCVEAT VQCFEDGQFV
241 LVVSQNITSE KQVSLKSLRL GYASGGCTPT QRTENIVVFH FPVTQCGTTI QLVNNQLIYE
301 NQLVSDIDIQ TGPEGAITRE STFLLHARCI YNASSFLPLH LEVFLPPPPA PVLRSGPLHL
361 ELRIAKDQKY SSYYHVEDFP IFKMLRQPVY VEVRLLRRTD PSLVLSLHHC WATPSTNPFK
421 EPQWPLLFDG CPFSGDGYKT QLASKKGMSE LLFPTHYQRF IVSTFTFVDS VSQRALSGPV
481 YFFCSVSACY ASETETCRTV CHHGATKRRR FVDHNNYMEG VQDIVGSPGP VGFGDSREQK
541 VNLQNKEPDF KERSVVLWPN VSEPRLLERS SWSTTLKPLL WLTLSLVVIT VLLVVAALLE
601 RSQKLQEQSR ECGQSQ*
```

Figura 19. Secuencia de aminoácidos de ZP1 del wallaby de Bennett. Los sitios potenciales de N-glicosilación se muestran en rojo y los de O-glicosilación en azul. El péptido señal (1-27) y el sitio consenso para corte de furina (507-510) se encuentran subrayados indicando el inicio y final de la proteína madura.

5.1.1.1.2 Caracterización de ZP4 del wallaby de Bennett

La secuencia amplificada de ZP4 contiene una secuencia codificante de 1575 nucleótidos (Fig. 20). Ésta se corresponde con el marco abierto de lectura completo de ZP4 de wallaby y fue depositada en el GenBank con número de acceso KC954399. El codón de iniciación (ATG) se predijo con el algoritmo de Pedersen y Nielsen (1997) y se encuentra asociado con el entorno Kozak (Kozak, 1991). La secuencia contiene un codón de terminación (TGA) en las posiciones 1576-1578.

El ADNc de ZP4 codifica un polipéptido de 525 aminoácidos (Figs. 20 y 21), con un peso molecular teórico de 58.40 kDa. ZP4 contiene un péptido señal de 18 aminoácidos con corte entre Gly18 y Glu19, que fue predicho con el algoritmo de Bendtsen *et al.*, (2004). El sitio de corte de furina es Arg460-Lys-Arg-Arg463 (Duckert *et al.*, 2004) y a continuación encontramos el dominio transmembrana entre Arg501 y Leu523 con 23 aminoácidos. Teniendo en cuenta la localización del sitio de corte de furina a nivel de la Lys461, el peso molecular de la proteína madura se estima en 49.29 kDa.

ZP4, al igual que ZP1, presenta un dominio ZP de 274 aminoácidos (Gln185-Gly458) con 10 residuos cisteína. Justo antes del dominio ZP encontramos un dominio trefoil de 46 aminoácidos (Asp138-Thr183). Este dominio es característico de las glicoproteínas ZP1 y ZP4 y es una región rica en cisteínas, habiendo 6 en ZP4 de wallaby.

En la proteína madura se localizan un total de 74 sitios potenciales de O-glicosilación y cinco sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-X-S/T) en posiciones Asn66, Asn199, Asn264, Asn323 y Asn402.

```

1 atgctgtggattttctttcttaccatcttatctttcttttgcagcagcctgggagagacc
1 M L W I F F L T I L S F F C S S L G E T
61 gaagacttgaaccatcctggaacactctcttgggactaaggagttttcagtttacacta
21 E D L N H P G T L S C G L R S F Q F T L
121 cctcttctaagtcgctatggaaaaaatcctggaatgatagcttgggacaacaaaggggtg
41 P L L S R Y G K N P G M I A W D N K G V
181 ctacactcactacagaacgattcagtcgtgtgggacttggatcacctacagctcacttgag
61 L H S L Q N D S V C G T W I T Y S S L E
241 tccatccaccttgaagcttcctattctggtactggttacggttactgaatgggacacctattac
81 S I H L E A S Y S G C Y V T E W D T Y Y
301 atgatgcctattggagtctcaggcctagatgctgatgaaagtaagactgttcacaagggtg
101 M M P I G V S G L D A D E S K T V H K V
361 aagggtgctcaagtggttcattcgctctcccagccctagatgctgcaggtcttgacctgtgt
121 K V L K C S F A L P A L D A A G L D L C
421 gatgtcaaaaactgaggataggctgtcctgtgctgtttcatccatcactaaagggagactgt
141 D V K T E D R L S C A V S S I T K G D C
481 gaggacctaggctgttgctatcactctgaggatgaagtaaatccttgctactatggaaac
161 E D L G C C Y H S E D E V N P C Y Y G N
541 acagtgactgcccagtgactcctgatggccaattgtccattgctgtttctcacaacgtg
181 T V T A Q C T P D G Q L S I A V S H N V
601 actcggccatcgttgcttttggattccatacgtttggtttctggactagatgataaatgt
201 T R P S L L L D S I R L V S G L D D K C
661 gatcctgtggaaaaaagtaatgcctttgtcctgttccagttcccactctcttctctgtggc
221 D P V E K S N A F V L F Q F P L S S C G

```

```

721 accatcgtacagatgattggtaaccaggcaatatataagaatgaactattggcatccagg
241  T I V Q M I G N Q A I Y K N E L L A S R
781 gatgtgagaaactggaccctgggtaataactagggacagcatcttcaggcttcacatc
261  D V R N W T R G L I T R D S I F R L H I
841 agctgtagctactctgtaagagatgagattttccagctagtagtccaggcttcaccctc
281  S C S Y S V R D E I F P A S I Q V F T L
901 ccccaccacttctgttaccgaagcaggcctctggctctggcactgcaaattgctaaa
301  P P P L P V T K P G P L A L A L Q I A K
961 gaagaaaactatagttcctactttgtggacactgattaccagtaacaaagctacttcgg
321  E E N Y S S Y F V D T D Y P V T K L L R
1021 gagccaattcacgtggagggttcgaatcctacgaagaacagacgcaaacctggttctgctt
341  E P I H V E V R I L R R T D A N L V L L
1081 ctgcaccattggtgggcaaccccaataccaatcctttgcatccaatacaatggcccatc
361  L H H C W A T P N T N P L H P I Q W P I
1141 ctagtgaaggatgcccctatgaaggagacaactacaggacgaagatggtgtcaatatcg
381  L V K G C P Y E G D N Y R T K M V S I S
1201 agaattcaacactacggtttccttctactacaagcgtttcatcattcatacctttgcc
401  R N S T L R F P S H Y K R F I I H T F A
1261 tttgtggattctgcttttaagaagtcactcatgggaccggtgtatttacactgcagtgcc
421  F V D S A F K K S L M G P V Y L H C S A
1321 tcagtctgccagcctccaggctcagactcctgcacagtaacctgccctgtgggaactaga
441  S V C Q P S R S D S C T V T C P V G T R
1381 aaaagaagaagctctgagactcattcttggacaagacttcaaagtgttctagcaagggg
461  K R R S S E T H S W N K T S N V S S K G
1441 cctatatTTTTTccttcaagttgctgagagctcctcctcaatcagggttcaggcctggacata
481  P I F F L Q V A E S S P Q S G S G L D I
1501 agaactctggtcatalcttctgtctggaataactaatcatggcagccttgttggtatccttc
501  R T L W H I L S G I L I M A A L L V S F
1561 ctagcactgagaaac tga
521  L A L R N -

```

Figura 20. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZP4 del wallaby de Bennett. Los codones de inicio y terminación se muestran en rosa. El péptido señal en verde. El dominio trefoil en azul. El dominio ZP en rojo. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en naranja.

```

1  MLWIFFLTIL SFFCSSLGET EDLNHPGTLS CGLRSFQFTL PLLSRYGKNP GMIAWDNKGV
61  LHSLQNDSVC GTWITYSSLE SIHLEASYSG CYVTEWDTY MMPIGVSGLD ADESKTVHKV
121 KVLKCSFALP ALDAAGLDLC DVKTEDRLSC AVSSITKGDC EDLGCCYHSE DEVNPCYYGN
181 TVTAQCTPDG QLSIAVSHNV TRPSLLLDSI RLVSGLDDKC DPVEKSNAFV LFQFPLSSCG
241 TIVQMIGNQA IYKNELLASR DVRNWTRGLI TRDSIFRLHI SCSYSVRDEI FPASIQVFTL
301 PPPLPVTKPG PLALALQIAK EENYSSYFVD TDYPVTKLLR EPIHVEVRIL RRTDANLVLL
361 LHHCWATPNT NPLHPIQWPI LVKGPYEGD NYRTKMVSIS RNSTLRFPSH YKRFIIHTFA
421 FVDSAFKKSL MGPVYLHCSA SVCQPSRSDS CTVTCPVGTR KRRSSETHSW NKTSNVSSKG
481 PIFFLQVAES SPQSGSGLDI RTLWHILSGI LIMAALLVSF LALRN*

```

Figura 21. Secuencia de aminoácidos de ZP4 del wallaby de Bennett. Los sitios putativos de N-glicosilación se muestran en rojo y los sitios putativos de O-glicosilación en azul. El péptido señal (1-18) y el sitio consenso para corte de furina (460-463) se encuentran subrayados indicando el inicio y final de la proteína madura.

RESULTADOS

Mujer	FPSPLDPGHSSVHPTPALPSPGPGPTLATLAQPHWGTLLEHWDVNRDYIGTHLSQEQQV	238
Coneja	FPIPLYLEHSLMLPTPAGPSLGGPPTPAVLAQ-----VERWEVDKPDVAGSHLPQ EWCQV	221
Ratona	GLTTLYPEQSFHPTPAPPSPSLGGPAGSTVPHSQWGTLEPWELELDSVGTHTLPQ ERCQV	230
Rata	GLTTLYPET---HPTPAPPSEPGVPGPTVPQSQWGTLSWELTELDISGTHLLQ ERCQV	228
Wallaby	-PFHSDSKHSSLSPVAN-RNHRPAHIHTWSSPSSGPVTLVHQISPYHTGDPLSRKQ CCQV	219
	* . . . * . . . : . . * * :: **	
Mujer	ASGHLP C IIVRRSKEAC Q QAG C CYDNTREVPCYYGNTATV Q CFRDGYFVLVVS Q EMAL T H	298
Coneja	ASGHIP C IVQSSSKEACE Q AGCCYDSAREVPCYYGNTATV Q CFRNGYFILVVA Q EMAL A H	281
Ratona	ASGHIP C MV N GSSKET C Q A GCCYDSTKEEPCYYGNTV T L Q CFKSGYFTLVMS Q ETAL T H	290
Rata	ASGHIP C MV K GSSEAC Q AGCCYDNTKEMPCYYGNTV T L Q CFRSGYFTLVMS Q ETAL T H	288
Wallaby	TSSRVP C VE-----ATV Q CFEDG Q FVLVVS Q NI T SE K	251
	:.:.*:* :.*:*:*.* * **:*:* : :	
Mujer	RITLANIHLAYAP T CSPTQHTEAFVVFYFPL T HCGTTMQVAGDQLIYENWLVS G IHI Q K	358
Coneja	RITLANVHLAYAP T CPPAQKTSAFVIFHVPL T HCGTTVQVLGSQLFYENQLVSDID V RE	341
Ratona	GVLLDNVHLAYAP N GCPPTQKTSAFVVFHVPL T L C GTAIQVVG E QLIYENQLVSDID V QK	350
Rata	GVMLDNVHLAYAP N GCPPTQKTSAFVVFHVPL T L C GTAIQVVG K QLVYENQLVSNIE V QT	348
Wallaby	QVSLKSLRLGYAS G CTPTQRTENIVVFHFPV T CGTTIQLVNNQLIYENQLVSDID I Q T	311
	: * .:.*:*.* *.*:*:*.* :.*:*:*.* **:*:* : ..*.* ** * **.*:*:	
Mujer	GPQGSITRDSTFQLHVR C FN A SDFLPIQASIFPPSPAPMTQ P GPLRLELRIAK D ET F S	418
Coneja	GPQGSITRDSFRL V RCIF N ASDFLPIQASIFSPPLPAPVTQ A GPLRLELRIAR D ET F S	401
Ratona	GPQGSITRDSAFRLHVR C IF N ASDFLPIQASIFSPQPPAPVT Q SGPLRLELRIAT D K T F S	410
Rata	GPQGSITRDGVFRLHVR C IF N ASDFLPIRASIFSPQPPAPV T RSGPLRLELRIAT D K T F S	408
Wallaby	GPEGAITRESTFLLHAR C I N ASSFLPLHLEVLFPPPPAPVLRSGPLHLELRIAK D Q K Y S	371
	:*:*:*:* : * * .:*:*:*.* **:*:* : :.*:*:*:*:* * **:*:	
Mujer	SYYGEDDYPIVRLRLREP V HVEVRL L QRTDPNLVLL H Q C WGAPSANPFQ P Q P W P ILSD G C	478
Coneja	SFYEEEDYPLVRLRLREP V HVEVRL L QRTDPSLVLEL H Q C WATPSANPVQ P Q P W P LLSD G C	461
Ratona	SYYQGSYDPLVRLRLREP V YVEVRL L QRTDPSLVLV L HQ C WATPTTS P FEQ P Q P W P ILSD G C	470
Rata	SYYQGSYDPLVRLRLQEP V YIEVRL L QRTDPLALML H Q C WATPSAS P FEQ P Q P W P ILSD G C	468
Wallaby	SYHYVEDFPIFKMLRQ P VYVEVRL L RR T DPSLVLSL H H C WATPST N PFKE P Q P W P LL F D G C	431
	: .:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*.* * **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* **	
Mujer	PFKGDYSYRTQ M V A -LDGAT-PFQSHYQRFTVATF A LLD S GS Q RALRGLV V Y F CS T S A CH T	536
Coneja	PFKGDYSYRTR V L A -LDRAELPFQSHYQRFTVAT F TFLD S GA Q RALRGLV V Y F CS A S A CH P	520
Ratona	PFKGDNYRTQ V V A -ADREALPFQSHYQRFTIT F MLLD S SS Q NALRGQV V Y F CS A S A CH P	529
Rata	PFKGDNYRTQ M V A -ADRATLFFW S HYQRFTIAT F LLD S SS Q NALRGQV V Y F CS A S A CH P	527
Wallaby	PFSGDGYKT Q LASK K GMSELLFP T H Y QR F IV S T F TFVDS V S Q RALS G PV V Y F CS V S A C Y A	491
	.*.*:*:*:* : . * :*** :.*:* :.*:* :.*.* * **:*:*:*.***:	
Mujer	SGLET C ST A CT S T G TTRQRRSSGHRNDTAR P QDIVSSPGPVGFEDSY G QEPT L GP T D---	592
Coneja	SGPET C SST C SS R TAKRRRSSGYHDG T PRALDIVSSPGPVGFQDSHR Q EPT L EST G ---	576
Ratona	L G SD T C S T T C D SGIARRRSSGHHN T LRALDIVSSPGAVGFED A ----AK L EP S G---	581
Rata	V G SE T C S T T C D SEIARRRSSGHHN S TIRALDIVSSPGAVGFED A ----PK L EP S G---	579
Wallaby	SE T E T C R T V C H H G ATKRRRFVDH H N M EGVQ D IVGSPGPVGF G DSRE Q VN L Q N KE P DF K	551
	:** :.* :::** :::: **.* ** * * : . *	
Mujer	-----SNGNSSLR P LL W AV L LL P AV L V L GF G V F V L GS Q T W A Q K L W E	634
Coneja	-----SGRNSNP K LL W V V LL L L A I A L V L G I G V F V L GS Q A W A H K L R E	618
Ratona	-----SSRNS S R M LL L ---LL A I T L A L A A G I F V L I W A W A Q K L W E	619
Rata	-----STRNSGS R PL W V L Q-LL A I T L V L G D G V L V L GS W A W A W A---	617
Wallaby	ERSVVLWPNVSE P RL L ERS S W S T L K P LL L W L T L SL V V I T V LL V V A AL L ERS---- Q K L Q E	607
	* .: : ** * .: : * .: :	
Mujer	SNR Q -----	638
Coneja	GHRL T D Q A Q	627
Ratona	GIR Y -----	623
Rata	-----	
Wallaby	QSRE C Q S Q	616

Figura 22. Comparación de las secuencias de aminoácidos de ZP1 de mujer, coneja, ratona, rata y wallaby. Los números de acceso de las secuencias usadas son: mujer (NP_997224), coneja (NP_001257409), ratona (NP_033606) y rata (NP_445961). Los aminoácidos idénticos se indican con asterisco (*). Dos

puntos (:) indican residuos conservados y punto (.) residuos semiconservados. El dominio trefoil se muestra en azul. El dominio ZP en rojo y el dominio transmembrana en naranja. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. Los aminoácidos cisteína se señalan en verde y los sitios potenciales de N-glicosilación en morado.

Mujer	-----M W L L R C V L L C V S L S L V A S G H K P E A P D Y S S V L H C G P W S F Q F A V N L -N Q E A T	50
Coneja	----MAPGSTMWLLGYIFLCFPVFSALIKQPKPETPTDPGVLHCRPWNFKFTINFQNETG	57
Rata	-MARQALRSTLWLLPSILLCFPFLPLSGQHVTELP---GVLHCGLQSFQFAVNL-SLEAE	56
Zarigüeya	-----MQWILLFTLFSFIWGSGLGETEDLDHPGTLSCGLRSFRFMLPLLSQYGK	48
Wallaby	-----MLWIFFLTLILSFFCSSLGETEDLNHPGTLSCGLRSFQFTLPLLSRYGK	48
	: ::: ..: .*	..* * .*: * : . .
Mujer	SPPVLI A W D N Q G L L H E L Q N D S D C G T W I R K G P G S S V V L E A T Y S S C Y V T E W D S H Y I M P V G V E	110
Coneja	SSPVLVTW N Q G R L H R L Q N D T D C G T R V G E G P G P S V V L E A N Y S S C Y V T E S E P Y V M L V G V E	117
Rata	S-PVLT T W D S Q G L P H R L K N D S D C G T W V M D S P D G F L V L E A S Y S G C Y V T L E G S H Y I M T V G V Q	115
Zarigüeya	N-PGLI A W D N K G M L H S L H N D S I C G T W I T Y S S L E S I Q L E A S Y S G C Y V T E W D T Y I M P I G V S	107
Wallaby	N-PG M I A W D N K G V L H S L Q N D S V C G T W I T Y S S L E S I H L E A S Y S G C Y V T E W D T Y I M P I G V S	107
	. * : :*: :* * * :*: * * : . . : * * * . * . * * * . : : * * * * *	
Mujer	GAGAAEHKVVTERKLLKCPMDLLARD--APDT D W C D S I P A R D R L P C A P S P I S R G D C E G L G	168
Coneja	EVDAAGQNLVTKQQLKCPMHLPA----PDAG L C D S V P V Q D R L P C A T A P I S Q E D C E E L G	172
Rata	EADVAGHVAGTRQRLLT C P L A L Q G K A P D T P S A K V C S F V P V K E R L P C A S T I S R G D C E E L G	175
Zarigüeya	GLDADGSKTVHKVTVL N C S F T L P A Q D--APGL N L C D--V T T E D R L S C A V P S I T K G D C E N L G	164
Wallaby	GLDADESKTVHKVVKV L C S F A L P A L D--AAGL D L C D--V K T E D R L S C A V S S I T K G D C E D L G	164
	. . : * . * . : * * . : . : * * . * * . * * : * * * * *	
Mujer	C C Y S S E E --V N S C Y G N T V T L H C T R E G H F S I A V S R N V T S P L L L D S V R L A L R N D S A--C N P	225
Coneja	C C H S S E E --V N A C Y G N T V T S H C T Q E G H F S I A V S R N V S S P L H L D S V H L V F G N D S E--C Q P	229
Rata	C C Y S S E E E G A D S C Y G N T V T S H C T K E G H F S I A V S R D V T S P L R L D S L R L G F R N I T T G C D P	235
Zarigüeya	C C Y H P E D E--V N P C Y G N T V T A Q C T P D G Q L S I A V S Q N M T Q P S L L L D S I H L V S G L D V K --C D P	222
Wallaby	C C Y H S E D E--V N P C Y G N T V T A Q C T P D G Q L S I A V S H N V T R P S L L L D S I R L V S G L D D K --C D P	222
	** : . * : . : *	
Mujer	V M A T Q A F V L F Q F P F T S C G T T R Q I T G D R A V E N E L V A T R D V K N G S R G S V T R D S I F R L H V S C	285
Coneja	V V A T R A F V L F Q F P F T S C G T T R Q I T G D R A I Y E N L L A T R E V R T W S R G S I T R D S I F R L R V S C	289
Rata	V M K T S T F V L F Q F P L T S C G T T Q R I T G D Q A M Y E N L V A I R D V Q A W G R S S I T R D S N F R L R V S C	295
Zarigüeya	V E K T N A F V L F Q F P L S C G T I V Q M I D N Q A I Y K N L L A S R D V R N W T H G S I T R D S I F R L H I S	282
Wallaby	V E K S N A F V L F Q F P L S C G T I V Q M I G N Q A I Y K N L L A S R D V R N W T R G L I T R D S I F R L H I S	282
	* : : *	
Mujer	S Y S V S S N S L P I N V Q F T L P P P P E T Q P G L T L E L Q I A K D N Y G S Y G V G D Y P V V K L L R D P	345
Coneja	S Y S I S S S A L P V D M H V L T L P P L P E T Q P G L T V V L Q I A K D K D Y H S Y T M D D Y P V V K L L R D P	349
Rata	T Y S I H S I M S P V N M Q V W T L P P L P K T Q P G L S L E L Q I A Q D K N Y S S Y G T D A Y P L V K F L Q D P	355
Zarigüeya	S Y S L K G D I L P A S I Q V F T L P P L P V T K P G L A L E L Q I A K E E H Y S Y V A T D Y P V T K L L R E P	342
Wallaby	S Y S V R D E I F P A S I Q V F T L P P L P V T K P G L A L Q I A K E E N Y S S Y F V D T D Y P V T K L L R E P	342
	: * * : . * : : *	
Mujer	I Y V E V S I L H R T D P Y L G L L L Q C W A T P S T D P L S Q P Q W P I L V K G C P Y I G D N Y Q T Q L I P V Q K A	405
Coneja	I Y V D V S I L Y R T D P Y L G R L H Q C W A T P R T N P L Y Q P Q W P I L V K G C P Y T G D N Y Q T Q L I P V Q E A	409
Rata	I Y V E V S I L H R T D P S L S L L L Q C W A T P G S N P F H Q P Q W P I L V K G C P Y A G D N Y Q T K R I P V Q K A	415
Zarigüeya	I H V E V R I L Q R T D P N L V L L L H H C W A T P N T N L P H P I R W P I L V K G C P Y E G D N Y L T K M V M P R N	402
Wallaby	I H V E V R I L R R T D A N L V L L L H H C W A T P N T N L P H P I Q W P I L V K G C P Y E G D N Y R T K M V S I S R N	402
	* : *	
Mujer	L D L P F F S H H Q R F S I F T F S F V N P T V E K Q A L R G P V H L C S V S V C Q P A E T P S C V V T C P D L S R --	464
Coneja	F D L P F F S H H Q R F S I F T F S F L D S S V A K E A L K G P I Y L H C S V S V C Q P T G T Q S C T V T C P I D S R--	468
Rata	S D V--F P S H H Q R F S I F T F S F A G R E K Q V L G G Q V Y L H C S A S V C Q P A G M P S C T V I C P A S R R--	473
Zarigüeya	S T L Q F P S H Y K R F I I H T F A F V D S --A F K K A L M G P V Y L H C S A S V C Q P S E S D S C T V T C P V G T R K	461
Wallaby	S T L R F P S H Y K R F I I H T F A F V D S --A F K K S L M G P V Y L H C S A S V C Q P S R S D S C T V T C P V G T R K	461
	: *	
Mujer	R R N F D N S S Q N T T A S V S S K G P M I L L Q A T K D P E K L R ----V P V D S K V L W V A G L S G--T L I L I G	519
Coneja	R R N S D I N F Q N S T A N I S S K G P M I L L Q A T E D P S E K L H K H S G V P V H P G A L W V A G L S G --I F I I G	527
Rata	R R K S E L Y F D N S T S--I S S K G P V I L L Q A T K D P A V M L H K H S G T H A D S P T L W V M G L S A S M V I T G	532
Zarigüeya	R R S S E T H P W N K S N S S Q P I F F L Q V A E S Y P Q S G P ----V L D V R T L W L T --L S G--I L I V A	514
Wallaby	R R S S E T H S W N K T S N V S S K G P I F F L Q V A E S S P Q S G S----G L D I R T L W H I --L S G--I L I M A	514
	** : . * : : *	

```

Mujer      ALLVSYLAVKKQKSCPDQMCQ 540
Coneja     ALLVSYVAIRTRR----- 540
Rata       VLVVSYLATRKQR----- 545
Zarigüeya VLLVSFLALRRVK----- 527
Wallaby    ALLVSFLALRN----- 525
          .*:***:* :
    
```

Figura 23. Comparación de las secuencias de aminoácidos de ZP4 de mujer, coneja, rata, zarigüeya australiana y wallaby. Los números de acceso de las secuencias usadas son: mujer (NP_067009), coneja (NP_001075764), rata (NP_758833) y zarigüeya australiana (AAF73042). Aminoácidos idénticos se indican con asterisco (*). Dos puntos (:) indican residuos conservados y punto (.) residuos semiconservados. El dominio trefoil se muestra en azul. El dominio ZP en rojo y el dominio transmembrana en naranja. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. Los residuos cisteína se señalan en verde y los sitios potenciales de N-glicosilación en morado.

5.1.1.1.4 Amplificación total de ZP2 y parcial de ZP3 del wallaby de Bennett

Del mismo modo que se amplificó ZP1 y ZP4, se amplificó completamente la secuencia de ZP2 (Fig. 24) y parcialmente la secuencia de ZP3 (Fig. 25) para demostrar la presencia de 4 transcritos correspondientes a las cuatro glicoproteínas en el ovario de wallaby. Las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank con los siguientes números de acceso: KP057615 para ZP2 y KP057618 para ZP3.

```

1  atgtggagaagggtcctttggggtcaggctaactggagtcacctaaaggacatgccctggc
1  M W R R V F G V R L T G V P K G T C P G
61  ccacagcttccttggtccttctgccttatgaccctggtaacttctgcagtggttggtaac
21  P Q L P W L F C L M T L V T S A V V G N
121 ttctcaaccaacagtttcccaggcacagtcgcttgctatgatgatgaaatgaagattgga
41  F S T N S F P G T V A C Y D D E M K I G
181 tttcctgaagatccttggaacaagtcttggttagcatatgtgggttgattcctttggcaat
61  F P E D L G N K S W L A Y V V D S F G N
241 aaaatcctgaattgtgcccattgtatgacctcagaaaacctcatcttgagcatcatgtat
81  K I L N C A H V M T S E N L I L S I M Y
301 aagagttgtgctgaaatgggtgcatgggtgtgtatcaagtgaatctcagattcctgccaat
101 K S C A E M V H G V Y Q V N L R F L P N
361 gagactatgagcaaccagggttgtaacctaccggctcagctgtcctgccactcaagctgat
121 E T M S N Q V V T Y R L S C P A T Q A D
421 gaggtcctgggtcacaatgtagctcccacaaactgtaccaaggatttcatgtctgtttca
141 E A L G Q M L A P T N C T K D F M S V S
    
```

```

481 ttttcacagatcctacccagttttgatgatgaaactatgggtacagaacctcaaacagct
161 F S Q I L P S F D D E T M G T E P Q T A
541 tggagtgtcattgtgggtgatagcccaaaatgcaaacccttacactgcaggaagccatg
181 W S V I V G D S P K M Q T L T L Q E A M
601 cagcgggggtacagtttcatcattgagaacagcaaaatcatctttcgagtgtccttcgat
201 Q R G Y S F I I E N S K I I F R V S F D
661 gctgtggagtctcacactatgagcaagaaaacaatcacctgtatactgtggctctcaaa
221 A A G V S H Y E Q E N N H L Y T V A L K
721 cttacatatggacctcctgaacagaggcttaccctctcatcccggatggtttgcataatta
241 L T Y G P P E Q R L T L S S R M V C I L
781 ggtccagccacctgtaattcaacgcacatgactcttattatacccaggtttccaggggtg
261 G P A T C N S T H M T L I I P E F P G V
841 ctgacagccataaatatagacaatcataatggtcccatgaattcgtcaaagatcagtggtc
281 L T A I N I D N H N V P M N S S K I S G
901 attgctgtagagtcaagaaatggctcaagattacatttcaacaaaagaattctgaaatct
301 I A V E S R N G S R L H F N K R I L K S
961 aaagtgtctgagaatgggtgcaggtattcagttttacttaccttcagtaaagactgactttt
321 K V S E N G A G I Q F Y L P S V K L T F
1021 caatattatggagagatggatctgtgatcacctatcctgaattctgccagtcctcctgtt
341 Q Y Y G E M V S V I T Y P E F C Q S P V
1081 tcagtattacagatagcacatgtaccctgatggctttatggactttgaagtctacagt
361 S V V T D S T C T P D G F M D F E V Y S
1141 caccaaacgaagccagccttgaacctggatagcgtccaagtaagagatacagcctgtcag
381 H Q T K P A L N L D T L Q V R D T A C Q
1201 ccggtttttaagaatccctctcaggacatggttcgtatttcacatacccctgaatgggtgt
401 P A F K N P S Q D M V R F H I P L N G C
1261 ggaacaagagcaaagtttgaaggagaccaagctatctatgaaaacgaaatccatgctctt
421 G T R A K F E G D Q A I Y E N E I H A L
1321 tggacagatctcccccaagcaaaattactagagacagtgaattcagtctgacagtgaga
441 W T D L P P S K I T R D S E F S L T V R
1381 tgctactataaccagcactgacctcatagtcagaacaaatatacagcagtcctccttctcca
461 C Y Y T S T D L I V R T N I S S P P S P
1441 attgcttcagtgaaccaggaccactttccttaatccttcaaatctatccagacaagtcc
481 I A S V K P G P L S L I L Q I Y P D K S
1501 tatctgcagccttatagggatgatcagatccaatagtgaatacctgcgtcaaccgatt
501 Y L Q P Y R D D Q Y P I V K Y L R Q P I
1561 tacatggaagttcaagttgtaaatagaaatgaccaagcatcaaactcgtcttagatgac
521 Y M E V Q V V N R N D P S I K L V L D D
1621 tgctggggcgacattatcagcggaccctacatctcttccccgatggaatgtcattgtggat
541 C W A T L S A D P T S L P R W N V I V D
1681 ggctgtgattatacactggacaactaccgcacaaaattccaccatgtaggctcttcagtg
561 G C D Y T L D N Y R T K F H H V G S S V
1741 aactatoccaatcactaccaaaaggttcgaagtgacaacttttgctttgtatctgggtggc
581 N Y P N H Y Q R F E V T T F A F V S G G
1801 caagctctcactagcctgatctatttccattgacgctcttgctctgtgaccaattctat
601 Q A L T S L I Y F H C S V L L C D Q F Y
1861 ccagattctcctttgtgttctgtgacttgtcctggatcatctaggatgaaaagagacatc
621 P D S P L C S V T C P G S S R M K R D I
1921 attgaagaaaagtctacaatagcaagcttctcctggacctgtctttttggatcagatcag
641 I E E K S T I A S L P G P V F L V S D Q
1981 gtcccttcatttagaggaccacggacgctgaagggcctaggtataaaggaacaagtatt
661 V P S F R G P T D A E G P R Y K G T S I
2041 gctcttcaagtaggggtctgtcttaataggagagatatttgttggcagtgctttgtctg
681 A L Q V G S V L I G E I F V V A V L C L
2101 gttaaatgtatgccaagcaggacaagagctgtgagttaa
701 V K C M P S R T R A V S -

```

Figura 24. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos amplificada de ZP2 del wallaby de Bennett. Los codones de inicio y fin se muestran en rosa. El péptido señal aparece en verde. El dominio ZP aparece en rojo. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en naranja.

```

1 atggctgagggaggctgttcttggcctggctcttgaagagctatgactcatgggtcctcc
1 M A E G G C S W P G L G R A M T H G S S
61 agccttctccctttccctcttctgctcctgatgcttaccgggacttcttggcaggcaccc
21 S L L P F P L L L L M L T G T S W Q A P
121 tattctcccagcctgtgcaggtacagtgcctggagtcaccagatggtagtcagtgttcaa
41 Y S P Q P V Q V Q C L E S Q M V V S V Q
181 agagatctgttggcactgggaagttgggtcaaagcagtgaccttagcctgggccagag
61 R D L F G T G K L V K A V D L S L G P E
241 ggctgcaggcctgcaactttgcaagaagatgcccaagtagtcacctttgaggtcggcctc
81 G C R P A T L Q E D A Q V V T F E V G L
301 catgagtggtgagtggtgtgcaggttaactccagatgggctgatttaccgcacaagcttg
101 H E C G S V V Q V T P D G L I Y R T S L
361 ttctaccacccacgcccagttggaaatttaccatcttaaggactaatcaggcggaaagt
121 F Y H P R P V G N F T I L R T N Q A E V
421 cccattgaatgtcactatccttaggtgggccaatgtcagcagcagagatatccagcctacg
141 P I E C H Y P R W A N V S S R D I Q P T
481 tgggtgccttccagatccaccatagcttcggaacagaagcttggccttttctctgcgctg
161 W V P F R S T I A S E Q K L G F S L R L
541 atgaatgatgactggctcagctgagagtacctcggctcagttccagctgggtgacaaagcc
181 M N D D W S A E S T S A Q F Q L G D K A
601 caccttcaggctgaagtccacacgggcagccatgtggcctgagactctttgttgatcac
201 H L Q A E V H T G S H V A L R L F V D H
661 tgtgtggccaccctaagcccagacaagaactcagagccccgtcatggtatcattgatcac
221 C V A T L S P D K N S E P R H G I I D H
721 catgggtgyctggtagatggcctttctgattcctcttctgccttccaagcccccggtc
241 H G X L V D G L S D S S S A F Q A P R P
781 aagccagatactctccaattcacagtgatgtgttccacttcgtcaatgattctcggaaa
261 K P D T L Q F T V D V F H F V N D S R K
841 ctgatctatattacatgccatctgagggctcactgccaactgaccaagccccagaccagata
281 L I Y I T C H L R V T A T D Q A P D Q I
901 aacaaggcctgttccttcaacaagtcattaatagctgggttccagtagaaggacctcct
301 N K A C S F N K S I N S W F P V E G P P
961 gacatttgcagatgctgcaacaccaaagactgtggacacctaaacaggtccaggagacta
321 D I C R C C N T K D C G H L N R S R R L
1021 cttcctatctcttcaargctgttgcaacagcgacaagaaagagaagcagacatcactggt
341 L P I S S X L L Q Q R Q E R E A D I T V
1081 gggcctgtgttcttggcactgaatgtcagccaccacaccccatgggagcccaaccggat
361 G P V F L A L N V S H H T P W E P N P D
1141 tttgtggaaaagtacgcagcccttagcctgggcctgtccctgattgctgtcttgggtttc
381 F V E K Y A A L S L G L S L I A V L V F
1201 accttagtcatcatggctctaa
401 T L V I M A L

```

Figura 25. Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos de ZP3 del wallaby de Bennett. Los codones de inicio y fin se muestran en rosa. El péptido señal aparece en verde. El dominio ZP aparece en rojo. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en naranja.

5.1.2 DUPLICACIONES DEL GEN *ZP3* EN MARSUPIALES

Meslin y colaboradores describen en 2012 una duplicación del gen *ZP3* en el genoma de la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*). Esto nos llevó a realizar un análisis *in silico* del genoma de dicha especie para buscar la duplicación de *ZP3* y observamos que en esta especie había tres copias de *ZP3*, aunque una de ellas presentaba codones de stop en su secuencia.

Por orden de antigüedad, decidimos denominar a estas tres copias *ZP3*-a (siendo la más antigua), *ZP3*-b y *ZP3*-c (siendo la más reciente), como ya han hecho otros autores anteriormente en casos similares (Bhat *et al.*, 2014).

De modo que, en *Monodelphis domestica*, habría dos copias de *ZP3*: *ZP3*-b cuyo número de acceso es ENSMODP00000017449 y *ZP3*-c cuyo número de acceso es ENSMODP00000038840, además observamos la presencia de una tercera copia que se correspondería con *ZP3*-a pero que carece de secuencia codificante puesto que presenta 4 codones de stop en su secuencia en posiciones: 25-27, 124-126, 226-228 y 232-234 (Fig. 26).

```

1 atgaccccaggacttgctgatctatagcaccatgctccattatgcacccagcctctccca
1 M T P G L A D L - H H A P L C T Q P L P
61 gagcccaactggctcctcagaagcagtcctgtaacagtcctccatccagtgcaatacccaag
21 E P T G P Q K Q S C N S P H P V S I P K
121 gagtgacaacgtgagcagcagaaccattcttcccacttgggtccctttccattctaccct
41 E - Q R E Q Q N H S S H L G P F P F Y P
181 gtccagggagcagcggctcagattctcccttcgcctcatggcaaatgactgtaggacaga
61 V Q G A A A Q I L P S P H G K - L - D R
241 gagggcctcttcaatcttccagctgggggactccatcatttccaggctgatgtctacact
81 E G L F N L P A G G L H H F Q A D V Y T
301 ggctaccatgtgcccttgaggatctttagatagctacacagccaccttgactccagat
101 G Y H V P L R I F V D S Y T A T L T P D
361 ccagcctctgtcccctaccatattggcattgacttcaatgggtgcctgggtggacggcaaa
121 P A S V P Y H I G I D F N G C L V D G Q
421 tcaggagactcttcttcaatcttcttcttccgcgccagggcaaatgtgttgtgttctc
141 S G D S S S I F I S P R P R Q I V L C F
481 aaggtagactctaagaaccagatctatgtcaactgccccctaaaagccacagccactgac
161 K V D S K N Q I Y V N C P L K A T A T D
541 caggccccagtgccataactcagcaggtgatgggtgggaacctgtggaaggccctagtg
181 Q A P S A I T Q Q V M G G N L W K A L V

```

```

601 acatctgcagctgcagggacctgcacatctctctcagcatccaagaaacagagcctggtg
201 T S A A A G T C T S L S A S K K Q S L V
661 gaccaggagccag
221 D Q E P

```

Figura 26. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZP3-a de *Monodelphis domestica*. En rojo se muestran los codones de stop.

Por otro lado, el estudio del genoma de las otras dos especies de marsupiales disponibles en GenBank y Ensembl nos ha permitido detectar igualmente tres copias de ZP3 en el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisi*) y en el wallaby de Tammar (*Macropus eugenii*).

Mientras que, el análisis de la secuencia de ZP3 de la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*) depositada por McCartney y Mate en 1999, se corresponde con la copia ZP3-a. Podríamos pensar que esta especie, que pertenece al mismo orden que el wallaby de Tammar (Diprotodontia), también podría presentar varias copias de ZP3 en su genoma aunque sólo se haya descrito una de ellas.

La disponibilidad de muestras de ovario del wallaby de Bennet, nos permitió estudiar la presencia del ARNm de estas tres copias en el ovario del mismo (Fig. 27). Como hemos mostrado en el apartado anterior, junto con ZP1, ZP2 y ZP4 se amplificó un fragmento correspondiente a ZP3. Según los análisis filogenéticos realizados se trataría de ZP3-c, la copia de ZP3 más reciente y que se encuentra más próxima a la ZP3 de mamíferos (Fig. 27). Pero además, también hemos amplificado el marco abierto de lectura correspondiente a ZP3-a y ZP3-b, que fueron depositadas en el GenBank con los siguientes números de acceso: KP057617 para ZP3-a, KP057616 para ZP3-b y KP057618 para ZP3-c.

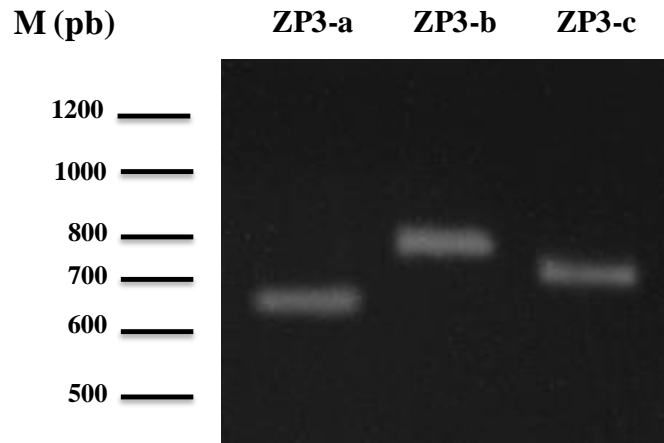


Figura 27. Análisis de la expresión génica de ZP3-a, ZP3-b y ZP3-c en el ovario del wallaby de Bennett mediante RT-PCR. Se muestran los amplicones correspondientes a fragmentos amplificados de cada transcrito.

La comparación de las tres secuencias de ZP3 amplificadas en el wallaby de Bennett con las secuencias de ZP3 de la rata y la ratona presentan distinto grado de similitud; siendo la similitud mayor entre ZP3-c y las secuencias de estos mamíferos (Tabla 17). El número de sitios potenciales de N-glicosilación varía entre las distintas ZP3, siendo de 3 en ZP3-a (Asn123, Asn149 y Asn306), de 4 en ZP3-b (Asn11, Asn142, Asn170 y Asn327) y de 5 en ZP3-c (Asn129, Asn151, Asn276, Asn307 y Asn335) (Fig. 28).

ZP3-b	MGQGGGL-----VGCLFLLLVLNDELVSVDLCGSSGSRSPLRDSDSSRLDHKS	46
ZP3-a	-----MTLGA-RL-VSVLLLW-----ALQGGD--WAGTK-----VL	25
ZP3-c	MAEGGCSWPGLGRAMTHGSSSLLFPPLLLL-----MLTGTS--WQA-----	39
Ratona	MASSYFL---FLCLLLCCGGPELCN-SQTLW-----LLPGGT--PTP-----	35
Rata	MGPSCLL---FLCLLLCCGGPELCY-PQTQW-----LLPGGT--PTP-----	35
	* *	
ZP3-b	SLIRSSSRGHGAHTQLLPVRVQCLEMKLVANIQRDLFGKGLIHPSDLTLGSGACQYTAF	106
ZP3-a	SWVTQHPALGSPFSPPPVVDVQCEDDRLVSVNRDFFGTGQLVQAAELTLGPSACAPMPA	85
ZP3-c	-----PY-SPQPQVQCLESQMVSVQRDLFGTGKLVKAVDLSLGPEGCRPATL	87
Ratona	-----VG-SSSPVKVECLEAELVVTVSRDLFGTGKLVQPGDRTLGSSEGCQPRV-	82
Rata	-----AG-SSSPVEVECKEAELVVTTARRDLFGTGKLVQPGDRTLGSSEGCQPLV-	82
	* * * * : : * . . * * * * . * * * : : * * * * . *	
ZP3-b	YESNNTIVFEAGLHECGSRLQVTTDLLVYSINLYNPTPIGNSVILRNSPAVILIECSYP	166
ZP3-a	DPLNKRVI FEVGLHECGSELQMT PDSFIYSTVLHYTPNLSQSPVVLRSPPVSVPIQCQYP	145
ZP3-c	QEDAQVVT FEVGLHECGSVVQVTPDGLIYRTSLFYHPRPVGNF TILRTNQA EVPIEC HYP	147
Ratona	SVDTDVVRFN AQLHECSSRVQMTKDALVYSTFLLHDP RPVSGLSILRTNRVEVPIEC RYP	142
Rata	AVDTDVVR LNAQLHECSSGVQVTE DALVYSTFLLHDP RPVNGLSILRTNRVEVPIEC RYP	142
	. : : . . * * * * . * : * * * * : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * * * * . . : * * * * *	

ZP3-b	RRSNVSSRAMQPTWTFPSSSTLSSQTGLKFTLQMLTDDWSTKRASSYQLGDVISLQADV	226
ZP3-a	RRDNVSSRAILPTWVPFHSTLSREQRKFLSLRLMADDWSTERISSAFQLGDLIHQAQEVY	205
ZP3-c	RWANVSSRDIQPTWVPFRSTIASAQKLGFLSLRLMDDWSAESTSAQFQLGDKAHLQAQEVH	207
Ratona	RQGNVSSHPHQPTWVPFRATVSSEKLAFLSLRLMEENWNTEKSAPTFHLGEVAHLQAQEVQ	202
Rata	RQGNVSSHPHQPTWVPFSATVSSEKLAFLSLRLMEEDWNTEKSSPTFHLGEVAHLQAQEVQ	202
	* ****: : ***.** ::: : * *:*:* :*: : : : **:	
ZP3-b	TGSHVTLRFLFIDS CVATSK--PNQDSSPRYALIDFHGCLVDGGQSENVGSTFISPRSKPET	284
ZP3-a	SGYHVPLRFLVDRC TATILT--PDPVSVPYHVIIDFNGCLVDGGQSHDSSSIFISPRPGQNV	263
ZP3-c	TGSHVALRFLVDH CVATLS--PDKNSEPRHGIIDHGGCLVDGLSD-SSSAFQAPRPKPD	264
Ratona	TGSHLPLQLFVDH CVATPSPLPDPNSSPYHFIVDFHGGCLVDGLSE-SFSAFQVPRRPET	261
Rata	TGSHLPLQLFVDH CVATPSPLPGQNSSPHHFIVDSHGCLVDGLSE-SFSAFQVPRRPET	261
	: * *: *:*:* * *.** . * * * : : : * . * **** * . * * * * : .	
ZP3-b	LQFIVDAFKFSREAKDQIYITC HLKVT EASDFPDP SNKACSFNKSSQEWSPVEGTD DICS	344
ZP3-a	LRFMVDSFRFAQDSRNEIYITC HLKVT TDQVPSPLNKACSYNLTTDMWVPVEGSDICT	323
ZP3-c	LQFTVDVFHFV NDRKLIYITC HLRVTATDQAPDQINKACSFNKSSINSWFPVEGPPDICR	324
Ratona	LQFTVDVFHFANSSRNTLYITC HLKVAPANQIPDKLNKACSFNKTSQSWLPVEGDADICD	321
Rata	LQFTVDVFHFANSSRNTVYITC HLKVAPANQIPDKLNKACSFNKTSQSWLPVEGDADICD	321
	: * * *: * ..: : : : : *****: : : * . ***** * : : * **** **	
ZP3-b	CCETGSCRKGHVPNKLRSHWKRKNLYWKDVPRKENEADVAGPLVISDVTMHPSSITSQ	404
ZP3-a	CCKTRTCTHLSSSRKRS LANQ-----ELGNPSELEADLMLGPLVLSEANGPKLGEEN	376
ZP3-c	CCNTKCGHLNRSRRLLPIS-----XLLQQRQEREDITVGPVFLALNVSH--HTPW-	375
Ratona	CCSHGNCSSSSSQFIHGPRQWSKLVSRNRRHVTD EADVTVGPLIFLGKANDQTVEGW-	380
Rata	CCSNGNCSSSSSEFETHEPAQWSTLVSRRNRHVTD EADVTVGPLIFLGKANDQAVEGW-	380
	** . * . . . *****: ** : : :	
ZP3-b	EKRARTNSQGLEKAPKTVILAAG--FVVFYLS CYSHGKI-----	441
ZP3-a	NVGDIP---E--WPE LLLLLMVGVAATVCLVLC LIVGSHKYRFP CSRNV-----	420
ZP3-c	--EPNP---D--FVEKYAALS LGLSLIAVLVFTLVIMAL-----	407
Ratona	--TASA-----QTSVALGGLATVAFLTLAAIVLAV TRKCHSSSYLVSLPQ	424
Rata	--TSSA-----QTSVALGGLATVAFLTLAAIVLGV TRMCHTSSSYLVSLPQ	424

Figura 28. Comparación de las secuencias de aminoácidos de ZP3-a, ZP3-b y ZP3-c del wallaby de Bennett con las secuencias de ZP3 de la ratona y la rata. Los números de acceso de las secuencias usadas son: ZP3-a (KP057617), ZP3-b (KP057616) y ZP3-c (KP057618) ratona (NP_035906) y rata (NP_446214). Aminoácidos idénticos se indican con asterisco (*). Dos puntos (:) indican residuos conservados y punto (.) residuos semiconservados. El dominio ZP se muestra en rojo y el dominio transmembrana se señala en naranja. El sitio consenso para corte de furina está subrayado.

Tabla 17. Porcentaje de similitud de ZP3-a, ZP3-b y ZP3-c del wallaby de Bennett con ZP3 de ratona y rata.

ZP3 (Porcentaje de similitud %)					
	ZP3-a	ZP3-b	ZP3-c	ratona	rata
ZP3-a	---	50	52	46	45
ZP3-b	50	---	52	49	49
ZP3-c	52	52	---	53	52

Con las secuencias analizadas en los distintos marsupiales se construyó un árbol filogenético donde se observa la relación existente entre las diferentes copias del gen *ZP3* (Fig. 29).

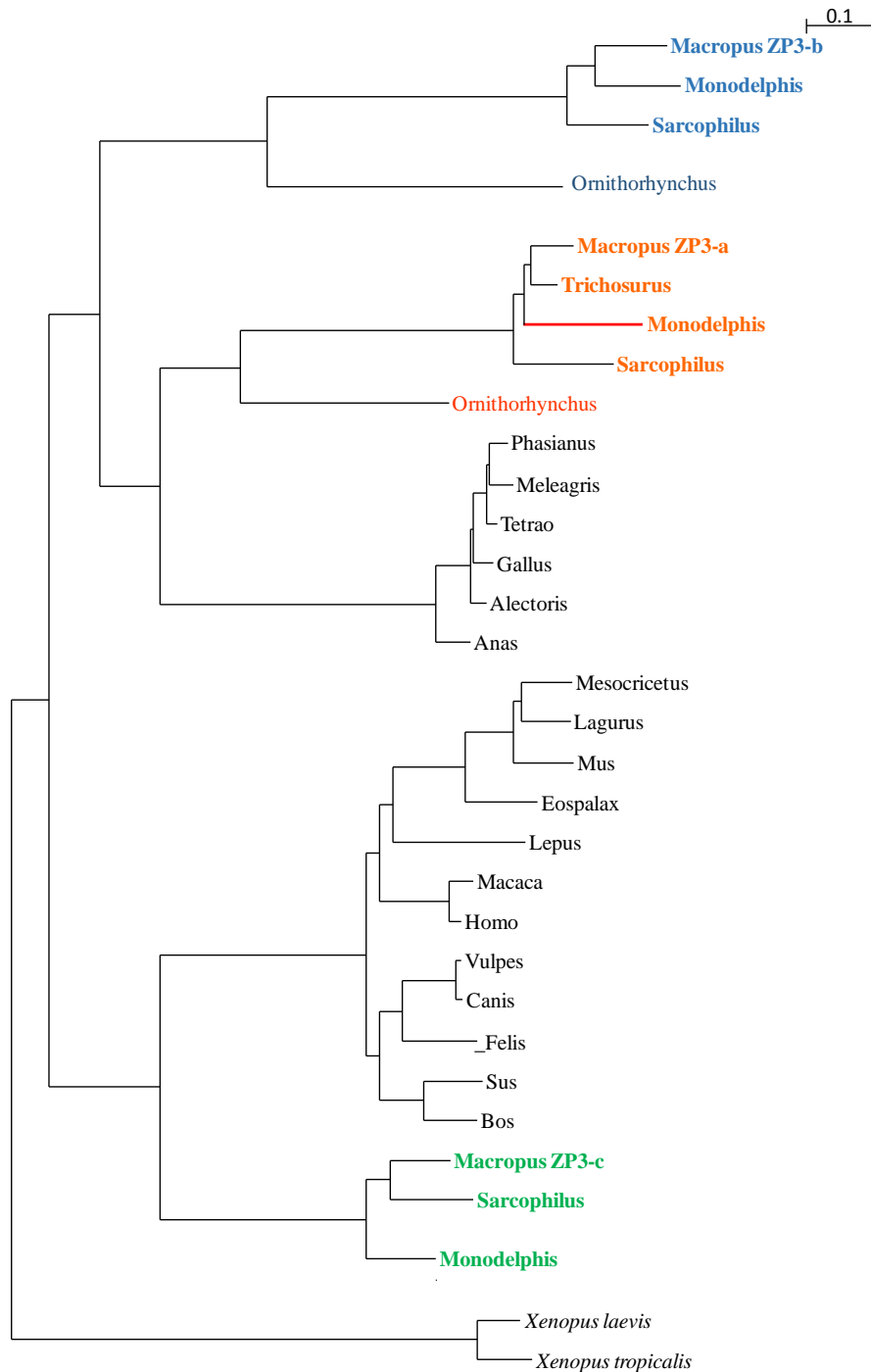


Figura 29. Árbol filogenético de *ZP3*. Se observa la presencia de tres copias del gen *ZP3* en marsupiales. En naranja se indica *ZP3-a*, en azul se indica *ZP3-b* y en verde se indica *ZP3-c*. La rama en rojo indica pseudogenización.

5.1.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ZP4 EN MARSUPIALES

Para el análisis del gen *ZP4* en marsupiales se utilizaron las secuencias disponibles en el GenBank y Ensembl de tres marsupiales: el demonio de Tasmania, el wallaby de Tammar y la zarigüeya de cola corta, así como la secuencia de *ZP4* depositada para la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*) (Haines *et al.*, 1999).

El análisis *in silico* realizado del gen *ZP4* de estos marsupiales, nos ha permitido detectar diferencias en la composición de la ZP en las distintas especies.

En el genoma de la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*) hay una secuencia similar a *ZP4* en el cromosoma 2. Los exones putativos de esta zarigüeya presentan entre 78 y 80% de similitud con los exones de *ZP4* de otros marsupiales (*Trichosurus vulpecula*, *Macropus eugenii*, *Sarcophilus harrisi*). Sin embargo, esta secuencia presenta grandes *indels*, un AAG en vez del ATG inicial y un codón de stop en posiciones 181-183. Estos resultados indican que *ZP4* en la zarigüeya de cola corta es un pseudogén (Fig. 30).

Mientras que, el análisis de *ZP4* de las otras tres especies estudiadas: el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisi*), el wallaby de Tammar (*Macropus eugenii*) y la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*) indica que hay un codón de iniciación (ATG) y no se observan codones de stop en la secuencia (Fig. 30).

Además, como hemos mostrado en el apartado 5.1.1.1.2, la secuencia completa de *ZP4* en el wallaby de Bennett ha sido amplificada, indicando que *ZP4* sería funcional en esta especie, al igual que en las tres especies citadas anteriormente.

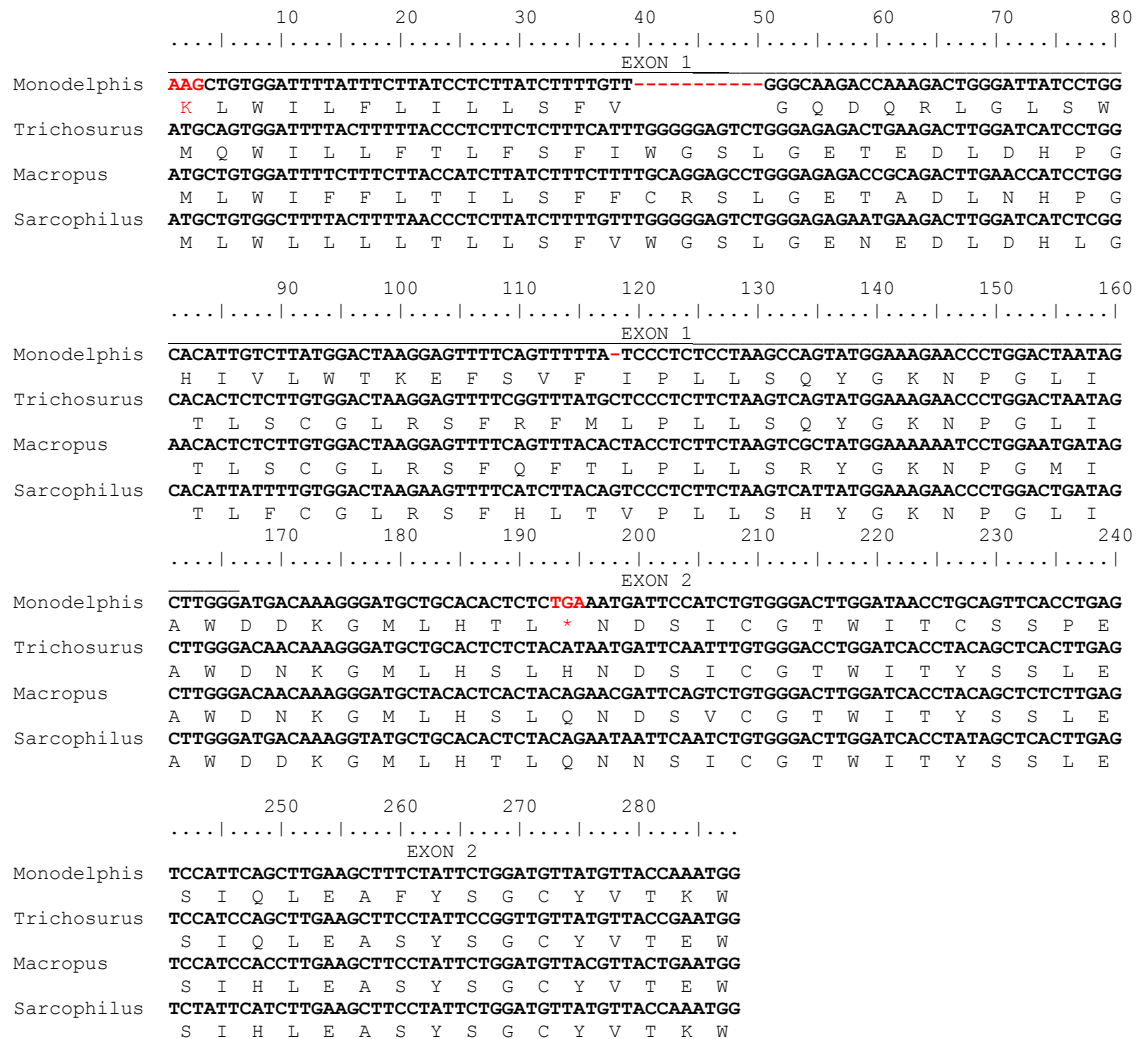


Figura 30. Alineamiento de los exones 1 y 2 de *Monodelphis domestica*, *Trichosurus vulpecula*, *Macropus eugenii* y *Sarcophilus harrisii*. Los indels, codones de stop y la modificación del ATG inicial de *Monodelphis domestica* se indican en rojo.

El análisis filogenético realizado para *ZP4*, indica que la pseudogenización de dicho gen no ha afectado exclusivamente a los marsupiales, sino que está presente en otras especies de mamíferos, concretamente en el armadillo (Género *Dasybus*) y en el perezoso (Género *Choloepus*) pertenecientes al superorden *Xenarthra*. Teniendo en cuenta la descripción previa del pseudogén *ZP4* en el ratón común, serían cuatro las especies de mamíferos en las cuales *ZP4* estaría pseudogenizada (Fig. 31).

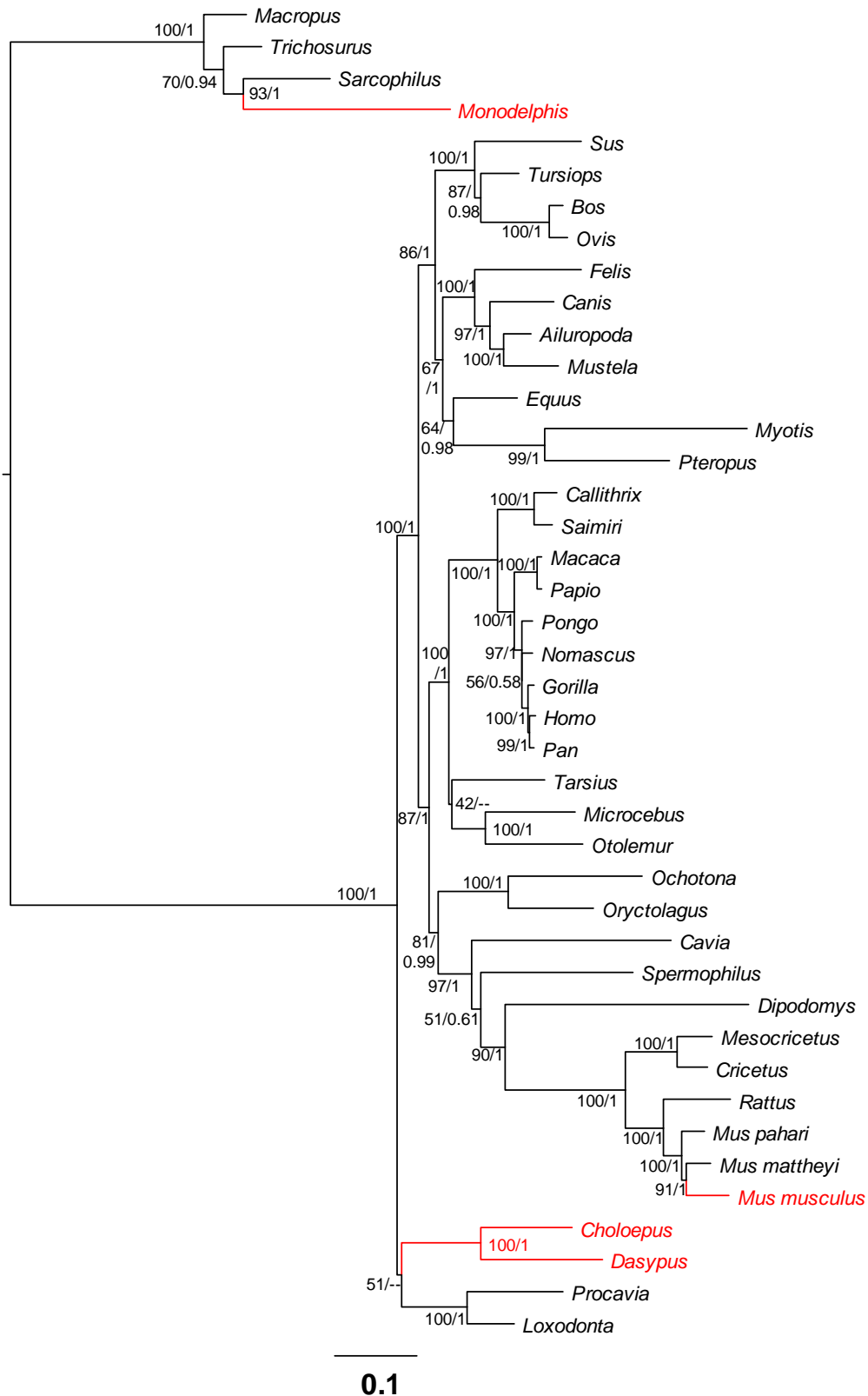


Figura 31. Relación filogenética del gen *ZP4* en diferentes especies de mamíferos. A nivel de cada rama se indica el valor de bootstrap y de inferencia bayesiana del nodo al que se dirige la rama. Las ramas en rojo indican pseudogenización.

El hallazgo de la pseudogenización de *ZP4* en la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*), nos llevó a estudiar la presencia de dicho gen en otros marsupiales mediante el uso de técnicas de biología molecular. Para ello, empleamos ADNg de un marsupial sudamericano, la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*) perteneciente al orden Didelphimorphia de la cohorte Ameridelphia y de un marsupial australiano, el koala (*Phascolarctos cinereus*) perteneciente al orden Diprotodontia de la cohorte Australidelphia.

En el estudio realizado en la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*) se observa la ausencia de un codón de iniciación en su secuencia (ATG), el cual ha sido sustituido por ATT y 5 codones de stop en posiciones 97-99, 127-129, 154-156, 157-159 y 190-192. Además, en esta especie, al igual que en la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*) se observa un largo indel en la secuencia (Fig. 32). Sin embargo, en el mismo estudio en el marsupial australiano analizado, el koala (*Phascolarctos cinereus*), no se observan codones de stop en su secuencia (Fig. 32).

```

Phascolarctos -----TGCTCTCTCTCTTTTGTGTTGGGGAGTCTGGGAGAGAC 39
Monodelphis  AAGCTGTGGATTTT-ATTTCTTATCCTCTTATCTTTTGT-----GGGCAAGAC 48
Didelphis    ATTCTGTGGATTTTATTTCGTATCCTCTTATCTTTTGTGTTAGGGTTTCTGGGCAAAAC 60
              *      *****
Phascolarctos TGAAGAGTTGGAACATCGTGGCACATTCTCTTGTGGACTAAGGAGTTTTCAGTTTACACT 99
Monodelphis  CAAAGACTGGGATTATCCTGGCACATTGTCTTATGGACTAAGGAGTTTTCAGTTTFTA-T 107
Didelphis    -AAAGATTGGGATT-GCCTGGCCATTGTCACATGGACTAAAGGAGTTTTCAAATTTATTCT 118
              **** * *** * ***** ** *****
Phascolarctos TCCTCTTCTAAGTCAGTATGAAAGAACCCTGGACTAATAGCTTGGGGTAAGGATGAAAA 159
Monodelphis  CCCTCTCCTAAGCCAGTATGAAAGAACCCTGGACTAATAGCTTGGGATGACAAAGGGAT 167
Didelphis    CCCTCTTCTAAACCAGTATGAAAGAACCCTGGACTAATAGCTTGGGATGCTAAAGGGAT 178
              ***** *****
Phascolarctos AACAAAAAACACCTAACTTGGGACAATCAAGGGACGCTGCACTCTCTGCAGAATGATTC 219
Monodelphis  GCTGCACA-----CTCTCTGAAAATGATTC 191
Didelphis    GCTGCAAA-----CTCTGAAATTATTC 200
              * * ** ** **
Phascolarctos AAGCTGTGGGACTTGGATCACCTACAGCTCACTTGAGTCTATCCAGCTA----- 268
Monodelphis  CATCTGTGGGACTTGGATAACCTGCAGTTCACCTGAGTCCATTGAGCTTGAAGCTTTCTA 251
Didelphis    CATCTGTGAGACTTGGATACCCTATAGCTCACCTGAGTCCATTGAGTCCAGTAAAGTTTCT 260
              * ***** ***** ** ** ***** **
    
```

Figura 32. Alineamiento de los exones 1 y 2 de *ZP4* de *Monodelphis domestica* (zarigüeya de cola corta), *Didelphis marsupialis* (zarigüeya común) y *Phascolarctos cinereus* (koala). Los codones de stop se muestran en rojo y la modificación del ATG inicial se muestra en verde.

En resumen, tomando conjuntamente los datos de los análisis *in silico* y los obtenidos mediante análisis por biología molecular; los resultados indican que el gen *ZP4* se encuentra pseudogenizado en los dos marsupiales sudamericanos estudiados: *Monodelphis domestica* y *Didelphis marsupialis*, pertenecientes al orden Didelphimorphia. Mientras que, en los marsupiales australianos analizados: *Macropus eugenii*, *Macropus rufogriseus*, *Phascolarctos cinereus*, *Sarcophilus harrisi* y *Trichosurus vulpecula* *ZP4* no se encontraría pseudogenizado (Fig. 33).

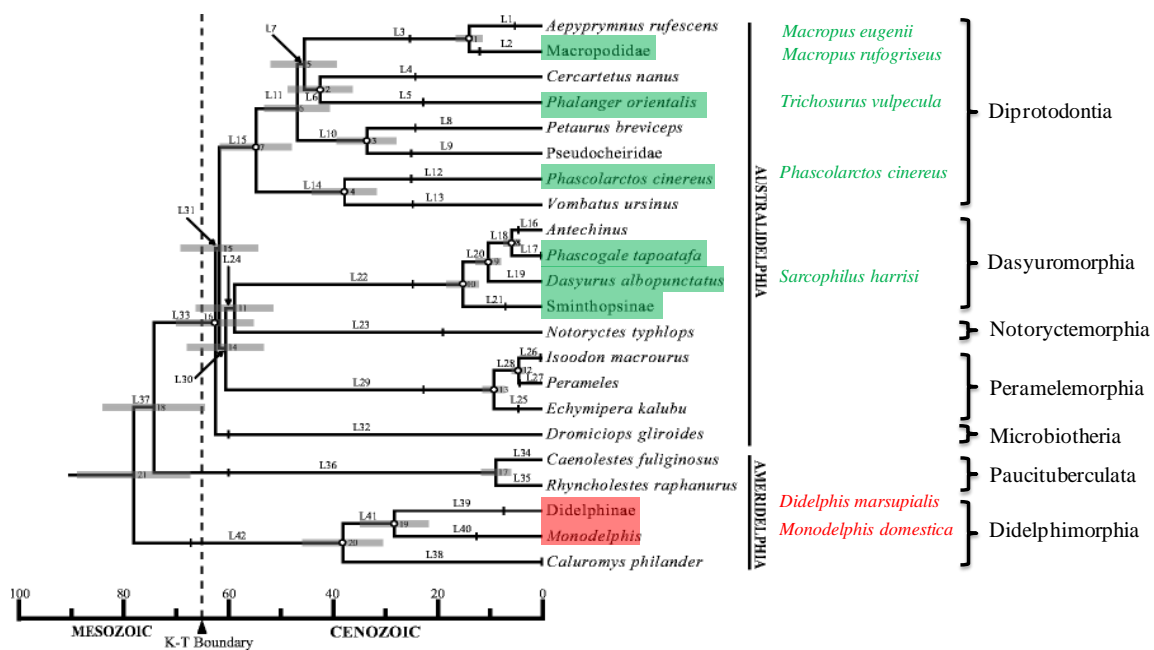


Figura 33. Árbol filogenético de los marsupiales y la evolución del gen *ZP4*. En verde están indicadas las especies analizadas con un gen *ZP4* funcional. En rojo se indican las especies analizadas con pseudogenización de *ZP4* (Modificado de Meredith *et al.*, 2008).

5.2 ANÁLISIS DE LA ZONA PELÚCIDA DE ROEDORES

5.2.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ZONA PELÚCIDA EN ROEDORES DE LA SUBFAMILIA MURINAE

5.2.1.1 Análisis de las secuencias de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en roedores

La ZP del ratón (*Mus musculus*) está formada por las glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3, mientras que ZP4 es un pseudogén (Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008).

El género *Mus*, está formado por 4 subgéneros: *Mus*, *Pyromys*, *Nannomys* y *Coelomys* (Musser y Carleton, 2005). Estudios anteriores realizados con ADNg de diferentes especies de roedores pertenecientes a los distintos géneros, indicaron que la pseudogenización de ZP4 únicamente afectaba al subgénero *Mus* (Tesis Doctoral Izquierdo-Rico, 2009). Nuestro objetivo consistió en la amplificación de distintos fragmentos de las 4 glicoproteínas de la ZP, en tres especies de la subfamilia Murinae: *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari* para determinar si la ZP estaba formada por 3 ó 4 glicoproteínas y así conocer el patrón evolutivo de esta subfamilia.

Se consiguió amplificar el marco abierto de lectura completo de ZP1 y ZP4, así como fragmentos de ZP2 y ZP3 en *Mus mattheyi* y *Mus pahari* (Fig. 34).

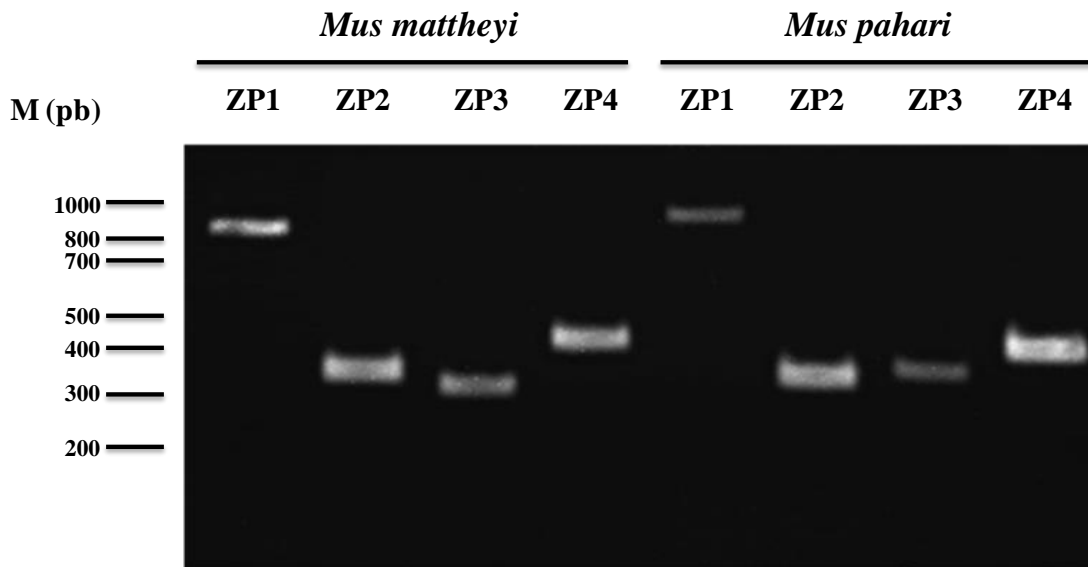


Figura 34. Análisis de la expresión génica de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en el ovario de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* mediante RT-PCR. Se muestran los amplicones correspondientes a fragmentos de cada transcrito.

En *Mastomys coucha*, igualmente se amplificaron fragmentos correspondientes a los cuatro transcritos (Fig. 35).

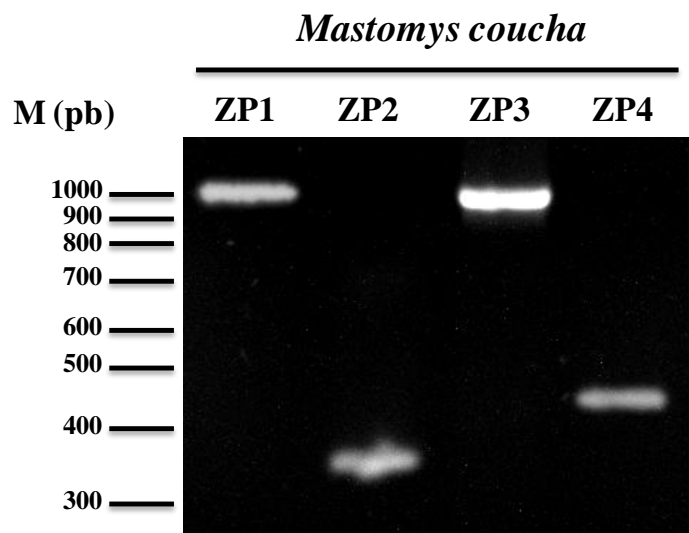


Figura 35. Análisis de la expresión génica de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en el ovario de *Mastomys coucha* mediante RT-PCR. Se muestran los amplicones correspondientes a fragmentos de cada transcrito.

5.2.1.1.1 Secuencias de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 amplificadas en *Mastomys coucha*

La secuenciación automática de los amplicones de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 obtenidos en *Mastomys coucha* indicaba que se trataba del ARNm de las 4 ZPs (Tabla 18).

Tabla 18. Secuencias obtenidas de los cuatro transcritos (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) en *Mastomys coucha*. Se indica la longitud de nucleótidos (nt) de cada secuencia, así como el fragmento que se ha amplificado.

ADNc	Secuencia de ADNc amplificada
ZP1 1872 nt	<p>54 ATGGGTCAGCGTCTGCCTCTCAAGCCTGGCTTTGAATACAGCTATGACTGTGGGGTACGGGGCATGCA GCTGCTGGTGTTCCTCCAGGCCAAACCAGACTATCCAATTCAGGTGCTGGATGAATTTGGGAACCGGTTTGA GGTGAATAACTGCTCTATCTGCTACCACTGGGTGACCAGTGAGGCCAGGACCTGCAGTATTTCTCAGCTGA TTACAAAGGCTGCCACGTGCTGGAGAAGGATGGGCAGTTCCACCTGAGGGTGTTCATACAAGCCGTCCTACC CAATGGCCGTGTGGATACAGCACAAGATGTCACTCTGATNTGTCCAAACCAGACCGCATCGTGACTCGGGA CCCCACCTGGCTCCACCCACCACCTGAGCCTTTTACACCTCATACTTTTGCCTTCACCCCATCACTAN CCACACCTTGGCTGGGTCTGGCTACTCTGGTCTCACTACGTGTGTACCCAGAGCACAGCAGCTTCACCCATCC GACTCTGCCACACCATCCCCAGGACCTGGACTTGTGGACCACCTGTGCCTCATCCCCAGTGGGGCAGCCT GGAGCCCTGGGAACTAAGTGAATGGATTTCTGTAGGTACCCATCTGCCCAAGAGCAATGTGCGGTAGCNTC TGGGCACATCCCATGCATGGTAAAAGGTAGTTCCAAGGAAGCCTGCCAGCAGGCTGGCTGTGCTATGACAA TACCAAAGAAGAGCCCTGTTACTATGGCAACTCAGTCACTCTCCAGTGTTCAAAAGTGGCTACTTTACCTT GGTCATGTGCAAGAAATGGCCTTGACACATGGGGTCATGCTGGACAATGTCCACCTGGCCTATGCCCCAA CGGATGCCCCCTACCCAGAAGACAAGTGCNTTNGTGGTCTTCCATGTCCCTCTCACCCCTGTGGAACGGC AATCCAGGTAGGAACGGAACCTAGGNTGGGGATGAGCACCACCTCTTAAGGGGCATCACCACCAGCTACCC CTTTATCCGCTGTGGTATCCTCATGGTTCAGTAGGGGTGAGATGCATGCTGGAAGTGAGTCCCACTCCTAG GGAGCCTCATCCACTACCTCCTCCTCAGGTGGTGGCGAACAACCTCATCTAA 1014</p>
ZP2 2142 nt	<p>1541 GCCAGCCAATCTACATGGAAGTACTGTCTTGAACAGGAACGATCCCAACATCAAGCTGGCCTTAGA TGACTGCTGGGCAACTTCTTCTGAGGACCCGGCCTGTGCCCCAGTGGCAGATTGTCATGGATGGCTGTGC ATATGAGCTGGACAACCTACCGCACTACTTTCCATTGAGCTGGCTCCTCTGTGGCCCATTTCTGGTCACTACCA GAGGTTTGTGTAAGACTTTTGCCTTTGTGTCAGAGGCAGGGAGCTCAACAGCCTGATTTACTTCCACTG CAGTGCCTTGATCTGTAACCAAGTCTCTCTGACTCCTCTCTGTGCTCTGTGACTTGCCA 1883</p>
ZP3 1275 nt	<p>208 TACCTCACCCCTGGCTCAGAAGGCTGTGAGCCCGGGTATCGGTGGATCCTGACGTGGTCAGGTTCAA CGCCAGTTGCAGAGTGCAGCAGCAGGGTGCAGATGACGAAAGATGCCCTGGTGTACAGCACCTTCTACT CCACGACCCCTGCGCCTGTGAGTGGCCTGTCCATCCTCAGGACTAACCCTGTGGAGGTACCCATTGAGTGCCG ATACCCAGGCAGGGCAATGTGAGCAGCCACCTATCCAGCCACCTGGGTTCCCTTCAGAGCCACTGTGTC CTCAGAGGAGAAACTGGCTTTCTCTCTGCTGATGGAGGAGAAGTGGAAATGAGAAATCGGCCTCCAC CTTCCACCTGGGAGAGGTAGCCACCTCCAGGCAGAAGTCCAGACTGGAAGCCACCTGCCGCTGCAGCTGTT TGTGGACCACTGCGTGGCCAGCCTTCACCTTTGCCAGACCCGAACCTCCTCCCCCTATCACTTCATCGTGG CTTCCACGGTTGCCCTGTGGATGGTCTATCTGAGAGCTTTTCCGCAATTCAGTCCCCAGACCCCGCCAGA GACTTCCAGTTACGGTGGATGATTTCCATTTTGGCAACAGCTCCAGAAATACGCTCTACATCACCTGCCA TCTCAAAGTCGCGCCAGCTAACCAGATCCCGATAAGCTCAACAAAGCCTGTTCGTTCAACAAGACTTCCCA GAGTTGGTTGCCAGTAGAGGGTGTGCTGACATCTGTGATTGCTGCAGCCATGGCAACTGTAGTAATTCAG CTCTTCACAGTTCAGATCCATGGACCCCGCAGTGGTCCAAGCTAGTTTCTCGAAACCCGAGGCACGCTGAC CGATGAAGCTGATGTCATCTAGGGCCCTGATATTCCTTGGAAAGGCCAACGACACAGACTGTGGAGGCTG GACTGCTTCTGCTCAAACCTCTGTGGCTCTTGGGTTAGGCTGGCCACAGTGGCATTCCTGACCCTG 1206</p>
ZP4 1629 nt	<p>1203 TTATCAGACCAAAGGATCCCTGTCCAGAAGCATCAGGCCCTTTCCGCTCTCATCGCCAGCGCTTC AGCATGCTACGTTTCTGCTCATGAGTGTGTAAGGGAGAAGCAGGTTTTAGGTGGACAGGTGACCTGCAC TGCAGTGCATCAGTCTGCCAGCCTGCTGGGATGCCATCCTGCATGATAATCTGCCCTGCTTCCAGGAGAAGA AGAAAATCTGAGCTTATTTTGGAGAACACCACAGCGTATCTAGCAAAGGCCCGTGTATCCTCCTCAAGCC ACGAAGGACCTGCAGAAACGCTTCATAGATACTCAAGCACCACAGTGGATTCTCCTGCTCTGTGGGTAGTG GGACTTTCTGCAACTGTGATCGTCATTGGAGTCTTGGTAGGATCTTACTTGGCCATCAGAAAATTGAGATGA AT 1629</p>

5.2.1.1.2 Caracterización de ZP1 en *Mus mattheyi* y *Mus pahari*

El ADNc de ZP1 contiene una secuencia de 1869 pares de bases en ambos roedores (Figs. 36 y 37). Los codones de iniciación (ATG) se predijeron con el algoritmo de Pedersen y Nielsen (1997) y se encuentran asociados con el entorno Kozak (Kozak, 1991). Las secuencias contienen un codón de stop (TAA) en las posiciones 1870-1872.

Las secuencias codificarían un polipéptido de 623 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 68.61 kDa para *Mus mattheyi* y 68.37 kDa para *Mus pahari*. En ambos casos, el péptido señal mide 20 aminoácidos, el dominio trefoil 44 aminoácidos, el dominio ZP 272 aminoácidos y el dominio transmembrana 23 aminoácidos, seguido por un corto tallo citoplasmático (Krogh *et al.*, 2001).

Las proteínas maduras se extienden desde Gln21 (*Mus mattheyi*) y Ala21 (*Mus pahari*), lugar donde corta el péptido señal hasta Arg546, aminoácido donde se encuentra el sitio consenso para corte de proteasas tipo furina (Duckert *et al.*, 2004). El peso molecular teórico del esqueleto proteico de las proteínas maduras sería de 58.36 kDa y de 58.07 kDa para *Mus mattheyi* y *Mus pahari* respectivamente.

```

1 atggccgtgggtggtggttgtgtggtccttctgctggcagcagctcctctacgattgggt
1  M A V G V V C V V L L L A A A P L R L G
61 cagcgtctgcatctcgagcctggccttgaatacagctatgactgtgggtacggggcatg
21  Q R L H L E P G F E Y S Y D C G V R G M
121 cagctgctgggtgttccccaggccaaaccagactgtccaattcaagggtgctggatgaattt
41  Q L L V F P R P N Q T V Q F K V L D E F
181 gggaaccggtttgaggtgaataactgctctatctgctaccactgggtgagcagtgaggcc
61  G N R F E V N N C S I C Y H W V S S E A
241 caggagcgcacagtggttctcagctgaatataaaggctgccatggttctggagaaggatggg
81  Q E R T V F S A E Y K G C H V L E K D G
301 cagttccacctgagagtggttcatacaagccgtcctacccaatggccgtgtggatgtagca
101 Q F H L R V F I Q A V L P N G R V D V A
361 caagatgtcactctgatctgtcccaaaccagaccacatcatgactccagacccttacctg
121 Q D V T L I C P K P D H I M T P D P Y L
421 gctccaccaccacacctgagccttttacacctcatacttttgcccttcacctcatccct
141 A P P T T P E P F T P H T F A L H L I P

```

```

481 ggccacaccttggtgggtctggccacactggccttactacgttgtaccagagcacagc
161 G H T L A G S G H T G L T T L Y P E H S
541 ttacccatccaactcctgctccaccatcccaggacctggacctgctggaccactgca
181 F T H P T P A P P S P G P G P A G P T A
601 cctcactcccaatggggcactctggagccctgggaattgactgagctggattctgtgggt
201 P H S Q W G T L E P W E L T E L D S V G
661 actcatctgccccaggagcagtgccaggatcctccaggcacatcccatgcatggtaaaa
221 T H L P Q E Q C Q V S S R H I P C M V K
721 ggaagtcctaaggaagcctgtcagcaggctggctgctgctatgacagtgccaaagaagag
241 G S P K E A C Q Q A G C C Y D S A K E E
781 ccctgttactacggcaacacagtcactctccagtggtttcaaaagtggtactttaccttg
261 P C Y Y G N T V T L Q C F K S G Y F T L
841 gtcattctgcaagaacagccttgacacacggagtcagctggtgacaatgtccacctggcc
281 V M S Q E T A L T H G V M L D N V H L A
901 tatgcctccaatggatgccccctaccagaagacaagtgcttttgggtctttcgtgtc
301 Y A S N G C P P T Q K T S A F V V F R V
961 ccttttacctctgtggaacaacaatccagggtggctggcgagcagcttatctatgagaac
321 P F T L C G T T I Q V V G E Q L I Y E N
1021 cagctgggtgtctgacattgatgtccaaaagggccacagggttccatcactcgggacagt
341 Q L V S D I D V Q K G P Q G S I T R D S
1081 gtcttcgggttcacgttcgctgcatcttcaatgctagtgatttctgcccattccaggca
361 V F R L H V R C I F N A S D F L P I Q A
1141 tctatcttctcacctcaaccacctgccccctgactcagctctggaccctgaggctggaa
381 S I F S P Q P P A P V T Q S G P L R L E
1201 ctgaggattgccacggataagactttcagctcctactatcaggggagtgactatcccctt
401 L R I A T D K T F S S Y Y Q G S D Y P L
1261 gtgagactgcttcaggagccagtcctatgtagaggtccgactcctacagagaactgatccc
421 V R L L Q E P V Y V E V R L L Q R T D P
1321 agtctggttctggtgctacaccagtgctgggcccacaccaccgcccagccccattgagcag
441 S L V L V L H Q C W A T P T A S P I E Q
1381 ccccaatggcccattctgtcagatgggtgtcctttcaaggggtgacaactacagaacacaa
461 P Q W P I L S D G C P F K G D N Y R T Q
1441 gtgggtggccacagacaaggaggcgcttcccttctgggtcccactatcagcgcttcaccatc
481 V V A T D K E A L P F W S H Y Q R F T I
1501 gccaccttcacactccttgacttcagttcccagaatgcccttaggggacaggtctatttc
501 A T F T L L D F S S Q N A L R G Q V Y F
1561 ttctgtagtgctctgctgccaccctgtggggctctgacacatgttctactacgtgtgac
521 F C S A S A C H P V G S D T C S T T C D
1621 tctgggatagcaaggcgtcgaagatcctctggtcaccacaacagcactctccgggcccctg
541 S G I A R R R R S S G H H N S T L R A L
1681 gacattgtaagctctccaggggagtggtgctttgaggatactgctaaacttgagccctca
561 D I V S S P G A V G F E D T A K L E P S
1741 ggttccagcaggaactccagttcaagaatgctgctcctgctgctggccatcaccctagcc
581 G S S R N S S S R M L L L L L A I T L A
1801 ctggcgccgggtatctttgtgggtctgatctgggcccctgggcccagaagctctgggaaggc
601 L A A G I F V G L I W A W A Q K L W E G
1861 atcagatattaa
621 I R Y -

```

Figura 36. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZP1 de *Mus mattheyi*. Los codones de inicio y terminación se muestran en rosa. El péptido señal aparece en verde. El dominio ZP aparece en rojo. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en naranja.

RESULTADOS

1 atgggctgggggtggttttgggcoctgcttctgctggcggcagctcccctaagattggct
1 M G W G C F V A L L L L A A A P L R L A
61 cagcatctgcatctggagcctggcttgggaatacagctatgactgtgggttacggggaatg
21 Q H L H L E P G L E Y S Y D C G V R G M
121 cagctgctgggtattccccaggccaaccagactatcgaatccaaggtgctggatgaattt
41 Q L L V F P R P N Q T I E S K V L D E F
181 gggaaccggtttgaggtgaataactgctctatctgctaccactgggtgaccagtgaggcc
61 G N R F E V N N C S I C Y H W V T S E A
241 cagaagcgcacagtattctcagctgattaccaaggctgccacgttctggagaaggatggg
81 Q K R T V F S A D Y Q G C H V L E K D G
301 cggttccacctgaggggtgttcatacaagccgtcctaccaatggccgtgtggatatagca
101 R F H L R V F I Q A V L P N G R V D I A
361 cgagatgtcactctgatctgtcccaaacagaccacatcatgactccggaccctactg
121 R D V T L I C P K P D H I M T P D P Y L
421 gctccaccaccacacctgagccttttacacctacttttggccttactccatccct
141 A P P T T P E P F T P P T F A L H S I P
481 ggccacaccttggctgggtctggccacactggctcactacgttgtactcagagcacagc
161 G H T L A G S G H T G L T T L Y S E H S
541 ttcacccatccaactcctgccccaccatccccaggacctggacctgctggaccaccgta
181 F T H P T P A P P S P G P G P A G P T V
601 cctcactcccaatggggcagcttggagccctgggaattgactgagctggattctgtaggc
201 P H S Q W G T L E P W E L T E L D S V G
661 acccatctgccccaggagcagtgccaggtagcctccgggcacatcccgtgcatggtaaaa
221 T H L P Q E Q C Q V A S G H I P C M V K
721 ggaagttccaaggaagcctgtcagcaggctggctgctgctacgacagtaccaaagaagag
241 G S S K E A C Q Q A G C C Y D S T K E E
781 ccctgttactatggcaacacagtcactctccagtggttcaaaagtggctactttacctg
261 P C Y Y G N T V T L Q C F K S G Y F T L
841 gtcgtgtcacaagaacagccttgacatggagtcagctgctggacaatgtccgtgctggcc
281 V V S Q E T A L T H G V M L D N V R L A
901 tatgcccccaacggatgccccctaccagaagacaagtgctttcgtggcttccatgtc
301 Y A P N G C P P T Q K T S A F V V F H V
961 cctctcaccctctgtggaacggcaatocagggtggttggtgagcagctcatctatgagaac
321 P L T L C G T A I Q V V G E Q L I Y E N
1021 cagctggtgtctgacattgatatccaaaagggggccacaagggttccatcactcgtgacagt
341 Q L V S D I D I Q K G P Q G S I T R D S
1081 gtcttccggcttcatgttctgctgcatcttcaatgcttagcgatttctgcccacccaggca
361 V F R L H V R C I F N A S D F L P I Q A
1141 tctatcctctcaccccaaccacctgcccccgctgactcagctctggaccctgaagctggaa
381 S I L S P Q P P A P V T Q S G P L K L E
1201 ctgaggattgccacggataagactttcagctcctactatcaggggagtgactatcccctt
401 L R I A T D K T F S S Y Y Q G S D Y P L
1261 gtgagactgctccaggaaccagttacatagaggtccgactcctgcagagaactgatccc
421 V R L L Q E P V Y I E V R L L Q R T D P
1321 agtctggtgctggtgctacaccagtgctgggccacgcccaccaccagcccctttgagcag
441 S L V L V L H Q C W A T P T T S P F E Q
1381 cccaatggcccattctgtcagatgggtgctcctttcaagggtgacaactacagaacaaa
461 P Q W P I L S D G C P F K G D N Y R T Q
1441 gtggtggctgcagacagggaggcgcttcccttctgggtccactatcagcggttcaccatt
481 V V A A D R E A L P F W S H Y Q R F T I
1501 gccaccttcacgctccttgactccagttcccagaatgccctaaggggacaggtctatttc
501 A T F T L L D S S S Q N A L R G Q V Y F
1561 ttctgtagtgttctgctgcccacctgctgggtccaacacatgctctactacatgtgac
521 F C S A S A C H P V G S N T C S T T C D
1621 tctgggatagcaagggcgtcagcagatcctctagtcaccacaacagcgttctccgggcccctg
541 S G I A R R R R S S S H H N S V L R A L
1681 gacattgtgagctctccaggggagtggtggttggaggatgctgctaaacttgagccctca
561 D I V S S P G A V G F E D A A K L E P S
1741 ggttccagcaggagctccagttcaagagtgctgctcccgtgctggccgtcaccctagcc
581 G S S R S S S S R V L L P L L A V T L A

```

1801 atggcgccggtatcctttgtgggtctgatctgggctgggcccagaaactctgggaaggc
601 M A A G I F V G L I W A W A Q K L W E G
1861 atcagatattaa
621 I R Y -

```

Figura 37. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZP1 de *Mus pahari*. Los codones de inicio y fin se muestran en rosa. El péptido señal aparece en verde. El dominio ZP aparece en rojo. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en naranja.

En la proteína madura encontramos un total de 82 y 85 sitios potenciales de O-glicosilación en *Mus mattheyi* y *Mus pahari* respectivamente. Además, identificamos 3 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn49, Asn68 y Asn371) en ambas especies, al presentar la secuencia consenso: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, siendo X cualquier aminoácido distinto de prolina (Fig. 38 y 39).

```

1 MAVGVVCVVL LLAAAPLRLG QRLHLEPGFE YSYDCGVVRGM QLLVFPRPNQ TVQFKVLDEF
61 GNRFEVNCS ICYHWSSSEA QERTVFSAEY KGCHVLEKDG QFHRLRVFIQA VLPNGRVDVA
121 QDVTLICPKP DHIMTPDPYL APPTTPEPFT PHTFFALHLIP GHTLAGSGHT GLTTLYPEHS
181 FTHPTPAPPS PGPGPAGPTA PHSQWGTLEP WELTELDSVG THLPQEQCQV SSRHIPCMVK
241 GSPKEACQQA GCCYDSAKEE PCYYGNTVTL QCFKSGYFTL VMSQETALTH GVMLDNVHLA
301 YASNGCPPTQ KTSAFAVVFRV PFTLCGTTIQ VVGEQLIYEN QLVSDIDVQK GPQGSITRDS
361 VFRLHVRCIF NASDFLPIQA SIFSPQPPAP VTQSGPLRLE LRIATDKTFS SYYQGSDYPL
421 VRLLQEPVYV EVRLLQRTDP SLVLVLHQCW APTTASPIEQ PQWPILSDGC PFKGDNYRTQ
481 VVATDKEALP FWSHYQRFTI ATFTLLDFSS QNALRGQVYF FCSASACHPV GSDTCSTTCD
541 SGIARRRSS GHHNSTLRAL DIVSSPGAVG FEDTAKLEPS GSSRNSSSRM LLLLLAITLA
601 LAAGIFVGLI WAWAQKLWEG IRY*

```

Figura 38. Secuencia de aminoácidos de ZP1 de *Mus mattheyi*. Los sitios putativos de N-glicosilación se muestran en rojo y los sitios putativos de O-glicosilación en azul. El péptido señal (1-20) y el sitio consenso para corte de furina (545-548) se encuentran subrayados.

```

1  MGWGCFVALL LLAAAPLRLA QHLHLEPGLE YSYDCGVRGM QLLVFPRPNQ TIESSKVLDEF
61  GNRFEVNCS ICYHWVTSEA QKRTVFSADY QGCHVLEKDG RFHLRVFIQA VLPNGRVDIA
121 RDVTLICPKP DHIMTPDPYL APPTTPEPFT PPTFALHSIP GHTLAGSGHT GLTTLYSEHS
181 FTHPTPAPPS PGPGPAGPTV PHSQWGTLEP WELTELDSVG THLPQEQCQV ASGHIPCMVK
241 GSSKEACQQA GCCYDSTKEE PCYYGNTVTL QCFKSGYFTL VVSQETTALTH GVMLDNVRLA
301 YAPNGCPPTQ KTSAFVVFHV PLTLCGTAIQ VVGEQLIYEN QLVSDIDIQK GPQGSITRDS
361 VFRLHVRCIF NASDFLPIQA SILSPQPPAP VTQSGPLKLE LRIATDKTFS SYQGSDYPL
421 VRLLQEPVYI EVRLLQRTDP SLVLVLHQCW ATPTTSPFEQ PQWPILSDGC PFKGDNYRTQ
481 VVAADREALP FWSHYQRFTI ATFTLLDSSS QNALRGQVYF FCSSASACHPV GSNTCSTTCD
541 SGIARRRRSS SHHNSVLRAL DIVSSPGAVG FEDAAKLEPS GSSRSSSSRV LLPLLAVTLA
601 MAAGIFVGLI WAWAQKLWEG IRY*

```

Figura 39. Secuencia de aminoácidos de ZP1 de *Mus pahari*. Los sitios putativos de N-glicosilación se muestran en rojo y los sitios putativos de O-glicosilación en azul. El péptido señal (1-20) y el sitio consenso para corte de furina (545-548) se encuentran subrayados.

5.2.1.1.2.1 Comparación de las secuencias de ZP1 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* con las secuencias de ZP1 de otros mamíferos

Las secuencias de ZP1 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari*, presentan un alto grado de similitud con las secuencias de ZP1 de otros roedores. Siendo, para *Mus mattheyi* de un 93% con *Mus pahari* y *Mus musculus* y un 86% con *Rattus norvegicus*. Para *Mus pahari*, el porcentaje de similitud es de un 93% con *Mus mattheyi*, un 92% con *Mus musculus* y un 86% con *Rattus norvegicus*. En ambas especies el porcentaje de similitud con la especie humana (*Homo sapiens*) es de un 67% (Tabla 19).

Tabla 19. Porcentaje de similitud entre ZP1 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* y ZP1 de otras especies.

ZP1 (Porcentaje de similitud %)				
<i>M. mattheyi</i>	<i>M. pahari</i>	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>H. sapiens</i>
	93	93	86	67
<i>M. pahari</i>	<i>M. mattheyi</i>	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>H. sapiens</i>
	93	92	86	67

En la figura 40 se muestra el alineamiento de la secuencia proteica de ZP1 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* con las secuencias de mujer, rata y ratona.

H.sapiens	MAGGSATTWGYPVALLLLV-ATLGLGRWLQDPGLPGLRHSYDCGKIKMQLLVFPRPQQT	59
R.norvegicus	-----MAWGCFVVLVLLVAAAPLRLAQHLHLK---PGFQYSYDCGVQGMQLLVFPRPNQT	51
M.pahari	-----MGWGC FVALLLLAAAPLRLAQHLHLLE---PGL EYSYDCGVRGMQLLVFPRPNQT	51
M.musculus	-----MAWGCFVVLVLLVAAAPLRLGQRLHLE---PGFEYSYDCGVRGMQLLVFPRPNQT	51
M.mattheyi	-----MAVGVVCVVLLVAAAPLRLGQRLHLE---PGFEYSYDCGVRGMQLLVFPRPNQT	51
	* .:***. * * *.: *: . **.:*****.:***** **	
H.sapiens	LRFKVDFEFGNRFVNVNCSIYHWVTSRPQEPAVFSADYRGCHVLEK-DGRFHRLRVFMEA	118
R.norvegicus	IQFKVLDFEFGNRFVNVNCSIYHWVISEAQKPAVFSADYKGCCHVLEKQDGRFHRLRVFIQA	111
M.pahari	IESKVLDFEFGNRFVNVNCSIYHWVTSEAQRKRVFSADYQGCCHVLEK-DGRFHRLRVFIQA	110
M.musculus	VQFKVLDFEFGNRFVNVNCSIYHWVTSEAQHTVFSADYKGCCHVLEK-DGRFHRLRVFIQA	110
M.mattheyi	VQFKVLDFEFGNRFVNVNCSIYHWVSSEAQERTVFSAEYKGCCHVLEK-DGQFHRLRVFIQA	110
	:. **.:*****.:***** * . *: :****.:***** **.:*****:.*	
H.sapiens	VLPNGRVDVAQDATLICKPKPDPSRTLDSQLAPPAMFSVSTPQTLSFLPTSGHTSQSGSHA	178
R.norvegicus	VLPNGRVDTAQDVTLICKPKPDHILTPESYLAPPTTPQPFIPHTFALHPI SGHTLAGSGHT	171
M.pahari	VLPNGRVDIARDVTLICKPKPDHIMTPDPYLAPPTTPEPFTPTPFALHSIPGHTLAGSGHT	170
M.musculus	VLPNGRVDIAQDVTLICKPKPDHIVTPDPYLAPPTTPEPFTPHAFALHPIPDHTLAGSGHT	170
M.mattheyi	VLPNGRVDVAQDVTLICKPKPDHIMTPDPYLAPPTTPEPFTPHFALHLIPGHTLAGSGHT	170
	***** *:*.****** * : ****: . * :::: ** ****:	
H.sapiens	FPSPLDPGHSSVHPTPALPSPGPGPTLATLAQPHWGTLEHWDVNRDYGTHLSQECCQV	238
R.norvegicus	GLTTLYPE---THPTPAPPSSEPGVPVQSQWGTLSWELTELDSIGTHLLQERCCQV	228
M.pahari	GLTTLYSEHSFTHPTPAPPSPGPGPAGPTVPHSQWGTLEPWELTELDSVGTHTLPQECCQV	230
M.musculus	GLTTLYPEQSFTHPTPAPPSLGPAGSTVPHSQWGTLEPWELTELDSVGTHTLPQERCCQV	230
M.mattheyi	GLTTLYPEHSFTHPTPAPPSPGPGPAGPTAPHSQWGTLEPWELTELDSVGTHTLPQECCQV	230
	: * ***** ** ** . * : :**** *::: * :**** **.*	
H.sapiens	ASGHLP C I V R R T S K E A C Q Q A G C C Y D N T R E V P C Y Y G N T A T V Q C F R D G Y F V L V V S Q E M A L T H	298
R.norvegicus	ASGHIPCMVKGSSSEACQQAGCCYDNTKEMPCYYGNTVTLQCFRSGYFTLVMSQETALH	288
M.pahari	ASGHIPCMVKGSSKEACQQAGCCYDSTKEEPCYYGNTVTLQC F K S G Y F T L V S Q E T A L H	290
M.musculus	ASGHIPCMVNGSSKETCQQAGCCYDSTKEEPCYYGNTVTLQC F K S G Y F T L V M S Q E T A L H	290
M.mattheyi	SSRHI PCMVKGSPEACQQAGCCYDSAKEEPCYYGNTVTLQC F K S G Y F T L V M S Q E T A L H	290
	:* **:*:* . : :*.*****.:* *****.:***:***.* ** **	
H.sapiens	RI TLANIHLAYAPTS CSPTQHT EAFVVFYFPLTHCGTTMQVAGDQLIYENWLVSIGIHIQK	358
R.norvegicus	GVMLDNVHLAYAPNGCPPTQKTSAFVVFHVPLTLCGTAIQVVGKQLVYENQLVSNIEVQT	348
M.pahari	GVMLDNVRLAYAPNGCPPTQKTSAFVVFHVPLTLCGTAIQVVGQQLIYENQLVSDIDIQK	350
M.musculus	GVLLDNVHLAYAPNGCPPTQKTSAFVVFHVPLTLCGTAIQVVGQQLIYENQLVSDIDVQK	350
M.mattheyi	GVMLDNVHLAYASNGCPPTQKTSAFVVFVFPVPLTLCGTTIQVVGQQLIYENQLVSDIDVQK	350
	: * *.:**** ..* ****.*.***** .* * ****:***.*.***.*** ** *.:*	

H.sapiens	GPQGSITRDSTFQLHVR	CVFNASDFLPIQASIFPPSPAPMTQPGPLRLELRIAKDETF	418		
R.norvegicus	GPQGSITRDGVFRLHVR	CIFNASDFLPIRASIFSPQPPAPVTRSGPLRLELRIATDKTF	408		
M.pahari	GPQGSITRDSVFRHLHVR	CIFNASDFLPIQASILSPQPPAPVTQSGPLKLELRIATDKTF	410		
M.musculus	GPQGSITRDSAFRLHVR	CIFNASDFLPIQASIFSPQPPAPVTQSGPLRLELRIATDKTF	410		
M.mattheyi	GPQGSITRDSVFRHLHVR	CIFNASDFLPIQASIFSPQPPAPVTQSGPLRLELRIATDKTF	410		
	*****	.*:****:*****:***: * ***: : ***:*****.:**			
H.sapiens	SYYGEDDYPIVRLLEP	VHVEVRLLRQRTDPNLVLLHQCWGAPSANPFQPPQWPILSDGC	478		
R.norvegicus	SYYQGSYDYLVRLLQ	EPVYIEVRLLRQRTDPLGLALMLHQCWATPSASPFEQPQWPILSDGC	468		
M.pahari	SYYQGSYDYLVRLLQ	EPVYIEVRLLRQRTDPSLVLVLHQCWATPTTSPFEQPQWPILSDGC	470		
M.musculus	SYYQGSYDYLVRLLQ	EPVYIEVRLLRQRTDPSLVLVLHQCWATPTTSPFEQPQWPILSDGC	470		
M.mattheyi	SYYQGSYDYLVRLLQ	EPVYIEVRLLRQRTDPSLVLVLHQCWATPTASPIEQPQWPILSDGC	470		
	***	.***:*****:***:***** * .*:*****.:*:.:*****			
H.sapiens	PFKGDNYRTQMVALD	G-ATPFQSHYQRFTVATFALLDSGSQRALRGLVYLF	CST	SACHTS	537
R.norvegicus	PFKGDNYRTQMVAAD	RATLFPWSHYQRFTIATFTLLDSSQNALRGQVYFF	C	SASACHPV	528
M.pahari	PFKGDNYRTQVVAAD	REALFPWSHYQRFTIATFTLLDSSQNALRGQVYFF	C	SASACHPV	530
M.musculus	PFKGDNYRTQVVAAD	REALFPWSHYQRFTITTFMLLDSSQNALRGQVYFF	C	SASACHPL	530
M.mattheyi	PFKGDNYRTQVVATD	KEALFPWSHYQRFTIATFTLLDFSSQNALRGQVYFF	C	SASACHPV	530
	*****	.*****:*** * : ** *****:*** ** * .**.* ***:***:****			
H.sapiens	GLETCSTACSTGT	TRQRRSSGHRNDTARPDIVSSPGVGFEDSYGQEP	TLGPTDSNGNS	597	
R.norvegicus	GSETCSTTC	DSEIARHRRSSGHHNSTIRALDIVSSPGAVGFEDAPK	----LEPSGSTRNS	584	
M.pahari	GSNTCSTTC	DSGIARRRRSSSHNSVLRALDIVSSPGAVGFEDA	AK----LEPSGSSRS	586	
M.musculus	GSNTCSTTC	DSGIARRRRSSGHHNITLRALDIVSSPGAVGFEDA	AK----LEPSGSSRS	586	
M.mattheyi	GSNTCSTTC	DSGIARRRRSSGHHNSTLRALDIVSSPGAVGFEDA	AK----LEPSGSSRS	586	
	*	:****:*. :*:*****:*. * ***** *****: * *: * .*			
H.sapiens	SIRP	LLWAVLLLPAVALVGGFVGL	SQTWAQKLWESNRQ	638	
R.norvegicus	GSRP	LLWVLQLL-ALTLVLDGVLVGL	SWAWA-----	617	
M.pahari	SSRV	LL---PLL-AVTLAMAAGIFVGL	IWAWAQKLWEGIRY	623	
M.musculus	SSRM	LL---LLL-AITLALAAGIFVGL	IWAWAQKLWEGIRY	623	
M.mattheyi	SSRM	LL---LLL-AITLALAAGIFVGL	IWAWAQKLWEGIRY	623	
	.	* ** ** *:*:.: *:*:*** :**			

Figura 40. Comparación de las secuencias de aminoácidos de ZP1 de *H.sapiens*, *R.norvegicus*, *M.pahari*, *M.musculus* y *M.mattheyi*. Los números de acceso de las secuencias usadas son: *H.sapiens* (NP_997224), *R.norvegicus* (NP_445961) y *M.musculus* (NP_033606). Los aminoácidos idénticos se indican con asterisco (*). Dos puntos (:) indican residuos conservados y punto (.) residuos semiconservados. El dominio trefoil se muestra en azul. Se muestran el dominio ZP en rojo y el dominio transmembrana en naranja. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. Los aminoácidos cisteína se señalan en verde

5.2.1.1.3 Caracterización de ZP4 en *Mus mattheyi* y *Mus pahari*

El ADNc de ZP4 contiene una secuencia de 1626 pares de bases en ambos roedores (Fig. 41 y 42). El codón de iniciación (ATG) se predijo con el algoritmo de Pedersen y Nielsen (1997) y se encuentra asociado con el entorno Kozak (Kozak, 1991). Las secuencias contienen un codón de terminación (TGA) en las posiciones 1627-1629.

Estas secuencia codifican un polipéptido de 542 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 59.51 kDa para *Mus mattheyi* y 59.54 kDa para *Mus pahari*. En ambos casos el péptido señal tiene una longitud de 28 aminoácidos, el dominio trefoil de 48 aminoácidos, el dominio ZP de 274 aminoácidos y el dominio transmembrana de 23 aminoácidos, seguido por un corto tallo citoplasmático (Krogh *et al.*, 2001).

La proteína madura se extiende desde Gln29 en ambas especies lugar donde se corta el péptido señal hasta Arg470, aminoácido donde se encuentra el sitio consenso para el corte de proteasas tipo furina (Duckert *et al.*, 2004). El peso molecular calculado para las proteínas maduras sería de 48.50 kDa y de 48.64 kDa para *Mus mattheyi* y *Mus pahari* respectivamente.

```

1 atggctggccaggctctaaggagcactttgtggcttctgccgagcatcttgctgtgtttc
1 M A G Q A L R S T L W L L P S I L L C F
61 ccattctgtcctcccttgagtggccagcatgtgactgaattgccagggtgtgctccactgt
21 P F C P P L S G Q H V T E L P G V L H C
121 gggttacagagcttccagtttactgcaaacctcagcctgggggagagagctcctgtgcta
41 G L Q S F Q F T A N L S L G A E S P V L
181 acagcttgggatagccaagggctgccacacaggcttaagaatgactctgactgtgggtata
61 T A W D S Q G L P H R L K N D S D C G I
241 tggatgacggacagtctgatgggtttctgggtattgaaagccacctacaatggctgctat
81 W M T D S P D G F L V L K A T Y N G C Y
301 gtcactctgaagggtcccattatgtcatgatggtcagcatgcaagaggtagatgtagct
101 V T L K G S H Y V M M V S M Q E V D V A
361 gaaatgatgacaggaacaagagagagactgcttaagtgccctttggatcttcgcgccccca
121 G N M T G T R E R L L K C P L D L R A P
421 gatgcaccaagtgctgaagtgtgcagtcctgtgccagtaaaggaaaggctgcctgtgct
141 D A P S A E V C S P V P V K E R L P C A
481 ccctgcgccatctccagaggagactgtgaagaggtgggctgctgctacagctctgaagaa
161 P S P I S R G D C E E V G C C Y S S E E
541 gaagaggcgggttctgttactatggaaacacagtgacctcccgttgtaccagggagggc
181 E E A G S C Y Y G N T V T S R C T R E G
601 cgcttttccattgctgtgtccaggaatgcaacctcaccacctgctgcttggattcccta
201 R F S I A V S R N A T S P P L R L D S L
661 cacctggcttccaggaacagcagtggtgtgatcctgtgatgatgacatccacctttgtc
221 H L V F R N S S G C D P V M M T S T F V
721 ctgttccaatttccatttacttctgtgggaccgcagggatcactggagaccaggct
241 L F Q F P F T S C G T A R R I T G D Q A
781 gtgtatgaaaatgagctagtggccattccggatgtgcaagcttggggcagaagctctatt
261 V Y E N E L V A I P D V Q A W G R S S I

```

```

841 acccgagacagcaacttcagggtccgagtcagctgcacctactctgctctcagcaacaca
281 T R D S N F R L R V S C T Y S A L S N T
901 tcccctattaacatgcaagtgctggctctcccaccacccttcctaagaccagcctggg
301 S P I N M Q V L A L P P P L P K T Q P G
961 ccctctctctggaacttcagattgccaaggataaaagctatggttcttactatggttct
321 P L S L E L Q I A K D K S Y G S Y Y G S
1021 gatgcctaccactggtaaaattcctccaggatcctatttatgtggagggtcctcatcatt
341 D A Y P L V K F L Q D P I Y V E V S I I
1081 cacagaacagatccctcattgggtctgctgctagatcaatggtgggcccacacctggctct
361 H R T D P S L G L L L D Q C W A T P G S
1141 aatccttttcatcaaccacagtgcccaatcctggggaaggatgcccatatgctggagac
381 N P F H Q P Q W P I L V K G C P Y A G D
1201 aactatcagacaaaaggatccctgtccagaaaacatcaagtccctttccatctcatcac
401 N Y Q T K R I P V Q K T S S P F P S H H
1261 cagcgcttcagcatcgataccttcagcttcatgagtgctgtaaggggagaagcagctttta
421 Q R F S I D T F S F M S A V R E K Q L L
1321 agtggacaggtgtacctgcactgcagtgcacatcagctctgccagcctgctgggatgccatcc
441 S G Q V Y L H C S A S V C Q P A G M P S
1381 tgtgtgacagtctgtcctgcttccaggagaagaagaaaatctgagcttcattttgagacc
461 C V T V C P A S R R R R K S E L H F E T
1441 accaccagcatatctagcaaaggccccctgatcctcctccaagccactaaggactctgca
481 T T S I S S K G P L I L L Q A T K D S A
1501 gacatgcttcatagacactcacgcaccocctgtggattctactgctctgtgggtcatgggg
501 D M L H R H S R T P V D S T A L W V M G
1561 ctttctgcaactgtgatcactcactggggctttttagtatacctacttggccatcagaaaa
521 L S A T V I I T G V F V V S Y L A I R K
1621 ttgagatga
541 L R -

```

Figura 41. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZP4 de *Mus mattheyi*. Los codones de inicio y fin se muestran en rosa. El péptido señal aparece en verde. El dominio ZP se muestra en rojo. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en naranja.

```

1 atggctggggcaggctctaaggagcactctgtggcttctgccaaagcatctttctgtgtttc
1 M A G Q A L R S T L W L L P S I F L C F
61 ccgttctgtcctcccttgagtgccagcagatgtgactgagttgccagggtgtgctccactgt
21 P F C P P L S G Q H V T E L P G V L H C
121 aggttacagagcttccagtttactgtgaacctcagcctggaggcagagagtcctgtgcta
41 R L Q S F Q F T V N L S L E A E S P V L
181 acagcttgggatagccaagggctgccacacaggcttaagaatgactctgactgtggtaca
61 T A W D S Q G L P H R L K N D S D C G T
241 tgggtgatggacagtcctgatggatttttggattggaagccactacaatggctgctat
81 W V M D S P D G F L V L E A T Y N G C Y
301 gtcactctggagggtcccattatgtcatgatggctcggcgtgcaagaggtagatgtagcc
101 V T L E G S H Y V M M V G V Q E V D V A
361 ggaaatataacgggaaggagagagagactgctcaagtgccctgtggatcttcacaccaca
121 G N I T G R R E R L L K C P V D L H T T

```

```

421 gatgcatcaaatgctgaagtgtgcagtcctgtgccagtaaaggaaaggctgcocctgtgct
141 D A S N A E V C S P V P V K E R L P C A
481 ccctcgcccatctccagaggagattgtgaagaggcaggctgctgctacagctccgaagag
161 P S P I S R G D C E E A G C C Y S S E E
541 gaagaggcaggttctgttactatggaaacacagtgacctcccgttgaccaggaggaggc
181 E E A G S C Y Y G N T V T S R C T R E G
601 cgcttttccattgctgtgtccaggaatgcaacctcgccaccctgcaacttggattcccta
201 R F S I A V S R N A T S P P L H L D S L
661 cgcttggcttccagggacaacagtgctgtgatcctgtgatgacaacagccacctttgtc
221 R L V F R D N S A C D P V M T T A T F V
721 ctgttccaatttccatttacttctgtgggaccacacggcggatcactggagacaaggcc
241 L F Q F P F T S C G T T R R I T G D K A
781 gtgtatgaaaatgaactagtggccattcgggatgtgcaagcttggggcagaagctctatt
261 V Y E N E L V A I R D V Q A W G R S S I
841 acccgagacagcaacttcaggctccgagtcagctgcatttactctgctctcagcaacaca
281 T R D S N F R L R V S C I Y S A L S N T
901 tccccagttaacatgcaagtgtggctctcccaccacccttccctaagacgcagcctggg
301 S P V N M Q V L A L P P P L P K T Q P G
961 ccctctctctgaaacttcagattgccaaaggataaaaagctatggttcttactatggttct
321 P L S L K L Q I A K D K S Y G S Y Y G S
1021 gatgcctaccactggtaaaattcctccaggatcctatttatgtggaggtctccatcatt
341 D A Y P L V K F L Q D P I Y V E V S I I
1081 cacaggacagaccctcattgggtctgctgctagagcaatggtggggccacacctggctct
361 H R T D P S L G L L L E Q C W A T P G S
1141 aatccttttcatcaaccacagtgccaatcctggtgaagggatgcccatatgctggagac
381 N P F H Q P Q W P I L V K G C P Y A G D
1201 aactatcagaccaaaggatccctgtccagaaagcatcaagtcctttccatctcatcac
401 N Y Q T K R I P V Q K A S S P F P S H H
1261 cagcgttcagcatcgctaccttcagcttcatgagtgctgcaagggagaagcaggtttta
421 Q R F S I A T F S F M S A A R E K Q V L
1321 agtggacaggtatacctgcaactgcaactgcaactgcaactgcaactgcaactgcaactgca
441 S G Q V Y L H C S A S V C Q P A G M P S
1381 tgtgtgatagtctgtcctgcttccaggagaagaagaaaatctgagctttattttgagaac
461 C V I V C P A S R R R R K S E L Y F E N
1441 acaaccagcatatctagcaaaggccctgtgatcctcctccaagccactaaggactctgca
481 T T S I S S K G P V I L L Q A T K D S A
1501 aacgtgcttcttagacactcaagcgccccctgtggattctcctgctctgtgggtaatgggg
501 N V L P R H S S A P V D S P A L W V M G
1561 ctttctgcaaccatgatcatcattggagtcttggtagtatcctacttggccatcagaaaa
521 L S A T M I I I G V L V V S Y L A I R K
1621 ttgagatga
541 L R -

```

Figura 42. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZP4 de *Mus pahari*. Los codones de inicio y fin se muestran en rosa. El péptido señal se muestra en verde. El dominio ZP se muestra en rojo. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en naranja.

En las proteínas maduras encontramos un total de 76 y 73 sitios potenciales de O-glicosilación en ZP4 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* respectivamente. Además, identificamos 6 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn50, Asn74, Asn122, Asn209, Asn226 y Asn299) en *Mus mattheyi* y 5 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn50, Asn74, Asn122, Asn209 y Asn299) en *Mus pahari* (Figs. 43 y 44).

```

1  MAGQALRSTL WLLPSILLCF PFCPPLSGQH VTELPGVLHC GLQSFQFTAN LSLGAESPVL
61 TAWDSQGLPH RLKNDSDCGI WMTDSPDGFL VLKATYNGCY VTLKGSHYVM MVSMQEVDVA
121 GNMTGTRERL LKCPLDLRAP DAPSAEVCSP VPVKERLPCA PSPISRGDCE EVGCCSSEE
181 EEAGSCYYGN TVTSRCTREG RFSIAVSRNA TSPPLRLDSL HLVFRNSSGC DPVMMTSTFV
241 LFQFPFTSCG TARRITGDQA VYENELVAIP DVQAWGRSSI TRDSNFRLRV SCTYSALSNT
301 SPINMQVLAL PPPLPKTQPG PLSLELQIAK DKSYGSYGS DAYPLVKFLQ DPIYVEVSII
361 HRTDPSLGLL LDQCWATPGS NPFHQPWPI LVKGCPYAGD NYQTKRIPVQ KTSSPFSSHH
421 QRFSIDTFSF MSAVREKQLL SGQVYLHCSA SVCPAGMPS CVTVCPASRR RRKSELHFFT
481 TTSISSKGPL ILLQATKDSA DMLHRHSRTP VDSTALWVMG LSATVIITGV FVVSYLAIRK
541 LR*

```

Figura 43. Secuencia de aminoácidos de ZP4 de *Mus mattheyi*. Los sitios putativos de N-glicosilación se muestran en rojo y los sitios putativos de O-glicosilación en azul. El péptido señal (1-28) y el sitio consenso para corte de furina (469-472) se encuentran subrayados.

```

1  MAGQALRSTL WLLPSIFLCF PFCPPLSGQH VTELPGVLHC RLQSFQFTVN LSLEAESPVL
61 TAWDSQGLPH RLKNDSDCGT WVMDSPDGFL VLEATYNGCY VTLEGSHYVM MGVGQEVDVA
121 GNITGRERL LKCPVDLHTT DASNAEVCSP VPVKERLPCA PSPISRGDCE EAGCCSSEE
181 EEAGSCYYGN TVTSRCTREG RFSIAVSRNA TSPPLHLDSL RLVFRDNSAC DPVMTTATFV
241 LFQFPFTSCG TTRRITGDKA VYENELVAIR DVQAWGRSSI TRDSNFRLRV SCIYSALSNT
301 SPVNMQVLAL PPPLPKTQPG PLSLKLQIAK DKSYGSYGS DAYPLVKFLQ DPIYVEVSII
361 HRTDPSLGLL LEQCWATPGS NPFHQPWPI LVKGCPYAGD NYQTKRIPVQ KASSPFSSHH
421 QRFSIATFSF MSAAREKQVL SGQVYLHCSA SVCPAGMPS CVIVCPASRR RRKSELYFEN
481 TTSISSKGPV ILLQATKDSA NVLPRHSSAP VDSPALWVMG LSATMIIIGV LVVSYLAIRK
541 LR*

```

Figura 44. Secuencia de aminoácidos de ZP4 de *Mus pahari*. Los sitios putativos de N-glicosilación se muestran en rojo y los sitios putativos de O-glicosilación en azul. El péptido señal (1-28) y el sitio consenso para corte de furina (469-472) se encuentran subrayados.

5.2.1.1.3.1 Comparación de las secuencias de ZP4 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* con las secuencias de ZP4 de otros mamíferos

Al igual que ZP1, la secuencia de ZP4 en *Mus mattheyi* y *Mus pahari*, muestra un alto grado de similitud con las secuencias de otras especies, siendo de un 91% entre ambos roedores, un 83% con *Rattus norvegicus*, 64% con *Homo sapiens*, 63% con *Bos taurus* y 62% con *Sus scrofa* (Tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de similitud entre ZP4 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* y ZP4 de otras especies.

ZP4 (Porcentaje de similitud %)					
<i>M. mattheyi</i>	<i>M. pahari</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>B. taurus</i>	<i>S. scrofa</i>
	91	83	64	63	62
<i>M. pahari</i>	<i>M. mattheyi</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>B. taurus</i>	<i>S. scrofa</i>
	91	83	64	63	61

En la figura 45 se muestra el alineamiento de la secuencia proteica de ZP4 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* con las secuencias de ZP4 de la mujer y la rata.

```

H.sapiens      -----MWLLRCVLLCVSLSLAVSGQHKPEAPDYSSVLHCGPWSFQFAVNLNQEATS 51
R.norvegicus  MARQALRSTLWLLPSILLCFPFCLPLSGQHVTELP---GVLHCGLQSFQFAVNLNLEAES 57
M.pahari      MAGQALRSTLWLLPSIFLCFPFCPPLSGQHVTELP---GVLHCRQLQSFQFTVNLNLEAES 57
M.mattheyi    MAGQALRSTLWLLPSILLCFPFCPPLSGQHVTELP---GVLHCGLQSFQFTANLSLGAES 57
              :***  :*:**  .:  :****  *  *  .****  *****:*.  *  *

H.sapiens      PPVLIAWDNQGLLHELQNSDCGTWIRKGPSSVLEATYSSCYVTEWDSHYIMTVGVGE 111
R.norvegicus  -PVLTTWDSQGLPHRLKNSDCGTWVMDSPDGFLVLEASYSGCYVTELEGSHYIMTVGVQE 116
M.pahari      -PVLTAWDSQGLPHRLKNSDCGTWVMDSPDGFLVLEATYNGCYVTELEGSHYIMTVGVQE 116
M.mattheyi    -PVLTAWDSQGLPHRLKNSDCGIWMTDSPDGFLVLEATYNGCYVTELEGSHYIMTVGMQE 116
              ***  :**.*  *  .*:*****  *:  .*  .  :*:**:*..****  ***:*  *  .:

H.sapiens      AGAAEHKVVTERKLLKCPMDLLA--RDAPDWDWCDSIPARDRLPCAPSISRGDCEGLGC 169
R.norvegicus  ADVAGHVAGTRQRLTCLPLAQGKAPDTPSAKVCSPVPVKERLPCASSTISRGDCEELGC 176
M.pahari      VDVAGNITGRERLLKCPVDLHT--TDASNAEVCSPVPVKERLPCAPSISRGDCEEAGC 174
M.mattheyi    VDVAGNMTGTRERLLKCPDLRA--PDAPSAEVCSPVPVKERLPCAPSISRGDCEEVGC 174
              .  *  .  .  .:***:**  *  *  :  .:  *  .  :*:**:*..****  *  *****  **

H.sapiens      CYSSEE--VNSCYYGNTVTLHCTREGHFSAIVSRNVTSPLLLDSVRLALRND-SACNPV 226
R.norvegicus  CYSSEEEGADSCYYGNTVTSHTCKEGHFSAIVSRDVTSPPLRLDSLRLGFRNITTCDPV 236
M.pahari      CYSSEEEEGASCYYGNTVTSRCTREGRFSAIVSRNATSPPLHLDSLRLVFRDN-SACDPV 233
M.mattheyi    CYSSEEEEGASCYYGNTVTSRCTREGRFSAIVSRNATSPPLRLDSLHLVFRNS-SGCDPV 233
              *****  .  *****  :*:**:*..*****:*****  *****  *  :*  :  .:  :*  **
    
```

H.sapiens	MATQAFVLFQFPFTSCGTRRITGDRAVYENELVATRDKVNGSRGVSVDTRDSIFRLHVS	CS	286
R.norvegicus	MKTSTFVLFQFPPLTSCGTRITGDQAMYENELVAIRDVQAWGRSSITRDSNFRLRV	CT	296
M.pahari	MTTATFVLFQFPFTSCGTRRITGDRAVYENELVAIRDVQAWGRSSITRDSNFRLRV	CI	293
M.mattheyi	MMTSTFVLFQFPFTSCGTRRITGDQAVYENELVAIPDVQAWGRSSITRDSNFRLRV	CT	293
	* * :*****:*****:..*****:***** * : .*.***** **:***		
H.sapiens	YVSSNSLPINQVFTLPPFPETQPGPLTLELQIAKDKNYGSYYGVDYPVVKLLRDP	I	346
R.norvegicus	YSIHSMSPVNMQVWTLPPPLPKTQPGPLSLELQIAQDKNYSSYYGTDAYPLVKFLQDP	I	356
M.pahari	YSALSNTSPVNMQVLALPPPLPKTQPGPLSLKLQIAKDKSYGSYYGSDAYPLVKFLQDP	I	353
M.mattheyi	YSALSNTSPINMQVLALPPPLPKTQPGPLSLELQIAKDKSYGSYYGSDAYPLVKFLQDP	I	353
	** * :*:* * :*****:*****:*.*****:*.***** * :*:*:*:***		
H.sapiens	YVEVSIHRTDPYLGILLQCCWATPSTDFLSQPQWPILVKGCPIYIGDNYQTQLIPVQK	AL	406
R.norvegicus	YVEVSIHRTDPSLSLLELQCCWATPGSNPFHQQPWPILVKGCPIYAGDNYQTKRIPVQK	AS	416
M.pahari	YVEVSIHRTDPSLGLLELQCCWATPGSNPFHQQPWPILVKGCPIYAGDNYQTKRIPVQK	AS	413
M.mattheyi	YVEVSIHRTDPSLGLLLDQCCWATPGSNPFHQQPWPILVKGCPIYAGDNYQTKRIPVQK	TS	413
	*****:***** * :***:*****:..* : ***** ***** *****: *****:		
H.sapiens	DLFPPSHHQRFISITFSFVNPTVEKQALRGPVHLHCSVSVCPAETPSCVVTCPDLSRRR		466
R.norvegicus	-DVFP SHHQRFISITFSFMSAGREKQVLGGQVYLHCSASVCPAGMPSCVTICPASRRRR		475
M.pahari	-SFP SHHQRFISATFSFMSAAREKQVLSGQVYLHCSASVCPAGMPSCVIVCPASRRRR		472
M.mattheyi	-SFP SHHQRFISIDTFSFMSAVREKQLLSGQVYLHCSASVCPAGMPSCVTVCPASRRRR		472
	***** ***** :. * * * * * :***** ***** * :. * * * *		
H.sapiens	NFDNSSQNTTASVSSKGPMLLQATKDPPEKL---RVPVDSKVLWVAGLSGTL-ILGAL		521
R.norvegicus	KSELYFDNST-SISSKGPVILLQATKDPVAVMLHKHSGTHADSP TLWVMGLSASMVITGV		534
M.pahari	KSELYFENTT-SISSKGPVILLQATKDSANVLRHSSAPVDSPALWVMGLSATMI IIGV		531
M.mattheyi	KSELHFETTT-SISSKGPLILLQATKDSADMLHRHSRTPVDSTALWVMGLSATVIITGV		531
	: : :*:*:*****:***** * . * . * . * * * * * : * * :		
H.sapiens	LVSYLAVKKQKSCPDQMCQ		540
R.norvegicus	VVSYLA TRKQR-----		545
M.pahari	VVSYLAIRKLR-----		542
M.mattheyi	VVSYLAIRKLR-----		542
	:***** :* :		

Figura 45. Comparación de las secuencias de aminoácidos de ZP4 de *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *M. pahari* y *M. mattheyi*. Los números de acceso de las secuencias usadas son: *H.sapiens* (NP_067009) y *R.norvegicus* (NP_758833). Aminoácidos idénticos se indican con asterisco (*). Dos puntos (:) indican residuos conservados y punto (.) residuos semiconservados. El dominio trefoil se muestra en azul. El dominio ZP en rojo y el dominio transmembrana en naranja. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. Los residuos cisteína se señalan en verde y los sitios potenciales de N-glicosilación en morado.

5.2.1.2 Análisis filogenético del gen ZP4 en roedores

El análisis de las secuencias de ARNm de ZP4 de los distintos roedores nos indica que las especies estudiadas están libres de codones de stop. Por tanto, *Mus mattheyi* (subgénero *Nannomys*), *Mus pahari* (subgénero *Coelomys*), ambos dentro del género *Mus*, así como *Mastomys coucha* perteneciente al género *Mastomys* presentarían un gen ZP4

funcional. No hemos podido incluir a *Mastomys coucha* en el árbol filogenético elaborado debido a que las secuencias de ZP4 obtenidas no se solapan entre sí; sin embargo, conocemos con bastante precisión la localización de *Mastomys* en el árbol de los roedores ya que es un taxón hermano de *Praomys* (Lecompte *et al.*, 2005).

De manera que, los codones de stop se localizarían sólo en 6 especies de ratones pertenecientes al subgénero *Mus*: *Mus caroli*, *Mus cypriacus*, *Mus macedonicus*, *Mus musculus*, *Mus spicilegus* y *Mus spretus*. En el árbol filogenético de ZP4 que hemos elaborado para roedores, se observa pseudogenización del gen ZP4 en estas especies de roedores. El resto de roedores presentarían un gen ZP4 funcional (Fig. 46). Nuestro árbol filogenético confirma la monofilia de este subgénero e indica que la pseudogenización de ZP4 tuvo lugar tras la divergencia del subgénero *Mus* y antes de la diversificación de las especies.

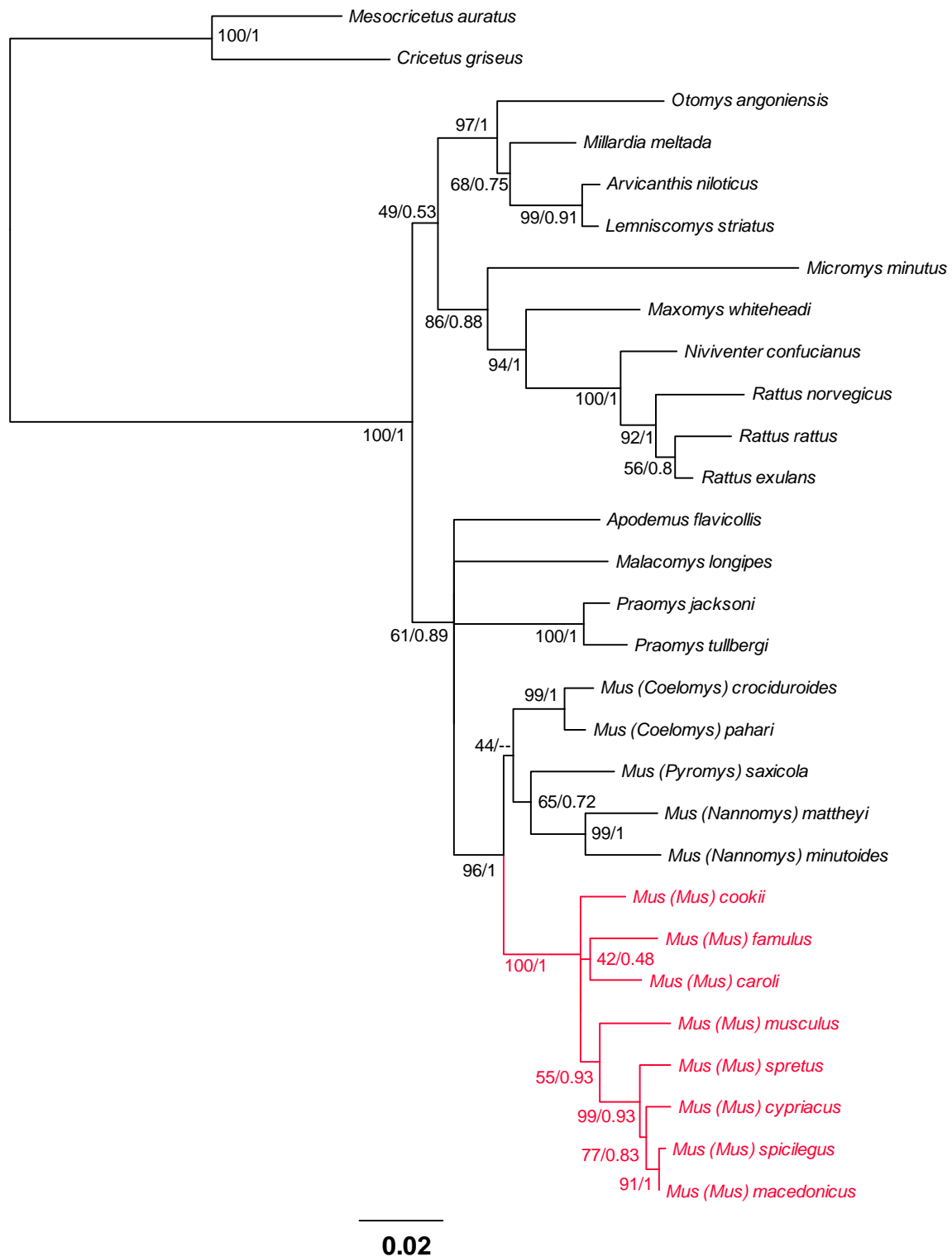


Figura 46. Árbol filogenético donde se observan las relaciones existentes entre *ZP4* de diferentes especies de roedores. La escala indica el número de sustituciones por sitio. A nivel de cada rama se indica el valor de bootstrap y de inferencia bayesiana del nodo al que se dirige la rama. En rojo se señalan aquellas especies en las que *ZP4* es un pseudogén.

5.2.2 PROTEÓMICA DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELÚCIDA DE ROEDORES

Una vez demostrada la presencia de los cuatro transcritos (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) en los ovarios de los tres roedores (*Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*) nos propusimos estudiar la presencia de las diferentes glicoproteínas de la ZP en dichos roedores. Para ello, se obtuvieron ZPs solubilizadas por calor a partir de ovario así como ZPs aisladas a partir de ovocitos como se ha descrito previamente en el apartado de Material y métodos.

5.2.2.1 Péptidos de ZP1 y ZP4 detectados en *Mus mattheyi*

En *Mus mattheyi*, se identifican 2 péptidos pertenecientes a ZP1 y un total de 12 péptidos pertenecientes a ZP4 (Tabla 21).

Tabla 21. Péptidos correspondientes a las glicoproteínas ZP1 y ZP4 de la ZP de *Mus mattheyi* detectados por espectrometría de masas. Los péptidos señalados en rojo presentan un score superior a 5 y un SPI superior a 60.

Mus mattheyi

ZP1				
Péptidos	Score	SPI	Secuencia	n
HIPCVMKGGSPKEACQQAGCCYDSAK	3.26	58.6	234-258	2
GDNYRTQVVATDK	3.37	90.6	474-486	3
ZP4				
Péptidos	Score	SPI	Secuencia	n
GSHYVMVSMQEVDVAGNMTGTREER	5.68	78.1	105-129	12
FSIAVSRNATSPPLRLDSLHLVFR	4.31	50.6	202-225	1
RRKSELHFETTTSISSKGPLILLQATK	3.48	56.2	471-497	1
LLKCPLDLRAPDAPSAEVCSPVPVK	3.54	64.2	130-154	1
DKSYGSYYGSDAYPLVK	3.38	63.6	331-347	1
KSELHFETTTSISSKGPLILLQATK	7.17	57.5	473-497	2
TSSPFPSHHQRFSIDTFSFMSAVR	7.03	56.8	412-435	1

FSIDTFSFMSAVREK	5.04	64.9	423-437	1
TQPGPLSLELQIAKDK	3.74	58.6	317-332	1
RKSELHFETTSSISSKGPLILLQATK	3.60	54.1	472-497	1
CTREGRFSAVSRNATSPPLR	4.30	50.9	196-216	1
CTREGRFSAVSR	4.28	86.1	196-208	1

La detección de estos 12 péptidos en la glicoproteína ZP4, supone un 30.99% de la cobertura total de la proteína madura. Dos de los sitios potenciales de N-glicosilación (Asn122 y Asn209) han sido detectados en péptidos lo que indica que estos sitios no estarían glicosilados en la proteína madura. Además, de los 76 sitios potenciales de O-glicosilación de la proteína madura, 33 de ellos se detectan en péptidos por proteómica, lo que indica que estos sitios no están ocupados en la proteína madura (Fig. 47).

1 **MAGQALRSTL** **WLLPSILLCF** **PFCPPLSGQH** VTELPGVLHC GLQSFQFTAN LSLGAESPVL
61 TAWDSQGLPH RLK**NDSDCGI** WMTD**SPDGFL** VLKATYNGCY **VTLKGS**SHYVM **MVSMQ**EVDVA
121 **GNMTG**TRERL LKCPLDLRAP **DAPSAEVCSP** VPKERLPCA **PSPI**SRGDCE EVGCCY**SS**SEE
181 EEAGSCYYGN **TVTSR**CTREG **RFSIAVSRNA** **TSPPLRLDSL** HLVFR**NSS**GC DPVMM**TST**TFV
241 LFQFP**FT**SCG **TARRIT**GDQA VYENELVAIP DVQAWGR**SSI** **TRDS**NFRLRV **SCTYSALS****NT**
301 **SPINMQVLAL** PPPLPK**TQPG** **PLSLELQIAK** **DKSYGS**YYGS **DAYPLVKFLQ** DPIYVEV**S**II
361 HRTD**PSL**GLL LDQCW**ATPGS** NPFHQ**PQWPI** LVKGCPYAGD NYQ**TKRIPVQ** **KTSS**PF**PSHH**
421 **QRFSIDTF**SF **MSAVREK**QLL **SGQVYLHCSA** **SVCQPAGMPS** CV**TVCPASRR** **RRKSELHFET**
481 **TTSISSKGPL** **ILLQATK**DSA DMLHR**SRTP** VD**STALWVMG** **LSATV**II**TGV** FV**VS**YLAI**RK**
541 LR*

Figura 47. Secuencia de aminoácidos de ZP4 de *Mus mattheyi*. Las secuencias en negrita y subrayadas representan los péptidos detectados por MS/MS. Los sitios putativos de N-glicosilación se muestran en rojo y los sitios putativos de O-glicosilación en azul. El péptido señal y el sitio de corte de furina se señalan en rosa.

5.2.2.2 Péptidos de ZP1 y ZP4 detectados en *Mus pahari*

En *Mus pahari*, se detectan 2 péptidos de ZP1 y un total de 6 péptidos de ZP4 (Tabla 22).

Tabla 22. Péptidos correspondientes a las glicoproteínas ZP1 y ZP4 de la ZP de *Mus pahari* detectados por espectrometría de masas. Los péptidos señalados en rojo presentan un score superior a 5 y un SPI superior a 60.

Mus pahari

ZP1				
Péptidos	Score	SPI	Secuencia	n
FTIATFTLLDSSSQNALR	4.58	62.5	498-515	1
SGYFTLVVSQETALTHGVMLDNVR	5.73	70.7	275-298	2
ZP4				
Péptidos	Score	SPI	Secuencia	n
CPVDLHTTDASNAEVCSPVPVK	6.75	60.2	133-154	3
LLKCPVDLHTTDASNAEVCSPVPVK	3.34	55.1	130-154	1
AVYENELVAIRDVQAWGRSSITR	5.91	70.9	260-282	1
ERLLKCPVDLHTTDASNAEVCSPVPVKER	3.44	60.8	128-156	2
RIPVQKASSPFSSHQRFSIA	5.39	62.8	406-426	4
RERLLKCPVDLHTTDASNAEVCSPVPVK	4.03	52.8	127-154	1

La identificación de los 6 péptidos de ZP4 suponen un 16.74% de la cobertura total de la proteína madura. De los 73 sitios potenciales de O-glicosilación de la proteína madura 11 están presentes en los péptidos secuenciados indicando la ausencia de glicosilación en estos residuos de serina o treonina o incompleta glicosilación. Ninguno de los sitios potenciales de N-glicosilación es detectado, lo que podría indicar que estos sitios se encuentran ocupados en la proteína madura (Fig. 48).

1 **MAGQALRSTL** **WLLPSIFLCF** **PFCPPLSGQH** **VTE**LPGLVHC **RLQSFQFTVN** **LSLEAES**PVL
 61 **TAWDSQGLPH** **RLK****NDS**DCGT **WVMDS**PDGFL **VLEAT**YNGCY **VTLEGS**HVYM **MVG**VQEVDA
 121 **GNITGR**RERL **LKCPVDLHTT** **DASNAEVCSP** **VPV**KERLPCA **PSPI**SRGDCE **EAGCCYSS**EE
 181 **EEAGS**CYYGN **TVTSR**CTREG **RFSIAVSRNA** **TSPPLHLDSL** **RLVFRD**NSAC **DPVM**TTATFV
 241 **LFQFPF**TSCG **TTRRIT**GDKA **VYENELVAIR** **DVQAWGRSSI** **TRDSNFRLRV** **SCIYSALSNT**
 301 **SPVNM**QVLAL **PPPLPK**TQPG **PLSLKLQIAK** **DKSYGS**YYGS **DAYPLVKFLQ** **DPIYVEV**SII
 361 **HR**T**DP**SLG**LL** **LEQCWATPGS** **NPFHQ**PQWPI **LVK**GCPYAGD **NYQ**TKRIPVQ **KASSPFP**SHH
 421 **QRFSIA**TFSF **MSAAREKQVL** **SGQVYLHCSA** **SVCQ**PAGMPS **CVIVCPASRR** **RK**SELYFEN
 481 **TTSISS**KGPV **ILLQATK**DSA **NVLPRHSSAP** **VDS**PALWVMG **LSATMI**IIGV **LVV**SYLAIRK
 541 LR*

Figura 48. Secuencia de aminoácidos de ZP4 de *Mus pahari*. Las secuencias en negrita y subrayadas representan los péptidos detectados por MS/MS. Los sitios putativos de N-glicosilación y O-glicosilación se muestran en rojo y azul respectivamente. El péptido señal y el sitio de corte de furina se señalan en rosa.

5.2.2.3 Péptidos de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 detectados en *Mastomys coucha*

En *Mastomys coucha*, se detectan 19 péptidos pertenecientes a ZP1, 7 péptidos a ZP2, 3 a ZP3 y 18 a ZP4; todos ellos (excepto uno perteneciente a ZP1) presentan un score superior a 5 y un SPI superior a 60 (Tabla 23).

Tabla 23. Péptidos correspondientes a las glicoproteínas ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 de la ZP de *Mastomys coucha* detectados por espectrometría de masas. En rojo se indican los péptidos detectados a partir de ZPs aisladas solubilizadas y en verde los péptidos detectados a partir de ovocitos solubilizados.

Mastomys coucha

ZP1					
Péptidos	z	m/z	Score	SPI	n
GHIPCMVKGSSKEACQAGCCYDSTKE	3	1013.27	10.47	80.1	1
SKETCQAGCCYDSTK	2	956.41	10.46	71.6	1
EDAAKLEPSGSSRSSSS	3	565.83	9.54	76.7	1
LDSSQNALRGQVYFFCSASACHP	3	890.67	8.24	82.0	1
MQLLVFPRPNQTVQFKVLDEFGN	3	912.18	8.15	86.1	1
GHIPCMVNGSSKET	1	1553.89	7.99	78.3	1
ILSDGCPFKGDNYRTQVVATDKEALPFWSHY	3	1232.14	7.76	70.2	1

PCMVNGSSKETCQAGCCYDS	3	791.33	7.69	94.7	1
TAKLEPSGSSRNSSRMLLLL	3	813.91	7.25	81.2	1
VSDIDVQKGPQGSITRDSAFRLHV	3	875.80	6.57	75.0	1
CFKSGYFTLVVVSQETALTHGVML	3	875.77	6.37	89.2	1
GRVDIARDVTLICPKPDHIMTP	3	875.23	6.22	72.0	1
RVFIQAVLPNGRVDIA	2	884.62	6.22	73.0	1
HYQRFTIATFTLLDSSSQNALRGQ	3	945.01	6.11	73.2	1
ENQLVSDIDVQKGPQGSITRDS	3	848.97	5.98	97.6	1
NSTLRALDIVSSPGAVGFEDTAKLEPSGSSR	5	649.33	5.35	71.8	1
LRALDIVSSPGAVGFEDTAKLEP	3	821.74	5.09	83.7	1
RIATDKTFSSYYQGS DYPLVR	3	876.91	5.07	73.1	1
RSSGHHNSTLRALDIVSSPGAVGFEDTAK	3	1057.32	3.51	53.9	1
ZP2					
Péptidos	z	m/z	Score	SPI	n
FYFQGNMLSTVIDPECHCESPVSIDELCAQDGFMDFEVYSHQT K	3	1724.11	9.53	75.0	1
QVNIRVGDTTTTDVRYKDDMYHFFCPAIQAE	3	1229.69	8.99	71.4	1
FMDFEVYSHQTKPALNLDTLVGNSSCQPIF	3	1230.31	8.33	72.0	1
PIYMEVKVLSRNDPN	3	592.05	6.88	70.3	1
NATGIVHYVQES	1	1479.90	6.85	80.3	1
QWSIPE	1	759.42	5.74	71.6	1
SSLKLTFFYFQGNMLST	3	645.34	5.61	89.0	1
ZP3					
Péptidos	z	m/z	Score	SPI	n
LVQPGDLTLGSEGCQPR	2	913.78	11.45	98.8	1
HLQAEVQTGSHL	1	1402.10	5.32	85.8	1
CSSRVQMTKDALVYSTFLLDHPRP	3	946.40	5.04	84.4	1
ZP4					
Péptidos	z	m/z	Score	SPI	n
YNGCYVTLKGSHYVMMVSMQEVDVAGNMTGTRERLLKCPPL	3	1554.61	10.52	76.0	1
EGSHYVMMVGVQEV DVAGNITGR	3	875.75	8.86	74.4	1
TDPSLGLLLEQCWATPGSNPFHQWPILVKGC	3	1230.15	8.61	78.7	1
RFSIDTFSFMSAVREKQLLSG	3	839.26	7.23	84.5	1
SALSNTSPINM	2	648.84	6.99	80.6	1
LKNSDCGIWMTDSP	2	888.89	6.87	88.9	1
IHRTPSLGLLLEQC	3	591.97	6.71	81.4	1
SCGTARRITGDQAVYENELVAIP	3	875.22	6.61	77.7	1
AEVCSPVPVKERLPCAPSPISRGDCE	3	966.31	6.55	71.3	1
ALPPPLPKTQPGPLSLKLQIAKD KSYG	3	979.12	6.55	82.8	1
MSAAREKQVLSGQVYLHCSAS	3	815.06	5.66	92.4	1
SRGDCEEAGCCYSSEEE EAGSCYYGNTV	3	1026.31	5.63	79.6	1
AVSRNATSPPLRLDSLHLVFRNS	3	877.25	5.52	70.5	1
PAGMPSCVTVCAPARRRRKSELH	3	892.04	5.37	88.8	1
KNSDCGIWMTD	3	462.24	5.25	82.1	1
VNMQVLA	2	396.24	5.24	80.6	1
GSHYVMMVSMQEVDVAGNMTGTR	3	892.04	5.35	87.1	1
NDSDCGIWMTDSPDGLVLK	3	791.33	5.14	90.5	1

5.2.3 ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE LA ZONA PELÚCIDA DE RATONA A LA DIGESTIÓN CON TRIPSINA

Se realizaron dos experimentos, midiéndose el tiempo en el que se digería totalmente la ZP empleando tripsina. Los resultados indican que en aquellas especies de ratones con una ZP compuesta por tres glicoproteínas la digestión completa de la ZP tarda más tiempo en producirse que en las especies con cuatro glicoproteínas en su ZP (Tabla 24).

Tabla 24. Tiempo que tarda la tripsina en digerir la ZP de roedores de diferentes especies.

	n	Tiempo digestion
<i>M. musculus</i>	10	78m10s
<i>M. mattheyi</i>	10	46m 40s

ESPECIE	n	Tiempo digestión
<i>M. musculus</i>	8	60m 30s
<i>M. pahari</i>	11	30m 10s

5.2.4 FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN ROEDORES

Se realizaron ensayos de fecundación *in vitro* (FIV) empleando cuatro especies de ratones de la subfamilia Murinae con una composición de la ZP diferente: *Mus musculus* (ZP1, ZP2, ZP3) y *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari* (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4).

Ovocitos de las cuatro especies fueron coincubados con espermatozoides de la misma especie (fecundación homóloga) o de diferente especie (fecundación heteróloga).

La fecundación homóloga únicamente fue posible en *Mus musculus* (81.61%). En las otras especies, o no se consiguió fecundación o el ratio fue muy bajo (0% en *Mastomys coucha* y *Mus mattheyi* y 3.84% en *Mus pahari*).

En la fecundación heteróloga, los porcentajes más elevados se obtuvieron cuando los espermatozoides de *Mus musculus* participaron en el proceso (69.43% en coincubación con ovocitos de *Mus pahari* y 10.98% en coincubación con ovocitos de *Mus mattheyi*). El porcentaje de fecundación en los casos en los que participaron los espermatozoides de *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari* fueron muy bajos (Fig. 49).

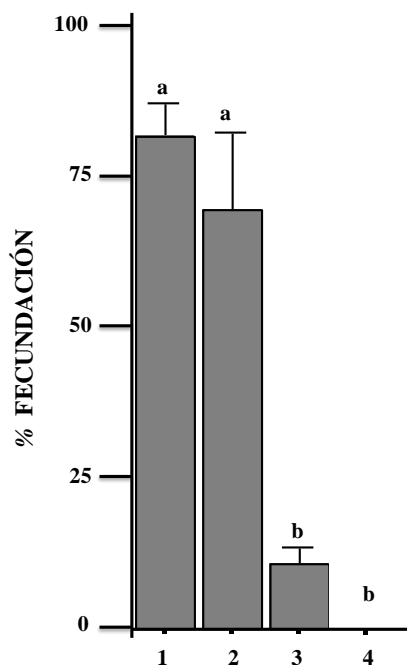


Figura 49. Porcentaje de fecundación en FIV de roedores. Se muestran los resultados de FIV usando espermatozoides de *Mus musculus* con 1) ovocitos de *Mus musculus*. 2) ovocitos de *Mus pahari*. 3) ovocitos de *Mus mattheyi* y 4) ovocitos de *Mastomys coucha*.

5.3 ANÁLISIS DE LA ZONA PELÚCIDA DE CARNÍVOROS

5.3.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA ZONA PELÚCIDA DE CARNÍVOROS

5.3.1.1 Secuencias de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 amplificadas en la hurona

Una vez obtenido el ARN total de ovarios de hurona, el ADNc sintetizado se empleó como molde para realizar las distintas amplificaciones por PCR con el objetivo de obtener fragmentos de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 (Fig. 50). La secuenciación automática de las PCRs indicó que las secuencias amplificadas se correspondían con dichos transcritos (Tabla 25).

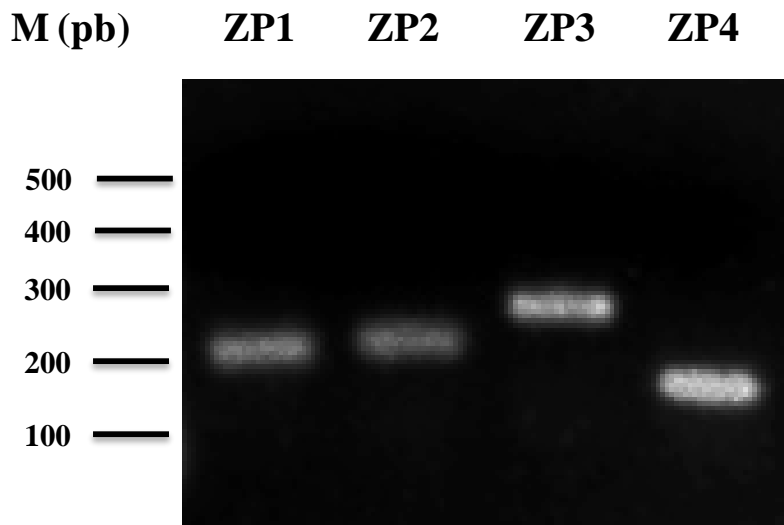


Figura 50. Análisis de la expresión génica de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en el ovario de hurona mediante RT-PCR. Se muestran los amplicones correspondientes a fragmentos de cada transcrito.

Tabla 25. Secuencias obtenidas de los cuatro transcritos (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) en la hurona. Se indica la longitud de nucleótidos (nt) de cada secuencia, así como el fragmento que se ha amplificado.

ADNc	Secuencia de ADNc amplificada
ZP1 2421 nt	609 GGTGACGAGCCACCATACTCAGGTGCACCTCTGACTCCAGAGCTGTGCCAGGTGCCCTCAAGGGCCA TCTCCTGTGGAGTGGGAAGAAGCTCGAAGGAAGCCTGCCAGCAGGCTGGCTGCTGTATGACAACAGCAGAG CGATTCCCTGTTACTATGGCAACACAGCAACTGTCCAGTGTTCAGAAATGGCCACTTTGTCTGGTGGTG TCCCAAGAACTGCCTTGGCGCACGGGATCACGCTGGCCAACCTCCACATGGCCTATG 877
ZP2 2145 nt	255 ACTGCATTTCCATCCTGGACTCAGAAAAGCTCACCCCTGAATGTCCCATATGAGACCTGTACCAAGAGA GTGCATGGCCAGCACCTGATTGCCATCGGTCTCCTGGACAACACTACTGCTTTACCATCTACGACTTTCATA TATCACATCAGATGTCCAGTTGCACAAGCAG 425
ZP3 1293 nt	739 TCTGATGCCTCTTCGTCCTTCAAAGAGCCCAGACCCAGGCCAGAGACACTGCAGTTTACAGTGGACAT GTTCCACTTTGCTAATGACTCCAGAAACATGATCTATATCACGTGCCATCTGAAGTCACTCTGGCAGACCG AGTCCCGGACCAGCTAAACAAAGCCTGTTCTTTTATCAAGTCCAGCAGGAGGTGGTCCCCCGTAGAAGGCAC TGCTGACA 958
ZP4 1668 nt	411 ACGCAGCACGGTTACAAGACAAAGCTGCTTAAGTGTCTGTGGATCCCCAGCCCTAGATGTCCAA ACGCTGACCTGTGTGATTCTGTCCCAGTGTGGGACAGGCTGCCATGTGCTCCTTCATCTATCAGTCAAAGAG ATTGTGAGAAGGTTGGTTGCTGCTACAATTTGGAGGCTAATTCCTGTTACTATGGAAACACAGTGACGTCCC ACTGTACCCAAGATGGCCACTT 644

5.3.1.2 Secuencias de ZP2, ZP3 y ZP4 amplificadas en la zorra

Tras la obtención de ARN total de ovarios de zorra, el ADNc obtenido se utilizó como molde para realizar las distintas amplificaciones por PCR con el objetivo de obtener el marco abierto de lectura completo de ZP4, así como fragmentos de ZP2 y ZP3 (Fig. 51).

Se realizaron múltiples intentos para amplificar la secuencia de ZP1 en la zorra; sin embargo, en ningún caso se logró amplificación, por lo que se realizó un control empleando los mismos cebadores y ADNg en vez de ADNc. En este caso se consiguió amplificar la secuencia buscada (Fig. 51 (calle 1)). Esto nos indica que los cebadores están correctamente diseñados y funcionan bajo nuestras condiciones de amplificación por PCR. En el apartado 5.3.1.3.1 se analiza en profundidad este resultado.

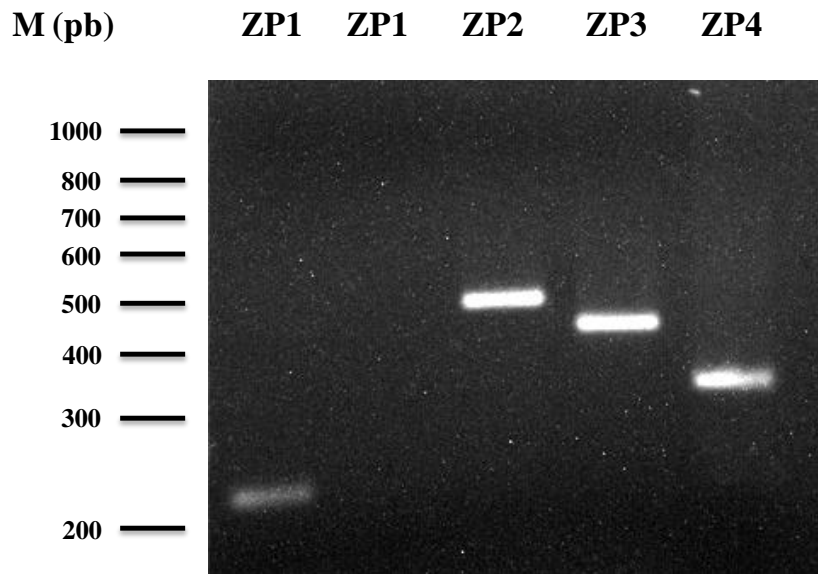


Figura 51. Análisis de la expresión génica de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 en el ovario de zorra mediante PCR. Se muestran los amplicones correspondientes a fragmentos de cada ZP. En la calle 1 se muestra el fragmento de *ZP1* amplificado empleando ADNg. En la calle 2 se ha intentado amplificar *ZP1* empleando ADNc. Las calles 3, 4 y 5 muestran fragmentos amplificados de *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* empleando ADNc.

5.3.1.2.1 Caracterización de ZP4 de zorra

El marco abierto de lectura de ZP4 contiene una secuencia codificante de 1704 nucleótidos (Fig. 52). La secuencia obtenida fue depositada en el GenBank con número de acceso KF956365. El codón de iniciación (ATG) se predijo con el algoritmo de Pedersen y Nielsen (1997) y se encuentra asociado con el entorno Kozak (Kozak, 1991). La secuencia contiene un codón de stop (TAG) en las posiciones 1705-1707.

El ADNc de ZP4 codifica un polipéptido de 568 aminoácidos (Figs. 52 y 53), con un peso molecular teórico de 63.25 kDa. Contiene un péptido señal de 16 aminoácidos con corte entre Ala16 y Leu17, que fue predicho con el algoritmo de Bendtsen *et al.*, (2004) y el sitio de corte de furina es Gln499

(Duckert *et al.*, 2004), de modo que el peso molecular de la proteína madura se estima en 53.87 kDa.

ZP4 presenta un dominio ZP de 274 aminoácidos (His224-Ala497) con 10 residuos cisteína. Justo antes del dominio ZP encontramos un dominio trefoil de 45 aminoácidos (Asp178-Thr222) con 6 cisteínas y el dominio transmembrana se encuentra entre Thr544 e Ile566 con 23 aminoácidos.

```

1 atgcggcagctgcagatcatcttgctctgtttcccttgctctcttgcggtgaggggcccac
1 M R Q L Q I I L L C F P L S L A L R G H
61 cctgagcctgaggcaccagattatctgggtgagctccactgtgggctccggagtcttcgg
21 P E P E A P D Y L G E L H C G L R S L R
121 ttcaccgtaaacctgagccaggggacagcgactcctacgctaatactgggatgaccac
41 F T V N L S Q G T A T P T L I A W D D H
181 gggctgccacgcaggctgcagaatgactctggctgtggtacctgggtgacggagggccca
61 G L P R R L Q N D S G C G T W V T E G P
241 ggaagctccatgggtgtagaagcctcttatgatggctgctatgtcaccgagtggtgagg
81 G S S M V L E A S Y D G C Y V T E W V R
301 acgactcgatcaccagaaatgccaaggccccgtgctcaccatcaggggtgtctccccag
101 T T R S P E M P R P R A S P S G V S P Q
361 gacccccactatatcatgatggttgagttgaaggagcagatgtggctggatgcaacatg
121 D P H Y I M M V G V E G A D V A G C N M
421 gttaccaagacacagctgctcaggtgtcctatggatccccagacccaactttgttatct
141 V T K T Q L L R C P M D P P D P T L L S
481 agcttgagttactctcctgatcaaaacagagccctagatgtcccaaagtctgatctgtgt
161 S L S Y S P D Q N R A L D V P N A D L C
541 gactttgtcccagtggtggacaggctgcatgtgttccttcacccatcactgaaggagac
181 D F V P V W D R L P C V P S P I T E G D
601 tgcaagaagattggttgctgctacaattcggagggtgaatttctgttattatggaaacaca
201 C K K I G C C Y N S E V N F C Y Y G N T
661 gtgacctcactgtacccaagatggctacttctacatcactgtgtctcgggatgtgacc
221 V T S H C T Q D G Y F Y I T V S R D V T
721 tcgccccacttctctgaattctgtgctgcttggccttcgggaatgatgtggaatgtacc
241 S P P L L L N S V R L A F G N D V E C T
781 cctgcatggcaacacacacttttgccctattctggtttccatttaactcctgtggtacc
261 P A M A T H T F A L F W F P F N S C G T
841 acaagacggatcactggagaccaggcagtatatgaaaatgagctggttgagctagagat
281 T R R I T G D Q A V Y E N E L V A A R D
901 gttagaacttgagccatggttctatcaccctgacagatattttcagggtccgaggttagc
301 V R T W S H G S I T R D S I F R L R V S
961 tgcagctactctataagtagcaatgccttcccagttaatgtccacgtgtttacatttcca
321 C S Y S I S S N A F P V N V H V F T F P
1021 ccaccgattctgagaccagcctggaccctcactctggaactcaagattgccaaggat
341 P P H S E T Q P G P L T L E L K I A K D
1081 aagcactatggttcttctacactggttggtgactaccagtggtgaagctacttcgggat
361 K H Y G S F Y T V G D Y P V V K L L R D
1141 cccatttatgtggaggtctctatccgccacagaacagacccccacctggggctgctcctc
381 P I Y V E V S I R H R T D P H L G L L L
1201 cttactgttgggcccacaccagcagaacccacagcatcagccccagtggtcatgcta
401 H Y C W A T P S R N P Q H Q P Q W L M L

```

```

1261 gtgaaaggggtgccctacactggagacaactatcagacgcagctgattcctgtccagaaa
421  V K G C P Y T G D N Y Q T Q L I P V Q K
1321 gtcctggatcctccatttccatcttactaccagcgcttcagcatttttaccttcagcttt
441  V L D P P F P S Y Y Q R F S I F T F S F
1381 atagactcgggtgacaaagtgggactcaggggaccgggtgatctgcactgtagtgcaccc
461  I D S V T K W A L R G P V Y L H C S A S
1441 gtctgccagcctgctggaacaccgtcctgtatgataacctgtcctggtgccaggcaaaga
481  V C Q P A G T P S C M I T C P V A R Q R
1501 agaaactctaacatccattttcacaaccatactgctagcatttctagcaaggggtcccatg
501  R N S N I H F H N H T A S I S S K G P M
1561 attctactccaagccactaaagactcaggaagctccataaataactcaagttttcctgta
521  I L L Q A T K D S G K L H K Y S S F P V
1621 gactctcaaactctgtggatggcaggcctttctgggaccttaatcgttggagccttgta
541  D S Q T L W M A G L S G T L I V G A L L
1681 gtgtcctacttagctatcaggaaa tag
561  V S Y L A I R K -

```

Figura 52. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ZP4 de zorra. Los codones de inicio y fin se muestran en rosa. El péptido señal en verde. El dominio trefoil en azul. El dominio ZP en rojo. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. El dominio transmembrana se muestra en naranja.

Un total de 89 sitios potenciales de O-glicosilación se localizan en la proteína madura y 3 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn-X-S/T) en posiciones Asn44, Asn68 y Asn509, de los cuales solamente los dos primeros se encontrarían en la proteína madura (Fig. 53).

```

1  MRQLQIILLC FPLSLALRGH PEPEAPDYLG ELHCGLRSLR FTVNLSQGTA TPTLIAWDDH
61  GLPRRLQNDS GCGTWTEGP GSSMVLEASY DGCYVTEWVR TTRSPEMPRP RASPSGVSPQ
121 DPHYIMMVGV EGADVAGCNM VTKTQLLRCP MDPPDPTLLS SLSYSPDQNR ALDVPNADLC
181 DFVPVWDRLP CVPSPITTEGD CKKIGCCYNS EVNFCYYGNT VTSHCTQDGY FYITVSRDVT
241 SPLLLLNSVR LAFGNDVECT PAMATHTFAL FWFPFNSCGT TRRITGDQAV YENELVAARD
301 VRTWSHGSIT RDSIFRLRVS CSYSISSNAF PVNVHVFTFP PPHSETQPGP LTLELKIAKD
361 KHYGSFYTVG DYPVVKLLRD PIYVEVSIRH RTDPHLGLLLL HYCWATPSRN PQHQPQWLML
421 VKGCPYTGDN YQTQLIPVQK VLDPPFPSYY QRFSIFTFSF IDSVTKWALR GPVYLHCSAS
481 VCQPAGTPSC MITCPVARQR RNSNIHFHNH TASISSKGPM ILLQATKDSG KLHKYSSFPV
541 DSQTLWMAGL SGTLLIVGALL VSYLAIRK*

```

Figura 53. Secuencia de aminoácidos de ZP4 de zorra. Los sitios putativos de N-glicosilación se muestran en rojo y los sitios putativos de O-glicosilación en azul. El péptido señal (1-16) y el sitio consenso para corte de furina (498-501) se encuentran subrayados.

5.3.1.2.1.1 Comparación de las secuencias de ZP4 de zorra con las secuencias de ZP4 de otros carnívoros

La comparación de la secuencia de ZP4 de zorra con las secuencias de otros carnívoros presenta la siguiente homología: 89% con la perra, 82% con la morsa, 80% con la hurona, 79% con la osa panda y 75% con la gata.

Gata	MWLLQPLLLCVPLSLAVHGQKPKVDPYPGELHCGGLQSLQFAINPSPGKATPALIVWDNR	60
Perra	MRQLQIILLCFPWSLALSGHPEPEAPDDLDELHCGLRGLRFTVNLISQGTATPTLIAGKH	60
Zorra	MRQLQIILLCFPWSLALSGHPEPEAPDYLGELHCGLRSLRFTVNLISQGTATPTLIAWDDH	60
Hurona	MWMLQSILLCLLSSLALSGHQKPEAPDYPGELHCGGLQSLQFTINLSQGTAAAPTLIAWDNH	60
Morsa	MWLLQSILLCFPLALASSSHQKPEAPDYPGELHCGLRSLQFTINLSQGTATPALIAWDNR	60
Panda	MWLLQSILLCFPLSLALSGHQKTEKPDYPGELHCGLWSLQFTINLSQGTAAAPTLIAWDNL	60
	* ** :*** . :** . : : * * * * * * . : * * * * * * .	
Gata	GLPHKLQNSGCGTWWRESPPGSLVLLDASYSSCYVNEWVSTTQSPGTSRPPTPASRVTPQ	120
Perra	GLPRRLQNSGCGTWWKRGPGSSMVLEASYDGCYVTEW-----	98
Zorra	GLPRRLQNSGCGTWWTEGPGSSMVLEASYDGCYVTEWVRTTRSPMPRPRASPSGVSPQ	120
Hurona	GLPHRLQNSGCGTRLREGPGSSMVLEASYSGCYVTEWVRTTQSPQMLRTPAPPSPGVTPQ	120
Morsa	GLPHRLQNSGCGIWLREGPGSSVLEASYSGCYVTEWGMTQSPGMLRPPAPPSPGVTPQ	120
Panda	GQPHRLQNSGCGTTLREGPGSSLVLEASYSGCYVTEW-----	98
	* * : * * * : * * * * . : . * * * . : * * * * . * * * * . * * *	
Gata	DSHYVMIVGVEGTDAAGR-VTNTKVLRCPRNPPDQALVSSLSPLQNVALEAPNADLC	179
Perra	DPHYVMLVGEADVAGRNMTKTQLLRCPMDPP-----DQNRALDVPNADLC	146
Zorra	DPHYIMMVGEADVAGCNMVTKTQLLRCPMDPPDPTLLSSLSYSPDQNRALDVPNADLC	180
Hurona	DPHYIMLLGVEADVTRSTVTKTKLLKCPVDPP-----ALDAPNADLC	164
Morsa	DPHYIMLLGVEADVAGRSMTKTMLKCPDTP-----ALDAPNADLC	164
Panda	DPHYIMLLGVEADVGRSIVTKTKLLKCPVDSP-----ALDAANADLC	142
	* * * : * * * * . * . : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * *	
Gata	DSVPKWDRLPCASSPITQGDCKNLGCCYKSEANSCYYGNTVTSRCTQDGHFSAIVSRNVT	239
Perra	DFVPVWDRLLPCVPSPI TEEDCKKIGCCYNLEVNFCYYGNTVTSHTQDGYFYIAVSRNVT	206
Zorra	DFVPVWDRLLPCVPSPI TEEDCKKIGCCYNSEVNFCYYGNTVTSHTQDGYFYITVSRDVT	240
Hurona	DSVPVWDRLLPCAPSSISQRDCEKVGCCYNLEANSYYGNTVTSHTQDGHFSAIVSRKVT	224
Morsa	DSVPVWDRLLPCAPSPITQGDCEKVGCCYNLEASSYYGNTVTSHTQDGHFSAIVSRKVT	224
Panda	DSVPVWDRLLPCAPSPITQGDCEKVGCCYNLEANSYYGNTVTSHTQDGHFSAIVSRKVT	202
	* * * * * * * . * * : * * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * *	
Gata	SPPLLLNSLR---LAFGKDRECNPVKATRAFALFFPFNSCGTTRWVTGDQAVYENELVA	296
Perra	SPPLLLNSVR---LAFRNDVECTPVMATHTFALFWFPFNSCGTTRRITGDQAVYENELVA	263
Zorra	SPPLLLNSVR---LAFGNDVECTPAMATHTFALFWFPFNSCGTTRRITGDQAVYENELVA	297
Hurona	SPPLLLNSVR---LAFRNDHECTPVMTHTFATFWFPLNSCGTTRRIIGDWVYENELVA	281
Morsa	SPPLLLNSVRLARLAFRNDHECTPVMATRTFALFWFSPFNSCGTTRLIIGDQAVYENELVA	284
Panda	SPPLLLNSVR---LAFRNDHECTPVMATRTFALFWFPFNSCGTTRRIIGDQAVYENELVA	259
	* * * * * * * : * * * * * * * . * * : * * * * * * * : * * * * * * *	
Gata	ARDVRTWSHGSITRDSIFRLRVS CSYSVRSNAFPLSVQVFTIPPHLKTQHGLTLELKI	356
Perra	ARDVRTWSHGSITRDSIFRLRVS CSYSISSNAFPVNVHVFTFPPHSETQPGPLTLELKI	323
Zorra	ARDVRTWSHGSITRDSIFRLRVS CSYSISSNAFPVNVHVFTFPPHSETQPGPLTLELKI	357
Hurona	TRDVRAWSHGSITRDSIFRLQVSCSYLISSNASQVNVQIFTLPPPLPETQAGPLTLELKI	341
Morsa	ARDVRTWSHGSITRDSIFRLRVS CSYSISSNAFPVNVQVFTLPPHPETQAGPLTLELKI	344
Panda	AQDVRTWSHGSITRDSIFRLRVS CSYSISSNAFPVNVQVFTLPPHPETQAGPLTLELKI	319
	: *	
Gata	AKDKHYGSYYTAGDYPVVKLLRDPIIYEVSIHRHRTDPSLGLLLHNCWATPGKNSQSLSQW	416
Perra	AKDKHYGSYYTAGDYPVVKLLRDPIIYEVSIHRHRTDPSLGLLLHNCWATPSRNPQHQPQW	383
Zorra	AKDKHYGSYYTAGDYPVVKLLRDPIIYEVSIHRHRTDPSLGLLLHNCWATPSRNPQHQPQW	417
Hurona	AKDKHYGSYYTAGDYPVVKLLRDPIIYEVSIHRHRTDPSLGLFLQHCWATPSLNPQHQRQW	401
Morsa	AKDKQYGSYYTAGDYPVVKLLRDPIIYEVSIHRHRTDPSLGLLLHNCWATPSTNSQHQPQW	404
Panda	AKDKHYGSYYTAGDYPVVKLLRDPIIYEVSLRHRTDPSLGLLLHNCWATPSTNPQHQLQW	379
	* * * * * * * : * * * * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Gata	PILVKGC PVTGDDYQTLIPVQKALDTPFPSSYKRFISFTFSFVDTMAKWALRGPVYLHC	476
Perra	LMLVKGC PVTGDDYQTLIPVQKALDTPFPSSYKRFISFTFSFVDSVTKWALRGPVYLHC	443
Zorra	LMLVKGC PVTGDDYQTLIPVQKALDTPFPSSYKRFISFTFSFVDSVTKWALRGPVYLHC	477

```

Hurona      PMLVKGCPYAGDNYQTQLIPVQKALDPPFPSHYQRFSIFTFSVDSVTKKALGGLVYLHC 461
Morsa      PMLVKGCPYAGDNYQTQLIPVQKALDPPFPSYQRFSIFTFSVDSVTK-ALGGPVYLHC 463
Panda      PMLVKGCPYTGDDYQTQLIPVQKALDPPFPSYQRFSIFTFSVDSVTKRALGGPVYLHC 439
           .:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****
           .:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****

Gata       NVSICQPAGTSSCRITCPVARRRRHSDLHHSSTASISSKGPMILLQATMDSAEKLHKNS 536
Perra      SASVCQPAGTPSCMITCPVARRRRNSNIHFQNHTASISSKGPMILLRATKDS-EKLHKYS 502
Zorra      SASVCQPAGTPSCMITCPVARRRRNSNIHFFNHTASISSKGPMILLQATKDS-GKLHKYS 536
Hurona     SASICQPAGTPSCMITCPVARRRRNSNIHFFNHTASISSKGPMILLQATKDSSEKLHKKP 521
Morsa      SASVCQPAGTPSCMITCPVARRRRNSNIHFFNHTASISSKGPMILLQATKDSSEKLHKNS 523
Panda      SASVCQPAGTPSCMITCPVARRRRNSNIHFFNHTANISSKGPMILLQATKDSSENLHKNS 499
           .:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****
           .:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****

Gata       SSPIDSQALWMAGLSGTLIFGFLLVSYLAIRKRR 570
Perra      SFPVDSQTLWMAGLSGTLIVGALLVSYLAIRK-- 534
Zorra      SFPVDSQTLWMAGLSGTLIVGALLVSYLAIRK-- 568
Hurona     SSPVDSQALWMAGLSGTLIIGALLVSYLAIRKWR 555
Morsa      SSPVDSQALWMAGLSGTLIIGALLVSYLAIRKWR 557
Panda      GSPVDSQALWMAGLSGTLIIGALLVSYLAIRKWR 533
           .:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****
           .:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****.**:*****

```

Figura 54. Comparación de las secuencias de aminoácidos de ZP4 de distintos carnívoros: gata, perra, zorra, hurona, morsa y panda. Los números de acceso de las secuencias usadas son: gata (NP_001009260), perra (XP_536329), hurona (XP_004818413), morsa (XP_004411394) y panda (ENSAMET00000003247). Aminoácidos idénticos se indican con asterisco (*). Dos puntos (:) indican residuos conservados y punto (.) residuos semiconservados. El dominio trefoil se muestra en azul. El dominio ZP en rojo y el dominio transmembrana en naranja. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. Los residuos cisteína se señalan en verde y los sitios potenciales de N-glicosilación en morado.

5.3.1.3 Análisis del gen *ZP1* en carnívoros

Teniendo en cuenta que *ZP1* en la perra es un pseudogén (Goudet *et al.*, 2008), el objetivo de este estudio fue analizar dicho gen en otras especies de carnívoros.

Para ello se analizaron las secuencias de aquellas especies cuyo genoma se encuentra disponible en las diferentes bases de datos (Ensembl y PubMed) como son la foca de Wedell, el gato, el hurón, el oso panda, el oso polar y el tigre.

Tigresa	-----
Hurona	TVPPGGRPGRGSKAKQPSTVERKRNLDPWPQTQAHV
Osa_panda	-----
Osa_polar	-----

Figura 55. Comparación de las secuencias de aminoácidos de ZP1 de distintos carnívoros: foca de Wedell, morsa, gata, tigresa, hurona, panda y osa polar. Los números de acceso de las secuencias usadas son: foca de Wedell (XP_006743428), morsa (XP_004410145), gata (AEI98737), tigresa (XP_007092072), hurona (XP_004770521), panda (XP_002928701) y osa polar (XP_008705767). Aminoácidos idénticos se indican con asterisco (*). Dos puntos (:) indican residuos conservados y punto (.) residuos semiconservados. El dominio trefoil se muestra en azul. El dominio ZP en rojo y el dominio transmembrana en naranja. El sitio consenso para corte de furina está subrayado. Los residuos cisteína se señalan en verde y los sitios potenciales de N-glicosilación en morado.

5.3.1.3.1 Análisis del gen *ZP1* en la perra y la zorra

El estudio de la presencia del ARNm de ZP1 en el ovario de zorra ha sido estudiado. Para ello, se realizaron múltiples amplificaciones por RT-PCR empleando ADNc; sin embargo, ninguna de las amplificaciones por PCR tuvo un resultado positivo. Para comprobar si nuestros resultados eran correctos, trabajamos con ADNg de zorra y empleamos los mismos cebadores en la amplificación por PCR, en este caso el resultado de la PCR fue positivo (Ver fig. 51 apartado 5.3.1.2).

Además, como control de nuestros resultados, realizamos el mismo ensayo con ADNg y ARNm obtenido de ovario de perra empleando los mismos cebadores en la amplificación por PCR. Al igual que en la zorra, la PCR únicamente fue positiva cuando empleamos ADNg.

Dado que Goudet *et al.*, en 2008, describen varios codones de stop en distintos exones de ZP1 de la perra (exones 3, 5 y 8), se procedió a amplificar una región correspondiente al exón 8 en la perra y en la zorra.

Tras la amplificación y secuenciación de los fragmentos, la comparación de las secuencias obtenidas muestra una alta similitud, presentando un codón de stop conservado en ambas especies (Fig. 56).

```

Perra      -----QVSI SPRPPPAPVSPSGPCGSSSNHQGYGAPRPAEETFCSY*EERDYPNIR
Zorra      FNASSLLLLQVSI FFPQPPAPVSPSGPCGSSSNHRGYGAPRATDETFC SY*EERDYPNIR
           **** *:*****:***** :*****
Perra      LPCKPVPVGVRLRLRAQTPVWSCCCT SAGPLVPAPSSSLSGPSYQTDEWQGMFLLPQGVT
Zorra      LPCKPVPVGVRLRLRAQTPVWSCCCT SAGPLLVPAPSSSLSGPSYQTDEWQGMFLLPQGVT
           ***** *****
Perra      PPTSPIPLLPTWPLSFPGVLLTG-----
Zorra      PPTSPIPLLPTWPHSFPGVLLTG TATGPKWYPWTEVSFSSHQCFTVTTTFALPDPGSQRT
           *****

```

Figura 56. Alineamiento de las secuencias amplificadas del exón 8 de ZP1 de perra y zorra. Se observa un codón de stop (*) y una alta similitud entre las secuencias.

En la figura 57, observamos el árbol filogenético elaborado a partir de las secuencias de *ZP1* de carnívoros. En rojo hemos señalado las dos especies de carnívoros a las que podría haber afectado la pseudogenización de *ZP1* (la perra y la zorra). En el resto de especies podría existir una proteína funcional.

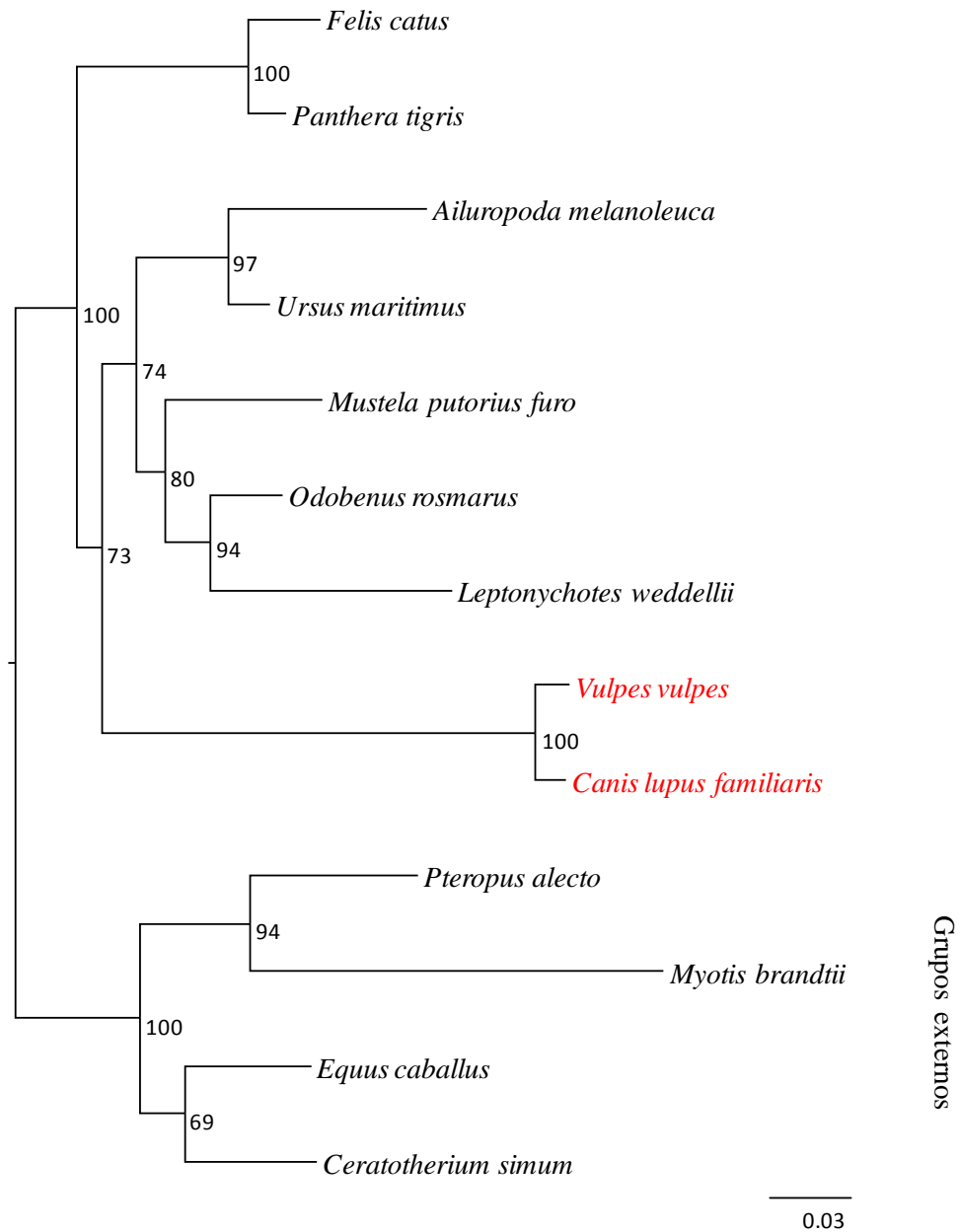


Figura 57. Relación filogenética del gen *ZP1* de carnívoros. A nivel de cada rama se indica el valor de bootstrap (porcentaje de bootstrap) del nodo al que se dirige la rama. Las especies en rojo indican pseudogenización.

6. DISCUSIÓN

6.1 LA ZONA PELÚCIDA EN MARSUPIALES

6.1.1 Composición de la zona pelúcida de marsupiales

Los marsupiales comprenden alrededor de unas 300 especies (Wilson y Reeder, 2005) que son clasificadas en dos cohortes: Ameridelphia, formada por tres órdenes (Didelphimorphia, Paucituberculata y Microbiotheria) y Australidelphia, formada por cuatro órdenes (Diprotodontia, Dasyuromorphia, Notoryctemorphia, Peramelemorphia) (Szalay, 1982; Aplin y Archer, 1987) (Ver fig. 14 de Revisión bibliográfica).

Los estudios evolutivos existentes en marsupiales son limitados en comparación con los existentes en su grupo hermano; los mamíferos placentarios. En parte, esto es debido a la falta de fósiles de ciertos periodos de la evolución de los marsupiales (Archer *et al.*, 1999). En estos casos, los estudios de filogenia molecular son útiles para reconstruir estos periodos de la evolución que no han sido totalmente esclarecidos (Mitchell *et al.*, 2014).

Durante décadas ha existido controversia en el emplazamiento del orden Microbiotheria, con únicamente una especie viva, el monito del monte (*Dromiciops gliroides*). En un principio, esta especie se encontraba localizada dentro del orden Didelphimorphia; pero, debido a los resultados de estudios morfológicos (Szalay, 1982), fue desplazada del mismo para formar un nuevo orden; el orden Microbiotheria dentro de la cohorte Australidelphia. Recientemente, diferentes estudios basados en el análisis de genes nucleares y retroposones han identificado claramente la posición de este orden como el grupo hermano de todos los marsupiales australianos (Nilsson *et al.*, 2010) (Ver fig. 14 de Revisión bibliográfica). Sin embargo, como sugieren estos autores, el uso de marcadores adicionales sería interesante para profundizar en la filogenia de los marsupiales y así confirmar sus resultados.

Hasta la fecha, los mamíferos habían sido clasificados en tres grupos en relación a la composición de glicoproteínas de su ZP (Goudet *et al.*, 2008):

1. Especies con una ZP formada por tres glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3 (hasta la fecha únicamente el ratón común); donde ZP4 es un pseudogén (Bleil y Wassarman, 1980a, Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008).

2. Especies con ZP2, ZP3 y ZP4 (cerda, perra, vaca, etc...); donde ZP1 es un pseudogén (Hedrick y Wardrip 1987; Noguchi *et al.*, 1994; Goudet *et al.*, 2008; Stetson *et al.*, 2012).

3. Especies con cuatro proteínas (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) (mujer, rata, hámster, conejo, gata, etc...) (Hughes y Barratt, 1999; Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2008; Izquierdo-Rico *et al.*, 2009, Stetson *et al.*, 2012, 2013).

Sin embargo, la ZP de marsupiales ha sido estudiada en pocas especies y poco se conoce sobre su función y estructura. Un estudio más profundo de la misma es necesario para entender la dificultad de la fecundación *in vitro* (FIV) en este grupo de mamíferos, así como para desarrollar vacunas anticonceptivas, lo cual es muy útil en algunas regiones de Australia y Nueva Zelanda donde es necesario controlar el rápido crecimiento de la población (Cowan y Tyndale-Biscoe, 1997; Duckworth *et al.*, 2001; Mate *et al.*, 2003; McCartney *et al.*, 2007, Weihong, 2009).

Pero, ¿es tan diferente la composición entre euterios y metaterios?; estos dos grupos de mamíferos compartieron un ancestro común datado hace 143-178 Ma (Warren *et al.*, 2008, Luo *et al.*, 2011) y aunque poco se sabe sobre la composición en marsupiales, se ha visto que las proteínas de la ZP de las especies estudiadas, muestran un alto grado de similitud con aquellas descritas en mamíferos placentarios.

Tradicionalmente, se ha considerado que la ZP de marsupiales estaba formada por tres glicoproteínas, pero la caracterización del marco abierto de

lectura y/o de las proteínas ha sido restringida a unas pocas especies. De modo que, únicamente tenemos información sobre la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*) perteneciente al orden Diprotodontia con tres proteínas caracterizadas completamente: ZP2, ZP3-a y ZP4 (Mate y McCartney, 1998; Voyle *et al.*, 1999; McCartney y Mate, 1999; Haines *et al.*, 1999; Mate *et al.*, 2003); y otros dos marsupiales pertenecientes al orden Dasyuromorphia: el ratón marsupial de cola gruesa (*Sminthopsis crassicaudata*) (Voyle *et al.*, 1999) y el ratón marsupial de cara rayada (*Sminthopsis macroura*) (Au *et al.*, 2008) con la caracterización parcial de ZP2.

Esta información podría sugerir que los marsupiales presentan una ZP formada por tres glicoproteínas, con una composición similar a la de la cerda, la vaca y la perra (Hedrick y Wardrip 1987, Noguchi *et al.*, 1994, Goudet *et al.*, 2008), donde *ZP1* sería un pseudogén. Sin embargo, recientemente un análisis *in silico* realizado por Meslin y colaboradores en 2012, demostró la presencia de dos copias del gen *ZP3* en la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*) por lo que la composición de la ZP de marsupiales parece ser más compleja de lo esperado.

En este trabajo, estudiamos la composición de la ZP de marsupiales, pertenecientes a diferentes órdenes. Centramos nuestro estudio en dos marsupiales australianos, el wallaby de Bennett (*Macropus rufogriseus*) y el koala (*Phascolarctos cinereus*), ambos pertenecientes al orden Diprotodontia y en un marsupial sudamericano, la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*) perteneciente al orden Didelphimorphia. Además, realizamos un análisis *in silico*, incluyendo a tres marsupiales australianos: el wallaby de Tammar (*Macropus eugenii*) y la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*) pertenecientes al orden Diprotodontia y el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisi*) perteneciente al orden Dasyuromorphia y a un marsupial sudamericano: la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*) del orden Didelphimorphia.

6.1.1.1 Composición de la zona pelúcida del wallaby de Bennett

Hemos demostramos la presencia de 6 transcritos (ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c y ZP4) en el ovario del wallaby de Bennett. Obtuvimos el ADNc completo de ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b y ZP4 y un fragmento casi completo del marco abierto de lectura de ZP3-c.

6.1.1.1.1 Dominios proteicos

El análisis de las secuencias de ZP1 y ZP4 indica que son secuencias codificantes, presentando un marco abierto de lectura, con un codón de iniciación y un codón de terminación. La comparación de las secuencias obtenidas, con las secuencias de otros mamíferos disponibles en el GenBank indica una alta homología con ZP1 y ZP4 de las otras especies (Ver fig. 22 y 23 de Resultados) mostrando una estructura similar a la de otras proteínas de la ZP que presentan dominios conservados a lo largo de las especies. Así, presentan, un péptido señal, un dominio trefoil, un dominio ZP y un dominio transmembrana.

El dominio ZP es esencial para la formación de la estructura filamentosa de la ZP. La distribución de los residuos cisteína en este dominio, se encuentra altamente conservada entre los mamíferos euterios y metaterios. Observamos que los 10 residuos cisteína presentes en el dominio ZP de ZP1 y ZP4 del wallaby de Bennett están conservados en todas las especies comparadas; la mujer, coneja, ratona, rata y zarigüeya. Aunque esto suponga una evidencia de la similitud de la estructura primaria entre las proteínas de diferentes especies; se ha visto que los puentes disulfuro que unen estas cisteínas no son idénticos entre especies por lo que no implica homología en la estructura terciaria, como ha sido descrito previamente en la cerda (Kanai *et al.*, 2008).

En marsupiales, algunos autores opinan que, el grado de enlaces disulfuro en la ZP puede diferir de la de los mamíferos euterios; puesto que, hay una susceptibilidad baja de la ZP de marsupiales a la reducción mediante β -mercaptoetanol y ditioneitol (Chapman *et al.*, 2000a).

6.1.1.1.2 Glicosilación

Se ha descrito una alta homología entre las glicoproteínas de la ZP en diferentes especies; pero se han observado diferencias evidentes en cuanto a la glicosilación que podrían estar relacionadas con la especificidad en la interacción entre los espermatozoides y la ZP (Wassarman, 1988; McCartney y Mate, 1999; Chapman *et al.*, 2000b; Chakravarty *et al.*, 2008).

Estudios realizados con lectinas en diversos marsupiales ponen de manifiesto la presencia de N-oligosacáridos en su ZP (Chapman *et al.*, 2000b). Estos estudios concuerdan con los realizados previamente en la zarigüeya australiana; donde las secuencias de ZP2, ZP3-a y ZP4 han sido amplificadas, destacándose la presencia de 9 sitios potenciales de N-glicosilación en ZP2 (de los cuales 1 es débil), 2 en ZP3-a y 5 en ZP4 (de los cuales 3 son débiles). Los autores señalan que aunque algunos de los sitios potenciales de glicosilación se encuentran conservados, hay variación en el número y posición de los mismos (Mate y McCartney, 1998; Voyle *et al.*, 1999; McCartney y Mate, 1999; Haines *et al.*, 1999; Breed, 2002). Coincidimos con estos autores en que en la glicoproteína ZP4 del wallaby de Bennett, se observa una mayor heterogeneidad respecto a la potencial glicosilación al compararla con la de otras especies. Sin embargo, debemos tener en cuenta que ZP1 nunca había sido secuenciada en marsupiales y según nuestros análisis comparativos observamos que en el wallaby de Bennett, esta glicoproteína presenta un mayor grado de conservación en la glicosilación que la glicoproteína ZP4.

ZP1:

En ZP1, Asn67 y Asn332 están conservados en todas las especies comparadas: mujer, coneja, ratona, rata y wallaby de Bennett. Además, la proteína ZP1 madura de wallaby presenta un sitio putativo de N-glicosilación no presente en las otras especies (Asn246). Por otro lado, el sitio de glicosilación Asn49 descrito en la región N-terminal de ZP1 de ratón y rata no está conservado en el wallaby (Boja *et al.*, 2003, 2005, Stetson *et al.*, 2012).

En resumen, en ZP1 del wallaby de Bennett encontramos 3 sitios potenciales de N-glicosilación; mientras que en las especies comparadas encontramos: 2 en la coneja y la mujer, 3 en la rata y 4 en la ratona (Boja *et al.*, 2003, 2005; Stetson *et al.*, 2012). El hecho de que estos sitios se hayan conservado en la evolución de los mamíferos implicaría su potencial importancia en la funcionalidad de la proteína.

ZP4:

En ZP4, hay dos sitios putativos de N-glicosilación conservados en todas las especies comparadas: mujer, coneja, rata, zarigüeya y wallaby de Bennett; Asn66 y Asn471. Además, el sitio putativo de N-glicosilación Asn199 está presente en todas las especies excepto en la rata. En posición Asn264, hay un sitio putativo de N-glicosilación presente en los dos marsupiales estudiados y en la mujer. Asn323 está presente en la rata y el wallaby, faltando en la zarigüeya. El sitio Asn402 sólo está presente en los marsupiales y el sitio de N-glicosilación Asn475 está presente en los marsupiales y en la coneja. En la ZP4 de rata, han sido descritos 4 sitios de N-glicosilación, en posiciones Asn50, Asn74, Asn228 and Asn336 (Hoodbhoy *et al.*, 2005) y dos de ellos (Asn74 y Asn336) están presentes en el wallaby como sitios putativos de glicosilación.

En la mujer se observan 5 sitios potenciales de N-glicosilación, al igual que en el wallaby de Bennett; coincidiendo con los resultados de Haines *et al.*, 1999 realizados en la zarigüeya australiana. Observamos que la glicoproteína ZP4 presenta una mayor variabilidad en relación a la N-glicosilación, estos sitios podrían intervenir en la especificidad de la unión espermatozoide-ZP, mediada en parte por las cadenas de oligosacáridos (Wassarman, 1988; McCartney y Mate, 1999; Chapman *et al.*, 2000b; Chakravarty *et al.*, 2008).

6.1.2 Pseudogenización de ZP4

Mientras que la pseudogenización de algunos de los genes de la ZP, como ZP1, ZPAX y/o ZPD es un fenómeno que se ha descrito en diversas especies (Goudet *et al.*, 2008); la pseudogenización de ZP4, hasta el momento únicamente había sido descrita en una especie, el ratón común (*Mus musculus*) (Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008).

Nuestro análisis *in silico* realizado a partir del genoma disponible para distintos marsupiales indica que los marsupiales presentan un número diferente de glicoproteínas en su ZP según la especie. Además, no sólo no presentan un modelo constituido por ZP2, ZP3 y ZP4, sino que aquella glicoproteína que puede estar sujeta a pseudogenización sería ZP4 y no ZP1. En esta Tesis Doctoral, investigamos si la pseudogenización de ZP4 está relacionada con diferentes órdenes taxonómicos.

El hallazgo de la pseudogenización de ZP4 en el genoma de la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*), nos llevó a estudiar la presencia de dicho gen en diferentes especies de marsupiales australianos y sudamericanos.

En este estudio identificamos a *ZP4* como un pseudogén en otra especie, la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*) perteneciente al orden Didelphimorphia. Esta pseudogenización consistía en la ausencia de un codón de iniciación (ATG) y en la presencia de varios codones de stop a lo largo de su secuencia (Ver fig. 32 de Resultados).

Mientras que, en el resto de marsupiales estudiados, todos ellos australianos, el koala (*Phascolarctos cinereus*), el demonio de Tasmania (*Sarcophilus harrisi*), el wallaby de Bennett (*Macropus rufogriseus*) y el wallaby de Tammar (*Macropus eugenii*); así como en la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*), donde *ZP4* había sido descrita previamente (Haines *et al.*, 1999; Mate *et al.*, 2003) no encontramos indicios de pseudogenización. Estos resultados sugieren que *ZP4* se perdió en el orden sudamericano Didelphimorphia, por tanto los marsupiales pertenecientes a este orden presentan *ZP4* pseudogenizada, al igual que el ratón común.

Esto indica que la pseudogenización de *ZP4* se produjo tras la separación de los marsupiales australianos y sudamericanos aproximadamente hace unos 80 Ma afectando al orden Didelphimorphia antes de la divergencia de las especies recientes datada hace unos 40 Ma (Beck, 2008; Meredith *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2014). La cuestión permanece abierta para los órdenes Paucituberculata y Microbiotheria para los cuales no hemos podido conseguir muestras para su análisis.

6.1.3 Duplicación génica de *ZP3* en marsupiales

Recientemente, Meslin y colaboradores (2012) tras realizar un análisis *in silico* del genoma de múltiples especies publicaron la existencia de diversas duplicaciones de los genes de la ZP. Estos autores, encuentran duplicaciones de los genes *ZPAX* y *ZP3* en peces como el espinoso, el medaka, el pez cebra, el pez globo moteado y el pez globo japonés. Además,

detectan duplicación de *ZP3* en aves como, el diamante mandarín y la gallina y en anfibios como la rana. En relación a los mamíferos, en el ornitorrinco, señalan la duplicación de dos genes, *ZP2* y *ZP3* (Meslin *et al.*, 2012). Pero, fue la duplicación de *ZP3* en la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*) (Meslin *et al.*, 2012), la que nos ha llevado a buscar esta duplicación en otros marsupiales.

Nuestro primer análisis *in silico* del genoma de la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*), nos permitió detectar las dos copias duplicadas de *ZP3* descritas previamente por Meslin y colaboradores. Además, encontramos una tercera copia que presentaba en su secuencia codones de stop, indels y no presentaría un codón de iniciación.

Posteriormente, realizamos un segundo análisis en otros dos marsupiales; el demonio de Tasmania y el wallaby de Tammar, y también encontramos las tres copias de dicho gen.

La disponibilidad de ovarios del wallaby de Bennet nos permitió estudiar la expresión de las tres copias en esta especie. Detectamos tres transcritos correspondientes a las tres copias de *ZP3* en este marsupial que, de acuerdo a casos similares descritos anteriormente (Bhat *et al.*, 2014) denominamos *ZP3*-a, *ZP3*-b y *ZP3*-c (siendo *ZP3*-a la más antigua y *ZP3*-c la más reciente); *ZP3*-c se encuentra filogenéticamente más próxima a la *ZP3* del resto de mamíferos, mientras que *ZP3*-a y *ZP3*-b están más cercanas a la *ZP3* del ornitorrinco y de las aves (Ver Fig. 30 de Resultados).

El número de sitios potenciales de N-glicosilación varía entre las distintas *ZP3*, siendo de 3 en *ZP3*-a (Asn123, Asn149 y Asn306), de 4 en *ZP3*-b (Asn11, Asn142, Asn170 y Asn327) y de 5 en *ZP3*-c (Asn129, Asn151, Asn276, Asn307 y Asn335). En la rata y la ratona hay descritos 5 sitios de N-glicosilación (Boja *et al.*, 2003, 2005), de los cuales 2 están conservados en los dos roedores y las 3 *ZP3* (Asn151 y Asn307) y un tercero está conservado en

ZP3-c (Asn276). Los sitios Asn327 y Asn330 presentes en la rata y el ratón no están presentes en ninguna de las ZP3 analizadas del wallaby de Bennett. En relación a la ZP3-a descrita en la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*), los autores señalan dos sitios potenciales de N-glicosilación los cuales coinciden con los del wallaby de Bennett (Asn123 y Asn149), sin embargo el sitio Asn306 no es citado, por lo que podría ser específico de especie (McCartney y Mate, 1999).

En un futuro sería necesario comprobar si las tres proteínas codificadas por estos tres genes se encuentran realmente formando parte de la ZP de los ovocitos de este marsupial; por ello, el próximo paso sería realizar un análisis por proteómica para analizar la presencia de péptidos de estas proteínas en el ovario. La función biológica que realizan estas tres ZP3 es una cuestión a resolver.

6.1.4 Propiedades biológicas de la ZP de marsupiales relacionadas con su composición

Pese a que existe un conocimiento escaso en relación a la estructura y función de la ZP de marsupiales; se han encontrado algunas diferencias respecto a la ZP de mamíferos placentarios. Se ha visto que la ZP de metaterios se digiere más fácilmente que la ZP de euterios. Así, en la zarigüeya de Virginia (*Didelphis virginiana*) la ZP se digiere con tripsina pancreática bovina al 0.1% en 2-3 segundos y en la zarigüeya de cola gruesa (*Sminthopsis crassicaudata*) la ZP es completamente digerida en 4-10 segundos con tripsina o quimiotripsina al 0.1%; mientras que la ZP de conejo resiste el mismo tratamiento durante 15-20 minutos (Rodger y Bedford, 1982; Bedford y Breed, 1994; Bedford, 2004). Además, se ha comprobado que el extracto acrosomal de espermatozoides de la zarigüeya de Virginia disuelve la ZP homóloga en solamente 20 minutos (Rodger y Bedford, 1982). Para algunos autores, estos resultados podrían estar relacionados con la importancia de la

digestión de la ZP en marsupiales por los enzimas acrosomales del espermatozoide; ya que, se ha visto que en marsupiales el agujero que produce el espermatozoide al penetrar la ZP es mucho mayor que el que se produce en mamíferos placentarios (Rodger and Bedford, 1982; Taggart *et al.*, 1993; Breed, 1996).

Aparentemente, una ZP con un mayor número de glicoproteínas debería ser más compacta que una con menos glicoproteínas, sin embargo, desconocemos el grado de glicosilación de las proteínas de estos marsupiales; por lo que la mayor rapidez en la digestión de la ZP podría atribuirse a que en general, los marsupiales presentan una ZP más delgada que aquella que presentan los euterios; como han descrito previamente diversos autores (Bedford, 1996, Selwood, 2000). Por ejemplo, en la ratona el grosor es de unos 6.2 μm , en la mujer de unos 15-20 μm (Wassarman, 1988; 2008; Pelletier *et al.*, 2004); mientras que, en marsupiales el grosor es muy variable (Selwood, 2000), pudiendo variar desde 1-2 μm en los didélfidos a 6-8 μm en el wallaby de Tammar (Talbot y Dicarlantonio 1984; Mate, 1998).

Estos resultados podrían estar relacionados con una menor glicosilación de las glicoproteínas de la ZP en marsupiales, teniendo las cadenas de O-oligosacáridos más cortas que aquellas presentes en euterios, como han sugerido algunos autores (Chapman *et al.*, 2000b).

6.1.4.1 Implicación de las diferentes proteínas en la anticoncepción

La identificación de los diferentes modelos de composición de la ZP en marsupiales y la descripción por primera vez de una nueva glicoproteína (ZP1), así como de diversas copias de ZP3, podría ser relevante en el desarrollo de nuevas vacunas anticonceptivas.

El control de la población es necesario en algunos países, donde algunas especies de marsupiales han llegado a considerarse una peste (Cowan y Tyndale-Biscoe, 1997; Duckworth *et al.*, 2001; Mate *et al.*, 2003; McCartney *et al.*, 2007, Weihong, 2009). En Australia, país con una población de canguros que casi triplica a su población humana, las campañas de control de la población son muy importantes, y en Nueva Zelanda, la introducción de la zarigüeya australiana en 1850 desde Australia afecta seriamente a la agricultura del país (Montague, 2000).

Las vacunas constituidas por proteína porcina nativa formadas por ZP2, ZP3 y ZP4 glicosiladas han sido testadas en la zarigüeya australiana (Duckworth *et al.*, 1999), en el wallaby de Tammar (Kitchener *et al.*, 2002) y en el koala (Kitchener *et al.*, 2009b); y al igual que en mamíferos euterios, los autores coinciden en que ZP3 es la más inmunogénica de las proteínas (Koyama *et al.*, 1996; Kitchener *et al.*, 2002). También han sido testadas en diferentes especies vacunas formadas por proteínas recombinantes de la ZP, como por ejemplo, ZP3 recombinante procedente de la zarigüeya australiana, testada en el canguro gris oriental (Kitchener *et al.*, 2009a), en el koala (Kitchener *et al.*, 2009b) y en la zarigüeya australiana (Duckworth *et al.*, 2008; Cui *et al.* 2010a, 2010b) o ZP2 recombinante procedente de la zarigüeya australiana, testada en esta misma especie (Cui y Duckworth 2005; Duckworth *et al.*, 2007, Walcher *et al.*, 2008). La efectividad de las distintas vacunas testadas se encuentra entre un 70-80%.

La identificación de distintas copias de ZP3 en marsupiales, nos ha hecho preguntarnos qué copia ha sido empleada en las vacunas anticonceptivas. Hemos visto que la ZP3 recombinante procedente de la zarigüeya australiana utilizada en la elaboración de vacunas sería ZP3-a, la única que se encuentra disponible en las bases de datos, cuya secuencia fue depositada por McCartney y Mate en 1999. Nuestros análisis filogenéticos demuestran que esta proteína se encuentra más próxima a la ZP3 de aves que a la ZP3 de mamíferos (Ver fig. 29 de Resultados). Desconocemos si el uso de una de las otras copias de ZP3 o una vacuna combinada podría tener un

mayor efecto inmunogénico. Igualmente desconocemos la abundancia relativa de estas diferentes proteínas así como su grado de glicosilación que pudiera tener un impacto en la inmunogenicidad.

En este trabajo describimos por primera vez la presencia de ZP1. Debemos tener en cuenta que, a esta glicoproteína se le han atribuido recientemente funciones relacionadas con la unión espermática y la inducción de la RA en humanos (Ganguly *et al.*, 2010a). Además, se ha visto que anticuerpos producidos contra ZP1 pueden reducir la unión del espermatozoide a la ZP (Sivapurapu *et al.* 2002, 2005, Hardy *et al.* 2004). Por otro lado, la importancia funcional de ZP1 se ha puesto de manifiesto recientemente, debido a la detección de mujeres estériles que presentan una mutación homocigótica de ZP1 que impide la formación de la ZP (Huang *et al.*, 2014).

Por todo lo expuesto anteriormente, creemos que tanto ZP1 como las distintas copias de ZP3 deberían ser consideradas para el desarrollo de nuevas vacunas anticonceptivas en diferentes marsupiales.

6.1.5 Nuevos modelos de composición de la zona pelúcida

Los resultados obtenidos sugieren que la composición de la ZP de marsupiales varía entre especies; pudiendo estar formada por 4-6 proteínas. Nuestros análisis indican que hay 6 transcritos (ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c y ZP4) en el ovario del wallaby de Bennett, lo mismo podría suceder en otros marsupiales australianos, como el wallaby de Tammar y el demonio de Tasmania. Mientras que, los análisis realizados en los marsupiales sudamericanos estudiados, como la zarigüeya de cola corta, indican que la composición sería diferente debido a la pseudogenización de ZP4 y a una de las copias de ZP3, por lo que en este marsupial podría haber 4 transcritos

(ZP1, ZP2, ZP3-b y ZP3-c), lo mismo podría suceder en el otro marsupial sudamericano analizado, la zarigüeya común (Fig. 58).

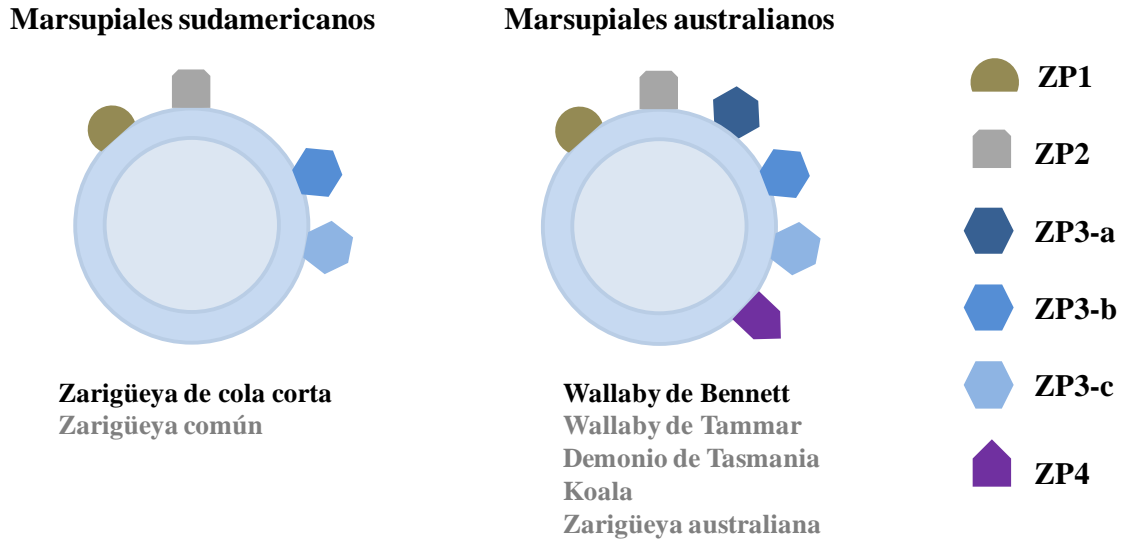


Figura 58. Nuevo modelo de composición de la zona pelúcida propuesto para los marsupiales. Los marsupiales sudamericanos presentarían ZP1, ZP2 y ZP3 (2 copias) siendo *ZP3-a* y *ZP4* pseudogenes. Los marsupiales australianos presentarían ZP1, ZP2, ZP3 (3 copias) y ZP4.

6.2 LA ZONA PELÚCIDA EN ROEDORES

6.2.1 Composición de la zona pelúcida de los roedores de la subfamilia Murinae

El género *Mus* está dividido en cuatro subgéneros: *Mus*, *Pyromys*, *Nannomys* y *Coelomys* (Musser y Carleton, 2005). Estudios anteriores realizados en nuestro grupo de investigación demostraron la presencia de 4 genes (*ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4*) en algunas especies del género *Mus* (Tesis Doctoral de Izquierdo-Rico, 2009; Izquierdo-Rico *et al.*, 2009b). Se analizaron 25 especies de roedores pertenecientes a la subfamilia Murinae y el análisis de las secuencias de *ZP4* en las especies estudiadas mostró la presencia de codones de stop únicamente en las especies pertenecientes al subgénero *Mus*. En la presente Tesis Doctoral hemos profundizado en estos hallazgos y hemos analizado la expresión de los cuatro genes de la ZP en el ovario de tres especies de ratón y determinado la presencia de las proteínas correspondientes mediante análisis proteómico.

El análisis realizado en *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*, demuestra claramente la presencia de cuatro transcritos (*ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4*) en sus ovarios mediante amplificación por PCR. Además, demostramos la presencia de cuatro proteínas funcionales mediante análisis por proteómica en las tres especies. Estos resultados concuerdan con previos estudios que demuestran la presencia de cuatro proteínas en otros roedores como la rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005) y el hámster (Izquierdo-Rico *et al.*, 2009a, Jiménez-Movilla *et al.*, 2009), demostrando que el número de especies con cuatro proteínas en la ZP en la subfamilia Murinae es más común que el de especies con tres proteínas.

Los resultados obtenidos nos permiten proponer cualquiera de estas especies como un modelo experimental mucho más apropiado para el estudio de las proteínas de la ZP y sus funciones para especies como la humana, al

presentar cuatro proteínas en su ZP; hecho que no ocurre en el ratón común (Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008) usado como modelo para el estudio de la ZP desde hace más de 30 años. Además, entendemos que al tratarse de especies de la subfamilia Murinae podrían desarrollarse animales KO para ZP4 y poder ver su efecto sobre la estructura y función de la ZP en la fecundación.

El ratón común ha aportado información relevante sobre las funciones de las distintas proteínas de la ZP gracias al uso de animales modificados genéticamente como KO y transgénicos (Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 1996, 1999, 2001; Dean, 2004). Se ha visto que ZP1 ofrece estabilidad e integridad estructural a la matriz y ratones KO para ZP1 tienen una ZP anormal siendo más porosa de lo normal; sin embargo, estos ratones son fértiles, aunque sus camadas presentan un menor número de individuos al habitual (Rankin *et al.*, 1999). Por otro lado, ratones KO para ZP2 o ZP3 presentan ovocitos que no están rodeados por una ZP, bien por una pérdida temprana de la misma, como ocurre en ausencia de ZP2 (Rankin *et al.*, 2001) o porque no se llega a formar en ausencia de ZP3 (Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 1996).

Como hemos dicho anteriormente, el descubrimiento de especies de roedores con 4 proteínas en su ZP nos permite estudiar mediante el uso de animales modificados genéticamente, la función que desempeña la glicoproteína ZP4 en la estructura de la matriz; hecho que no se ha podido realizar hasta la fecha.

Este tipo de análisis también se podría realizar en la rata y el hámster, especies con 4 glicoproteínas en su ZP (Hoodbhoy *et al.*, 2005; Izquierdo-Rico *et al.*, 2009a); sin embargo, la tecnología necesaria para obtener animales transgénicos ha sido desarrollada muy recientemente en especies diferentes al ratón, estando disponible en muy pocos laboratorios y siendo muy costosa (Kaneke *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2014).

Además, los ratones empleados en esta Tesis Doctoral se encuentran más próximos filogenéticamente al ratón común que el hámster y la rata. Entre las tres especies empleadas en este estudio (*Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*), *Mastomys coucha* sería a nuestros ojos el mejor candidato, puesto que no tiene problemas de cría en cautividad, tienen un tamaño intermedio entre la rata y el ratón, son animales mansos y manejables, tienen camadas de gran tamaño y ovulan espontáneamente a lo largo de todo el año, además ensayos previos de FIV se han realizado con éxito (Nohara *et al.*, 1998).

Los ensayos realizados de FIV cruzada entre las distintas especies han sido realizados para ver si la presencia de una cuarta glicoproteína tiene efecto a nivel de la fecundación. Sin embargo, a la vista de nuestros resultados es necesario poner a punto la técnica de FIV en estas especies; donde experimentos acerca del proceso de capacitación espermática parecen ser claves.

La fecundación homóloga no tuvo éxito en ningún grupo, excepto en el grupo control (*Mus musculus*); posiblemente por la dificultad para capacitar los espermatozoides de las tres especies empleadas: *Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*, ya que, parecen no responden a los protocolos establecidos para el ratón común.

En estudios previos se ha visto que los requerimientos de capacitación de los espermatozoides de *Mastomys coucha* varían considerablemente en relación a los del ratón común, siendo necesaria la presencia de una concentración óptima de contenido de la cola epididimaria (CEC) en el medio de capacitación HTF y entre unas 6-8 horas para que capaciten adecuadamente (Nohara *et al.*, 1998). El grupo de Nohara obtuvo un porcentaje de FIV de 43.7 % empleando esta técnica de capacitación y realizando la FIV a las 15 horas post-hCG. Además, destacan que el porcentaje de fecundación

se reduce significativamente (25.3 %) cuando la FIV se produce una hora más tarde, es decir 16 horas post-hCG.

La fecundación heteróloga únicamente fue posible cuando se emplearon espermatozoides de ratón común (*Mus musculus*) con ovocitos de *Mus pahari* y *Mus mattheyi*, lo que indicaría que la presencia de ZP4 no estaría implicada en la unión especie-específica del espermatozoide. Estudios previos han demostrado que la fecundación heteróloga entre distintas especies de roedores es posible, aunque el éxito de la misma está directamente relacionado con la proximidad filogenética de las especies empleadas (Roldan *et al.*, 1985); aun así la tasa de fecundación *in vivo* e *in vitro* se reduce considerablemente si la comparamos con la tasa de fecundación homóloga (Roldan *et al.*, 1985, 1989; Dean y Nachman, 2009; Martín-Coello *et al.*, 2009). Además, en aquellos casos en los que se ha realizado el cultivo de embriones se ha visto que los mismos no son viables (Roldan *et al.*, 1985). Diversos autores destacan que la fecundación no es estrictamente especie-específica, pero existen factores que reducen su eficiencia, los cuales pueden estar relacionados con la transferencia, almacenamiento o transporte de espermatozoides y con fallos en la interacción entre gametos (Roldan *et al.*, 1985; 1989; Vacquier, 1998; Price *et al.*, 2001; Martín-Coello *et al.*, 2009).

Nuestros resultados preliminares de FIV heteróloga demuestran que la estructura de una ZP formada por 4 proteínas no es una barrera para los espermatozoides de una especie con una ZP formada por 3 proteínas, al menos en condiciones *in vitro*. No podemos saber si se produce el mismo efecto en la situación inversa. Para poder averiguarlo, en un futuro sería necesario poner a punto la técnica de FIV en estas especies.

Por otro lado, nuestros análisis preliminares de digestión de la ZP con tripsina, muestran que la ZP de aquellas especies con 3 proteínas (*Mus musculus*) resisten la digestión de la ZP durante más tiempo que aquellas que presentan 4 proteínas (*Mus mattheyi* y *Mus pahari*) (aproximadamente

70 min en *Mus musculus* y entre 30-46 min en *Mus mattheyi* y *Mus pahari*). Estos resultados concuerdan con experimentos realizados en nuestro laboratorio con anterioridad; donde la ZP porcina (3 proteínas) resiste a la digestión con tripsina durante 5 horas, mientras que en el hámster (4 proteínas) únicamente se requieren 60 segundos para la digestión completa de la misma y en la rata (4 proteínas) se requieren unos 37 minutos (Ballester *et al.*, 2013), siendo los valores de esta última especie similares a los de *Mus mattheyi* y *Mus pahari*.

Aparentemente, una ZP con cuatro glicoproteínas debería ser más compacta que una ZP con tres glicoproteínas y por tanto, el tiempo de digestión de la misma debería ser superior; sin embargo, los resultados obtenidos indicarían que no existe relación entre el número de glicoproteínas y el tiempo de digestión de la ZP. La diferencia en el tiempo de digestión podría deberse a las cadenas oligosacáridicas con polilactosaminoglicanos que han sido detectadas tanto en la cerda (Noguchi y Nakano, 1992; Takasaki *et al.*, 1999) como en la vaca (Katsumata *et al.*, 1996), mientras que en el resto de especies estudiadas no se han detectado o son muy escasas (Easton *et al.*, 2000). Por otro lado, desconocemos el grado de glicosilación de las especies de ratones que se han estudiado en esta Tesis Doctoral, que debería ser comparado con la especie de referencia, el ratón.

6.2.2 Análisis de la proteína ZP1 en *Mus mattheyi* y *Mus pahari*

Las secuencias completas de ZP1 obtenidas en *Mus mattheyi* y *Mus pahari*, se corresponden con una secuencia codificante, con un codón de iniciación y uno de terminación (Ver fig. 36 y 37 de Resultados). El alineamiento de la secuencia de la proteína ZP1 con las secuencias de otras especies, muestra un alto grado de similitud entre ellas; principalmente a nivel del dominio ZP, donde las 8 cisteínas se encuentran conservadas en todas las especies analizadas, sugiriendo que presentan una estructura

tridimensional similar. Los sitios consensos para corte de furina descritos en la mujer (Ganguly *et al.*, 2010), la rata (Boja *et al.*, 2005) y la ratona (Boja *et al.*, 2003) coinciden con los sitios potenciales para los roedores analizados. (Ver fig. 40 de Resultados).

En la proteína madura ZP1 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* identificamos 3 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn49, Asn68 y Asn371), los cuales coinciden con los sitios de N-glicosilación descritos en ZP1 de ratón y rata (Boja *et al.*, 2003, 2005); sin embargo, Asn240 descrito en ZP1 de ratón (Boja *et al.*, 2003), no se encuentra conservado en estos roedores. Estos resultados implicarían que Asn240 parece no ser relevante a nivel funcional aunque podría estar implicada en algún mecanismo relacionado con la interacción específica de especie. En la coneja, coincidirían los sitios de N-glicosilación Asn68 y Asn371 (Stetson *et al.*, 2012).

La glicoproteína ZP1 del ratón común (*Mus musculus*) y rata es pobre en O-glicanos (Boja *et al.*, 2003, 2005) y puesto que el número de péptidos de ZP1 que hemos detectado en *Mus mattheyi* y *Mus pahari* es muy bajo no podemos decir si los sitios potenciales de O-glicosilación se corresponden con sitios reales.

6.2.3 Análisis de la proteína ZP4 en *Mus mattheyi* y *Mus pahari*

El análisis de las secuencias obtenidas de ZP4 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari*, indica la presencia de una secuencia codificante, con un codón de iniciación y un codón de terminación (Ver fig. 41 y 42 de Resultados). La comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias de otras especies depositadas en el GenBank muestra una alta similitud entre ellas indicando que se trataría de ZP4 (Ver fig. 45 de Resultados). El alineamiento de ZP4 de *Mus mattheyi* y *Mus pahari* con la rata y la mujer muestra un alto grado de conservación principalmente a nivel del dominio ZP, donde las 10 cisteínas

encontradas están conservadas en todas las especies. Los sitios consensos para corte de furina, descritos en la mujer (Kiefer y Sailing, 2002) y la rata (Boja *et al.*, 2005) coinciden con los sitios potenciales para los roedores analizados.

En *Mus pahari*, la herramienta informática empleada (Smart Genome) para identificar los dominios proteicos de ZP4 no identifica el dominio transmembrana, pensamos que esto no tiene relevancia puesto que en el alineamiento con el resto de especies se observa una alta similitud.

En la proteína madura ZP4 (Ver fig. 43 y 44 de Resultados) identificamos 6 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn50, Asn74, Asn122, Asn209, Asn226 y Asn299) en *Mus mattheyi* y 5 sitios potenciales de N-glicosilación (Asn50, Asn74, Asn122, Asn209 y Asn299) en *Mus pahari*. De los cuales, Asn122 y Asn209 han sido identificados por proteómica en péptidos de ZP4 de *Mus mattheyi*, lo que indicaría que estos sitios no están glicosilados o no siempre están ocupados. Los sitios potenciales de N-glicosilación Asn50, Asn74 y Asn226 han sido identificados en ZP4 de rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005), por lo que parecen estar conservados en estos roedores; sin embargo, Asn299 no ha sido detectado en el resto de especies comparadas. Esto implicaría que existen diferencias en el patrón de glicosilación entre estas especies y la rata siendo necesarios estudios posteriores para identificar los puntos de glicosilación así como el tipo de cadena glucídica presente y ver su potencial implicación biológica.

En la proteína madura ZP4 encontramos un total de 76 y 73 sitios potenciales de O-glicosilación en *Mus mattheyi* y *Mus pahari* respectivamente. Algunos de estos sitios han sido encontrados en los péptidos detectados por proteómica, 25 en *Mus mattheyi* y 11 en *Mus pahari*, por lo que estos sitios se encontrarían libres o parcialmente ocupados en estas proteínas. Únicamente existen datos de O-glicosilación en ZP4 de cerda y rata (Kudo *et al.*, 1998; Hoodbhoy *et al.*, 2005). En la rata, se ha descrito una región O-glicosilada (Thr296, Ser298, Ser301, Ser304 y Thr312) (Hoodbhoy *et al.*, 2005), pudiendo estar conservadas en *Mus mattheyi* y *Mus*

pahari las Ser298, Ser301 y Ser304, además de la Thr296 únicamente en *Mus pahari* (Ver Fig. 45 de Resultados).

Teniendo en cuenta que el análisis por HPLC/MS se puede considerar una técnica semicuantitativa; el hecho de que la cobertura para ZP1 sea en *Mus mattheyi* y *Mus pahari* de 7.22% y 7.98% respectivamente, frente a la cobertura para ZP4 de 30.99% en *Mus mattheyi* y de 16.74% en *Mus pahari*, podría indicarnos que la glicoproteína ZP1 es menos abundante en la ZP que la glicoproteína ZP4. Estos resultados coinciden con los publicados para la rata, donde la cobertura de la proteína ha sido de 52% para ZP1 y de 70% para ZP4 (Boja *et al.*, 2005; Hoodbhoy *et al.*, 2005); además también coincidirían con los resultados publicados para otras especies, como la coneja (Stetson *et al.*, 2012) y la gata (Stetson *et al.*, 2013), donde la cobertura de ZP1 ha sido menor que la de ZP4; sin embargo no coinciden con los resultados publicados para el hámster, donde la cobertura de ZP1 fue de un 12.6% y la de ZP4 de un 11.2% (Izquierdo-Rico *et al.*, 2009a).

6.2.4 Análisis filogenético del gen ZP4 en roedores de la subfamilia Murinae

Como ya hemos dicho anteriormente, *ZP4* es un pseudogén en el ratón (*Mus musculus*). Se han detectado numerosos codones de stop en el marco abierto de lectura de su secuencia (Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008), además mediante espectrometría de masas, se han encontrado péptidos pertenecientes a ZP1, ZP2 y ZP3, pero ninguno perteneciente a ZP4 (Boja *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta la presencia de una proteína ZP4 funcional en el genoma de la rata (Hoodbhoy *et al.*, 2005), se puede decir que la pseudogenización de *ZP4* tuvo lugar tras la divergencia evolutiva de la rata y el ratón hace unos 12 Ma (Jaeger *et al.*, 1986; Jacobs *et al.*, 1989, 1990; Goudet *et al.*,

2008). Sin embargo, los análisis realizados en la Tesis Doctoral de Izquierdo-Rico en 2009, junto con los resultados de esta Tesis Doctoral muestran que este evento tuvo lugar recientemente en la evolución del género *Mus*.

Estudios previos demuestran que la divergencia de los 4 subgéneros del género *Mus* se produjo hace 6-7 Ma (Lecompte *et al.*, 2008, Pagès *et al.*, 2012) y en el subgénero *Mus* la primera rama divergente se calcula hace 5 Ma (Pagès *et al.*, 2012); lo que indicaría que la pseudogenización de *ZP4* tuvo lugar hace aproximadamente 5-7 Ma.

Además, nuestro análisis filogenético realizado para *ZP4*, muestra que la pseudogenización de dicho gen se produjo al menos tres veces en la evolución de los mamíferos. Produciéndose en el subgénero *Mus*, en dos marsupiales (zarigüeya de cola corta y zarigüeya común) y en dos xenartros (el armadillo y el perezoso).

Estudios recientes han demostrado que la pseudogenización de los genes en la familia ZP son eventos frecuentes. Estas pérdidas han tenido lugar a lo largo de la evolución de la familia, afectando a diversos genes como *ZP1*, *ZP4*, *ZPD* y/o *ZPAX* en diferentes especies. Ésto podría explicarse como un fenómeno de duplicación y muerte génica, así el gen *ZPB* se duplicó originándose *ZP1* y *ZP4*. De modo que, *ZP1* y *ZP4*, previamente considerados genes ortólogos, son en realidad parálogos (Hughes *et al.*, 1999; Bausek *et al.*, 2000; Goudet *et al.*, 2008).

Tras la duplicación génica, pueden producirse tres fenómenos diferentes de evolución de las dos copias duplicadas:

- 1) La función ancestral es dividida y compartida por los dos genes duplicados (subfuncionalización).
- 2) Un duplicado adquiere una nueva función, mientras que el otro mantiene la función ancestral (neofuncionalización).

3) Uno de los genes degenera transformándose en un pseudogén por acumulación de mutaciones y el otro conserva la función original.

En el ratón común (*Mus musculus*), la pseudogenización de *ZP4* indicaría que *ZP1* conservaría la función del gen ancestral *ZPB*. A *ZP1* se le ha atribuido una función estructural en el ratón (Greve y Wassarman, 1985; Rankin *et al.*, 1999); sin embargo, en la mujer, con 4 proteínas, diversos estudios indican que tanto *ZP1* como *ZP4* se unen al espermatozoide y son capaces de inducir RA (Caballero-Campo *et al.*, 2006; Ganguly *et al.*, 2010a, 2010b). Además, este mismo año se ha descrito que una mutación homocigótica de *ZP1* en la mujer impide la formación de la ZP induciendo esterilidad (Huang *et al.*, 2014); mientras que, ratonas KO para *ZP1* son capaces de formar la ZP aunque sería más delgada de lo normal y estas ratonas no serían estériles aunque su fertilidad está comprometida (Rankin *et al.*, 1999). Esto destaca la diferente importancia o funcionalidad de una misma proteína en diferentes especies. Habría que investigar la función de las proteínas *ZP1* y *ZP4* en los roedores descritos en esta Tesis Doctoral. Además, al desconocer la función desempeñada por estas glicoproteínas en estos ratones, no podemos responder a la pregunta de si la presencia de los dos genes (*ZP1* y *ZP4*) se ha producido por subfuncionalización o neofuncionalización.

En resumen, esta Tesis Doctoral aporta evidencias por primera vez de que la mayor parte de los roedores de la subfamilia Murinae contienen 4 proteínas en su ZP y que, únicamente el subgénero *Mus* dentro del género *Mus* ha sufrido pseudogenización de *ZP4* hace aproximadamente 5-7 Ma. Animales modificados genéticamente han contribuido a esclarecer dudas sobre la función génica/proteica de las distintas proteínas de la ZP; sin embargo, esto no ha sido posible en el caso de *ZP4* debido a la ausencia de este gen en el ratón común. Por tanto, este estudio aporta nuevas especies con las que poder desarrollar técnicas (KO, transgénesis) con las que estudiar la función de esta proteína.

6.3 LA ZONA PELÚCIDA EN CARNÍVOROS

6.3.1 Composición de la zona pelúcida de carnívoros

Estudios previos indican que la ZP de los carnívoros estaría formada por tres glicoproteínas: ZP2, ZP3 y ZP4, donde ZP1 sería un pseudogén como sucede en la perra (Goudet *et al.*, 2008). Diferentes autores han depositado secuencias de estas tres glicoproteínas, pero nunca de ZP1. Así, en el armiño y el hurón doméstico (Jackson y Beaton, 2004), la perra (Harris *et al.*, 1994; Okazaki *et al.*, 1995; Okazaki y Sugimoto, 1995; Blackmore *et al.*, 2004; McLaughlin *et al.*, 2004) y la zorra (Reubel *et al.*, 2005) habían sido descritas previamente algunas glicoproteínas de la ZP (Ver Tabla 6 de Revisión bibliográfica).

En la gata, las secuencias depositadas hasta 2013, habían sido como en el resto de carnívoros: ZP2, ZP3 y ZP4 (Harris *et al.*, 1994, 1995; Okazaki y Sugimoto, 1995; Jewgenow y Fickel, 1999; Okazaki *et al.*, 2007; Eade *et al.*, 2009); y no fue hasta este año cuando se describió la presencia de ZP1 en esta especie, siendo el primer carnívoro descrito con 4 proteínas (Stetson *et al.*, 2013).

Los carnívoros se dividen en dos superfamilias (caniformes y feliformes); por lo que, la presencia de ZP1 en la gata indicaba que la pseudogenización del gen ZP1, podría haber afectado únicamente a los caniformes; produciéndose tras la divergencia evolutiva de estas dos superfamilias, evento datado hace unos 60-65 Ma (Nyakatura *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Los caniformes, a su vez se dividen en dos infraórdenes: los Canoidea, formado por la familia Canidae (perros, lobos, zorros) y los Arctoidea, formado por las familias Ursidae (osos), Procyonidae (mapaches, coatíes), Mephitidae (mofetas), Mustelidae (comadreja, nutrias), Otariidae (lobos marinos), Odobenidae (morsa) y Phocidae (focas) (Agnarsson *et al.*, 2009).

Actualmente, la disponibilidad del genoma de diversas especies nos permite analizar las secuencias de los distintos genes de la ZP. Haciendo una búsqueda en las distintas bases de datos (Ensembl, Pubmed) descubrimos que la foca de Wedell, el hurón, la morsa, el oso panda, el oso polar y el tigre presentaban una secuencia correspondiente a *ZP1*; lo que nos permitía acotar la pseudogenización de dicho gen hacia el infraorden Canoidea.

Por otro lado, quisimos ampliar el estudio analizando la presencia del ARNm de los genes de la ZP en dos especies de carnívoros pertenecientes a ambos infraórdenes: la hurona (infraorden Arctoidea) y la zorra (infraorden Canoidea).

6.3.2 Composición de la zona pelúcida de hurona

Como hemos señalado, la hurona fue una de las especies elegidas para el estudio de la pseudogenización de *ZP1* dada su posición en el árbol filogenético de los carnívoros dentro del infraorden Arctoidea. Además, considerábamos al hurón una especie de estudio interesante debido a que es relativamente fácil disponer de estos animales; se están empezando a introducir como animal de compañía y las hembras son sometidas de forma rutinaria a la esterilización ovárica, por lo que podíamos obtener muestras biológicas para realizar nuestro estudio.

Por tanto, a partir del ADNc de ovario se amplificaron fragmentos de los 4 genes de la ZP. La secuenciación automática de los amplicones obtenidos indicaba que se trataba de dichos genes por lo que podemos decir que el ARNm de *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* se expresa en el ovario de la hurona.

Por tanto, como esperábamos, nuestros resultados indicaban que en la familia Mustelidae hay un gen *ZP1* funcional, por lo que la

pseudogenización de dicho gen probablemente se produjo posteriormente a la divergencia de los dos grandes infraórdenes de los caniformes, los Arctoidea (donde se incluye a la familia Mustelidae) y los Canoidea (donde se incluye a la familia Canidae) hace unos 60 Ma (Nyakatura *et al.*, 2012).

Al igual que en marsupiales, la descripción de ZP1 en la hurona podría ser de utilidad a la hora de elaborar vacunas anticonceptivas. Principalmente para controlar las poblaciones de distintos mustélidos que fueron introducidas por el hombre en Nueva Zelanda para reducir la población de conejos europeos. Actualmente la población de estos depredadores (armiños, comadrejas y hurones) está descontrolada y afecta severamente a la población endémica de este país, con especial relevancia en las aves emblemáticas de Nueva Zelanda, como son el kiwi (*Apteryx* sp.) y el kaka (*Nestor meridionalis*) (McLennan *et al.* 1996; Wilson *et al.* 1998; Jackson *et al.*, 2007).

Vacunas con ZP nativa de visón y hurón ya han sido producidas y testadas en la gata; los animales presentaron títulos altos de anticuerpos frente a las mismas; no obstante, cuando se realizaron ensayos de HIS no se observó ninguna reacción y todas las gatas quedaron gestantes (Levy *et al.*, 2005). Sin embargo, parece que hasta el momento ninguna de estas vacunas ha sido testada en la población de mustélidos.

6.3.3 Composición de la zona pelúcida de zorra

En la zorra únicamente han sido descritas las glicoproteínas ZP2 y ZP3 (Reubel *et al.*, 2005). Por lo que nos preguntamos si esta especie, tan próxima filogenéticamente al perro (Nyakatura *et al.*, 2012) presentaba el mismo modelo de composición que ésta; con ZP2, ZP3 y ZP4, donde ZP1 es un pseudogén (Goudet *et al.*, 2008).

El primer paso fue amplificar la secuencia de ZP4, la cual está presente en todos los carnívoros estudiados hasta la fecha (Harris *et al.*, 1994; Jewgenow y Fickel, 1999; Eade *et al.*, 2009; Blackmore *et al.*, 2004; Jackson y Beaton, 2004; McLaughlin *et al.*, 2004). Conseguimos amplificar la secuencia por completo y esta fue depositada en la base de datos GenBank. Además, amplificamos fragmentos de ZP2 y ZP3; demostrando la presencia del ARNm de ZP2, ZP3 y ZP4 en el ovario de la zorra.

La secuencia aminoacídica de ZP4 presenta una alta homología con la del resto de carnívoros estudiados, principalmente con la perra, siendo de un 89 % con esta especie. Los 10 residuos cisteína del dominio ZP se encuentran conservados en todas las especies comparadas; al igual que los dos sitios putativos de N-glicosilación detectados en ZP4 de zorra en posiciones: Asn44 y Asn68. Además, encontramos otros sitios putativos en otras especies; como Asn237 y Asn477 en la gata, Asn204 en la perra y Asn312 en la hurona. En la gata, el sitio putativo Asn237 ha sido detectado anteriormente en un péptido, por lo que esto indicaría que este sitio no está ocupado (Stetson *et al.*, 2013) (Ver Fig. 54 de Resultados).

Respecto a los residuos cisteína, los 10 presentes en el dominio ZP se encuentran conservados en todas las especies (Fig. 54).

El siguiente paso, fue intentar amplificar ZP1 como se explica en el siguiente apartado.

6.3.3.1 Pseudogenización de ZP1 en la zorra

En 2008, Goudet y colaboradores describieron la presencia de ZP1 en la perra como un pseudogén que se localizaba en el cromosoma 18. Estudiaron diversos exones y observaron la presencia de codones de stop en al menos tres de ellos (exones 3, 5 y 8).

Como hemos señalado anteriormente la descripción de ZP1 en la gata (Stetson *et al.*, 2013) así como el hallazgo de un gen *ZP1* funcional en diversas especies del infraorden Arctoidea, nos ha llevado a pensar que la pseudogenización de dicho gen únicamente afectada al infraorden Canoidea, constituido por la familia Canidae.

La familia Canidae está formada por dos subfamilias Canini y Vulpini, por lo que nos preguntamos si dicho evento afectaba únicamente a la rama de los perros y los lobos o si afectaba también a la rama de los zorros. Teniendo en cuenta que los perros y los zorros proceden de un ancestro común datado hace 10 Ma (Wayne *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999; Wienberg, 2004) este evento podía afectar también a los zorros.

Para comprobar si la pseudogenización también afectaba a los zorros amplificamos el exón 8 de *ZP1* de perra y zorra empleando ADNg y encontramos un codón de stop conservado en ambas especies, como ya había señalado previamente Goudet *et al.*, 2008 en la perra. Por tanto, podemos decir que la pseudogenización de *ZP1* probablemente se produjo cuando la familia Canidae se separó del resto de carnívoros, hecho datado aproximadamente hace 60 Ma, y dado que este evento afecta a las subfamilias Canini y Vulpini el rango en el que se pudo producir la pseudogenización de *ZP1* puede estar datado entre 15-60 Ma (Nyakatura *et al.*, 2012). Por todo esto, podemos indicar que la composición más común de la ZP de carnívoros es de cuatro proteínas y que la pseudogenización de *ZP1* ha afectado únicamente a la familia Canidae.

Como se ha demostrado con anterioridad, la pseudogenización de *ZP1* se ha producido varias veces en la evolución de los mamíferos, afectando a otros órdenes además de a los carnívoros. Ha sido previamente documentada en otras especies como la vaca (Goudet *et al.*, 2008), la cerda, el delfín, el tití común y el tarsero (Stetson *et al.*, 2012) (Ver Fig. 9 de Revisión Bibliográfica).

7. CONCLUSIONES

1. MARSUPIALES

1.1 En el ovario del wallaby de Bennett se expresa el ARNm de ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c y ZP4, lo que sugiere la existencia de 6 proteínas en su ZP.

1.2 Los análisis *in silico* demuestran que hay tres copias de *ZP3* en el wallaby de Tammar y en el demonio de Tasmania; mientras que, en la zarigüeya de cola corta hay dos copias ya que *ZP3-a* se encuentra pseudogenizada.

1.3 El análisis molecular de los exones 1 y 2 de *ZP4* indica que el gen *ZP4* está pseudogenizado en el orden Didelphimorphia de los marsupiales sudamericanos.

1.4 La composición de la ZP es diferente en los marsupiales australianos y sudamericanos, pudiendo estar formada por 4 a 6 glicoproteínas. En los marsupiales sudamericanos, concretamente en el orden Didelphimorphia, la ZP podría estar formada por 4 glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3-b y ZP3-c), estando *ZP3-a* y *ZP4* pseudogenizadas y en los marsupiales australianos la ZP podría estar formada por 6 glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c y ZP4).

1.5 El análisis filogenético realizado para *ZP4* en mamíferos indica que la pseudogenización de dicho gen afectaría además de al orden Didelphimorphia de los marsupiales a dos xenartros: el armadillo y el perezoso.

2. ROEDORES

2.1 En el ovario de tres roedores de la subfamilia Murinae (*Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* y *Mus pahari*) se expresa el ARNm de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4 codificando para proteínas como ha sido confirmado mediante espectrometría de masas.

2.2 La ZP de los ovocitos de especies de la subfamilia Murinae estaría formada por 3 o 4 proteínas dependiendo del género analizado. La pseudogenización de ZP4 se produjo hace 5-7 Ma, afectando únicamente al subgénero *Mus*.

2.3 La ZP de ratonas con 4 proteínas se digiere más rápido que la ZP de ratonas con 3 proteínas indicando que la presencia de una cuarta proteína no implicaría la existencia de una ZP molecularmente más densa o compacta.

2.4 Los análisis de fecundación *in vitro* demuestran que los espermatozoides de ratones con 3 proteínas en su ZP pueden fecundar el ovocito de ratonas con 4 proteínas en su ZP. Esto indica que la glicoproteína ZP4 no estaría implicada en la unión especie-específica del espermatozoide.

3. CARNÍVOROS

3.1 El análisis *in silico* realizado en distintos carnívoros muestra la presencia del gen ZP1 en la foca de Wedell, la morsa, el tigre, el oso panda y el oso polar.

3.2 En el ovario de hurona se expresa el ARNm de ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4, lo que sugiere la existencia de 4 proteínas en su ZP.

3.3 En el ovario de zorra se expresa el ARNm de ZP2, ZP3 y ZP4, mientras que *ZP1* está pseudogenizado en esta especie, lo que sugiere la presencia de 3 proteínas en su ZP.

3.4 La pseudogenización de *ZP1* únicamente afecta a la familia Canidae de los carnívoros.

8. CONCLUSIONS

1. MARSUPIALS

1.1 In Bennett's wallaby ovaries the mRNA of ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c and ZP4 is expressed, suggesting the presence of six proteins in its ZP.

1.2 The *in silico* analysis made in Tammar wallaby and Tasmanian devil showed the presence of three copies of the *ZP3* gene, whilst in grey short-tailed opossum the presence of only two copies was evident due to a *ZP3-a* pseudogenization.

1.3 The molecular analysis of ZP4 (exons 1 and 2) revealed that *ZP4* is pseudogenized in the South American order Didelphimorphia.

1.4 ZP composition differs between Australasian and South American marsupials. ZP might be formed of four to six glycoproteins. In South American marsupials, specifically in the Didelphimorphia order, the ZP is probably formed of four proteins (ZP1, ZP2, ZP3-b and ZP3-c) being *ZP3-a* and *ZP4* pseudogenes, whilst in Australasian marsupials the ZP is probably formed of six proteins (ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c and ZP4).

1.5 The phylogenetic analysis made for *ZP4* in mammals indicates that the pseudogenization not only affects the Didelphimorphia order of marsupials but also two xenarthrans: the armadillo and the tree sloth.

2. RODENTS

2.1 In the ovaries of three rodents from the Murinae subfamily (*Mastomys coucha*, *Mus mattheyi* and *Mus pahari*) the mRNA of ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4 is expressed codifying for proteins, as confirmed by means of mass spectrometry.

2.2 The oocytes ZP of species of the Murinae subfamily could be formed of 3 or 4 proteins. The pseudogenization of *ZP4* happened around 5-7 Ma, but only affected the subgenus *Mus*.

2.3 ZP digestion of mice with 4 glycoproteins is produced faster than ZP digestion of mice with 3 glycoproteins indicating that the presence of a fourth protein does not imply a thicker or compacter ZP at a molecular level.

2.4 The *in vitro* fertilization analysis demonstrated that mice with three proteins in their ZP can fertilize mice with four proteins. This indicates that *ZP4* is not involved in the species-specific binding of sperm.

3. CARNIVORES

3.1 The *in silico* analysis conducted in different carnivores showed the presence of a *ZP1* gene in panda, polar bear, tiger, walrus and Wedell seal.

3.2 In ferret ovaries the mRNA of *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* and *ZP4* is expressed suggesting the presence of four proteins in its ZP.

3.3 In fox ovaries the mRNA of *ZP2*, *ZP3* and *ZP4* is expressed, whilst *ZP1* is a pseudogene in this species, suggesting the presence of three proteins in its ZP.

3.4 The *ZP1* pseudogenization only affects the Canidae family of carnivores.

9. RESUMEN

La zona pelúcida (ZP) es una matriz traslúcida, glicoproteica y acelular que rodea los ovocitos de los mamíferos. Otros vertebrados presentan una estructura similar que se conoce como envoltura vitelina en anfibios, corion en peces y envoltura perivitelina en aves (Wassarman, 1988; Tian *et al.*, 1997; Hyllner *et al.*, 2001; Sasanami *et al.*, 2002; Monné y Jovine, 2011). Las funciones de la ZP están relacionadas con importantes eventos que implican la formación del ovocito, diferentes etapas durante la fecundación y desarrollo embrionario temprano. Así, interviene en la foliculogénesis, la organización y diferenciación de las células de la granulosa, el reconocimiento y unión del espermatozoide, la inducción de la reacción acrosómica (RA), el bloqueo de la polispermia y la protección del embrión preimplantado (Modlinski, 1970; Bleil y Wassarman, 1980; Florman y Storey, 1982; Berger *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 1996, 1999, 2001; Benoff, 1997; Fazeli *et al.*, 1997; Kölle *et al.*, 1998; Dean, 2004; Gupta *et al.*, 2011, 2012; Tanihara *et al.*, 2013).

Pese a que la ZP ha sido intensamente estudiada en las últimas décadas; ha sido recientemente cuando se ha profundizado en el estudio de la composición de la misma en las distintas especies, en la evolución de los genes de la familia ZP, así como en la función realizada por las distintas glicoproteínas; gracias, principalmente al desarrollo de animales modificados genéticamente.

En la presente Tesis Doctoral ahondamos en la composición de la ZP en mamíferos placentarios (carnívoros y roedores) y en mamíferos metaterios (marsupiales), descubriendo que la composición de la misma en las diversas especies es más compleja de lo que en un principio se pensaba. También se estudia la evolución de los distintos genes descritos en esta Tesis Doctoral. Además, se analiza el comportamiento de la ZP de varias especies con diferente composición proteica mediante estudios funcionales como la fecundación *in vitro* y la digestión de la ZP mediante proteasas.

A continuación, se exponen brevemente los experimentos realizados y los resultados obtenidos diferenciando entre los marsupiales, los roedores y los carnívoros.

1. MARSUPIALES

Hasta ahora, en marsupiales se había creído que la ZP estaba formada por tres glicoproteínas: ZP2, ZP3 y ZP4 (McCartney and Mate, 1999; Selwood, 2000; Mate *et al.*, 2003) ya que, únicamente en una especie; la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*), los genes o proteínas habían sido caracterizados (Mate y McCartney, 1998; Voyle *et al.*, 1999; McCartney y Mate, 1999; Haines *et al.*, 1999; Mate *et al.*, 2003).

No obstante, la reciente descripción de 4 glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3, y ZP4) en la ZP de algunas especies de euterios y de la presencia de una duplicación del gen *ZP3* en la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*) (Meslin *et al.*, 2012) nos ha hecho profundizar en la verdadera composición de la ZP de marsupiales.

Para ello, hemos analizado la composición de la ZP en marsupiales, mediante la realización de análisis *in silico* y análisis moleculares; diferenciando entre marsupiales australianos (Demonio de Tasmania, koala, wallaby de Bennett y wallaby de Tammar) y marsupiales sudamericanos (zarigüeya de cola corta y zarigüeya común).

En esta Tesis Doctoral, mostramos evidencia de la presencia de 6 transcritos en los ovarios del wallaby de Bennett: ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c y ZP4. Por primera vez, la presencia del ARNm de ZP1 y de las tres copias de ZP3 ha sido demostrada en los ovarios de un marsupial. Además, nuestros análisis *in silico* indicarían la presencia de estos transcritos en otros dos marsupiales; el wallaby de Tammar y el demonio de Tasmania. En

la zarigüeya de cola corta (*Monodelphis domestica*), *ZP1* estaría presente y habría dos copias de *ZP3*, puesto que *ZP3-a* es un pseudogén. Sin embargo, experimentos futuros son necesarios para clarificar si los 6 transcritos detectados en el ovario del wallaby de Bennett están presentes como proteínas funcionales en la ZP, para lo que sería necesario realizar un análisis proteómico.

Por otro lado, hemos estudiado la evolución del gen *ZP4* en diversos marsupiales australianos y sudamericanos; observando que, en algunas especies de marsupiales sudamericanos este gen no sería funcional. Aportamos evidencias de que la pseudogenización de *ZP4* ha afectado al orden Didelphimorphia. Por lo que, este proceso se tuvo que producir tras la divergencia de los marsupiales australianos y sudamericanos hace aproximadamente 80 millones de años (Ma) y en el orden Didelphimorphia antes de la divergencia de las especies recientes, hace aproximadamente 40 Ma (Beck, 2008; Meredith *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2014).

La pseudogenización del gen *ZP4*, hasta la fecha únicamente había sido descrita en el ratón (Bleil y Wassarman, 1980; Boja *et al.*, 2003; Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008) y por primera vez se describe en marsupiales. Nosotros proponemos el uso del gen *ZP4* como un marcador adicional para reconstruir la filogenia de los marsupiales en combinación con otros descritos anteriormente en la literatura.

La identificación de proteínas de la ZP adicionales podría tener una implicación relevante en el desarrollo de vacunas anticonceptivas para el control de la población de algunas especies de marsupiales en países como, Australia y Nueva Zelanda, donde algunos marsupiales son considerados una peste (Cowan and Tyndale-Biscoe, 1997; Mate *et al.*, 2003; McCartney *et al.*, 2007, Weihong, 2009). Previamente han sido testadas vacunas constituidas por proteínas nativas y recombinantes; pero, creemos que sería interesante el desarrollo de vacunas más completas empleando todas las proteínas,

incluyendo las descritas en este estudio; ya que podrían tener una mayor eficacia. De todos modos, son necesarios estudios adicionales que nos permitan conocer previamente la concentración relativa de dichas proteínas en la ZP; así como, las funciones desempeñadas por las mismas.

2. ROEDORES

Hasta hace 30 años, se había considerado que la ZP de mamíferos estaba formada por tres glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3), tomando como modelo al ratón de laboratorio, donde ZP4 es un pseudogén (Bleil y Wassarman, 1980a; Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008). Sin embargo, recientemente se han descrito cuatro proteínas (ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4) en los ovocitos de otros roedores, como la rata (*Rattus norvegicus*) (Hoodbhoy *et al.*, 2005) y el hámster (*Mesocricetus auratus*) (Izquierdo-Rico *et al.*, 2009a; Jiménez-Movilla *et al.*, 2009). Además, en 2009 se demostró la presencia del gen ZP4 en algunas especies de roedores pertenecientes al género *Mus* (Izquierdo-Rico *et al.*, 2009b). Nuestro objetivo era saber si este gen se expresa en el ovario como una proteína funcional.

Nuestros análisis moleculares realizados en tres especies de roedores pertenecientes al género *Mus*: *Mus mattheyi* y *Mus pahari* y al género *Mastomys*: *Mastomys coucha*, indicaban la presencia de 4 transcritos en los ovarios de estos roedores. Además, los análisis de espectrometría de masas; confirmaron la expresión de 4 proteínas; como previamente se ha descrito en la mujer, la rata, el hámster, la coneja y la gata (Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Izquierdo-Rico *et al.*, 2009a; Stetson *et al.*, 2012, 2013).

Teniendo en cuenta que la rata (con 4 glicoproteínas en su ZP) y el ratón (con 3 glicoproteínas) pertenecen a la misma subfamilia de roedores (Murinae) el gen ZP4 se tuvo que perder tras su divergencia hace unos 12 Ma (Jaeger *et al.*, 1986; Jacobs *et al.*, 1989, 1990; Goudet *et al.*, 2008). Sin embargo, la

descripción de 4 proteínas en especies de ratones pertenecientes al género *Mus*, indica que este evento tuvo lugar más recientemente en la evolución de dicho género. Estudios previos indican que los 4 subgéneros del género *Mus* divergen hace 6-7 Ma (Lecompte *et al.*, 2008, Pagès *et al.*, 2012), y dentro del subgénero *Mus* la primera rama se estima hace unos 5 Ma (Pagès *et al.*, 2012), lo que indicaría que la pseudogenización de *ZP4* tuvo lugar entre 7 y 5 Ma.

Nuestros resultados, nos permiten proponer a estas especies, como modelos experimentales más apropiados para el estudio de la estructura y función de las proteínas de la ZP para especies con 4 glicoproteínas en su ZP, como por ejemplo, la mujer.

Sin embargo, sería necesario optimizar las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) en estas especies. Nuestros ensayos de FIV homóloga únicamente han resultado satisfactorios en el grupo control (*Mus musculus*) y la FIV heteróloga ha sido posible cuando los espermatozoides de *Mus musculus* fecundaban el ovocito de *Mus pahari* y *Mus mattheyi*; poniendo de manifiesto que, la estructura de una ZP formada por 4 glicoproteínas no es una barrera para los espermatozoides de una especie con una ZP formada por 3 glicoproteínas, al menos en condiciones de fecundación *in vitro*.

3. CARNÍVOROS

Estudios previos han documentado la pseudogenización del gen *ZP1* en la perra (Goudet *et al.*, 2008). Este hallazgo hizo creer a algunos autores que *ZP1* también podía estar pseudogenizada en otros carnívoros; como por ejemplo, la gata (Meslin *et al.*, 2012). De hecho, hasta el año 2013, la presencia de la glicoproteína *ZP1* nunca había sido demostrada en ningún carnívoro. Fue en este año, cuando se describe esta glicoproteína en el ovario y los ovocitos de gata tras realizar un análisis molecular y proteómico (Stetson *et al.*, 2013).

En este estudio hemos realizado distintos análisis *in silico* demostrando la presencia del gen *ZP1* en diversos carnívoros; como la foca de Wedell, la morsa, el tigre, el oso panda y el oso polar. Además, los análisis moleculares realizados en la hurona, demuestran la presencia del ARNm de *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* y *ZP4* en sus ovarios.

Al igual que en marsupiales, la descripción de *ZP1* en la hurona podría ser de utilidad a la hora de elaborar vacunas anticonceptivas para controlar las poblaciones de distintos mustélidos en países como Nueva Zelanda, donde la población de estos depredadores está descontrolada y afecta severamente a la población endémica de este país, con especial relevancia en las aves emblemáticas, como el kiwi (*Apteryx* sp.) y el kaka (*Nestor meridionalis*) (McLennan *et al.* 1996; Wilson *et al.* 1998; Jackson *et al.*, 2007).

El hallazgo de la presencia de *ZP1* en varias especies de carnívoros como, la foca de Wedell, la morsa, el tigre, el oso panda y el oso polar (análisis *in silico*), sumado a la presencia del ARNm de *ZP1* en el ovario de hurona; demuestra que *ZP1* sería un gen funcional en la mayor parte de las familias de carnívoros. Por lo que, la pseudogenización del gen *ZP1* descrita previamente en el perro, podría ser un evento aislado en la rama de los perros. Pero, ¿este suceso, está afectando otras ramas más cercanas al perro, como la rama de los zorros?. Teniendo en cuenta que los perros y los zorros proceden de un ancestro común datado hace 10 Ma (Wayne *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999; Wienberg, 2004), pensamos que este evento podría haber afectado igualmente a los zorros.

Para estudiar este evento, nos propusimos amplificar el ADNc de las distintas ZPs de la zorra, amplificando completamente el marco abierto de lectura de *ZP4* y parcialmente los de *ZP2* y *ZP3*. Para saber si la pseudogenización del gen *ZP1* afectaba a la zorra nos propusimos amplificar el exón 8 de la perra donde previamente se había descrito un codón de stop

(Goudet *et al.*, 2008). Nuestros resultados indicaron que este codón de stop estaba conservado en ambas especies.

Estos resultados confirman que la pseudogenización de *ZP1* afecta también a la rama de los zorros. Por lo que probablemente se produjo cuando la familia Canidae se separó del resto de carnívoros, hecho datado hace aproximadamente unos 60 Ma (Nyakatura *et al.*, 2012).

10. SUMMARY

The zona pellucida (ZP) is a translucent, glycoproteic and acellular matrix that surrounds mammalian oocytes. Other vertebrates have a similar structure, which is called the vitelline envelope in amphibians, chorion in fishes and the perivitelline envelope in birds (Wassarman, 1988; Tian *et al.*, 1997; Hyllner *et al.*, 2001; Sasanami *et al.*, 2002; Monné and Jovine, 2011). The ZP functions are related with important events in oocyte formation and different steps during fertilization. For instance, it is involved in folliculogenesis, the organization and differentiation of granulosa cells, recognition and binding to spermatozoa, the induction of the acrosome reaction (AR), blocking polyspermy and the protection of the preimplanted embryo (Modlinski, 1970; Bleil and Wassarman, 1980; Florman and Storey, 1982; Berger *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1996; Rankin *et al.*, 1996, 1999, 2001; Benoff, 1997; Fazeli *et al.*, 1997; Kölle *et al.*, 1998; Dean, 2004; Gupta *et al.*, 2011, 2012; Tanihara *et al.*, 2013).

Although the ZP has been well studied, it is only recently that its composition in different species and the evolution of the ZP gene family have been studied in depth. Furthermore, much has been learnt about the functions related with the different glycoproteins due to the availability of genetically modified animals. The present thesis looks in depth at the ZP composition in placental mammals (carnivores and rodents) and metatherian mammals (marsupials), finding that the ZP composition in the different species is more complex than was previously thought. The evolution of the different genes described in the thesis was studied and the ZP behavior in several species of different protein composition was analyzed by means of functional studies, such as *in vitro* fertilization (IVF) and ZP digestion with proteases.

The different experiments carried out and the results distinguished among marsupials, rodents and carnivores.

1. MARSUPIALS

The ZP composition has been analyzed in different Australasian (Koala, Tasmanian devil, Bennett's wallaby and Tammar wallaby) and South American marsupials (grey short-tailed opossum and common opossum), conducting *in silico* and molecular analysis.

Until recently, it had been believed that the ZP of marsupials was formed of three glycoproteins (ZP2, ZP3 and ZP4) (McCartney and Mate, 1999; Selwood, 2000; Mate *et al.*, 2003) and only in one species, the brushtail opossum (*Trichosurus vulpecula*), had three cDNAs encoding zona pellucida been cloned and sequenced: ZP2, ZP3 and ZP4 (Mate and McCartney, 1998; Voyle *et al.*, 1999; McCartney and Mate, 1999; Haines *et al.*, 1999; Mate *et al.*, 2003).

Nevertheless, the recent description of four glycoproteins (ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4) in the ZP of some eutherian species and the presence of a *ZP3* gene duplication in the grey short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*) (Meslin *et al.*, 2012) suggests the need for a fresh look at the ZP composition in marsupials.

In this thesis, we provide evidence for the existence of six transcripts in Bennett's wallaby ovaries: ZP1, ZP2, ZP3-a, ZP3-b, ZP3-c and ZP4. This is the first time that the ZP1 mRNA and the three copies of ZP3 have been described in marsupial ovaries. Furthermore, our *in silico* analysis showed that in other marsupial species, such as Tammar wallaby and Tasmanian devil, these transcripts are also present. In grey short-tailed opossum, *ZP1* is present and there are two copies of *ZP3*; whilst the copy *ZP3-a* is a pseudogene. Future studies are needed to clarify whether the 6 transcripts detected in Bennett's wallaby ovaries are present as a functional protein, for which it would be necessary to carry out a proteomic analysis.

In addition, when we studied the *ZP4* gene evolution in Australasian and South American marsupials, this gene was found to be non-functional in some species. We provide evidence that *ZP4* pseudogenization affected at least the South American order Didelphimorphia. This process occurred after the split between the South American and Australasian marsupials, approximately 80 million years ago (Ma) and in the Didelphimorphia order before the divergence of recent species, around 40 Ma (Beck, 2008; Meredith *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2014).

Until now, *ZP4* pseudogenization has only been described mouse (Bleil and Wassarman, 1980; Boja *et al.*, 2003; Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008) and this is the first time that it has been described in a marsupial. We propose the *ZP4* gene for use as an additional marker to reconstruct marsupial phylogeny in combination with other markers previously described in the literature.

The identification of additional ZP proteins could have implications for the development of contraceptive vaccines for use in the population control of some species, mainly in Australia and New Zealand, where some marsupials are considered a pest (Cowan and Tyndale-Biscoe, 1997; Mate *et al.*, 2003; McCartney *et al.*, 2007, Weihong, 2009). While vaccines constituted by native and recombinant proteins have been tested before, we think that it would be interesting to test the new proteins described in this thesis, as they could have an improved immunogenic effect. However for this, the relative concentration of these proteins in the ovary and the functions related with them would need to be studied.

2. RODENTS

Until 30 years ago, the zona pellucida had been considered as being formed of three glycoproteins (ZP1, ZP2 and ZP3), because evidence was based on the laboratory mouse, which has three glycoproteins, *ZP4* being a pseudogene (Bleil and Wassarman, 1980a; Lefièvre *et al.*, 2004; Evsikov *et al.*, 2006; Goudet *et al.*, 2008). Nevertheless, four glycoproteins (ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4) have recently been reported in the oocytes of other rodents such as rat (*Rattus norvegicus*) (Hoodbhoy *et al.*, 2005) and hamster (*Mesocricetus auratus*) (Izquierdo-Rico *et al.*, 2009a; Jiménez-Movilla *et al.*, 2009). Moreover, in 2009 the presence of a *ZP4* gene was reported in some species of the genus *Mus* (Izquierdo-Rico *et al.*, 2009b). Our aim was to know if this gene was expressed in the ovary as a functional protein.

The molecular analysis conducted in three species of rodent from the genus *Mus* (*Mus mattheyi* and *Mus pahari*) and the genus *Mastomys* (*Mastomys coucha*), showed the presence of four transcripts in the ovaries. Furthermore, peptides of the four mature proteins were detected by MS-MS analyses, confirming for the first time that the four distinct genes are effectively expressed, as already seen in the ZP of other species including human, rat, hamster, rabbit and cat using proteomics approaches (Lefièvre *et al.*, 2004; Hoodbhoy *et al.*, 2005; Izquierdo-Rico *et al.*, 2009a; Stetson *et al.*, 2012, 2013).

Since rat (with four glycoproteins) and mouse (with three glycoproteins) belong to the same subfamily of rodents (the Murinae), seems that *ZP4* was probably lost after their divergence around 12 Ma (Jaeger *et al.*, 1986; Jacobs *et al.*, 1989, 1990; Goudet *et al.*, 2008). However, the description of four glycoproteins in some species of mouse from the genus *Mus* indicates that this event took place more recently in the evolution of the genus. Previous studies have reported that the four subgenera of *Mus* diverged between 6-7 Ma (Lecompte *et al.*, 2008, Pagès *et al.*, 2012). Within the subgenus *Mus*, the

earliest offshoot is estimated at around 5 Ma (Pagès *et al.*, 2012), indicating that pseudogenization took place between 7 and 5 Ma.

Our results, lead us to propose that these species could be used as an experimental model to study the structure and function of species with four glycoproteins in their ZP, such as human.

Nevertheless, it would be necessary to optimize *in vitro* fertilization (IVF) techniques in these species, in order to study the function of this protein. Our IVF homologous experiments, were only satisfactory in the control group (*Mus musculus*) and the heterologous IVF has been possible when the spermatozoa from *Mus musculus* had to fertilize the oocytes from *Mus pahari* and *Mus mattheyi*; demonstrating that, a ZP formed of 4 glycoproteins is not a barrier for the spermatozoa of species with a ZP formed of 3 glycoproteins, at least in *in vitro* conditions.

3. CARNIVORES

Previous studies have reported a *ZP1* pseudogenization in dog (Goudet *et al.*, 2008), a finding that lead some authors to believe that *ZP1* is a pseudogene in other carnivores such as cat (Meslin *et al.*, 2012). In fact, the presence of *ZP1* had never been reported in a carnivore until 2013, when this glycoprotein was described in the cat zona pellucida after a molecular and proteomic analysis (Stetson *et al.*, 2013).

In the present study, different *in silico* analyses demonstrate the presence of the *ZP1* gene in several carnivores, like panda, polar bear, tiger, walrus and Wedell seal. Moreover, the molecular analysis conducted in the ferret showed the presence of *ZP1*, *ZP2*, *ZP3* and *ZP4* mRNA in its ovaries.

As in marsupials, the description of *ZP1* in ferret could be important for developing contraceptive vaccines to control the population size. This could be relevant in countries like New Zealand, where the number of these predators is out of control, severely affecting the endemic population of the country, specially emblematic birds, such as the kiwi (*Apteryx* sp.) and the kaka (*Nestor meridionalis*) (McLennan *et al.* 1996; Wilson *et al.* 1998; Jackson *et al.*, 2007).

Our finding about the presence of *ZP1* in several species of carnivores, such as panda, polar bear, tiger, walrus and Wedell seal (*in silico* analysis), added to the presence of *ZP1* mRNA in ferret ovaries, demonstrate that *ZP1* is a functional gene in most of carnivorous families. Thus, *ZP1* pseudogenization could be an isolated event affecting the dog branch, although how do we know whether or not other close branches to the dog, like foxes are not affected? Taking into account that dogs and foxes come from a common ancestor dated 10 Ma (Wayne *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1999; Wienberg, 2004), it would not be suspicious if the fox, too, might be affected in the same way.

To analyze this possibility, the cDNA of different *ZPs* was amplified from fox ovaries. The open reading frame of red fox *ZP4* was completely amplified and a partial sequence of the open reading frames of *ZP2* and *ZP3* was also obtained. To ascertain wheter *ZP1* pseudogenization also affected the foxes, we amplified the exon 8 of the dog, as a stop codon has previously been described in it (Goudet *et al.*, 2008). Our results indicated that this stop codon was conserved in both species.

These results confirm that the *ZP1* gene pseudogenization has also affected the fox branch. Thus, this event probably occurred when the Canidae family separated from the other carnivorous families, dated around 60 Ma (Nyakatura *et al.*, 2012).

11. ABREVIATURAS

ADNc: ácido desoxirribonucleótido complementario
ADNg: ADN genómico
ARN: ácido ribonucleico
BSA: albúmina sérica bovina
CEC: contenido de la cola epididimaria
CCO: complejo cúmulo-ovocito
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato
EDTA: ácido etildiaminotetraacético
DTT: ditioneitol
FIV: fecundación *in vitro*
GC: gránulos corticales
VG: vesícula germinal
hCG: gonadotropina coriónica humana
HIS: hibridación *in situ*
HTF: human tubal fluid
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides
kDa: kilodalton
KO: *knock out*
m/z: relación masa/carga
MS: espectrometría de masas
Ma: millones de años
PB: tampón fosfato
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PMSG: gonadotropina sérica de yegua gestante
RA: reacción acrosómica
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a partir de ADNc
RT-qPCR: PCR en tiempo real
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SDS: dodecilsulfato de sodio
TAE: tris acetato EDTA
TFA: ácido trifluoroacético
Tm: temperatura de fusión o de melting
UI: unidades internacionales
ZP: zona pelúcida

12. ANEXOS

ANEXO 1

Medio M2

	Cantidades en gramos		
	500 ml	250 ml	Referencia Sigma
Hepes	2.4845	1.4907	H4043
Cloruro de calcio dihidratado ($\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.126	0.0756	C7902
Cloruro de sodio (NaCl)	2.7665	1.6599	S5886
Cloruro de potasio (KCl)	0.178	0.1068	P5405
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	0.081	0.0486	P5655
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.1465	0.0879	M1880
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	0.1745	0.1047	S8875
Piruvato sódico	0.018	0.0108	P2256
Glucosa anhidra	0.5	0.3	G7021
Lactato de sodio (60%)	1.885 ml	1.131 ml	L7900
Rojo fenol	0.005	0.003	P5530
Penicilina G	0.0312	0.0186	P4687
Estreptomina	0.0250	0.0150	S9137
Ajustar pH 7.3 con NaOH 1M y medir osmolaridad (250-255 mosmoles)			
BSA	4	2.4	A3311

ANEXO 2

Medio HTF (Human tubal fluid)

	Cantidades en gramos		
	500 ml	250 ml	Referencia Sigma
Cloruro de calcio dihidratado ($\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.15	0.075	C7902
Cloruro de sodio (NaCl)	2.96875	1.48438	S9625
Cloruro de potasio (KCl)	0.1748	0.0874	P5405
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	0.0252	0.0126	P5655
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.0246	0.0123	M1880
Lactato de sodio (60%)	1.71 ml	0.855 ml	L7900
Piruvato sódico	0.0182	0.0091	P2256
Glucosa anhidra	0.25	0.125	G7021
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	1.05	0.525	S5761
Penicilina G	0.0375	0.018	P4687
Estreptomina	0.025	0.0125	S9137
Rojo fenol	0.002	0.001	P5530
BSA	2	1	A3311

13. BIBLIOGRAFÍA

- Agnarsson I, Kuntner M, May-Collado LJ (2010).** Dogs, cats, and kin: a molecular species-level phylogeny of Carnivora. *Mol Phylogenet Evol.* 54:726-745.
- Akatsuka K, Yoshida-Komiya H, Tulsiani DRP, Orgebin-Crist MC, Hiroi M, Araki Y (1998).** Rat zona pellucida glycoproteins: Molecular cloning and characterization of the three major components. *Mol Reprod Dev.* 51:454-467.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EV, Lipman DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403-410.
- Aplin KP, Archer M (1987).** Recent advances in marsupial systematics with a new syncretic classification. En: M. Archer (ed). *Posums and Opossums: studies in evolution*, Vol. 1, Surrey Beatty and Sons and the Royal Zoological Society of New South Wales, Sydney. pp. 15-72.
- Archer M, Arena R, Bassarova M, Black K, Brammall J, Cooke B, Creaser P, Crosby K, Gillespie A, Godthelp G, Gott M, Hand SJ, Kear B, Krikmann A, Mackness B, Muirhead J, Musser A, Myers T, Pledge N, Wang Y, Wroe S (1999).** The evolutionary history and diversity of Australian mammals. *Australian Mammalogy*, 21:1-45.
- Au PCK, Whitley J, Vaux D, Selwood L, Familiar M (2008).** Identification of novel and known ovary-specific genes including ZP2, in a marsupial, the Stripe-faced dunnart. *Mol Reprod Dev.* 75:318-325.
- Avella MA, Baibakov B, Dean J (2014).** A single domain of the ZP2 zona pellucida protein mediates gamete recognition in mice and humans. *J Cell Biol.* 205:801-809.
- Baibakov B, Boggs NA, Yauger B, Baibakov G, Dean J (2012).** Human sperm bind to the N-terminal domain of ZP2 in humanized zonae pellucidae in transgenic mice. *J Cell Biol.* 197:897-905.
- Ballester L, Fernández-Luna E, Pilar C, García-Vázquez F, Avilés M (2013).** Análisis de la resistencia a la proteólisis de la zona palúcida de ovocitos de cerda u hámster. 10º Congreso Internacional de Estudiantes de Ciencias Experimentales y de la Salud. 24-26 Abril 2013.
- Barber MR, Lee SM, Steffens WL, Ard M, Fayrer-Hosken RA (2001).** Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology.* 1;55:1705-1517.
- Bausek N, Waclawek M, Wolfgang JS, Wohlrab F (2000).** The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 275: 28866-28872.
- Beck RMD (2008).** A dated phylogeny of marsupials using a molecular supermatrix and multiple fossil constraints. *J Mammal.* 89:175-189.

Bedford JM, Breed WG (1994). Regulated storage and subsequent transformation of spermatozoa in the fallopian tubes of an Australian marsupial, *Sminthopsis crassicaudata*. Biol Reprod. 50:845-854.

Bedford JM (1996). What marsupial gametes disclose about gamete function in eutherian mammals. Reprod Fertil Dev. 8:569-580.

Bedford JM (2004). Enigmas of mammalian gamete form and function. Biol Rev. 79:429-460.

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol. 340:783-795.

Benoff S (1997). Carbohydrates and fertilization: an overview. Mol Hum Reprod. 3:599-637.

Berger T, Turner KO, Meizel S, Hedrick JL (1989). Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. Biol Reprod. 40:525-530.

Berlin S, Smith NG (2005). Testing for adaptative evolution of the female reproductive protein ZPC in mammals, birds and fishes reveals problems with the M7-M8 likelihood ratio test. BMC Evol Biol 2005; 5:65-74.

Bhat R, Chakraborty M, Mian IS, Newman SA (2014). Structural divergence in vertebrate phylogeny of a duplicated prototype galectin. Genome Biol Evol. 6:2721-2730.

Blackmore DG, Baillie LR, Holt JE, Dierkx L, Aitken RJ, McLaughlin EA (2004). Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. Biol Reprod. 71:661-668.

Bleil JD, Wassarman PM (1980a). Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. Dev Biol. 76:185-202.

Bleil JD, Wassarman PM (1980b). Mammalian sperm-egg Interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. Cell. 20:873-882.

Bleil JD, Wassarman PM (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. Dev Biol. 95:317-324.

Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM (1988). Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. Dev Biol. 128:376-385.

Bodmer M, Ashburner M (1982). Conservation and change in the DNA sequences coding for alcohol dehydrogenase in sibling species of *Drosophila*. Nature. 309:425-430.

- Bogner K, Hinsch KD, Nayudu P, Konrad L, Cassara C, Hinsch E (2004).** Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Mol Hum Reprod.* 10:481-488.
- Boja ES, Hoodbhoy T, Fales HM, Dean J (2003).** Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins using mass spectrometry. *J Biol Chem.* 278:34189-34202.
- Boja ES, Hoodbhoy T, Garfield M, Fales HM (2005).** Structural conservation of mouse and rat zona pellucida glycoproteins. Probing the native rat zona pellucida proteome by mass spectrometry. *Biochemistry.* 44:16445-16460.
- Bork P, Sander C (1992).** A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *FEBS Lett.* 300:237-240.
- Bork P (1993).** A trefoil domain in the major rabbit zona pellucida protein. *Protein Sci.* 2:669-670.
- Bousquet D, Léveillé MC, Roberts KD, Chapdelaine A, Bleau G (1981).** The cellular origin of the zona pellucida antigen in the human and hamster. *J Exp Zool.* 215:215-218.
- Braun BC, Ringleb J, Waurich R, Viertel D, Jewgenow K (2009).** Functional role of feline zona pellucida protein 4 trefoil domain: a sperm receptor or structural component of the domestic cat zona pellucida?. *Reprod Domest Anim.* 2:234-238.
- Breed WG, Leigh CM (1990).** Morphological changes in the oocyte and its surrounding vestments during in vivo fertilization in the dasyurid marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. *J Morphol.* 204:177-196.
- Breed WG (1996).** Egg maturation and fertilization in marsupials. *Reprod Fertil Dev.* 8:617-643.
- Breed WG, Hope RM, Wiebkin OW, Spargo SC, Chapman JA (2002).** Structural organization and evolution of the marsupial zona pellucida. *Reproduction.* 123:13-21.
- Burkart AD, 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.
- Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, González-González ME, Galicia-Chavarría M, Larrea F, Gerton GL (2006).** Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol Reprod.* 74:760-768.
- Calafell JM, Nogués C, Ponsà M, Santaló J, Egozcue J (1992).** Zona pellucida surface of immature and in vitro matured mouse oocytes: analysis by scanning electron microscopy. *J Assist Reprod Genet.* 9:365-372.
- Callebaut I, Mornon JP, Monget P (2007).** Isolated ZP-N domains constitute the N-terminal extensions of Zona Pellucida proteins. *Bioinformatics.* 23:1871-1874.

Cánovas S, Romar R, Grullón LA, Avilés M, Coy P (2009). Pre-fertilization zona pellucida hardening by different cross-linkers affects IVF in pigs and cattle and improves embryo production in pigs. *Reproduction*. 137:803-812.

Chakravarty S, Suraj K, Gupta SK (2005). Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Mol Hum Reprod*. 11:365-372.

Chakravarty S, Kadunganattil S, Bansal P, Sharma RK, Gupta SK (2008). Relevance of glycosylation of human zona pellucida glycoproteins for their binding to capacitated human spermatozoa and subsequent induction of acrosomal exocytosis. *Mol Reprod Dev*. 75:75-88.

Chang YS, Wang SC, Tsao CC, Huang FL (1996). Molecular cloning, structural analysis, and expression of carp ZP3 gene. *Mol Reprod Dev*. 44:295-304.

Chapman JA, Wiebkin OW, Breed WG (2000a). Structure of the zona pellucida of a model marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*: Family Phalangeridae). *J Reprod Fertil Abstract Series* 25, abstract 6.

Chapman JA, Wiebkin OW, Breed WG (2000b). Interspecific variation of zona pellucida glycoconjugates in several species of marsupial. *J Reprod Fertil*. 119:111-120.

Chen S, Costa V, Beja-Pereira A (2011). Evolutionary patterns of two major reproduction candidate genes (ZP2 and ZP3) reveal no contribution to reproductive isolation between bovine species. *BMC Evol Biol*. 11:24-34.

Chiu PC, Wong BS, Lee CL, Pang RT, Lee KF, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WS (2008a). Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties. *Hum Reprod*. 23:1385-1393.

Chiu PC, Wong BS, Chung MK, Lam KKW, Pang RT, Lee KF, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WS (2008b). Effects of native human zona pellucida glycoprotein-3 and -4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 79:869-877.

Civetta A, Singh RS (1995). High divergence of reproductive tract proteins and their association with postzygotic reproductive isolation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* group species. *J Mol Evol*. 41:1085-1095.

Claw KG, George RD, Swanson WJ (2014). Detecting coevolution in mammalian sperm-egg fusion proteins. *Mol Reprod Dev*. 81:531-538.

Conner SJ, Hughes DC (2003). Analysis of fish ZP1/ZPB homologous genes evidence for both genome duplication and species-specific amplification models of evolution. *Reproduction*. 126:347-352.

Cowan PE, Tyndale-Biscoe CH (1997). Australian and New Zealand mammal species considered to be pests or problems. *Reprod Fertil Dev*. 9:27-36.

- Coy P, Cánovas S, Mondéjar I, Saavedra MD, 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, Avilés M (2010).** What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte?. *Biol Rev.* 85:593-605.
- Cui X, Duckworth JA (2005).** Mapping of B cell epitopes on the zona pellucida 2 protein of a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Mol Reprod Dev.* 70:485-493.
- Cui X, Duckworth JA, Molinia FC, Cowan PE (2010a).** Identification and evaluation of an infertility-associated ZP3 epitope from the marsupial brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Vaccine.* 28:1499-1505.
- Cui X, Duckworth JA, Lubitz P, Molinia FC, Haller C, Lubitz W, Cowan PE (2010b).** Humoral immune responses in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) induced by bacterial ghosts expressing possum zona pellucida 3 protein. *Vaccine.* 28:4268-4274.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012).** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772.
- Dean J (2004).** Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *BioEssays.* 26:29-38.
- Dean MD, Nachman MW (2009).** Faster fertilization rate in conspecific versus heterospecific mating in house mice. *Evolution.* 63:20-28
- Dong KW, Chi TF, Juan YW, Chen CW, Lin Z, Xiang XQ, Mahony M, Gibbons WE, Oehninger S (2001).** Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells. *Am J Obstet Gynecol.* 184:835-844.
- Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, Kopf GS, Schultz RM (1990).** Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol.* 137:46-55.
- Ducibella T, Kurasawa S, Duffy P, Kopf GS, Schultz RM (1993).** Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation-dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C. *Biol Reprod.* 48:1251-1257.
- Duckert P, Brunak S, Blom N (2004).** Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel.* 17:107-112.
- Duckworth JA, Harris MS, Mate KE, McCartney CA, Buist JA, Scobie S, Jones D, Jones S (1999).** Development of brushtail possum immunocontraception: targeting sperm and egg antigens. *Advances in the biological control of possums. The Royal Society of New Zealand Miscellaneous Series* 56: 72-76.

Duckworth JA, Mate KE, Scobie S, Jones D, Buist J, Molinia FC, Glazier A, Cui X, Cowan PE, Walmsley A, Kirk D, Lubitz W, Haller C (2001). Evaluating zona pellucida antigens and delivery systems for possum fertility control in New Zealand-Progress and future directions. In book: Biological Management of Possums, Publisher: Ministry of Agriculture and Forestry, Wellington, New Zealand.

Duckworth JA, Wilson K, Cui X, Molinia FC, Cowan PE (2007). Immunogenicity and contraceptive potential of three infertility-relevant zona pellucida 2 epitopes in the marsupial brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction*. 133:177-186.

Duckworth JA, Cui X, Scobie S, Arrow J, Cowan PE (2008). Development of a contraceptive vaccine for the marsupial brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): lack of effects in mice and chickens immunized with recombinant possum ZP3 protein and a possum ZP3 antifertility epitope. *Wildlife Research*. 35:563-572.

Eade JA, Roberston ID, James CM (2009). Contraceptive potential of porcine and feline zona pellucida A, B and C subunits in domestic cats. *Reproduction*. 137:913-922.

Easton RL, Patankar MS, Lattanzio FA, Leaven TH, Morris HR, Clark GF, Dell A (2000). Structural analysis of murine zona pellucida glycans evidence for the expression of core 2-type O-glycans and the Sda antigen. *J Biol Chem*. 275:7731-7742.

Eberspaecher U, Becker A, Bringmann P, van der Merwe L, Donner P (2001). Immunohistochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries. *Cell Tissue Res*. 303:277-287.

Epifano O, Liang LF, Familiari M, Moos MC Jr, Dean J (1995). Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development*. 121:1947-1956.

Evsikov AV, Graber JH, Brockman JM, Hampl A, Holbrook AE, Singh P, Eppig JJ, Solter D, Knowles BB (2006). Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes Dev*. 20: 2713-2727.

Familiari G, Nottola SA, Micara G, Aragona C, Motta PM (1988). Is the sperm-binding capability of the zona pellucida linked to its surface structure? A scanning electronmicroscopic study of human in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 5:134-143.

Familiari G, Nottola SA, Macchiarelli G, Micara G, Aragona C, Motta PM (1992). Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide. *Mol Reprod Dev*. 32:51-61.

Familiari G, Relucenti M, Heyn R, Micara G, Correr S (2006). Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microsc Res Tech*. 69:415-426.

Familiari G, Heyn R, Relucenti M, Sathananthan H (2008). Structural changes of the zona pellucida during fertilization and embryo development. *Front Biosci*. 13:6730-6751.

- Fazeli A, Hage WJ, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B (1997).** Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida *in vitro*. Biol Reprod. 56:430-438.
- Florman HM, Storey BT (1982).** Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. Dev Biol. 91:121-130.
- Florman HM, Ducibella T (2006).** Fertilization in Mammals. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Chapter 2. Elsevier.
- Frankenberg S, Selwood L (1998).** An ultrastructural study of the role of an extracellular matrix during normal cleavage in a marsupial, the brushtail possum. Mol Reprod Dev. 50:420-433.
- Frankenberg S, Shaw G, Freyer C, Pask AJ, Renfree MB (2013).** Early cell lineage specification in a marsupial: a case for diverse mechanisms among mammals. Development. 140:965-975.
- Galindo BE, Vacquier VD, Swanson WJ (2003).** Positive selection in the egg receptor for abalone sperm lysin. Proc Natl Acad Sci USA. 100:4639-4643.
- Ganguly A, Sharma RK, Gupta SK (2008).** Bonnet monkey (*Macaca radiata*) ovaries, like human oocytes, express four zona pellucida glycoproteins. Mol Reprod Dev. 75:156-166.
- Ganguly A, Bukovsky A, Sharma RK, Bansal P, Bhandari B, Gupta SK (2010a).** In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. Hum Reprod. 25:1643-1656.
- Ganguly A, Bansal P, Gupta T, Gupta SK (2010b).** "ZP domain" of human zona pellucida glycoprotein-1 binds to human spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. Reprod Biol Endocrinol. 8:110-123
- Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M (2008).** Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis. Hum Reprod. 23:394-402.
- Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P (2008).** Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. Biol Reprod. 78:796-806.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010).** SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol. 27:221-224.
- Greve JM, Wassarman PM (1985).** Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. J Mol Biol 181:253-264
- Grootenhuis AJ, Philipson HL, de Breet-Grijsbach JT, van Duin M (1996).** Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. J Reprod Fertil. 50:43-54.

Guindon S, Gascuel O (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol.* 52:696-704.

Gupta R, Brunak S (2002). Prediction of glycosilation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput.* 310-322.

Gupta SK, Bhandari B (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J Androl.* 13:97-105.

Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res.* 349:665-678.

Haddad A, Nagai ME (1977). Radioautographic study of glycoprotein biosynthesis and renewal in the ovarian follicles of mice and the origin of the zona pellucida. *Cell Tissue Res.* 177:347-369.

Haerty W, Jagadeeshan S, Kulathinal RJ, Wong A, Ravi Ram K, Sirot LK, Levesque L, Artieri CG, Wolfner MF, Civetta A, Singh RS (2007). Evolution in the fast lane: rapidly evolving sex-related genes in *Drosophila*. *Genetics.* 177:1321-1335.

Haines BP, Rathjen PD, Hope RM, Whyatt LM, Holland MK, Breed WG (1999). Isolation and characterisation of a cDNA encoding a zona pellucida protein (ZPB) from the marsupial *Trichosurus vulpecula* (Brushtail possum). *Mol Reprod Dev.* 52:174-182.

Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S (1998). NetOglyc: Prediction of mucin type O-glycosilation sites based on sequence context and surface accesibility. *Glycoconj J.* 15: 115-130.

Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG (1994). Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq.* 4:361-393.

Hedrick JL, Wardrip NJ (1987). On the macromolecular of the zona pellucida from porcine oocytes. *Dev Biol.* 121:478-488.

Hellberg ME, Vacquier VD (1999). Rapid evolution of fertilization selectivity and Lysin cDNA sequences in Teguline gastropods. *Mol Biol Evol.* 16-839-848.

Hyllner SJ, Westerlund L, Olsson PE, Schopen A (2001). Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins. *Biol Reprod.* 64:805-11.

Hoodbhoy T, Joshi S, Boja ES, Williams SA, Stanley P, Dean J (2005). Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J Biol Chem.* 280:12721-12731.

Hoodbhoy T, Avilés M, Baibakov B, Epifano O, Jiménez-Movilla M, Gauthier L, Dean J (2006). ZP2 and ZP3 traffic independently within oocytes prior to assembly into the extracellular zona pellucida. *Mol Cell Biol.* 26:7991-7998.

Huang HL, Lv C, Zhao YC, Li W, He XM, Li P, Sha AG, Tian X, Papasian CJ, Deng HW, Lu GX, Xiao HM (2014). Mutant ZP1 in familial infertility. *N Engl J Med.* 370:1220-1226.

Hughes DC, Barratt CL (1999). Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida. *Biochim. Biophys Acta.* 1447:303-6.

Hughes RL, Shorey CD (1973). Observations on the permeability properties of the egg membranes of the marsupial, *Trichosurus vulpecula*. *J Reprod Fertil.* 32:25-32.

Hyllner SJ, Haux C (1992). Immunochemical detection of the major vitelline envelope proteins in the plasma and oocytes of the maturing female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J Endocrinol.* 135:303-9.

Hyllner SJ, Westerlund L, Olsson PE, Schopen A (2001). Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins. *Biol Reprod.* 64:805-11.

Izquierdo-Rico MJ, Jimenez-Movilla M, Llop E, Pérez-Oliva AB, Ballesta J, Gutierrez-Gallego R, Jimenez-Cervantes C, Avilés M (2009a). Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins. *J Proteome Res.* 8:926-41.

Izquierdo-Rico MJ, Laudet V, Ballesta J, Avilés M, Chevret P (2009b). Molecular evidences of the presence of zp4 in the subfamily Murinae. XIII Congreso de la SEBC.

Izquierdo-Rico MJ, Gimeno L, Jiménez-Cervantes C, Ballesta J, Avilés M (2011). Biosynthesis of hamster zona pellucida is restricted to the oocyte. *Theriogenology.* 75:463-72.

Jackson RJ, Beaton S, Dall DJ (2007). Stoat zona pellucida genes with potential for immunocontraceptive biocontrol in New Zealand. DOC Research & Development Series 275.

Jacobs L, Flynn L, Downs W (1989). Neogene rodents of southern Asia. In: Black, C.C., Dawson, M.R. (Eds.), *Neogene Rodents of Southern Asia*. Nat. Hist. Mus. Sci., Los Angeles, pp.157-177.

Jacobs L, Flynn L, Downs W, Barry J (1990). The Siwalik muroid record. In: Lindsay, E.H., Fahlbush, V., Mein, P. (Eds.), *Quo vadis, Antemus?* The Siwalik muroid record. *Quo vadis, Antemus?*. Plenum Press, New York, pp. 573-586.

Jaeger J, Tong H, Denys C: Age de la divergence Mus-Rattus: comparaison des données paléontologiques et moléculaires (1986). *C R Acad Sci Paris, SerII*, 302:917-922.

Jansa SA, Lundrigan BL, Tucker PK (2003). Tests for positive selection on immune and reproductive genes in closely related species of the murine genus *Mus*. *J Mol Evol.* 56:294-307.

Jewgenow K, Fickel J (1999). Sequential expression of zona pellucida protein genes during the oogenesis of domestic cats. *Biol Reprod.* 60:522-526.

Jewgenow K, Rudolph M (2001). Timing and location of zona pellucida synthesis during oogenesis in domestic cats: an ultrastructural immunohistological investigation. *J Reprod Fertil.* 57:23-29.

Jiménez-Movilla M, Martínez-Alonso E, Castells MT, Izquierdo-Rico MJ, Saavedra MD, Gutiérrez-Gallego R, Fayrer-Hosken R, Ballesta J, Avilés M (2009). Cytochemical and biochemical evidences for a complex tridimensional structure of the hamster zona pellucida. *Histol Histopathol.* 24:599-609.

Jiménez-Movilla M, Dean J (2011). ZP2 and ZP3 cytoplasmic tails prevent premature interactions and ensure incorporation into the zona pellucida. *J Cell Sci.* 124:940-950.

José O, Hernández-Hernández O, Chirinos M, González-González ME, Larrea F, Almanza A, Felix R, Darszon A, Treviño CL (2010). Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 395:530-534.

Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM (2002). The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat Cell Biol.* 4:457-461.

Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher ES, Wassarman PM (2004). A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:5922-5927.

Jovine L, Janssen WG, Litscher ES, Wassarman PM (2006). The PLAC1-homology region of the ZP domain is sufficient for protein polymerisation. *BMC Biochem.* 7:11-19

Kanai S, Kitayama T, Yonezawa N, Sawano Y, Tanokura M, Nakano M (2008). Disulfide linkage patterns of pig zona pellucida glycoproteins ZP3 and ZP4. *Mol Reprod Dev.* 75:847-856.

Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T (2014). Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep.* 4:6382.

Katsumata T, Noguchi S, Yonezawa N, Tanokura M, Nakano M (1996). Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Eur J Biochem.* 240:448-453.

Kiefer SM, Saling P (2002). Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biol Reprod.* 66:407-414.

- Kinloch RA, Sakai Y, Wassarman PM (1995).** Mapping the mouse ZP3 combining site for sperm by exon swapping and site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:263-267.
- Kitchener AL, Edds LM, Molinia FC, Kay DJ (2002).** Porcine zonae pellucidae immunization of tammar wallabies (*Macropus eugenii*): fertility and immune responses. *Reprod Fertil Dev*. 14:215-223.
- Kitchener AL, Harman A, Kay DJ, McCartney CA, Mate KE, Rodger JC (2009a).** Immunocontraception of Eastern Grey kangaroos (*Macropus giganteus*) with recombinant brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) ZP3 protein. *J Reprod Immunol*. 79:156-162.
- Kitchener AL, Kay DJ, Walters B, Menkhorst P, McCartney CA, Buist JA, Mate KE, Rodger JC (2009b).** The immune response and fertility of koalas (*Phascolarctos cinereus*) immunised with porcine zonae pellucidae or recombinant brushtail possum ZP3 protein. *J Reprod Immunol*. 82:40-47.
- Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Totzauer I, Amselgruber W, Plendl J (1996).** Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization. *Histochem J*. 28:441-447.
- Kölle S, Sinowatz F, Boie G, Palma G (1998).** Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Mol Reprod Dev*. 49:435-443.
- Kölle S, Dubois CS, Caillaud M, Lahuec C, Sinowatz F, Goudet G (2007).** Equine zona protein synthesis and ZP structure during folliculogenesis, oocyte maturation, and embryogenesis. *Mol Reprod Dev*. 74:851-859.
- Konrad L, Kuhnert S, Nayudu PL, Einspanier R, Hinsch KD, Hinsch E (2012).** Quantification of ZP1, ZP2 and ZP3 mRNA of marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocytes from periantral and antral follicles. *Andrologia*. 1:349-353.
- Koyama K, Hasegawa A., Inoue M, Taya H, Tsubamoto H, Yamasaki N (1996).** Studies on the epitope of pig zona pellucida recognised by a fertilization-blocking monoclonal antibody. *J. Reprod. Fertil. Suppl*. 50: 135-142.
- Kozak M (1991).** Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*. 266:19867-19870.
- Kress A, Selwood L (2003).** Conceptus polarity and cell-zona adhesion during early cleavage (fertilized tubal egg to 8-cell stage) in the marsupial *Sminthopsis macroura*. *Cells Tissues Organs*. 175:9-24.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 305:567-580.

Lecompte E, Denys C, Granjon L (2005). Confrontation of morphological and molecular data: the Praomys group (Rodentia, Murinae) as a case of adaptive convergences and morphological stasis. *Mol Phylogenet Evol.* 37: 899-919.

Lecompte E, Aplin K, Denys C, Catzefflis F, Chades M, Chevret P (2008). Phylogeny and biogeography of African Murinae based on mitochondrial and nuclear gene sequences, with a new tribal classification of the subfamily. *BMC evolutionary biology.* 8:199.

Lee VH, Schwoebel E, Prasad S, Cheung P, Timmons TH, Cook R, Dunbar BS (1993). Identification and structural characterization of the 75-kDa rabbit zona pellucida protein. *J Biol Chem.* 268:12412-12417.

Lee VH (2000). Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. *Biol Reprod.* 63:401-408.

Lefièvre L, Barratt CLR, Harper CV, Conner SJ, Flesch FM, Deeks E, Moseley FLC, Pixton KL, Brewis IA and Publicover SJ (2003). Physiological and proteomic approaches to study pre fertilisation events in the human. *Reprod Bio Med Online.* 7:419-427.

Lefièvre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod.*19:580-586.

Levy JK, Mansour M, Crawford PC, Pohajdak B, Brown RG (2005). Survey of zona pellucida antigens for immunocontraception of cats. *Theriogenology.* 63:1334-1341.

Li WH, Gojobori T, Nei M (1981). Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature.* 292:237-239.

Litscher ES, Wassarman PM (2007). Egg extracellular coat proteins: From fish to mammals. *Histol Histopathol.* 22:337-347.

Liu C, Litscher ES, Mortillo S, Sakai Y, Kinloch RA, Stewart CL, Wassarman PM (1996). Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc Nati Acad Sci USA.* 93:5431-5436.

Louros NN, Iconomidou VA, Giannelou P, Hamodrakas SJ (2013). Structural analysis of peptide-analogues of human Zona Pellucida ZP1 protein with amyloidogenic properties: insights into mammalian Zona Pellucida formation. *PLoS One.* 8:e73258.

Luo ZX, Yuan CX, Meng QJ, Ji Q (2011). A Jurassic eutherian mammal and divergence of marsupials and placentals. *Nature.* 476:442-445.

Makalowski W, Boguski MS (1998). Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: an analysis of 2820 orthologous rodent and human sequences. *Proc Nati Acad Sci USA.* 95:9407-9412.

- Maresh GA, Timmons TM, Dunbar BS (1990).** Effects of extracellular matrix on the expression of specific ovarian proteins. *Biol Reprod.* 43:965-976.
- Martín-Coello J, Benavent-Corai J, Roldan ER, Gomendio M (2009).** Sperm competition promotes asymmetries in reproductive barriers between closely related species. *Evolution.* 63:613-623.
- Martínez ML, Fontenot GK, Harris JD (1996).** The expression and localization of zona pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil Suppl.* 50:35-41.
- Mate KE (1998).** Timing of zona pellucida formation in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) and brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Anim Reprod Sci.* 53:237-252.
- Mate KE, McCartney CA (1998).** Sequence and analysis of zona pellucida 2 cDNA (ZP2) from a marsupial, the Brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*. *Mol Reprod Dev.* 51:322-329
- Mate KE, Buist JM and Duckworth JA (2003).** Expression in *Escherichia coli* and immunological characterization of three zona pellucida proteins (ZP1, ZP2, and ZP3) from a marsupial, the Brushtail Possum (*Trichosurus vulpecula*). *Mol Reprod Dev.* 64:136-143.
- McCartney CA, Mate KE (1999).** Cloning and characterization of a zona pellucida 3 cDNA from a marsupial, the brushtail possum *Trichosurus vulpecula*. *Zygote.* 7:1-9.
- McCartney CA, Harris MS, Rodger JC, Mate KE (2007).** Towards a ZP-based contraceptive for marsupials: comparative analysis and developmental expression of marsupial ZP genes. *Mol Reprod Dev.* 74:1581-1589.
- McLennan JA, Potter MA, Robertson HA, Wake GC, Colbourne R, Dew L, Joyce L, McCann AJ, Miles J, Miller PJ, Reid J (1996).** Role of predation in the decline of the kiwi, *Apteryx spp.*, in New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology* 20: 27-35.
- Menkhorst E, Nation A, Cui S, Selwood L (2009).** Evolution of the shell coat and yolk in amniotes: a marsupial perspective. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 312:625-38.
- Meredith RW, Westerman M, Case JA, Springer MS (2008).** A Phylogeny and timescale for marsupial evolution based on sequences for five nuclear genes. *J Mamm Evol.* 15:1-36.
- Meslin C, Mugnier S, Callebaut I, Laurin M, Pascal G, Poupon A, Goudet G, Monget P (2012).** Evolution of genes involved in gamete interaction: evidence for positive selection, duplications and losses in vertebrates. *PLoS One.* 7: e44548. doi: 10.1371/journal.pone.0044548.
- Mitchell KJ, Pratt RC, Watson LN, Gibb GC, Llamas B, Kasper M, Edson J, Hopwood B, Male D, Armstrong KN, Meyer M, Hofreiter M, Austin J, Donnellan SC, Lee MS, Phillips MJ, Cooper A (2014).** Molecular phylogeny, biogeography, and habitat preference evolution of marsupials. *Mol Biol Evol.* 31:2322-2330.

Modlinsky J (1970). The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs *in vivo*. *J Embryol Exp Morphol.* 23:539-547.

Montague TL (2000). The brushtail possum: Biology, impacts and management of an introduced marsupial. Manaaki Whenua Press: Lincoln, New Zealand.

Monné M, Jovine L (2011). A structural view of egg coat architecture and function in fertilization. *Biol Reprod.* 85:661-669.

Moore HDM, Taggart DA (1993). In vitro fertilization and embryo culture in the grey short tailed opossum *Monodelphis domestica*. *J Reprod Fertil.* 98:267-274.

Mugnier S, Dell'Aquila ME, Pelaez J, Douet C, Ambruosi B, De Santis T, Lacalandra GM, Lebos C, Sizaret PY, Delaleu B, Monget P, Mermillod P, Magistrini M, Meyers SA, Goudet G (2009). New Insights into the Mechanisms of Fertilization: Comparison of the Fertilization Steps, Composition, and Structure of the Zona Pellucida Between Horses and Pigs. *Biol Reprod.* 81:856-870.

Musser GG, Carleton MD (2005). Superfamily Muroidea. In: Wilson DE, Reeder DM, éditeurs. *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference.* Baltimore: Johns Hopkins University. 894-1531

Nakano M, Yonezawa N (2001). Localization of sperm ligand carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoproteins. *Cells Tissues Organs.* 168:65-75.

Nilsson MA, Churakov G, Sommer M, Van Tran N, Zemmann A, Brosius J, Schmitz J (2010). Tracking Marsupial Evolution Using Archaic Genomic Retroposon Insertions. *PLoS Biol.* 8:1000436.

Noguchi S, Nakano M. (1992). Structure of the acidic N-linked carbohydrate chains of the 55-kDa glycoprotein family (PZP3) from porcine zona pellucida. *Eur. J. Biochem.* 209:883-894.

Noguchi S, Nakano M (1993). Structural characterization of the N-linked carbohydrate chains from mouse zona pellucida glycoproteins ZP2 and ZP3. *Biochim Biophys Acta.* 1158:217-226.

Noguchi S, Yonezawa N, Katsumata T, Hashizume K, Kuwayama M, Hamano S, Watanabe S, Nakano M (1994). Characterization of the zona pellucida glycoproteins from bovine ovarian and fertilized eggs. *Biochim Biophys Acta.* 1201:7-14.

Nohara M, Hirayama T, Ogura A, Hiroi M, Araki Y (1998). Partial characterization of the gametes and development of a successful *in vitro* fertilization procedure in the *Mastomys (Praomys coucha)*: a new species for reproductive biology research. *Biol Reprod.* 58:226-233.

Nyakatura K, Bininda-Emonds ORP (2012). Updating the evolutionary history of Carnivora (Mammalia): a new species-level supertree complete with divergence time estimates. *BMC Biology.* 10:12-42.

- Pagès M, Chevret P, Gros-Balthazard M, Hughes S, Alcover JA, Hutterer R, Rando JC, Michaux J, Hänni C (2012).** Paleogenetic Analyses Reveal Unsuspected Phylogenetic Affinities between Mice and the Extinct *Malpaisomys insularis*, an Endemic Rodent of the Canaries. *PLoS ONE*. 7(2):e31123.
- Parillo F, Stradaioli G, Dall'Aglio C, Verini-Supplizi A (1996).** Characterization of the complex carbohydrates in the zona pellucida of mammalian oocytes using lectin histochemistry. *Vet Res Commun*. 20:225-236.
- Pedersen AG, Nielsen H (1997).** Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 5:226-233.
- Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR (2004).** Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertil Steril*. 81 Suppl 1:850-856.
- Phillips DM, Shalgi RM (1980).** Surface properties of the zona pellucida. *J Exp Zool*. 213:1-8.
- Price CS, Kim CH, Gronlund CJ, Coyne JA (2001).** Cryptic reproductive isolation in the *Drosophila simulans* species complex. *Evolution*. 55:81-92.
- Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K (2007).** Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reprod Biomed Online*. 14:166-174.
- Rankin T, Familiari M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J (1996).** Mice homozygous for an insertional mutation in the *Zp3* gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development*. 122:2903-2910.
- Rankin T, Talbot P, Lee E, Dean J (1999).** Abnormal zonae pellucidae in mice lacking *ZP1* result in early embryonic loss. *Development*. 126:3847-3855.
- Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J (2001).** Defective zonae pellucidae in *Zp2*-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*. 128:1119-1126.
- Reubel GH, Beaton S, Venables D, Pekin J, Wright J, French N, Hardy CM (2005).** Experimental inoculation of European red foxes with recombinant vaccinia virus expressing zona pellucida C proteins. *Vaccine*. 23:4417-4426.
- Rodger JC, Bedford JM (1982).** Separation of sperm pairs and sperm-egg interactions in the opossum *Didelphis virginiana*. *J Reprod Fertil*. 64:171-179.
- Roldan ER, Vitullo AD, Merani MS, Von Lawzewitsch I (1985).** Cross fertilization in vivo and in vitro between three species of vesper mice, *Calomys* (Rodentia, Cricetidae). *J Exp Zool*. 233:433-442.

Roldan ER, Yanagimachi R (1989). Cross-fertilization between Syrian and Chinese hamsters. *J Exp Zool.* 250:321-328.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 61:539-542.

Rosiere TK, Wassarman PM (1992). Identification of a region of mouse zona pellucida glycoprotein mZP3 that possesses sperm receptor activity. *Dev Biol.* 154:309-317.

Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-425.

Sasanami T, Pan J, Doi Y, Hisada M, Kohsaka T, Toriyama M (2002). Secretion of egg envelope protein ZPC after C-terminal proteolytic processing in quail granulosa cells. *Eur J Biochem.* 269:2223-2231.

Sasanami T, Pan J, Mori M (2003). Expression of perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in the liver of Japanese quail (*Coturnix japonica*) after in vivo treatment with diethylstilbestrol. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 84:109-116.

Schwoebel E, Prasad S, Timmons TM, Cook R, Kimura H, Niu EM, Cheung P, Skinner S, Avery SE, Wilkins B, Dunbar BS (1991). Isolation and characterization of a full-length cDNA encoding the 55-kDa rabbit zona pellucida protein. *J Biol Chem.* 266:7214-7219.

Scobie GA, Kerr LE, MacDuff P, Aitken RJ (1999). Cloning, sequencing and site of origin of the rat sperm receptor protein, ZP3. *Zygote.* 7:27-35.

Selwood L (1994). Development of early cell lineages in marsupial embryos: an overview. *Reprod Fertil Dev.* 6:507-527.

Selwood L, Robinson ES, Pedersen RA, Vandenberg JL (1997). Development in vitro of Marsupials: a comparative review of species and a timetable of cleavage and early blastocyst stages of development in *Monodelphis domestica*. *Int J Dev Biol.* 41:397-410.

Selwood L (2000). Marsupial egg and embryo coats. *Cell Tissues Organs.* 166:208-219.

Serizawa M, Kinoshita M, Rodler D, Tsukada A, Ono H, Yoshimura T, Kansaku N, Sasanami T (2011). Oocytic expression of zona pellucida protein ZP4 in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Anim Sci J.* 82:227-35.

Shao Y, Guan Y, Wang L, Qiu Z, Liu M, Chen Y, Wu L, Li Y, Ma X, Liu M, Li D (2014). CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat Protoc.* 9:2493-512.

Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR (2005). High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. *Hum Reprod.* 20:1596-1606.

- Sievers F, Higgins DG (2014).** Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol Biol.* 1079:105-116.
- Singh RS, Kulathinal RJ (2000).** Sex gene pool evolution and speciation: a new paradigm. *Genes Genet Syst.* 75:119-130
- Sinowatz F, Amselgruber W, Töpfer-Petersen E, Totzauer I, Calvete J, Plendl J (1995).** Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anat Embryol.* 191:41-46.
- Sinowatz F, Kölle S, Töpfer-Petersen E (2001).** Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs.* 168:24-35.
- Sivapurapu N, Upadhyay A, Hasegawa A, Koyama K & Gupta SK (2002).** Native zona pellucida reactivity and in-vitro effect on human sperm-egg binding with antisera against bonnet monkey ZP1 and ZP3 synthetic peptides. *J Reprod Immunol.* 56:77-91.
- Sivapurapu N, Hasegawa A, Gahlay GK, Koyama K & Gupta SK (2005).** Efficacy of antibodies against a chimeric synthetic peptide encompassing epitopes of bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida-1 and zona pellucida-3 glycoproteins to inhibit in vitro human sperm-egg binding. *Mol Reprod Dev.* 70:247-254.
- Skutelsky E, Ranen E, Shalgi R (1994).** Variations in the distribution of sugar residues in the zona pellucida as possible species-specific determinants of mammalian oocytes. *J Reprod Fertil.* 100:35-41.
- Spargo SC, Hope RM (2003).** Evolution and nomenclature of the zona pellucid gene family. *Biol Reprod.* 68:358-362.
- Stetson I, Izquierdo-Rico MJ, Moros C, Chevret P, Lorenzo PL, Ballesta J, Rebollar PG, Gutiérrez-Gallego R and Avilés M (2012).** Rabbit zona pellucida composition: A molecular, proteomic and phylogenetic approach. *J Proteomics.* 75:5920-5935.
- Stetson I, Avilés M, Moros C, García-Vázquez FA, Ballesta J, Izquierdo-Rico MJ (2013).** Proteomic analysis of cat zona pellucida. 29th Annual Meeting A.E.T.E.
- Swann CA, Cooper SJ, Breed WG (2007).** Molecular evolution of the carboxy terminal region of the zona pellucida 3 glycoprotein in murine rodents. *Reproduction.* 133:697-708.
- Swanson WJ, Yang Z, Wolfner MF, Aquadro CF (2001a).** Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:2509-2514.
- Swanson WJ, Clark AG, Waldrip-Dail HM, Wolfner MF, Aquadro CF (2001b).** Evolutionary EST analysis identifies rapidly evolving male reproductive proteins in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7375-7379.
- Swanson WJ, Vacquier VD (2002).** The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet.* 3:137-144.

Szalay FS (1982). A new appraisal of marsupial phylogeny and classification. In: Archer M, ed. Carnivorous marsupials. Sydney: Royal Zoological Society of New South Wales. pp 621-640.

Taggart DA, O'Brien HP, Moore HD (1993). Ultrastructural characteristics of in vivo and in vitro fertilization in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Anat Rec.* 237:21-37.

Takasaki S, Mori E, Mori T (1999). Structures of sugar chains included in mammalian zona pellucida glycoproteins of their potential roles in sperm-egg interaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1473:206-215.

Talbot P, Dicarlantonio G (1984). Ultrastructure of opossum oocyte investing coats and their sensitivity to trypsin and hyaluronidase. *Dev Biol.* 103:159-167.

Tanihara F, Nakai M, Kaneko H, Noguchi J, Otoi T, Kikuchi K (2013). Evaluation of zona pellucida function for sperm penetration during in vitro fertilization in pigs. *J Reprod Dev.* 59:385-392.

Tesarík J, Pilka L, Trávník P (1988). Zona pellucida resistance to sperm penetration before the completion of human oocyte maturation. *J Reprod Fertil.* 83:487-495.

Tian J, Gong H, Thomsen GH, Lennarz WJ (1997). Gamete interactions in *Xenopus laevis*: identification of sperm binding glycoproteins in the egg vitelline envelope. *J Cell Biol.* 136:1099-108.

Tian S, Huang Q, Fang Y, Wu J (2011). FurinDB: a database of 20-residue furin cleavage site motifs, substrates and their associated drugs. *Int J Mol Sci.* 12:1060-1065.

Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsoлова M (2008). Glycobiology of fertilization in the pig. *Int J Dev Biol.* 52:717-736.

Totzauer I, Kölle S, Sinowatz F, Plendl J, Amselgruber W, Töpfer-Petersen E (1998). Localization of the zona glycoproteins ZPB (ZP3 alpha) and ZPC (ZP3 beta) in the bovine ovary during pre- and postnatal development. *Ann Anat.* 180:37-43.

Tsubamoto H, Hasegawa A, Nakata Y, Naito S, Yamasaki N, Koyama K (1999). Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod.* 61:1649-1654.

Turner LM, Hoekstra HE (2006). Adaptive evolution of fertilization proteins within a genus: variation in ZP2 and ZP3 in deer mice (*Peromyscus*). *Mol Biol Evol.* 23:1656-1669.

Turner LM, Hoekstra HE (2008). Causes and consequences of the evolution of reproductive proteins. *Int J Dev Biol.* 52:769-780.

Vaquier VD (1998). Evolution of gamete recognition proteins. *Science* 281:1995-1998.

- Van Duin M, Polman JE, De Breet IT, Van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, Brindle J, Aitken RJ (1994).** Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod.* 51:607-617.
- Vicens A, Lüke L, Roldan ER (2014).** Proteins involved in motility and sperm-egg interaction evolve more rapidly in mouse spermatozoa. *PLoS One.* 9:e91302.
- Voyle RB, Haines BP, Loffler KA, Hope RM, Rathjen PD, Breed WG (1999).** Isolation and characterisation of zona pellucida A (ZPA) cDNAs from two species of marsupial: regulated oocyte-specific expression of ZPA transcripts. *Zygote.* 7:239-248.
- Walcher P, Cui X, Arrow JA, Scobie S, Molinia FC, Cowan PE, Lubitz W, Duckworth JA (2008).** Bacterial ghosts as a delivery system for zona pellucida-2 fertility control vaccines for brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Vaccine.* 26:6832-6838.
- Warren WC, Hillier LW, Marshall Graves JA, Birney E, Ponting CP, et al., (2008).** Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature.* 453:175-183.
- Wassarman PM (1988).** Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem.* 57:415-442.
- Wassarman PM (1990).** Profile of a mammalian sperm receptor. *Develop.* 108:1-17.
- Wassarman PM (2008).** Zona pellucida glycoproteins. *J Biol Chem.* 283:24285-24289.
- Wassarman PM, Litscher ES (2009).** The multifunctional zona pellucida and mammalian fertilization. *J Reprod Immunol.* 83:45-49.
- Wassarman PM, Litscher ES (2012).** Influence of the zona pellucida of the mouse egg on folliculogenesis and fertility. *Int J Dev Biol.* 56:833-839.
- Wassarman PM, Litscher ES (2013).** Biogenesis of the mouse egg's extracellular coat, the zona pellucida. *Curr Top Dev Biol.* 102:243-266.
- Wayne RK, Geffen E, Girman DJ, Koepfli KP, Lau LM, Marshall CR (1997).** Molecular systematics of the *Canidae*. *Syst. Biol.* 46:622-653.
- Weihong J (2009).** A review of the potential of fertility control to manage de brushtail possums in New Zealand. *Human-Wildlife Conflicts.* 3:20-29.
- Wienberg J (2004).** The evolution of eutherian chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 14:657-666.
- Wilson PR, Karl BJ, Toft RJ, Beggs JR, Taylor RH (1998).** The role of introduced predators and competitors in the decline of kaka (*Nestor meridionalis*) populations in New Zealand. *Biological Conservation* 83: 175-185.

Wilson DE, Reeder DM (2005). Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Baltimore (MD): Auscipub Pty Ltd.

Wozencraft WC (1993). Order Carnivora. En Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 2nd edition. Washington: Smithsonian Institution Press. 279-348.

Xie Y, Yu Y, Nie C, Cao Z (2010). Mouse granulosa cells contribute more to the mRNA synthesis of mZP2 than oocytes does. *Cell Biochem Funct.* 28:661-667.

Yang F, O'Brien PC, Milne BS, Graphodatsky AS, Solanky N, Trifonov V, Rens W, Sargan D, Ferguson-Smith MA (1999). A complete comparative chromosome map for the dog, red fox, and human and its integration with canine genetic maps. *Genomics* 62:189-202.

Yanagimachi R (1994). Mammalian fertilization. En physiology of reproduction, Knobil y Neil J (eds). 189-317.

Yang Z, Bielawski JP (2000). Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol Evol.* 15:496-503.

Yauger B, Boggs NA, Dean J (2011). Human ZP4 is not sufficient for taxon-specific sperm recognition of the zona pellucida in transgenic mice. *Reproduction.* 141:313-319.

Yonezawa N, Mitsui S, Kudo K, Nakano M (1997). Identification of an N-glycosylated region of pig zona pellucida glycoprotein ZPB that is involved in sperm binding. *Eur J Biochem.* 248:86-92.

Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, Nakano M (2001). Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem.* 268:3587-3594.

Yonezawa N, Kanai-Kitayama S, Kitayama T, Hamano A, Nakano M (2012). Porcine zona pellucida glycoprotein ZP4 is responsible for the sperm-binding activity of the ZP3/ZP4 complex. *Zygote.* 20:389-397.

Yurewicz EC, Sacco AG, Gupta SK, Xu N, Gage DA (1998). Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J Biol Chem.* 273:7488-7494.

Zhang G, Cowled C, Shi Z, Huang Z, Bishop-Lilly KA, Fang X, Wynne JW, Xiong Z, Baker ML, Zhao W, Tachedjian M, Zhu Y, Zhou P, Jiang X, Ng J, Yang L, Wu L, Xiao J, Feng Y, Chen Y, Sun X, Zhang Y, Marsh GA, Cramer G, Broder CC, Frey KG, Wang LF, Wang J (2013). Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science.* 339:456-460.

Zhao M, Gold L, Dorward H, Liang LF, Hoodbhoy T, Boja E, Fales HM, Dean J (2003). Mutation of a conserved hydrophobic patch prevents incorporation of ZP3 into the zona pellucida surrounding mouse eggs. *Mol Cell Biol.* 23:8982-8991.