



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Análisis Transcriptómico y Proteómico del Oviducto y  
Útero Bovino en la Fase Periovulatoria**

**D. Omar Salvador Acuña Meléndez  
2015**



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **FACULTAD DE VETERINARIA**

Análisis transcriptómico y proteómico del oviducto y útero bovino en la fase periovulatoria

**Omar Salvador Acuña Meléndez**

2015









UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

Murcia, España 23 de febrero de 2015

**D. Manuel Avilés Sánchez**, Profesor Titular en el departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "*Análisis transcriptómico y proteómico del oviducto y útero bovino en la fase periovulatoria*", realizada por **D. Omar Salvador Acuña Meléndez**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia con Mención Internacional.



Dr. Manuel Avilés Sánchez

**Manuel Avilés Sánchez**  
Facultad de Medicina  
Departamento de Biología Celular e Histología

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia  
T. 868 884385





Eidgenössische Technische Hochschule Zürich  
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

**Animal Physiology**  
**Institute of Agricultural Sciences**

ETH Zurich  
**PD Dr. Stefan Bauersachs**  
Universitaetstrasse 2 / LFW B 58.1  
8092 Zurich, Switzerland  
Phone +41 44 632 26 31  
stefan.bauersachs@usys.ethz.ch  
www.ap.ethz.ch

Prof. Dr. Manuel Avilés Sánchez  
Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina  
Universidad de Murcia, Campus Espinardo  
Murcia, España. CP. 30100

To whom it may concern,

**Priv.-Doz. Dr. Stefan Bauersachs** (Oberassistent) Fisiología Animal, Instituto de Ciencias Agrícolas. ETH Zürich, Suiza, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Análisis transcriptómico y proteómico del oviducto y útero bovino en la fase periovulatoria**", realizada por **D. Omar Salvador Acuña Meléndez**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia con Mención Internacional

**Priv.-Doz. Dr. Stefan Bauersachs** (Oberassistent/Senior Scientist) Animal Physiology, Institute of Agricultural Sciences, ETH Zurich, Switzerland, APPROVES:

The presentation of the doctoral thesis entitled "**Transcriptomic and proteomic analysis of the bovine oviduct and uterus in the periovulatory phase**" by **Omar Acuña Salvador Meléndez**, under my direction and supervision, and presents for obtaining PhD from the University of Murcia with International Mention.

Zurich, March 3, 2015

ETH Zurich  
**Animal Physiology**  
Institute of Agricultural Sciences  
Universitätstrasse 2 / LFW B 58.1  
8092 Zurich, Switzerland







UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

Murcia, España 23 de febrero de 2015

Dña. **Maria Jiménez Movilla**, Profesor Contratado Doctor del departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "*Análisis transcriptómico y proteómico del oviducto y útero bovino en la fase periovulatoria*", realizada por **D. Omar Salvador Acuña Meléndez**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia con Mención Internacional.





Esta Tesis Doctoral ha sido propuesta para Mención de doctorado Internacional en virtud de la siguiente estancia de investigación e informes:

**Estancia de investigación:**

Ludwig Maximilians Universität München, Genzentrum, Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA-Genomics).  
Múnich, Alemania. Dr. Stefan Bauersachs, Priv. Doz. Dr. rer. nat.,  
Dr. habil. vet. med.

Período del 01/05/2013 al 31/07/2013.

**Informes de Tesis:**

Dr. Riccardo Focarelli, Universidad de Siena, Italia

Dra. María Dolores Saavedra Leos, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.





LMU · Genzentrum · Feodor-Lynen-Str. 25 · 81377 München

Prof. Ann Van Soom

Chair, COST Action FA1201

Dr. Stefan Bauersachs  
LAFUGA - Genomics

Telefon +49 (0)89 2180-76701  
Telefax +49 (0)89 2180-76849

bsachs@lmb.uni-muenchen.de

www.lafuga.de

Feodor-Lynen-Str. 25  
81377 München

Ihr Zeichen, Ihre Nachricht vom

Unser Zeichen  
COST FA1201 STSM

Munich, 31.07.2013

Confirmation COST STSM of Omar Salvador Acuña Meléndez

Dear Dr. Van Soom,

Hereby I confirm the COST STSM of Salvador Acuna "Transcriptomics and proteomics of oviduct and uterus in cattle" (Reference: ECOST-STSM-FA1201-010513-028404) in LAFUGA Genomics under my supervision from 01-05-2013 to 31-07-2013. Salvador was highly motivated and worked hard during his stay to prepare and synchronize 6 heifers for the collection of tissue samples, oviduct and uterine fluids, and blood samples at the peri-ovulation phase. He isolated RNA from selected tissue samples and successfully performed an analysis of 16 samples with Agilent bovine custom-designed microarrays (8x60k array format). In addition, he learned the isolation of total RNA from tissues using endometrial tissue samples of different origin.

Salvador acquired and trained different skills and techniques during his stay at LAFUGA Genomics, e.g., genomic PCR, DNA sequencing, isolation and analysis of total RNA, and performing Agilent microarrays, which will be valuable for the successful conduction of his PhD work. The analysis of the gene and protein expression data obtained during his STSM will be continued in a further collaboration between the University of Murcia and ETH Zurich, where Dr. Bauersachs is going to move in September 2013.

Por la presente confirmo la estancia científica de corta duración "Short Term Scientific Mission" (STSM) COST de Salvador Acuña denominada "transcriptómica y proteómica del oviducto y útero en el ganado" (Referencia: ECOST-STSM-FA1201-010513-028404) en el Laboratorio de análisis de genómica funcional "Laboratory for Functional Genome Analysis" (LAFUGA Genómica) bajo mi supervisión del 01/05/2013 al 31/07/2013. Salvador estuvo muy motivado y trabajó duro durante su estancia para preparar y sincronizar 6 novillas para la recogida de muestras de tejidos de oviducto y útero; fluidos y muestras de sangre en la fase peri-ovulación. Se aisló el ARN de muestras de tejidos seleccionados y se realizó con éxito un análisis de 16 muestras de micromatrices Agilent® de diseño personalizado de la especie bovina (formato array 8x60k). Además, aprendió el aislamiento de ARN total de tejidos, utilizando muestras de tejido endometrial de diferentes orígenes. Salvador adquirió y se capacito en diferentes



habilidades y técnicas durante su estancia en LAFUGA Genómica, por ejemplo, genómica peR, secuenciación del ADN, aislamiento y análisis de ARN total, con chips de Agilent®, estas técnicas que serán de gran valor para la conducción exitosa de su trabajo de Tesis Doctoral. El análisis de los datos de expresión de genes y proteínas obtenidas durante su STSM se continuará en una mayor colaboración entre la Universidad de Murcia y la ETH Zurich, donde el Dr. Bauersachs se va a desplazar en septiembre de 2013.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke that curves upwards at the end.







UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240



DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

Dr. Riccardo Focarelli  
Dept. Of Life Sciences  
University of Siena  
Tel. 0039-0577-234409  
E-mail: [riccardo.focarelli@unisi.it](mailto:riccardo.focarelli@unisi.it)

Asunto: informe sobre la Tesis doctoral de D. Omar Salvador Acuña

A quien corresponda,

La Tesis del D. Acuña Meléndez titulado "*Análisis transcriptómico y proteómico del oviducto y útero bovino en la periovulatoria*" es muy interesante e importante para el avance en el campo de la reproducción y para la identificación de proteínas relevantes presentes en los fluidos del tracto reproductivo femenino que contribuirán a la fisiología de espermatozoide durante su trayecto hasta el sitio de la fecundación. Los resultados de esta tesis proporcionan información esencial para el desarrollo futuro nuevos medios de cultivo para mejorar las técnicas de reproducción asistida relacionados con la manipulación de los gametos masculinos.

La introducción y la revisión literaria es completa y actualizada, los métodos utilizados son tecnológicamente avanzados y adecuados, la sección de resultados es clara y la discusión también es muy informativa incluye los diferentes resultados obtenidos recientemente en el campo de la transcriptómica y proteómica en especies similares. Consecuentemente, este estudio ofrece conclusiones pertinentes y razonables. Por todas las razones mencionadas anteriormente, considero que esta Tesis está lista para ser defendida.

Atentamente

Dr. Riccardo Focarelli





**UASLP**  
Universidad Autónoma  
de San Luis Potosí



COORDINACIÓN  
ACADÉMICA  
**REGIÓN  
HUASTECA SUR**

Tamazunchale, san Luis Potosí, México  
04 Febrero 2015

**A quien corresponda**

Informe del trabajo de tesis realizado por el Sr. Osmar Salvador Acuña Meléndez

El trabajo de tesis denominado Análisis transcriptómico y proteómico del oviducto y útero bovino en la fase preovulatoria que el Sr. Osmar Salvador Acuña Meléndez presenta como tesis doctoral, desde mi punto de vista es aceptable para su defensa. Los resultados obtenidos en este trabajo ayudaran de forma importante a dilucidar los complejos procesos biológicos que rodean la fecundación. El hecho de que algunos de los resultados de esta tesis han sido incluidos en publicaciones y presentados en congresos especializados confirma la pertinencia de este trabajo de tesis.

El documento que el Sr. Osmar Salvador Acuña Meléndez, presenta una introducción clara, materiales y métodos descritos de tal forma que cada una de las técnicas puede ser reproducida. A pesar de que la introducción es muy amplia puede ser muy informativo para los estudiantes que inician en al área de reproducción. Las conclusiones son claras y concuerdan con los resultados.

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

Saludos cordiales

**Dra. María Dolores Saavedra Leos**  
Profesar de Tiempo Completo  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina con la financiación de diferentes proyectos de investigación:

AGL2009-12512-C02-02 del MEC

AGL2012-40180-C03-02 del MIMECO

Proyecto de Excelencia de la Fundación Séneca 04542/GERM/06.

Omar Salvador Acuña Meléndez disfrutó de una beca de estudios de Doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (México), registro 213560.

Omar Salvador Acuña Meléndez disfrutó de una beca de estudios de Posgrado en el marco del programa "Doctores Jóvenes" otorgada por la Universidad Autónoma de Sinaloa (México).

Omar Salvador Acuña Meléndez disfrutó de apoyo de movilidad "Short Term Scientific Mission Grants" (STSM). *COST-Epigenetics and Periconception Environment-Periconception environment as an epigenomic lever for optimising food production and health in livestock*. (COST-STSM-ECOST-STSM-FA 1201-010513-028404). Para la obtención de la Mención Internacional en el título de doctor.



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

Artículos:

Mondejar I.; Acuña O. S.; Izquierdo-Rico M. J.; Coy P.; Avilés M., 2012: *The Oviduct: Functional Genomic and Proteomic Approach*. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 22-29.

Comunicaciones a Congresos:

Acuña O. S.; Vilella I.; Canovas S.; Coy P.; Jimenez-Movilla M.; Avilés M., 2014: *Detection of SPAM1 in exosomes isolated from the bovine oviductal fluid*. *Reproduction in Domestic Animals*, 49 97-98.

Acuña O. S.; Jimenez-Movilla M.; Vilella I.; Jara L.; Canovas S.; Coy P.; Avilés M., 2014. *Detection of SPAM1 in the bovine oviductal fluid*. Poster. World Congress of Reproductive Biology (WCRB). Edimburgo, Reino Unido. Septiembre 2014.

Acuña O. S.; Stetson I.; Izquierdo-Rico M. J.; Coy P.; Avilés M., 2011: *Expression of sperm adhesion molecule-1 (SPAM1) in cow and sow oviduct*. *Reproduction in Domestic Animals*, 46 79-79.

Acuña O. S.; Moros C.; Izquierdo-Rico M. J.; Avilés M., 2011. *Expresión de la molécula de adhesión del espermatozoide 1 (SPAM1) en trompa de Falopio de mujer*. Poster. Asociación Española de Biólogos de la Reproducción (ASEBIR), Girona, España, Octubre 2011.





# AGRADECIMIENTOS

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A mi tutor Manuel Avilés Sánchez quiero manifestarle mi gratitud por todo el apoyo recibido para la realización de esta Tesis, por la confianza que depositó en mi, por compartir sus conocimientos, consejos y proyectos, que acrecentaron en mi el interés de continuar una carrera científica. Agradezco muy especialmente el gran apoyo que me brindó fuera del ámbito profesional, que me permitió reconocer en él su gran sentido de solidaridad y calidad humana.

A mi tutor Stefan Bauersachs, agradezco el que me haya permitido asistir a su laboratorio. Le agradezco por participar activamente proporcionando los medios para que este proyecto haya sido posible, agradezco también que haya atendido a todas mis dudas y cuestionamientos con especial profesionalismo y paciencia.

*Mein ganz besonderer Dank gilt bei Herr Dr. Stefan Bauersachs, Ich danke ihn dafür, dass ich in sein Labor zu besuchen. Ich schätze Ihre aktive Teilnahme an liefern die notwendige Ausrüstung dieses Projekt möglich zu machen. Ich schätze Ihre für die Beantwortung aller Fragen, mit Professionalität und Geduld.*

A mi tutora María Jiménez Movilla por la atención y consejos recibidos para que esta Tesis haya sido posible.

Agradezco a la Dra. Susanne Ulbrich por facilitar las novillas e instalaciones para la obtención de muestras.

*Ich danke Frau Dr. Susanne Ulbrich erleichtern Färsen und Einrichtungen für die Probenahme.*

Agradezco al Dr. Helmut Blum por permitirme visitar su laboratorio y por su paciencia. A todo el personal del laboratorio LAFUGA de genómica, a Andrea Klanner, a Sylvia Mallok, al Dr. Krebs, a Alex y muy especialmente a Sylvia y Ernest Hornig, por su apoyo y agradable compañía.

*Bei Herr Dr. Helmut Blum Danke für die Erlaubnis, sein Labor zu besuchen und für Ihre Geduld. Vielen Dank an alle Laborpersonal LAFUGA Genomik, Andrea Klanner, Sylvia Mallok, Dr. Stefan Krebs, Alex und vor allem Sylvia und Ernest Hornig, für ihre Unterstützung und guter Gesellschaft.*

Un especial agradecimiento a María José Izquierdo por todo el apoyo y sus consejos, a todos los profesores del departamento de Biología Celular e Histología, Concha Ferrer, Emma Martínez, Luis Miguel Pastor, José Ángel Martínez, Francisco Hernández, Juan Francisco Madrid, Emilio Gómez, José Ballesta y María Teresa Castells, gracias por su ayuda y compañía durante estos años.

A mis compañeros del departamento que compartieron conmigo todos estos años, por su ánimo, apoyo y compañerismo. A Lily, Carla, Narci, Wilson, Vicente, Blanca, Ascen, Lourdes, Sara, Esther, Tere y Luis Miguel. Un agradecimiento especialmente a Airyn por su paciencia en mis inicios en el laboratorio, por su apoyo y amistad. A Carla por su amable y atenta disposición que tiene siempre por ayudar.

A todos los profesores de Fisiología Animal en la Facultad de Veterinaria. Por las facilidades otorgadas para trabajar en su laboratorio y facilitar sus muestras para nuestros proyectos. Agradezco a Juan y especialmente a Sole por permitirme acompañarle para la recogida de muestras de mataderos. A los compañeros de Fisiología Animal en la Facultad de Veterinaria Jon, Aitor, Luis, Irene, Rebeca, Karen y Cristina siempre dispuestos a ayudar.

Gracias por todo el soporte técnico por parte de los diferentes departamentos del SACE y CAID. Hago un especial agradecimiento a Alejandro Torrecillas por su gran implicación en este proyecto y por su excelente apoyo técnico.

Un especial agradecimiento a todas las personas de la Universidad Autónoma de Sinaloa que me apoyaron para poder lograr mis estudios de Doctorado. Al MC Héctor M. Cuen, a los Doctores Francisco Ríos, Alfredo Estrada, A. Corrales Burgueño, Mario Nieves, al Ing. A. Valle y especialmente a Blanca López por sus amables y atentas gestiones.

A la memoria de mi abuelita Lucina López, por hacer de mi un hombre de bien. Agradezco a mi mamá, hermanas y hermano por su gran apoyo a pesar de la distancia. A mi papá por su siempre y acertado consejo, por su serenidad y madurez. A mis abuelos por sus consejos y por ser un modelo a seguir. A toda mi familia y a José Luis Cervantes.

A mi esposa y compañera de vida Tere Caro por ser parte de esta aventura, por su paciencia y apoyo incondicional, por ser como es, por estar a mi lado y por darme lo más preciado que tengo, mi hijo Marcos. Ellos me dan la fuerza día a día para seguir adelante.



*A MI ESPOSA Y MI HIJO*



***A MI ABUELITA LUCINA***





# T ABLA DE CONTENIDOS

## I NDICE DE CONTENIDOS



<b>1 RESUMEN</b>	<b>1</b>
1.1.- RESUMEN	3
1.2.- SUMMARY	9
<b>2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
2.1.- TRACTO GENITAL FEMENINO	18
2.1.1.- El ciclo estral bovino	18
2.1.2.- Generalidades del tracto genital de la vaca	21
2.1.2.1.- Útero	22
2.1.2.1.1.- Anatomía	22
2.1.2.1.2.- Histología	23
2.1.2.1.3.- Transcriptoma	24
2.1.2.1.4.- Proteoma	27
2.1.2.2.- Oviducto	28
2.1.2.2.1.- Anatomía	28
2.1.2.2.2.- Histología del oviducto	30
2.1.2.2.3.- Transcriptoma	34
2.1.2.2.4.- Fluido oviductal	37
2.1.2.3 Efecto del tracto genital femenino en el espermatozoide	39
2.1.2.3.1.- Transporte espermático	39
2.1.2.3.2.- Reservorio espermático	43
2.1.2.3.3.- Capacitación espermática	46
2.1.2.3.3.1.- Modificación de la membrana plasmática del espermatozoide	47
2.1.2.3.3.2.- Fosforilación de proteínas	49
2.1.2.3.3.3.- Cambios en los patrones de motilidad espermática	50
2.2.- ESPERMATOZOIDE	51
2.2.1.- Espermatogénesis	51
2.2.2.- Morfología y Estructura	53
2.2.2.1.- Cabeza	55
2.2.2.1.1.- Acrosoma	56
2.2.2.1.2.-Membrana plasmática	58
2.2.2.2.- Cuello	60

2.2.2.3.- Cola o flagelo _____	60
2.2.3.- Maduración espermática _____	62
2.2.3.1.- Fluido epididimario _____	64
2.2.3.2.- Epididimosomas _____	67
2.2.3.3.- Reacción acrosómica _____	68
2.3.- MOLÉCULA DE ADHESIÓN DEL ESPERMATOZOIDE 1 (SPAM1) _____	72
2.3.1.- Estructura de la proteína SPAM1 _____	73
2.3.2.- Localización de SPAM1 en el espermatozoide _____	74
2.3.3.- Expresión de SPAM1 en testículo y epidídimo _____	75
2.3.4.- Funciones reproductivas de SPAM1 _____	78
2.3.4.1.- Actividad hialuronidasa de SPAM1 _____	78
2.3.4.2.- Capacidad de unión a ZP de SPAM1 _____	79
2.3.4.3.- Actividad de señalización celular de SPAM1 _____	81
<b>3 OBJETIVOS</b> _____	<b>85</b>
3.1.- Objetivo general: _____	87
3.2.- Objetivos específicos: _____	87
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b> _____	<b>89</b>
4.1.- MATERIALES _____	91
4.1.1.- Anticuerpos _____	91
4.1.2.- Hormonas _____	91
4.1.3.- Reactivos y Kits _____	92
4.1.4.- Tampones y soluciones _____	96
4.1.5.- Varios _____	97
4.1.6.- Equipos _____	98
4.2.- MÉTODOS _____	100
4.2.1.- Animales _____	100
4.2.1.1.- Novillas _____	100
4.2.1.2.- Sincronización del ciclo estral de novillas _____	101
4.2.2.- Obtención de material biológico _____	102
4.2.2.1.- Suero y plasma sanguíneo bovino _____	102
4.2.2.2.- Fluido oviductal bovino (FOB) _____	102
4.2.2.3.- Fluido uterino bovino (FUB) _____	103

4.2.2.3.1 Extracción de proteínas de exosomas de fluido oviductal	_____	104
4.2.3.4.- Extracción de proteínas de espermatozoides bovinos	_____	104
4.2.3.5.- Extracción de proteínas de células epiteliales del oviducto bovino	_____	105
4.2.3.6.- Determinación de la concentración de proteínas	_____	105
4.2.2.7.- Muestras de tejido para biología molecular	_____	105
4.2.2.7.1 Muestras de oviducto y endometrio bovino	_____	106
4.2.2.8.- Obtención de ovocitos bovinos ováricos	_____	107
4.2.3.- Análisis proteico	_____	107
4.2.3.1.- Producción de anticuerpos	_____	108
4.2.3.1.1.- Cultivo de hibridomas para la obtención de anticuerpo SPAM1 bovino	_____	108
4.2.3.2.- Inmunohistoquímica para microscopia óptica (MO)	_____	109
4.2.3.2.1.- Fijación de muestras	_____	109
4.2.3.2.2.- Inclusión de tejidos en bloques de paraplast	_____	109
4.2.3.2.3.- Inmunohistoquímica en portaobjetos	_____	109
4.2.3.3.- Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	_____	110
4.2.3.3.1.- Fijación	_____	110
4.2.3.3.2.- Inclusión de tejidos en LR-White	_____	110
4.2.3.3.3.- Inmunocitoquímica en rejillas	_____	111
4.2.3.4.- Inmunoprecipitación de proteínas	_____	111
4.2.3.6.- Determinación de la unión de SPAM1 oviductal a ZP de ovocitos bovinos	_____	114
4.2.3.7.- Análisis por electroforesis	_____	114
4.2.3.7.1.- Electroforesis	_____	114
4.2.3.7.2.- Western-blot	_____	115
4.2.3.7.3.- Inmunodetección en membrana	_____	115
4.2.3.7.4.- Electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y Electroforesis bidimensional diferencial en gel (DiGE)	_____	115
4.2.3.8.- Análisis proteómico	_____	120
4.2.3.8.1.- Análisis por proteómica de fluidos oviductales y uterinos bovinos	_____	120
4.2.3.8.2.- Análisis funcional de datos de proteómica	_____	121
4.2.4.- Análisis molecular	_____	121

4.2.4.1.- Aislamiento y análisis de ARN _____	121
4.2.4.2.- Síntesis de ADN complementario para PCR _____	123
4.2.4.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) _____	123
4.2.4.4.- Electroforesis en gel de agarosa _____	124
4.2.4.5.- Análisis de micromatrices (Microarray) _____	125
4.2.4.5.1.- Preparación de muestras y el procesamiento de microarray _	125
4.2.4.5.2.- Análisis de la integridad del ARN _____	127
4.2.4.5.3.- Hibridación _____	128
4.2.4.5.4.- Lavado y escaneo de Microarray _____	129
4.2.4.5.5.- Análisis de Microarray _____	130
4.2.4.5.6.- Análisis funcional de datos de Microarray _____	130
<b>5 RESULTADOS _____</b>	<b>131</b>
<b>5.1.- ANÁLISIS DEL OVIDUCTO Y ÚTERO BOVINO EN FASE PERIOVULATORIA _</b>	<b>133</b>
5.1.1.- Análisis de micromatrices _____	133
5.1.2.- Análisis proteómico de fluido oviductal y uterino en la especie bovina __	150
5.3.1.2.- Análisis por electroforesis _____	150
5.3.1.2.1.- Electroforesis bidimensional (2D-PAGE) _____	150
5.1.1.2.2.- Electroforesis bidimensional diferencial en gel (DiGE) _____	157
5.1.1.2.3.- Western-blot _____	172
5.2.- SPAM1 _____	173
5.2.1.- Análisis molecular _____	173
5.2.1.1- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) _____	173
5.2.2.- Análisis Bioquímico _____	174
5.2.2.1.- Western-blot _____	174
5.2.2.2.- Inmunoprecipitación _____	175
5.2.2.2.- Tinción de coomassie _____	175
5.2.2.2- Western-blot _____	176
5.2.3.- Análisis proteómico _____	176
5.2.3.1.- Análisis proteómico _____	176
5.2.4.- Análisis Histoquímico _____	178
5.2.4.1.- Microscopia Óptica (MO) _____	178
5.2.4.2.- Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) _____	179

5.2.5- Unión de SPAM1 oviductal a la ZP de ovocitos bovino _____	182
<b>6 DISCUSIÓN</b> _____	<b>183</b>
6.1.- EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE EL OVIDUCTO Y EL ENDOMETRIO DE LA VACA _____	186
6.1.1.- Agrupamiento de las sondas detectadas por el análisis de micromatrices según su perfil expresión _____	188
6.1.1.1.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA1) _____	188
6.1.1.2.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA2) _____	189
6.1.1.3.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA3) _____	193
6.1.1.4.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA4) _____	197
6.1.1.5.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA5) _____	198
6.1.1.6.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA6) _____	198
6.1.2.- Expresión diferencial entre la ampolla y la unión istmo-ampular del oviducto. _____	199
6.1.3.- Clasificación funcional de transcritos identificados que sintetizan a proteínas secretadas _____	200
6.2.- PROTEOMA DEL OVIDUCTO Y ENDOMETRIO EN LA ESPECIE BOVINA _____	202
6.2.1.- Proteoma del fluido oviductal _____	205
6.2.2.- Proteoma del fluido uterino _____	207
6.2.3.- Comparativa del proteoma del oviducto y endometrio en la especie bovina _____	208
6.2.4- Aportación del suero sanguíneo a los fluidos reproductivos del tracto femenino bovino _____	212
6.3.- SPAM1 EN LA REPRODUCCIÓN DE LOS MAMÍFEROS _____	212
<b>7 CONCLUSIONES</b> _____	<b>217</b>
7.1.- CONCLUSIONES _____	219
7.2.- CONCLUSIONS _____	220
<b>8 ANEXOS</b> _____	<b>223</b>
Anexo I Proteínas identificadas en el fluido uterino bovino _____	225
Anexo II Listado de genes agrupados (SOTA1) _____	228
Anexo III Listado de genes agrupados (SOTA2) _____	261
Anexo IV Listado de genes agrupados (SOTA3) _____	285
Anexo V Listado de genes agrupados (SOTA4) _____	295



Anexo VI Listado de genes agrupados (SOTA5)	297
Anexo VII Listado de genes agrupados (SOTA6)	298
Anexo VIII Genes expresados únicamente por el oviducto en la especie bovina	299
Anexo IX Genes expresados únicamente por el endometrio en la especie bovina	300
<b>9 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>305</b>

## I. Abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
BSP	Proteína de unión del espermatozoide
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CCO	Complejo <i>Cumulus Oophorus</i>
CHAPS	(3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato)
DAB	3,3'diaminobencidina
DAVID	" <i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i> " Base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado
DEGs	Genes expresados diferencialmente
DiGE	Electroforesis diferencial en gel bidimensional
DPBS	Tampón fosfato salino Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
FDR	Filtrado de falsos descubrimientos
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
FOB	Fluido Oviductal Bovino
FSH	Hormona folículo estimulante
FUB	Fluido Uterino Bovino
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina humana
GO	Ontología de genes
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HA	Ácido hialurónico
IA	Inseminación artificial
IM	Intramuscular
LH	Hormona luteinizante
MO	Microscopía Óptica
P4	Progesterona
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
PGF <sub>2</sub> α	Prostaglandina F2 alfa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RA	Reacción acrosómica
RIN	Número de integridad de ARN
RT	Temperatura ambiente
SDS-PAGE	Electroforesis en gel depoliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopia electrónica de barrido

<b>SSB</b>	Suero Sanguíneo Bovino
<b>TBS</b>	Solución salina tamponada de Tris
<b>TBST</b>	Solución salina tamponada de Tris con 0,05% de tween 20
<b>TEM</b>	Microscopia Electrónica de Transmisión
<b>Tm</b>	Temperatura de fusión
<b>UTJ</b>	Unión útero tubárica
<b>ZP</b>	Zona Pelúcida

## II. Lista de figuras

<i>Figura 1 Representación esquemática del ciclo estral bovino.</i> .....	19
<i>Figura 2 Tracto genital de la vaca.</i> .....	22
<i>Figura 3 Cuerno uterino diseccionado de vaca nulípara en fase periovulatoria.</i> .....	23
<i>Figura 4 Vascularización del cuerno uterino de vaca.</i> .....	23
<i>Figura 5 Microscopia óptica de útero bovino. Corte transversal del epitelio endometrial. Epitelio glandular del útero bovino. Epitelio columnar (E), estroma (e), epitelio glandular (Eg).</i> .....	24
<i>Figura 6 Agrupamiento por perfiles de expresión en el ciclo estral en endometrio bovino.</i> .....	26
<i>Figura 7 Representación esquemática del oviducto y las estructuras adyacentes en la especie bovina.</i> .....	29
<i>Figura 8 Disección de oviducto bovino. Se muestra las tres regiones, ampolla (a), unión istmo-ampular (uia), istmo (i) y unión útero- tubárica (uut).</i> .....	30
<i>Figura 9 Esquema de la histología del oviducto de cerda. Secciones transversales del istmo (arriba), la unión útero-tubárica (izquierda), y de la ampolla (derecha).</i> .....	31
<i>Figura 10 Imagen por TEM y SEM del oviducto bovino.</i> .....	32
<i>Figura 11 Representación esquemática del endosalpinx en le especie bovina al examen microscópico.</i> .....	33
<i>Figura 12 Esquema de GO de genes expresados diferencialmente en estro y diestro en el endometrio bovino.</i> .....	34
<i>Figura 13 Clasificación por localización de genes expresados en la trompa de Falopio normal (GEO: GSE10971).</i> .....	35
<i>Figura 14 Agrupación funcional de los genes clasificados como “secretados” utilizando DAVID con datos de las trompas de Falopio normales.</i> .....	36
<i>Figura 15 Diagrama de Venn que muestra la superposición de genes expresados oviducto de humano, bovino y porcino.</i> .....	36
<i>Figura 16 Cambios del volumen fluido del oviducto de las vacas durante el ciclo estral. Los volúmenes máximos de fluido se produjeron inmediatamente después del estro (línea blanca) y correspondían a bajas concentraciones de progesterona, y un pico de estradiol.</i> .....	38
<i>Figura 17 SEM de esperma bovino y epitelio oviductal bovino.</i> .....	45
<i>Figura 18 Bases moleculares de procesos rápidos y lentos asociados a la capacitación espermática.</i> .....	49
<i>Figura 19 Representación de la hiperactivación espermática.</i> .....	50
<i>Figura 20 Fases de la espermatogénesis del humano.</i> .....	53

<i>Figura 21 Representación esquemática de un espermatozoide típico de mamífero, señalando las diversas regiones del espermatozoide.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 22 Características generales de la cabeza de espermatozoide de ratón (izquierda) y conejo (derecha)..</i>	<i>56</i>
<i>Figura 23 Esquema de las partes del espermatozoide humano maduro con sus diferentes partes. ....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 24 Proteoma y secretoma de epidídimo de bovino en SDS-PAGE. ....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 25 Secuencia de eventos durante la reacción acrosómica del espermatozoide de los mamíferos.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 26 Fecundación desde un punto de vista moderno. ....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 27 Esquema de la proteína Spam1 del ratón en forma madura. ....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 28 Esquema de la proteína SPAM1 bovino.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 29 Detección por Western-blot de las dos isoformas de SPAM1 en el fluido epididimario. ....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 30 Esquema de la proteína SPAM1 de conejillo de indias antes y después de la RA.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 31 Modelo de expresión de HSPA2, SPAM1 y ARSA en la superficie de los espermatozoides humanos.</i>	<i>82</i>
<i>Figura 32 Inyección de hormonas a novillas. Se realizó vía intramuscular en la región de la anca.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 33 Extracción de fluido oviductal con micropipeta.....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 34 Disección de tracto genital de vaca. (A) Oviducto ipsilateral (B) Cuerno uterino ipsilateral. ....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 35 Imagen del oviducto bovino posterior a la disección donde se indican sus diferentes regiones. (a) ampolla, (uia) unión istmo ampular, (i) istmo y (uut) unión útero tubárica.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 36 Representación esquemática del protocolo de inmunoprecipitación.....</i>	<i>112</i>
<i>Figura 37 Representación esquemática del protocolo de electroforesis en dos dimensiones 2D-PAGE.....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 38 Representación esquemática del protocolo de electroforesis diferencial DiGE.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 39 Diagrama de flujo de trabajo para la preparación de muestras y su procesamiento para el análisis de micromatrices (microarray). ....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 40 Visualización de ARN ribosomal en gel de agarosa (1%) incubado en bromuro de etidio.....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 41 Imagen de electroforesis de ARN, generada por bionalizador Agilent.....</i>	<i>128</i>
<i>Figura 42 Cámara de hibridación de micromatrices Agilent a). Ejemplo de carga de muestras en los slides b). Burbujas deseables una vez montados los slides en la cámara de hibridación c). ....</i>	<i>129</i>
<i>Figura 43 Diagrama de caja de las 14 muestras filtradas para sondas detectables y normalizadas con el paquete VSN de BioConductor.....</i>	<i>134</i>

<i>Figura 44 Heatmap de correlación de pares de conjunto de datos de normalizados de micromatrices. Generado con el paquete geneplotter de BioConductor. ....</i>	<i>134</i>
<i>Figura 45 Seis agrupamientos tipo SOTA basados en la similitud en los perfiles de expresión génica en los tejidos estudiados.....</i>	<i>135</i>
<i>Figura 46 Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados entre las muestras de endometrio (U_cr) y las dos regiones del oviducto (O_a y O_u). ....</i>	<i>140</i>
<i>Figura 47 Diagrama de Venn del transcriptoma de las muestras de endometrio y el oviducto.....</i>	<i>141</i>
<i>Figura 48 Gráfica de tarta de genes expresados comunes entre el endometrio y oviducto de la vaca.....</i>	<i>142</i>
<i>Figura 49 Redes de interacción por evidencia de los 175 genes clasificados como secretados y del espacio extracelular expresados comunes entre el endometrio y el oviducto de vaca. ....</i>	<i>143</i>
<i>Figura 50 Electroforesis en 2D de FOB en fase periovulatoria. Resolución de 300 µg de FOB en maxigel con tiras reactiva de gradiente no lineal de pH (3-10), teñido con azul de coomassie. ....</i>	<i>151</i>
<i>Figura 51 Electroforesis en 2D de FUB en fase periovulatoria. Resolución de 300 µg de FUB en maxigel con tiras reactiva de gradiente no lineal de pH (3-10), teñido con azul de coomassie. ....</i>	<i>151</i>
<i>Figura 52 Electroforesis en 2D de FOB en fase periovulatoria marcado con sonda fluorescente Cy2. Resolución de 300 µg de FOB en maxigel, con tiras de gradiente no lineal de pH (3-10).....</i>	<i>152</i>
<i>Figura 53 Electroforesis en 2D de FUB en fase periovulatoria marcado con sonda fluorescente Cy2. Resolución de 300 µg de FUB en maxigel, con tiras de gradiente no lineal de pH (3-10). ....</i>	<i>153</i>
<i>Figura 54 Proteínas más abundantes del fluido oviductal de la vaca. Electroforesis en 2D de FOB en fase periovulatoria. Resolución de 300 µg de FOB en maxigel con tiras reactiva de gradiente no lineal de pH (3-10), teñido con azul de coomassie.....</i>	<i>154</i>
<i>Figura 55 Red de interacción por evidencia de las proteínas más abundantes del FOB en fase periovulatoria, donde se detectaron hasta 32 interacciones.. ....</i>	<i>155</i>
<i>Figura 56 Proteínas más abundantes del fluido oviductal de la vaca. Electroforesis en 2D de FUB es fase periovulatoria. Resolución de 300 µg de FUB en maxigel con tiras reactiva de gradiente no lineal de pH (3-10), teñido con azul de coomassie.....</i>	<i>156</i>
<i>Figura 57 Red de interacción por evidencia de las proteínas más abundantes del FUB en fase periovulatoria, donde se detectaron hasta 15 interacciones.....</i>	<i>157</i>
<i>Figura 58 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FOB, FUB y SSB en fase periovulatoria. Comparativa entre FOB (verde) y FUB (rojo) y la mezcla (azul) imágenes a, b y c. ....</i>	<i>158</i>
<i>Figura 59 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FOB y FUB en fase periovulatoria.....</i>	<i>159</i>
<i>Figura 60 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FOB y SSB en fase periovulatoria.....</i>	<i>160</i>
<i>Figura 61 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FUB y SSB en fase periovulatoria.....</i>	<i>161</i>

<i>Figura 62 Diagrama de Venn de las proteínas identificadas por espectrometría de masas de fluido oviductal bovino (FOB), fluido uterino bovino (FUB) y suero sanguíneo bovino (SSB).</i> .....	162
<i>Figura 63 Red de interacción por evidencia de las 47 proteínas identificadas por MS/MS de FOB y FUB en fase periovulatoria, se observan 91 interacciones.</i> .....	166
<i>Figura 64 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FOB y FUB en fase periovulatoria.</i> .....	169
<i>Figura 65 Red de interacción por evidencia de las 42 proteínas de FOB.</i> .....	170
<i>Figura 66 Red de interacción por evidencia de las 44 proteínas de FUB.</i> .....	171
<i>Figura 67 Inmunodetección por Western-blot en membrana en FOB y FUB con anticuerpo anti-OVGP1.</i> .	172
<i>Figura 68 Expresión por PCR de SPAM1 en oviducto de diferentes especies de mamíferos. Mujer (a), yegua (b), vaca (c) y cerda (d).</i> .....	173
<i>Figura 69 Inmunodetección por Western-blot de SPAM1 en espermatozoides y FOBs bovinos.</i> .....	174
<i>Figura 70 Gel SDS-PAGE de inmunoprecipitación de SPAM1. Resolución de 10 µg aprox. de FOB (a), inmunoprecipitación con el protocolo de crosslink (b) y clásico (c) Teñido con azul de coomassie.</i> .....	175
<i>Figura 71 Inmunodetección por Western-blot de SPAM1 de proteína inmunoprecipitada de FOB.</i> .....	176
<i>Figura 72 Inmunodetección con anti SPAM1 bovino (1:100) en corte histológico de istmo oviductal de vaca, visto al microscopio óptico, revelado con DAB.</i> .....	178
<i>Figura 73 TEM de inmunocitoquímica ultraestructural de oviducto bovino con anti-SPAM1.</i> .....	180
<i>Figura 74 TEM de inmunocitoquímica ultraestructural de oviducto bovino con anti-OVGP1.</i> .....	181
<i>Figura 75 Inmunodetección con anti SPAM1 en ovocitos de vaca, observación microscópica confocal.</i> ....	182

# 1 RESUMEN





## 1.1.- RESUMEN

La fecundación de los mamíferos es un proceso complejo que requiere una serie de eventos que comienzan con la fusión de los gametos, hasta el desarrollo de un nuevo individuo. La fecundación es un proceso biológico que ha sido estudiado en gran medida; Sin embargo, este análisis se centró principalmente en los gametos y su interacción. El número de estudios que tratan de descifrar el papel desempeñado por el tracto genital de la mujer en la fecundación *in vivo* es escasa. Un evento clave en la reproducción es el momento en que el espermatozoide se deposita en el tracto genital de la mujer después de la cópula o la inseminación artificial. El tracto genital femenino ofrece el entorno necesario para el transporte de los espermatozoides para llegar al lugar donde ocurre la fecundación. Este microentorno está mediado principalmente por los fluidos presentes en el lumen uterino y oviductales. Se sabe que estos fluidos contenían la secreción producida por las células epiteliales y por el trasudado de la sangre. Entonces, es muy importante conocer en detalle la composición de estos fluidos y su influencia en los gametos anteriores a la fecundación. En el período cercano a la ovulación o período periovulatorio el tracto genital de la mujer está listo para la interacción de gametos y fecundación. En la especie bovina, hay un período previo a la ovulación en la cual el espermatozoide debe permanecer en el tracto femenino para obtener su capacidad fecundante. Debido a la importancia de este período centraremos nuestro estudio en esta fase del ciclo estral.

Diferentes metodologías se han utilizado para saber cómo se sintetizan estos fluidos y su composición en los diferentes órganos del aparato genital femenino. Básicamente podríamos hablar de dos enfoques fundamentales, el estudio desde la genómica funcional y el estudio desde de la proteómica. Estas técnicas nos permiten estudiar un gran número de datos simultáneamente, como es el caso de la genómica funcional donde el análisis de micromatrices nos permite conocer los perfiles de expresión génica y la expresión diferencial entre

diferentes muestras. Estas técnicas nos indican con fiabilidad las proteínas que pueden ser sintetizadas en el oviducto y endometrio de la especie estudiada. Por otro lado, el estudio de la proteómica, ayuda a conocer el contenido proteico de los fluidos oviductales y uterinos, desde una forma general por espectrometría de masas (MS/MS) y desde el análisis de los "spots" obtenidos después de la separación de las proteínas por electroforesis en gel de dos dimensiones (2D), así como la identificación de algunas proteínas por Western-blot.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el determinar mediante técnicas de biología molecular y proteómica, la expresión general y diferencial de genes y proteínas expresados por el oviducto y endometrio en el período periovulatorio en la especie bovina. Investigamos la posible influencia del tracto femenino en el espermatozoide en el período cerca del momento de la fecundación. Por otra parte, se realizó un análisis más detallado sobre la molécula de adhesión del espermatozoide 1 (SPAM1) en el oviducto y su fluido en la especie bovina.

Para cumplir con nuestros objetivos, enfocamos nuestro estudio desde tres puntos. El primero desde el análisis molecular, con el estudio de micromatrices de tejidos epiteliales de oviducto y endometrio de la especie bovina, en el período periovulatorio, con el fin de conocer a través de este análisis la información acerca de la expresión génica diferencial entre los diferentes tejidos y la agrupación de los genes de acuerdo a la similitud en su patrón de expresión.

El segundo enfoque fue desde el punto de vista proteómico. Diferentes técnicas fueron utilizadas para identificar las proteínas contenidas en los fluidos oviductales y uterinos de la fase periovulatoria de la vaca. La electroforesis 2D y DiGE, nos permitieron identificar las proteínas mayoritarias y las diferenciales presentes en cada uno de los fluidos. Además de enriquecer nuestro conocimiento del proteoma de dichos fluidos. El último enfoque fue el estudio a

detalle de alguna de las proteínas mediante el uso de técnicas de biología molecular y proteómica, inmunohistoquímica y en Western-blot.

Los diferentes tejidos y fluidos para el análisis de micromatrices, electroforesis 2D y DiGE fueron obtenidos de seis novillas sincronizadas hormonalmente. El ARN total de las muestras de oviducto y endometrio fue extraído mediante el protocolo Trizol®. La integridad del ARN se evaluó en un Bioanalizador Agilent 2100. Para nuestro estudio las muestras utilizadas tenían un valor RIN superior a 7,9. El análisis de micromatrices de expresión se realizó con microarray personalizado de bovino (8x60k, Agilent). El escaneo y extracción de imagen se realizó con Agilent Technologies. Los datos filtrados fueron normalizados con el paquete VSN (Bioconductor). El análisis estadístico se realizó con el paquete Limma (Bioconductor) (FDR 1%). La clasificación funcional se hizo con la herramienta bioinformática DAVID. Las redes de interacción se realizaron con la herramienta bioinformática de STRING 9.1.

Las seis muestras fueron agrupadas en 3 grupos. Para los geles 2D fueron cargados 300 µg de proteína total y para los geles DiGE 100 µg por muestras. Las muestras de DiGE fueron marcadas con los fluoróforos de cianina (CyDyes 2, 3 y 5). La primera dimensión se hizo bandas de gradiente pH 3 a 10 no lineal. La segunda dimensión se hizo por electroforesis en SD-PAGE. Las imágenes fueron obtenidas con un escáner de alta definición y Thyphoon™ para los geles 2D y DiGE respectivamente. El análisis de imagen se realizó con el software ImageMaster 2D Platinum 7.0. Los "spots" seleccionados fueron recortados e identificados por MS/MS.

Para la identificación y aislamiento de la proteína SPAM1 en el bovino, las muestras procedieron de matadero comercial. Para la detección por Western-blot y aislamiento de SPAM1 bovino se utilizó fluido oviductal. Esta proteína fue identificada por MS/MS e incubada

posteriormente con ovocitos bovinos para determinar la interacción con ZP.

El análisis de micromatrices nos dio como resultado 5509 genes con expresión diferencial, entre las muestras de oviducto y endometrio. Los resultados obtenidos una vez clasificados en función de los perfiles de expresión (SOTA), nos dieron hasta 6 grupos diferentes. El primer grupo de 1523 genes se caracterizó por tener una expresión ligeramente aumentada en las muestras de oviducto en comparación con el endometrio. Una vez clasificados encontramos que hasta 221 de ellos fueron clasificados por que tenían una actividad catalítica. Dentro de este grupo de genes que codifican enzimas, pudimos identificar los genes HPSE, GPX2 y TSSK3. El segundo grupo con 1079 genes tenía una expresión ligeramente disminuida en las muestras de oviducto en comparación con el endometrio.

Posterior a la clasificación funcional se encontró que 245 genes fueron clasificados como proteínas de unión. Dentro de este grupo encontramos genes como ACRBP, ANXA5, ANXA6, APOA1 y GPX4. Los cuatro grupos restantes se caracterizan por tener una expresión disminuida en los tejidos oviductales y una expresión especialmente aumentada en el endometrio. Estas diferencias de los grupos van desde 2 a 5 veces. Así por ejemplo, nos encontramos que el tercer agrupamiento tenía hasta 38 genes clasificados como hidrolasas, dentro de estos se puede destacar la presencia de hidrolasas lisosomales como FUCA1, HYAL1, GNS y RNASE6. Los tres grupos restantes contenían 97, 21 y 40 genes.

Otro dato importante que nos aportó el análisis de micromatrices es que la diferencia de expresión génica entre la ampolla y la unión istmo-ampular era muy escasa teniendo una homología de entre el 89% entre los genes aumentados respecto al endometrio y de un 86% para los genes disminuidos respecto a la expresión en el tejido endometrial.

Por otro lado, pudimos observar que de los 5509 genes expresados tanto en el oviducto como en el endometrio, 5160 genes eran comunes entre ambos tejidos. Posterior a su clasificación funcional encontramos que 175 de ellos eran clasificados como secretados y/o de matriz extracelular. Dentro de este grupo encontramos grupos de genes que participan en las vías de respuesta a estímulos, adhesión focal y la de interacción con ECM-receptor. En el grupo de genes que se consideraron como expresados únicos por el oviducto (fold change  $\log_2 \geq 4$ ) se clasificaron y se encontró que 18 proteínas se definieron como secretados y/o del espacio extracelular, dentro de estas se identificó OVGP1, CFH y MU16. En el caso de los genes únicos del endometrio, fueron catalogados como secretados un total de 101 genes. Entre estos, se detectaron algunos colágenos y otros genes (COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL5A3, COL6A1, COL6A2, FN1, LAMC3, PGF, COL6A3, TNC, TNXB) relacionados con la vía de la adhesión focal.

Los resultados obtenidos a partir de los geles 2D de los fluidos oviductales y uterinos nos permitieron identificar una media de 458 y 242 "spots" en el fluido oviductal y uterino respectivamente. Un análisis cuantitativo de la relación de volumen de los diferentes puntos reveló que la albúmina de suero es la proteína más abundante en ambos fluidos.

Los geles de tipo DiGE, nos aportaron datos para identificar las proteínas comunes presentes en los fluidos oviductales y uterinos. Hasta un total de 52 "spots" fueron identificados, estos se correspondían a 47 proteínas, se observó que 29 de estas eran comunes para el fluido oviductal y uterino. Tras la clasificación funcional de estas 47 proteínas encontramos que 28 de ellas se agrupaban como proteínas de unión y 28 en la vía de respuesta al estímulo.

El análisis de la imagen del gel DiGE mostró que la proteína TPPP3 es hasta 421 veces más abundante en el fluido oviductal en comparación con el uterino, así también para las proteínas siguientes

HSPA5, ANXA8, HSP90B1, ANXA1 (7,62; 6,06; 5,50; 2,41 número de veces más abundante respectivamente). Por otro lado, las proteínas más abundantes en el fluido uterino respecto al fluido oviductal fueron la proteína AKR1B1 con un valor de 59,73, veces más; IQGAP1 con 41,85; PSAT1 29,00; PHGDH 16,20 y otras 10 proteínas por encima de 2 veces más respecto al fluido oviductal. Algunas de estas proteínas como ANXA1 y AKR1B1 se comprobaron por Western-blot, coincidiendo los resultados obtenidos con los geles DiGE.

La última parte de esta tesis se encargó del estudio de la proteína SPAM1. Se detectó la presencia de ARNm de SPAM1 en el oviducto de diferentes especies de mamíferos, tal es el caso de la mujer, yegua, cerda y vaca. Mediante Western-blot e inmunocitoquímica, se comprobó también que SPAM1 se encuentra en el fluido oviductal y en las células epiteliales oviductales. Mediante técnicas inmunocitoquímicas pudimos observar que esta proteína se observa en el citoplasma (no asociado a orgánulos) de células secretoras y ciliadas, por lo que no se encuentra asociada su expresión en los gránulos secretores de las células no ciliadas oviductales. Después del aislamiento de SPAM1 del fluido oviductal de la vaca, se comprobó que se une a la ZP de ovocitos bovinos.

En conclusión, nuestros resultados mostraron de una manera general, las similitudes y diferencias que aportan las diferentes partes del tracto genital femenino durante el período cercano a la ovulación en la especie bovina. Comprobamos mediante la expresión génica y del proteoma que hay vías y mecanismos reproductivos comunes para el útero y el oviducto, como son las vías que intervienen en la unión a proteínas, de respuesta al estímulo, los mecanismos de defensa y de protección ante el estrés oxidativo. Sin embargo, también se comprobó la existencia de vías específicas para cada uno de los tejidos de estudio. Así, en el oviducto destacan las proteínas del choque térmico, algunas con actividad catalítica y de unión y en el fluido uterino destacan la presencia de proteínas que intervienen en la adhesión focal,

modificación de la matriz extracelular (ECM) y gran cantidad de inmunoglobulinas procedentes de suero sanguíneo. Estos resultados implican un alto grado de especialización de estos órganos reproductivos proporcionando el microambiente necesario para la acogida del espermatozoide y su transporte, de cara al posterior encuentro, interacción y fusión con el ovocito, hasta la culminación de una fecundación exitosa.

Cabe mencionar que algunas de estas proteínas y vías detalladas en este estudio, con anterioridad han sido descritas en el tracto genital masculino, algunas de ellas ya se ha demostrado que juegan un papel importante en conferir y mejorar la capacidad fecundante de los espermatozoides. Por lo tanto, podríamos deducir que el tracto femenino podría jugar un papel en corregir algunas posibles deficiencias reproductivas de los espermatozoides y/o mejorarlos para que la fecundación tenga lugar.

## 1.2.- SUMMARY

Mammalian fertilization is a complex process that requires a series of events, starting with gamete fusion and culminating in the development of a new individual. Fertilization is a widely studied biological process; however previous but this analysis mainly focuses on gametes and their interactions. The number of studies that attempt to describe the role played by the female genital tract in *in vivo* fertilization is scarce. A key event in reproduction is the step when the sperm are deposited in the female genital tract after copulation or artificial insemination. The female genital tract provides the environment needed for the sperm to reach the site where fertilization takes place. This microenvironment is mainly mediated by the fluids present in the uterine and oviductal lumen, and it is known that these fluids contain the secretion produced by the epithelial cells and by the blood transudate. It is therefore very important to investigate in detail the composition of these fluids and their influence on gametes prior to



fertilization. In the periovulatory period, the female genital tract is ready for gamete interaction and fertilization. In bovine species, there is a period before ovulation occurs in which the sperm must remain in the female tract in order to attain its fertilization capacity. This study will focus in this period due to its biological relevance.

Different methodologies have been used to investigate how these fluids are synthesized and its composition in the different organs of the female genital tract. Basically, two different methods have been used for this analysis, functional genomic and proteomic analysis, both of which allow the analysis of a large number of data simultaneously. Thus, the microarray analysis provides the gene expression profile and throws light on differential gene expression among different biological samples. This technique provides accurate information about the proteins synthesized in the oviduct and endometrium of the species of interest. On the other hand, proteomic analysis provides information about the proteins present in the oviductal and uterine fluids by using mass spectrometry (MS/MS) and, more specifically, the different spots obtained after the separation of the proteins using two dimensional (2D) gel electrophoresis, and also the identification of some proteins by Western-blot.

The general aim of this Doctoral Thesis is to analyse gene expression, differential gene expression and proteins by means of molecular and proteomic techniques in the oviduct and endometrium during the periovulatory period in bovine species. We investigate the possible influence of the female genital tract on sperm near the fertilization time. Moreover, a more detailed analysis of sperm adhesion molecule 1 (SPAM1) in the oviduct and its fluid in the bovine species was carried out.

To attain these objectives, this thesis focuses on three points. First, a microarray molecular analysis of epithelial cell isolated from the oviduct and the endometrium of bovine species in the periovulatory period was carried out. This kind of analysis provides information on

differential gene expression in different tissues and groups the genes according to the gene expression pattern.

Second, a proteomic analysis was performed to identify the proteins contained in the oviductal and uterine fluids of bovine species in the periovulatory phase. The 2D gel electrophoresis and DiGE analysis allow the identification of abundant proteins and the proteins that are specific to each of these fluids. Moreover, this analysis will enrich our knowledge of the proteome of both fluids.

Third, a detailed analysis of some proteins of interest was carried out by means of PCR molecular analysis, immunohistochemistry and Western-blot.

The different tissues and fluids for microarray analysis, 2D and DiGE electrophoresis were obtained from six hormonally synchronized heifers. Total RNA from oviducts and endometrium were obtained using Trizol®. RNA integrity was evaluated with the Bioanalyzer Agilent 2100, while only samples with an RIN value higher than 7.9 were used. Slides specific for bovine species with 8x60k and the scan were from Agilent Technologies. All the filtered data were normalized using the VSN (Bioconductor) package, while the statistical analysis used Limma (Bioconductor, FDR 1%). The functional classification of the differentially expressed genes was performed using the bioinformatics tool DAVID. The network of the different groups of genes was obtained using the web bioinformatics tool STRING 9.1.

The six different samples were classified into 3 groups. A total of 300 µg of proteins was used for the 2D electrophoresis and 100 µg for the DiGE analysis. The different samples were labelled with the cyanine fluorophores (CyDyes 2, 3 and 5). Strips with a non-linear gradient of pH 3 to 10 were used for the first dimension separation. The second dimension corresponded to SDS-PAGE electrophoresis. The images were obtained using a high resolution scanner and Thyphoon™ for the 2D gel and DiGE respectively. Image analysis was performed using the

software ImageMaster 2D Platinum 7.0. The spots were selected and processed for MS/MS analysis.

Different samples were obtained from a commercial slaughterhouse for the identification and isolation of the SPAM1 protein. This protein from the oviductal fluid was analyzed by Western-blot and MS/MS. Also, bovine oocytes were incubated with this protein to study its interaction with the ZP.

The microarray analysis showed that 5509 genes are differentially expressed (DEGs) in the oviduct and endometrium. A total of 6 different groups were obtained after the use of SOTA classification according to their gene expression profiles. The first group includes 1523 genes with an expression slightly higher in the oviduct when compared with the endometrium. 221 of these genes, including HPSE, GPX2 and TSSK3, have a catalytic activity. A total of 1079 expressed genes were detected in the second group with a slightly lower expression in the oviduct when compared with the endometrium.

245 of these genes including ACRBP, ANXA5, ANXA6, APOA1 and GPX4 are classified as binding protein. The last four groups are characterized by a lower expression in the oviduct and an especially higher expression in the endometrium compared with the oviduct. These differences showed a range between 2-5 fold. For example, in the third group there are at least 38 genes classified as hydrolases including the lysosomal enzymes FUCA1, HYAL1, GNS and RNASE6. The three remaining groups have 97, 21 and 40 genes respectively.

Another important finding of the microarray analysis was the low difference of the gene expression pattern between the ampulla and the isthmus-ampullary region. Thus, an 89% and 86% of up-regulated and down-regulated genes compared to the endometrium are similar among the two different oviductal tissues used in this study.

It was observed that 5160 of a total of 5509 genes were expressed in both the oviduct and the endometrium. After a functional classification, it was found that 175 of these genes were included in the secreted and/or extracellular group. Some genes were involved in the response to stimulus, focal adhesion and ECM-receptor interaction. In the group of genes considered as unique to the oviduct (fold change  $\log_2 \geq 4$ ), 18 genes codified for secreted or extracellular space proteins, including OVGP1, CFH and MUC16. In the case of the genes uniquely expressed in the endometrium, 101 genes were classified as secreted, including different genes that codify for the collagen protein (COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL5A3, COL6A1 and COL6A2, COL6A3) and other genes (FN1, LAMC3, PGF, TNC and TNXB) related with focal adhesion.

The 2D electrophoresis analysis allowed the identification of 458 and 242 different spots in the oviductal and uterine fluid respectively. A quantitative analysis of the volume ratio of the different spots revealed that serum albumin is the most abundant protein in both fluids.

The DiGE analysis allowed discrimination between the proteins that were common to and specific to the uterine and oviductal fluids. Of the 52 spots identified, 47 proteins corresponded to proteins, of which 29 were common to both fluids. The functional classification of these 47 proteins indicated that 28 are involved in protein binding and 28 in the response to stimulus.

Image analysis of the DiGE gel showed that the protein TPPP3 is 421 times more abundant in the oviductal fluid than in the uterine fluid. It was also observed that the proteins HSPA5, ANXA8, HSP90B1 and ANXA1 are 7.62; 6.06; 5.50 and 2.41 times more abundant in the oviductal fluid than in the uterine fluid. On the other hand, the proteins AKR1B1, IQGAP1, PSAT1 and PHGDH were 59.73, 41.85, 29 and 16.20 times more abundant in the uterine fluid than in the oviductal fluid. A

further 10 proteins were also more abundant (2-fold) in the uterine fluid. Some of these, including ANXA1 and AKR1B1, were corroborated by Western-blot which supported the results obtained with the DiGE analysis.

Finally of this thesis also provides information on SPAM1. The SPAM1 gene is expressed in the oviduct of different mammalian species including human, equine, porcine and bovine. Western-blot and immunohistochemistry techniques also showed the SPAM1 protein to be present in the oviductal fluid and the oviductal epithelial cells in bovine. The use of immunogold techniques showed that the protein is present in the cytoplasm (not associated with organelles) of both ciliated and non-ciliated cells. There was non-specific immunolabelling in the secretory granules of the non-ciliated cells. SPAM1 isolated from the oviductal fluid is able to bind to the ZP

In conclusion, the results obtained in this thesis illustrate the similarities and differences in the oviduct and endometrium during the periovulatory period in bovine species. It was seen that the gene expression and the proteome of both tissues shared some pathways, such as those involved in protein binding, response to stimulus, with the mechanisms of defense and protection against oxidative stress. However, some specific pathways for particular tissues were also identified. Thus, the pathways highlighted in the oviduct are related with the heat shock proteins and others with catalytic activity and binding. In the uterus, specific pathways included the presence of proteins involved in focal adhesion modification of extracellular matrix (ECM) and a high amount of immunoglobulins originating from serum. These results point to the high degree of specialization of the tissues analyzed in this study in providing an adequate microenvironment for the sperm reception, sperm transport, gamete interaction and gamete fusion needed for successful fertilization.

It should be noted that some of the proteins and pathways described in this study were described previously in the male genital tract, where, some of these proteins were reported to play an important role in sperm fertility and its improvement. It may be deduced therefore that the female genital tract contributes to the correction of some sperm deficiencies.



# 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Σ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ



## 2.1.- TRACTO GENITAL FEMENINO

### 2.1.1.- El ciclo estral bovino

La pubertad en novillas se puede definir como el momento en que se produce el primer celo o estro. La edad en el inicio de la pubertad depende una gran cantidad de factores genéticos y ambientales, como la raza, nutrición, época del año (Ball y Peters 2004).

El ciclo estral se divide en cuatro fases: El estro, que es el período de receptividad sexual (día 0), el metaestro o período post-ovulatorio (días 1-4), el diestro, donde está presente el cuerpo lúteo activo (días 5-18) y por último el pro-estro, que es justo el período antes de celo (días 18-20). Sin embargo, en la vaca el ciclo podría describirse mejor en términos de la función ovárica, el cual consiste en dividir el ciclo en dos fases: la fase folicular (proestro y estro) y la fase luteal (metaestro y diestro) (Ball y Peters 2004). En el bovino el ciclo estral tiene una duración de 21 días. El ciclo se inicia por la liberación de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) desde el hipotálamo, que a su vez provoca la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) de la glándula pituitaria anterior, esto estimula el crecimiento folicular. Varios folículos son los que se desarrollan hasta la etapa antral, sin embargo, sólo el más maduro (folículo dominante) responde a los niveles de FSH y es destinado a ovular (Webb et al., 2003). Los folículos antrales restantes dejan de crecer y sufren atresia. El aumento de los niveles de estrógenos desde el folículo preovulatorio inicia una respuesta de retroalimentación positiva desde el hipotálamo, de modo que una liberación de GnRH inicia el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH). El pico de LH por lo general dura 7-8 horas y la ovulación ocurre generalmente 24-32 horas después (Ball y Peters 2004) (Fig. 1).

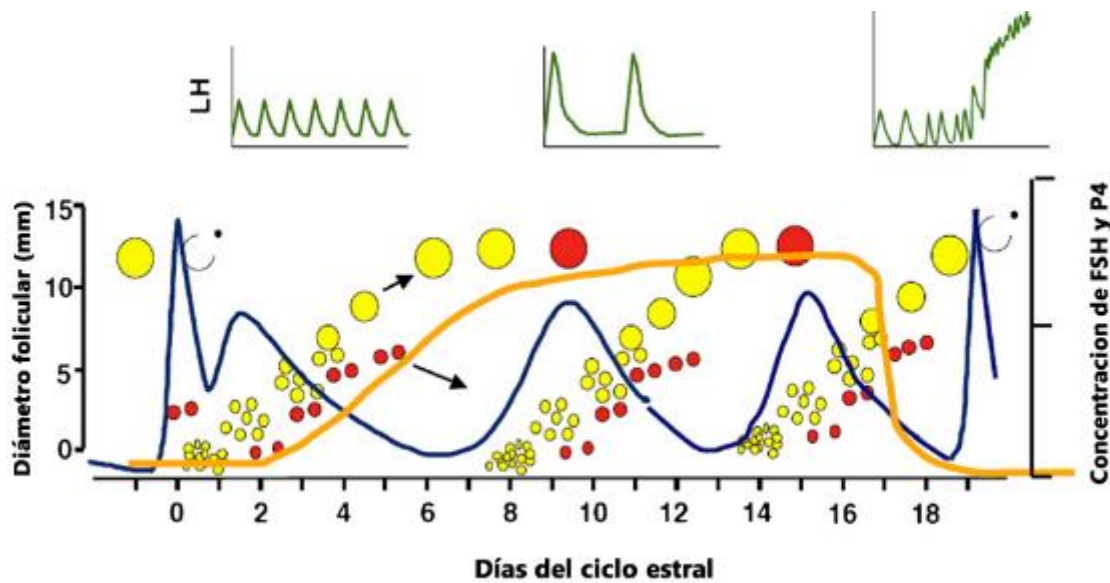


Figura 1 Representación esquemática del ciclo estral bovino. Patrón de secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y progesterona (P4); y el Patrón de crecimiento de los folículos ováricos durante el ciclo estral en bovinos. Modificado de Forde et al., 2011b.

En la ovulación, el folículo maduro se rompe y dispersa su contenido de líquido folicular en la cavidad abdominal, la liberación del óvulo rodeado por células del complejo *cumulus oophorus* (CCOs) es recogido por la fimbria del oviducto y se transporta hacia el oviducto, por una combinación de la acción ciliar y las contracciones musculares de la pared oviducto.

Diversos cambios son los que provocan los estrógenos sobre el tracto reproductor femenino. Los estrógenos promueven la retención de líquidos por parte de la vagina, útero y oviducto, a la palpación rectal estos órganos se sienten más turgentes, estos cambios también son apreciados por imagen ecográfica transrectal (Pierson y Ginther 1987). Los estrógenos también aumentan el flujo de sangre hacia el tracto reproductivo, provocando con ello el aumento en la producción de los fluidos contenidos en el tracto (Ball y Peters 2004, Araki y Yoshida-Komiya 1998, Pierson y Ginther 1987).

En el endometrio bovino durante el ciclo estral ocurren cambios característicos en cuanto a su composición y estado de diferenciación. Estos cambios están regulados principalmente por las hormonas, como la progesterona (P4) (Forde et al., 2011a), el estradiol y la oxitocina

(Spencer et al., 2004). En el estro, los niveles de P4 son bajos hasta llegar a los niveles más altos en diestro. La oxitocina ocupa sus receptores en el útero e induce la secreción pulsátil de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  del útero.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  desencadena en la regresión de cuerpo lúteo ovárico o luteólisis a través de contra-corriente entre la vena y la arteria uterina de ovario dando como resultado el inicio de un nuevo ciclo ovárico (Forde et al., 2011b).

Estos cambios también se aprecian en el microambiente al interior del útero y sirven para satisfacer las necesidades de los gametos masculinos y el embrión temprano. Las acciones de los estrógenos en el útero durante el ciclo estral están mediadas a través de la interacción con su respectivo receptor de estrógeno intracelular (Meikle et al., 2001). Los estrógenos inducen la síntesis de su propio receptor, así como el receptor de progesterona en varias especies. La hormona LH participa en la regulación de la ciclooxigenasa 2 (COX2) y la producción de prostaglandinas por las células epiteliales endometriales, provocando con ello la luteólisis y la posterior ovulación. Aunado a este aumento de prostaglandinas y la disminución de receptores en el útero del receptores de FSH, GnRH y LH, demuestra la participación activa del útero en la autorregulación autocrina-paracrina durante el ciclo estral del bovino (Shemesh 2001).

En el oviducto estos cambios hormonales también afectan a la producción del fluido oviductal.

La producción de este fluido depende de la influencia que ejercen las hormonas esteroideas del ovario (Araki y Yoshida-Komiya 1998). Sin embargo, el mecanismo por el cual los esteroides ováricos influyen en la secreción de los fluidos del oviducto no está del todo esclarecida. Trabajos realizados con oviductos de ovejas se demostró que, tanto las células secretoras ciliadas y no ciliadas del epitelio oviductal son sensibles a las variaciones en las concentraciones de esteroides (Murray 1995, DeSouza y Murray 1995). En cultivos *in vitro* se observó que los

estrógenos inducen la hipertrofia, maduración y el aumento de la altura de las células epiteliales secretoras y puede restaurar parcialmente las ciliadas (Comer et al., 1998), mientras que la progesterona causa atrofia y disminución de la actividad secretora. Estos cambios en la morfología de las células epiteliales provocan también variaciones en su actividad de síntesis proteica, que contribuyen a la variación en la producción de fluido del oviducto. Las hormonas esteroideas pueden influir en la tasa de secreción de líquido mediante la modulación del movimiento de iones a través del epitelio oviductal (Leese et al., 2001).

### 2.1.2.- Generalidades del tracto genital de la vaca

El tracto reproductivo femenino está formado por diferentes órganos que incluyen los ovarios, que producen los gametos femeninos; los oviductos, son el sitio que proporciona el microambiente necesario para la unión de los gametos masculino y femenino en la fecundación y el inicio del desarrollo embrionario; el útero, es donde el embrión resultante de la fecundación se desarrolla; la vagina, que sirve como protección para el tracto genital superior y por último se incluyen también la vulva, ésta forma la abertura exterior del tracto genital (Fig. 2). La vulva sirve para la entrada del pene del toro en la copula, así como para la expulsión del ternero al nacer (Ball y Peters 2004).

La vagina constituye el órgano copulativo de la vaca. Dependiendo de la raza, edad o estado reproductivo, el tamaño de la vagina varía, pero este oscila entre los 25 y 30 cm. En el piso de la vagina, aproximadamente a 10 cm de la parte anterior de la vulva se encuentra la salida de la uretra en el divertículo sub-uretral. En la especie bovina, el cuello del útero sobresale y restringe el lumen de la parte craneal de la vagina a un espacio en forma de anillo, conocido como fórnix (König y Liebich 2004).

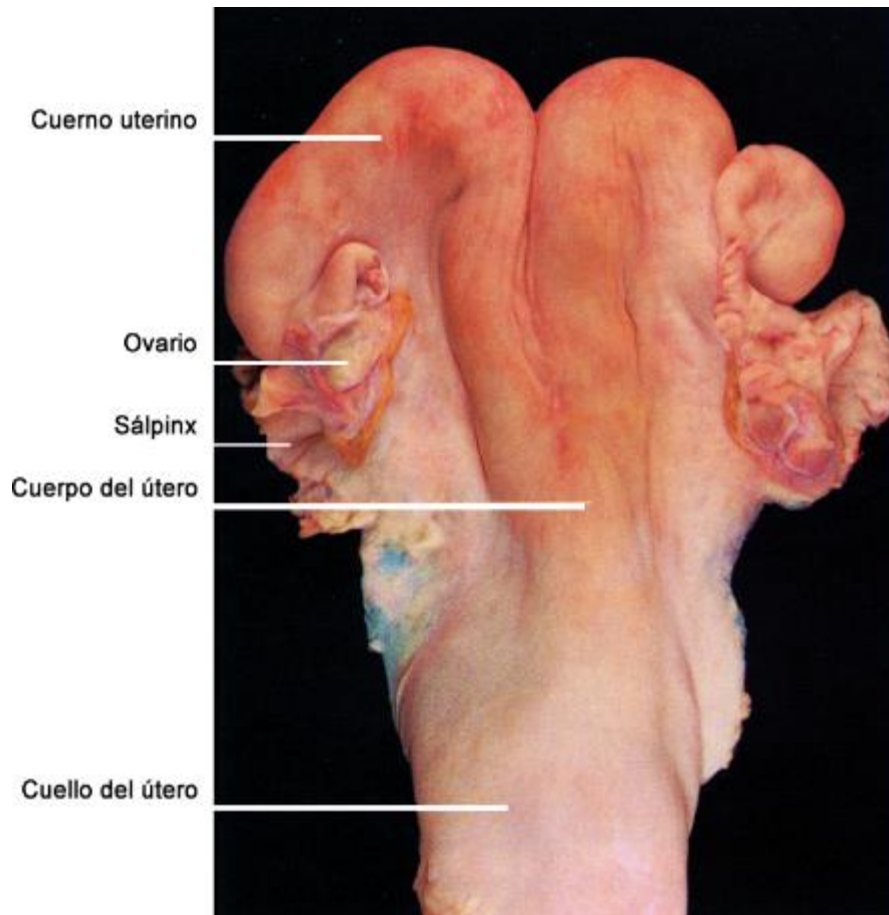


Figura 2 Tracto genital de la vaca. Modificado de König and Liebich, 2004.

### 2.1.2.1.- Útero

#### 2.1.2.1.1.- Anatomía

El útero es un órgano muscular hueco que consta de un cuerpo corto y dos cuernos. El útero bovino al diseccionarlo tiene forma de "Y".

El tamaño de los cuernos varía dependiendo de la edad y paridad de la vaca, pero oscila entre los 20 a 45 cm aproximadamente (McEntee 1990) (Fig. 3). Las puntas de los cuernos uterinos tienen forma de "S". El útero se suspende en la cavidad pélvica por los ligamentos uterinos grandes en ambos lados. Por estos ligamentos transitan las venas, arterias y nervios que irrigan e inervan al útero. La sangre se suministra al tracto por las arterias útero-ováricas y uterinas de las cuales la arteria uterina media es la más grande (Ball y Peters 2004) (Fig. 4).



Figura 3 Cuerno uterino diseccionado de vaca nulípara en fase periovulatoria.

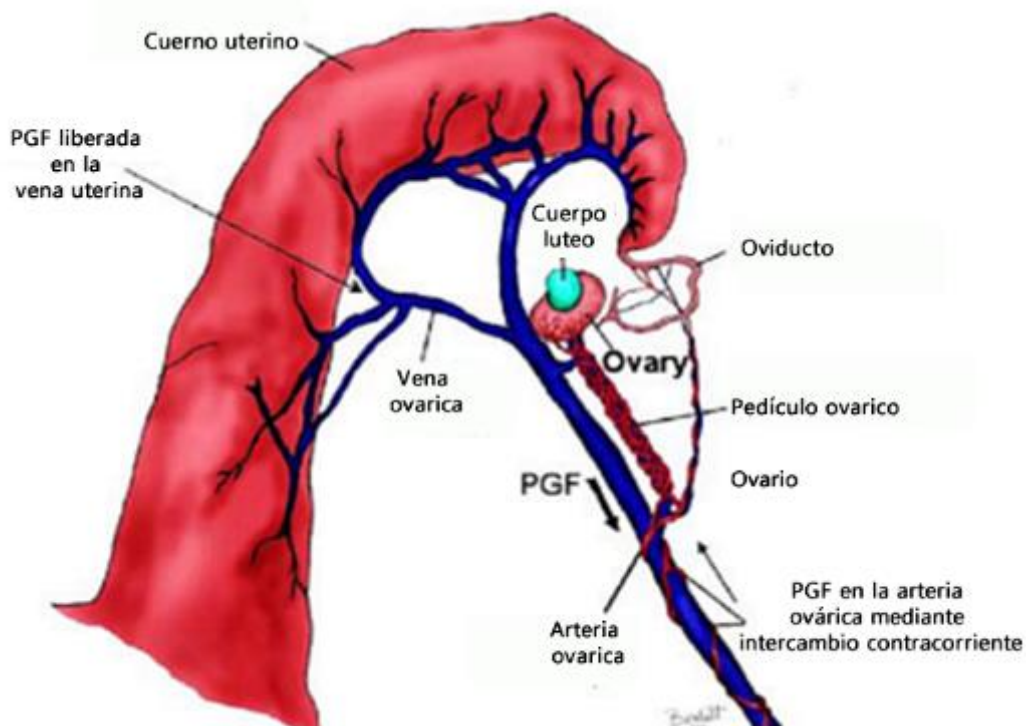


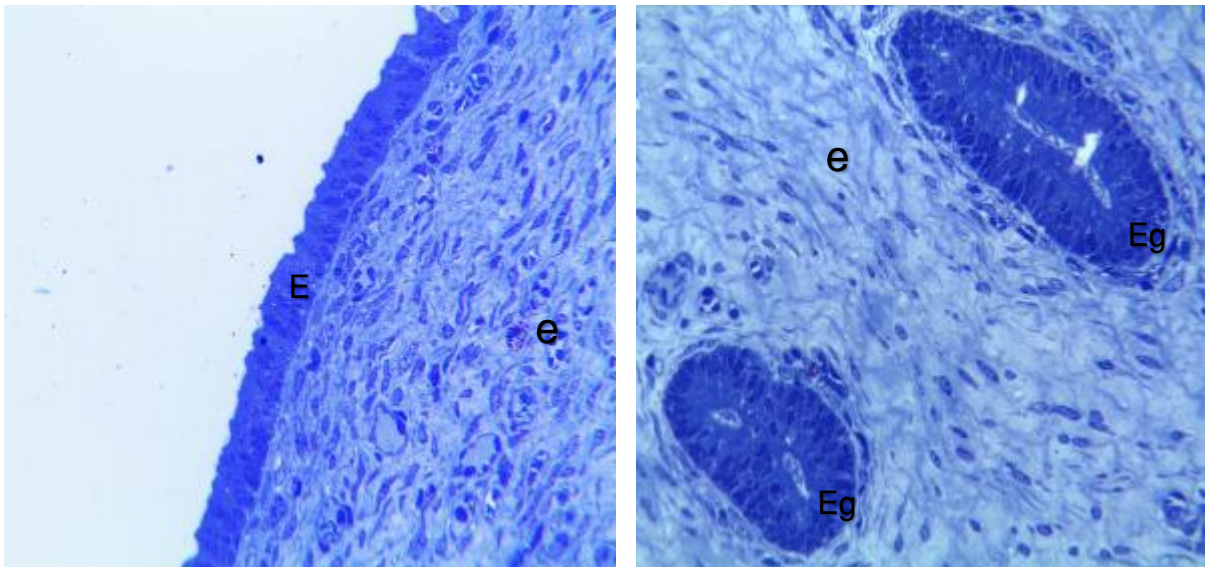
Figura 4 Vasculización del cuerno uterino de vaca. Modificado de Forde et al., 2011b.

#### 2.1.2.1.2.- Histología

La pared uterina varía desde 3 hasta 10 mm de espesor y se compone de tres capas: la capa interna o endometrio; una capa muscular, el miometrio; y la capa externa o serosa (McEntee 1990). En el endometrio de los cuernos uterinos existen unas áreas elevadas especializadas conocidas como carúnculas dispuestas en cuatro filas longitudinales, que son características de los rumiantes y éstas actúan

como puntos de unión de la placenta durante la gestación (Ball y Peters 2004).

La superficie de epitelio del endometrio es columnar pseudoestratificado no ciliado y el epitelio de las glándulas es columnar (Fig. 5). Las glándulas uterinas son estructuras tubulares en espiral, que se extienden hasta el miometrio. Los conductos de las glándulas se vuelven rectos a medida que pasan a través del estroma endometrial compacto debajo de la superficie del epitelio. Las glándulas uterinas se distribuyen de manera uniforme entre las carúnculas y por debajo de ellas. El estroma endometrial consiste en dos zonas: una zona relativamente estrecha y superficial, llamada zona compacta, esta zona formada por tejido fibroso, contiene numerosos vasos capilares; la otra zona profunda es mucho más amplia esta zona se le denomina estrato esponjoso. (McEntee 1990).



*Figura 5 Microscopía óptica de útero bovino. Corte transversal del epitelio endometrial. Epitelio glandular del útero bovino. Epitelio columnar (E), estroma (e), epitelio glandular (Eg).*

#### 2.1.2.1.3.- Transcriptoma

Las primeras investigaciones del transcriptoma del endometrio bovino estuvieron basadas en una combinación de ADNc e hibridación de matrices de ADNc, demostraron que algunos genes tienen una expresión diferencial entre las diferentes regiones del cuerno uterino

en el día 0 y 12 del ciclo estral (Bauersachs et al., 2005). En este mismo trabajo se realizó un análisis comparativo entre el estro y diestro del ciclo estral teniendo como resultado por lo menos 2 veces más expresión en estro respecto al diestro. El análisis completo de los fragmentos indicó que hasta 65 genes fueron diferencialmente expresados en el estro, una clasificación de la ontología de estos genes indicó que estos están relacionados con la adhesión celular, la motilidad celular y la matriz extracelular.

Los genes que mostraron mayor expresión diferencial en el estro fueron: la proteína de la leche uterina (UTMP), claudina 10 (CLDN), inhibina beta A (INHBA), metaloproteinasa de matriz 2 (MMP2), proteína convertasa 5 (PCSK5), ácido retinoico (RA), proteína del receptor de ácido retinoico respondedor 1 (RARRES1), proteína de la glándula salival 1 (SAL1) y la tenascina C (TNC). En la fase del diestro, se encontraron 68 genes con mayor expresión en esta fase. El análisis ontológico de estos genes mostró que se relacionan con ARN mensajeros que codifican para enzimas y proteínas de transporte, en particular las que están involucradas en los canales iónicos. Los transcritos con mayor expresión diferencial fueron el angiotensinógeno (GT), N/K ATPasa (ATP1B1), citocromo P450 (CYP26A1), diacilglicerol O-aciltransferasa (DGAT2), proencefalina (PENK) y el factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma 1 (TDGF1) (Bauersachs et al., 2005). Un análisis posterior se incluyeron las diferentes fases del ciclo estral (día 0, 3.5, 12, y 18 con concentraciones bajas de P4 "18 P4 Low" y altas "18 P4 High" de P4 en suero), los resultados demostraron que no hay unas diferencias significativas de expresión entre las muestras de los días 0, 18 P4 Low, la expresión génica en día 3,5 es un intermedio entre el estro y diestro para la mayoría de los genes analizados, mostrando mayores diferencias entre las muestras del día 12 y 18 P4 High. La agrupación de acuerdo con la correlación de sus perfiles de expresión pueden observarse en la figura 6.



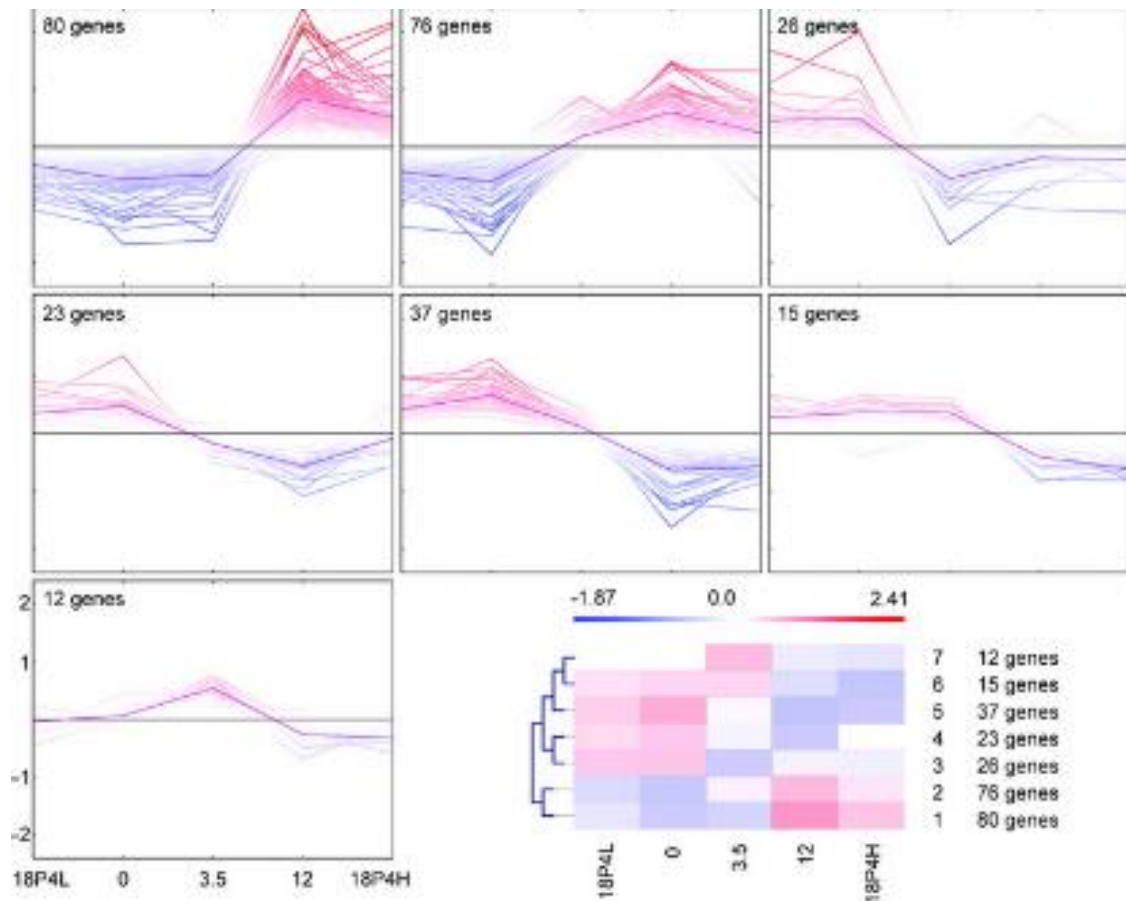


Figura 6 Agrupamiento por perfiles de expresión en el ciclo estral en endometrio bovino. Tomado de Mitko et al., 2008.

El análisis ontológico de los genes altamente expresados en la fase periovulatoria y que corresponde a la fase de estudio de tesis se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 Genes altamente expresados en fase periovulatoria (día 0 y "18 P4 Low") del endometrio bovino.

Categoría Gene Ontology GO	Número de genes	P valor
Región extracelular	29	<0,001
Transporte	28	<0,001
La matriz extracelular	13	<0,001
Transporte intracelular	13	<0,001
Establecimiento de localización de la proteína	10	0,005
Retículo endoplasmático	10	0,008
Parte del citoesqueleto	9	0,005

Regulación del crecimiento celular	8	<0,001
Morfogénesis celular	8	0,001
Organización del citoesqueleto y la biogénesis	8	0,003
Unión a IGF	5	<0,001
Transporte intracelular dependiente del citoesqueleto	5	<0,001
Actividad de factores de crecimiento	5	0,004
Movimiento basado en microtúbulos	4	<0,001
Microsoma	4	0,005
Actividad de la proteína disulfuro isomerasa	3	<0,001
Filamentos de actina	3	0,001
Vía de señalización neuropéptido	3	0,003
Regulación positiva de la I-kappa B quinasa / NF-kB en cascada	3	0,005

Tabla modificada de Mitko et al., 2008.

#### 2.1.2.1.4.- Proteoma

El proteoma uterino está compuesto de proteínas trasudadas de la sangre y por proteínas secretadas por el epitelio uterino (Roberts y Parker 1974). Las proteínas del suero sanguíneo se transfieren al lumen del útero tras atravesar el endotelio y el epitelio uterino, estas estructuras actúan como limitante para el flujo de moléculas del suero al fluido uterino (McRae 1988, Avilés et al., 2010). Los trabajos que han investigado la composición del proteoma del útero bovino son escasos. Los trabajos publicados hasta ahora se centran especialmente en el período preimplantacional (Forde et al., 2014, Beltman et al., 2014, Faulkner et al., 2013), otro se encarga del análisis comparativo entre las proteínas del plasma y las del fluido uterino en el día 7 del ciclo estral (Faulkner et al., 2012), dos trabajos más hacen una comparativa entre vacas gestantes y no gestantes (Berendt et al., 2005, Ledgard et al., 2009), desarrollo embrionario temprano (Muñoz et al., 2012a). En otro trabajo se analiza el efecto de los embriones sexados sobre el proteoma uterino (Gómez et al., 2013); pero hasta el día de hoy no hay ningún estudio que sea de nuestro conocimiento del proteoma uterino en las

diferentes fases del ciclo estral en el bovino. Basado en los trabajos anteriormente citados identificamos hasta 157 proteínas diferentes contenidas en el fluido uterino bovino (Anexo I).

### *2.1.2.2.- Oviducto*

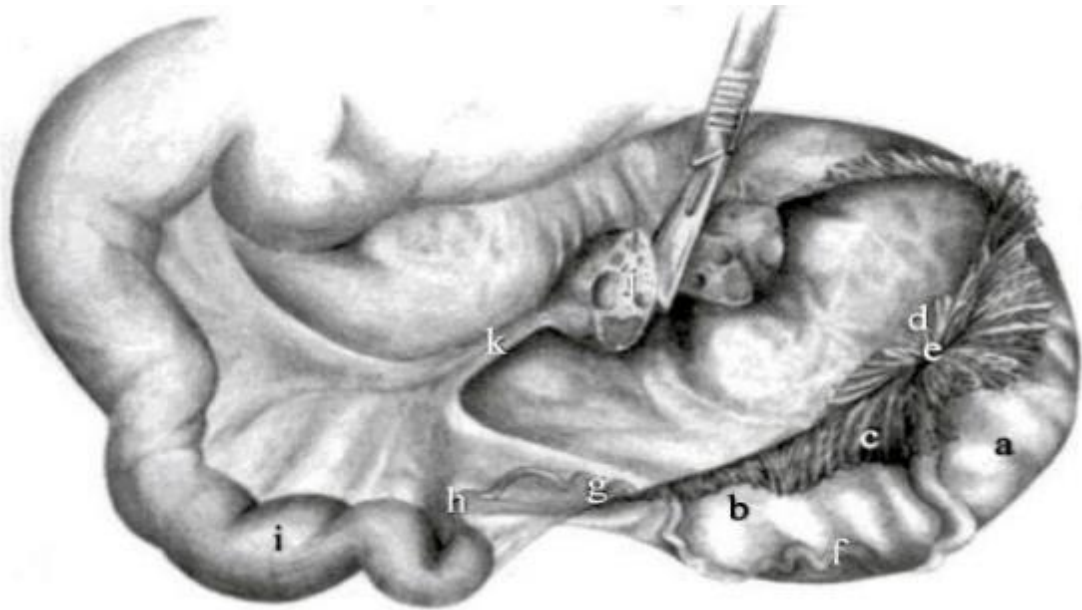
Los oviductos llamados así en los mamíferos o también llamados trompas de Falopio en los primates incluyendo la mujer, son un par de ductos que se extienden desde los ovarios hasta la porción más distal del útero. El oviducto juega un papel importante en el transporte, almacenamiento y adquisición de la capacidad fecundante de los gametos, bloqueo de la polispermia, así como para el desarrollo embrionario temprano (Hunter 1998, Holt y Fazeli 2010, Coy et al., 2012). El papel que desempeña el oviducto en los procesos reproductivos se discutirán a lo largo de esta revisión.

#### *2.1.2.2.1.- Anatomía*

En la vaca, el oviducto mide alrededor de 25-30 cm. Este desciende primero ventralmente al ovario y a bastante distancia de él asciende bruscamente hacia el centro de las espirales del cuerno correspondiente, hasta que termina en dirección caudal uniéndose al extremo de dicho cuerno (Fig. 7).

El oviducto de los mamíferos domésticos presenta cuatro regiones conocidas: infundíbulo, ámpula, istmo y la útero-tubárica (Hunter 1998). El infundíbulo es la estructura por la cual se conecta el ovario y el oviducto, es un estructura asimétrica en forma de embudo, que consta de prolongaciones digitiformes (fimbrias) adyacentes al ovario que permiten la captación del ovocito, estas fimbrias constituyen el tercio distal de esta porción del oviducto. Está porción también brinda una comunicación con la cavidad peritoneal (Yaniz et al., 2000, Yaniz et al., 2006). Este componente del oviducto tiene como finalidad el transporte de los ovocitos, (Yaniz et al., 2000, Yaniz et al., 2006). El infundíbulo muestra un borde anular que delimita su abertura; esta se muestra bordeada por numerosas placas o fimbrias tubáricas, una de

estas fimbrias adquiere un especial desarrollo y forma el ligamento tubo-ovárico. Este ligamento tiene una gran importancia a la hora de la recogida de los ovocitos en el momento de la ovulación. En el infundíbulo se abre el orificio abdominal de la trompa que marca el tránsito entre las partes infundibular y tubular del órgano.



*Figura 7 Representación esquemática del oviducto y las estructuras adyacentes en la especie bovina. Mesosalpinx (a); ligamento infundíbulo-cornual (b); lado ancho del infundíbulo (c); fimbrias (d); Infundíbulo (e); ampolla (f); Istmo (g); unión útero-tubárica (h); cuerno uterino (i); ovario (j); ligamento propio del ovario (k). Tomado de Yaniz et al., 2000.*

La ampolla es la porción media del oviducto y de mayor longitud, ocupa aproximadamente la mitad de la longitud total del oviducto, se extiende desde el infundíbulo hasta la unión istmo-ampular; esta región es de suma importancia, ya que en ella ocurre la fecundación (Hunter, 1998). El istmo forma el tercio proximal del oviducto y está adyacente al útero. En el istmo también ocurre la capacitación de los espermatozoides (Hunter, 1998). El sitio de unión con el útero se le llama unión útero-tubárica (UTJ) (Fig. 8).

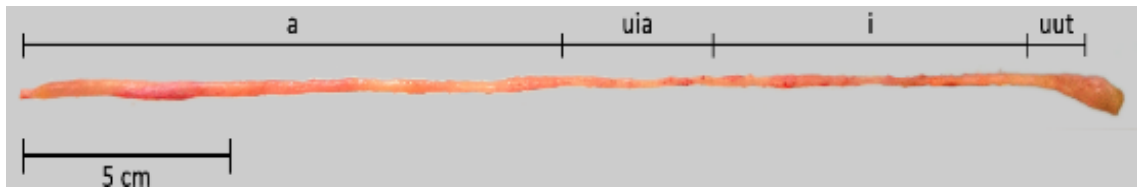


Figura 8 Diseción de oviducto bovino. Se muestra las tres regiones, ampolla (a), unión istmo-ampular (uia), istmo (i) y unión útero- tubárica (uut).

#### 2.1.2.2.2.- Histología del oviducto

La pared del oviducto se compone por tres capas de tejido; la túnica serosa o capa más externa, la túnica muscular o capa media, y la túnica mucosa o capa más interna (Fig. 9). La túnica serosa está compuesta por mesotelio que se continúa con el peritoneo, y el tejido conectivo. La túnica muscular consiste en una combinación de músculo longitudinal en la parte más externa y una capa interior de músculo circular. La capa muscular envuelve a la mucosa a lo largo de todo el oviducto. La túnica muscular es más gruesa en la región ístmica, cerca de la unión con el útero y gradualmente disminuye en espesor hacia la región ampular, finalmente desaparece en el infundíbulo (Muglia et al., 1997, Lombard et al., 1950).

La mucosa es una túnica de tejido altamente plegado, con cuatro a ocho pliegues en la región ístmica y hasta 40 en la región de la ampolla. En la ampolla estas rugosidades contienen ramificaciones secundarias y terciarias (Lombard et al., 1950). La mucosa está formada por un epitelio columnar simple y una lámina propia de tejido conjuntivo laxo.

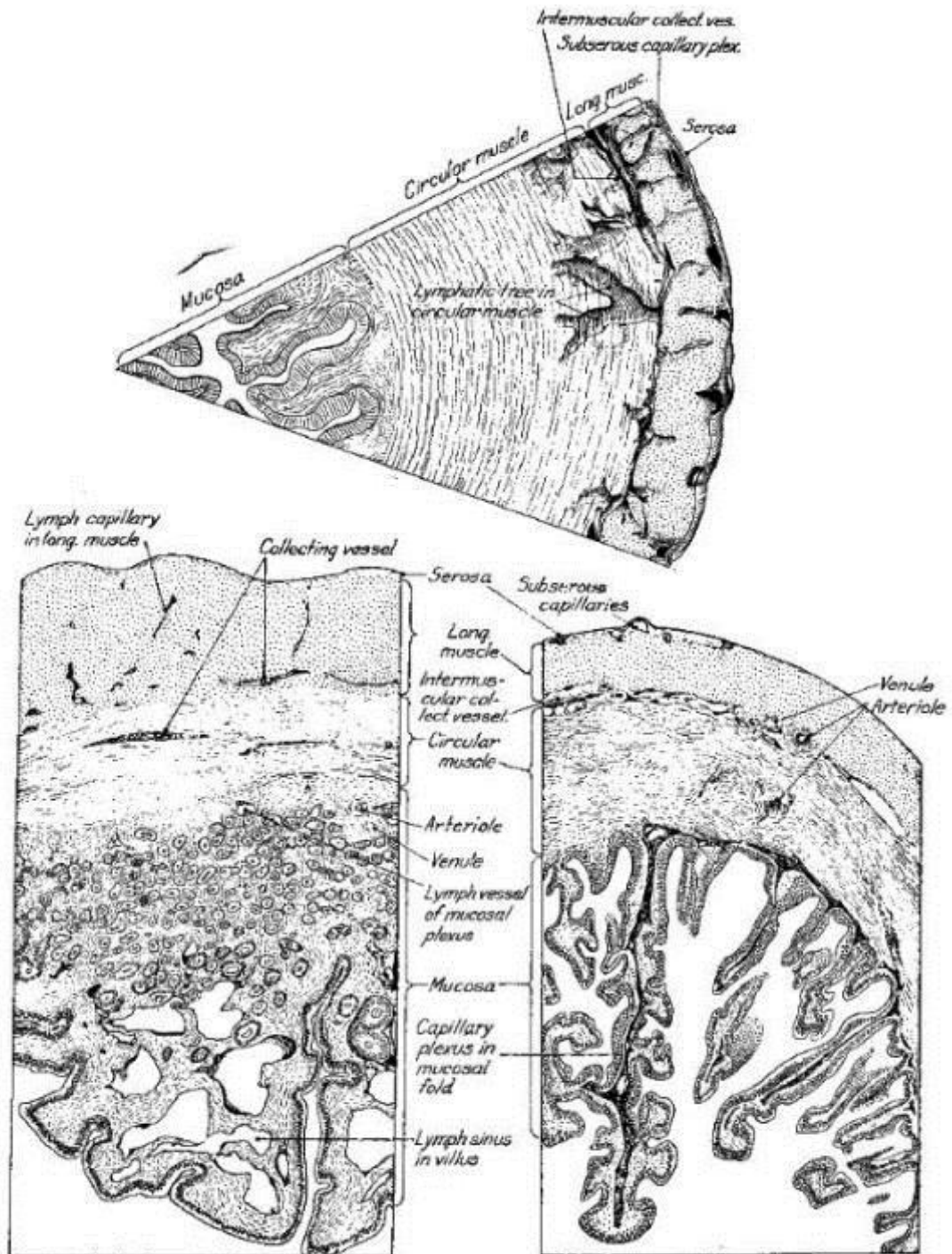


Figura 9 Esquema de la histología del oviducto de cerda. Secciones transversales del istmo (arriba), la unión útero-tubárica (izquierda), y de la ampolla (derecha). Tomado de Hunter, 1998.

El epitelio posee dos tipos de células, unas son ciliadas y las otras secretoras (Fig. 10). Los cilios se mueven en dirección al útero, provocando el movimiento de la capa de moco que recubre la superficie. Este líquido consta principalmente de productos de las

células secretoras, que están interpuestas entre las células ciliadas. Las células no ciliadas están abundantemente distribuidas a lo largo de la ampolla en muchas especies. La estructura interna de las células secretoras del oviducto es típica de las células que sintetizan proteínas activamente, con muchos gránulos de secreción (Brenner y Slayden 1994).

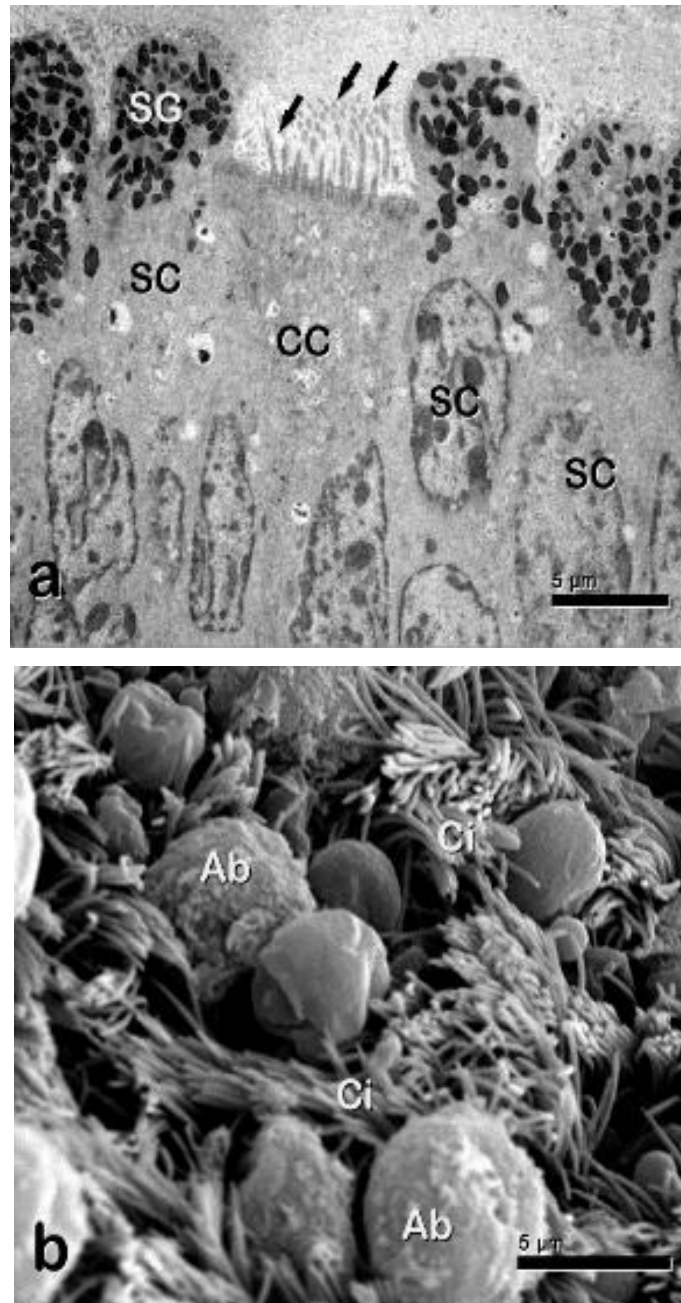


Figura 10 Imagen por TEM y SEM del oviducto bovino. Células epiteliales de la unión ampular ístmica (UAI) de oviducto bovino. Imagen de TEM de la mucosa del oviducto bovino embebido en epon (a). Imagen de SEM de la mucosa del oviducto en fase folicular tardía (b). Células ciliadas (CC), células secretoras (SC), gránulos secretores (SG) y cilios (CI). Bar: 5 µm.

La altura del epitelio y la actividad secretora de estas células llega a un máximo cerca del momento de la ovulación (Hunter 2012). (Fig. 11). Durante la fase folicular, especialmente cuando la ovulación está próxima, los tejidos del oviducto se vuelven progresivamente más tónicos, debido en parte a la condición edematosa de la mucosa y a la congestión de los vasos sanguíneos durante esta fase. Todo ello provoca la reducción de la permeabilidad del conducto por el plegamiento de los pliegues evidentes en la región del istmo (Hunter 2012).



*Figura 11 Representación esquemática del endosalpinx en la especie bovina al examen microscópico. Secciones transversales del istmo (a), Unión Istmo-Ampular (b), y la ampolla (c) Se demuestra el incremento comparativo de diámetro desde el istmo hasta la ampolla, así como el aumento de la altura relativa de los pliegues en cada uno. Un segmento longitudinal del sótano del istmo (d), Unión Istmo-Ampular (e), y la ampolla (f) demostrando las diferencias comparativas de dirección de los pliegues secundarios a lo largo de las paredes laterales, así como la estructura de cada segmento. Tomado de Yaniz et al., 2000.*



## 2.1.2.2.3.- Transcriptoma

El análisis del transcriptoma del oviducto en la especie bovina, permitió detectar los niveles de expresión génica de este órgano entre el estro y el diestro. Los resultados revelaron que hasta 37 genes fueron diferencialmente expresados en el estro y 40 en el diestro (Bauersachs et al., 2004), en la figura 12 se observa la clasificación de "Gene Ontology" (GO). En este trabajo también se comprobó que la proteína OVGP1 fue la más altamente expresada por la células epiteliales oviductales hasta 2.7 veces comparando con las otras sondas incluidas en el análisis. Este mismo grupo realizó un análisis comparativo de la expresión génica del oviducto ipsilateral y contralateral, teniendo como resultado 35 genes diferencialmente expresados, de los cuales 27 se corresponden a ipsilateral y 8 en el oviducto contralateral (Bauersachs et al., 2003).

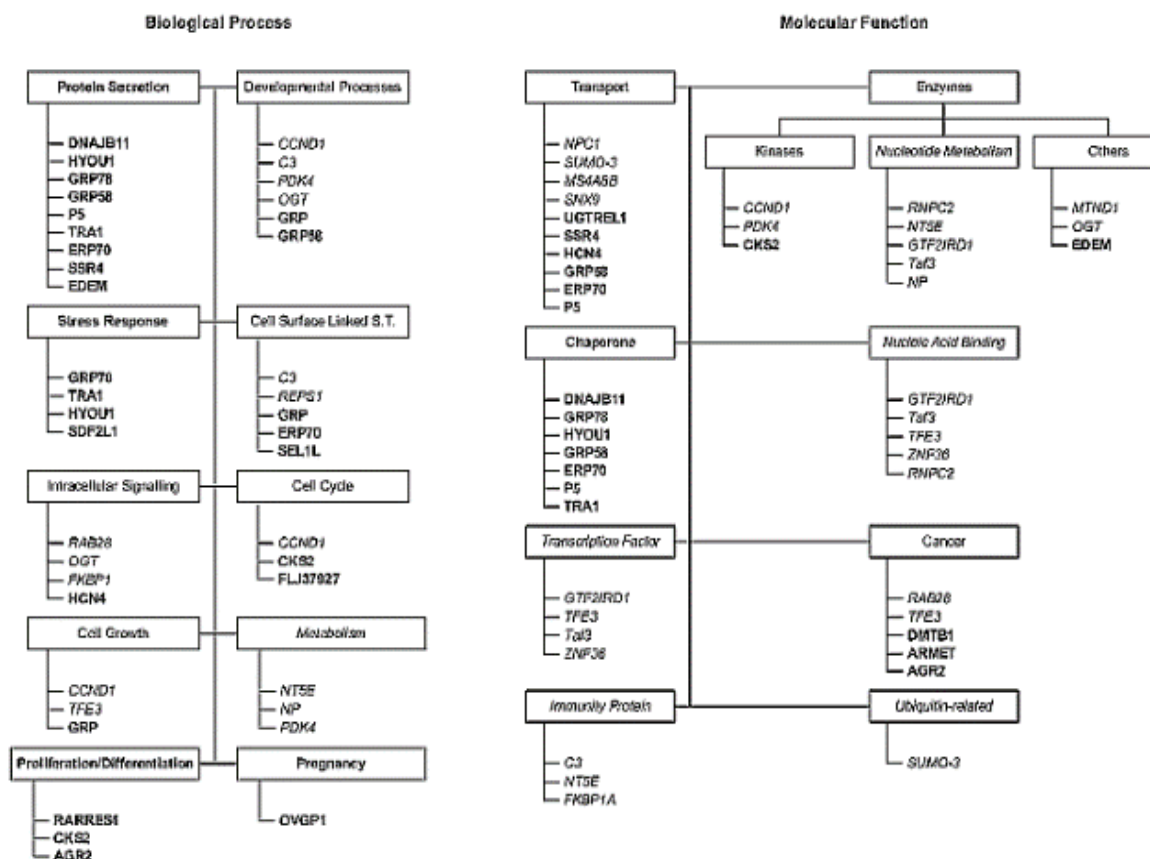


Figura 12 Esquema de GO de genes expresados diferencialmente en estro y diestro en el endometrio bovino. Tomado de Bauersachs et al., 2004.

Un análisis *in silico* realizado en nuestro laboratorio de datos de micromatrices de oviducto humano (Tone et al., 2008) ("*Gene Expression Omnibus*" (GEO) con numero de acceso GSE10971), demostró que hasta 5703 genes son expresados por el oviducto humano en la fase folicular (Mondejar et al., 2012), al hacer la clasificación con la herramienta bioinformática DAVID 6.7 (Huang et al., 2009a, Huang et al., 2009b) de estos genes nos encontramos que hasta 245 genes fueron clasificados como que sintetizan a proteínas "Secretadas" (Fig. 13).

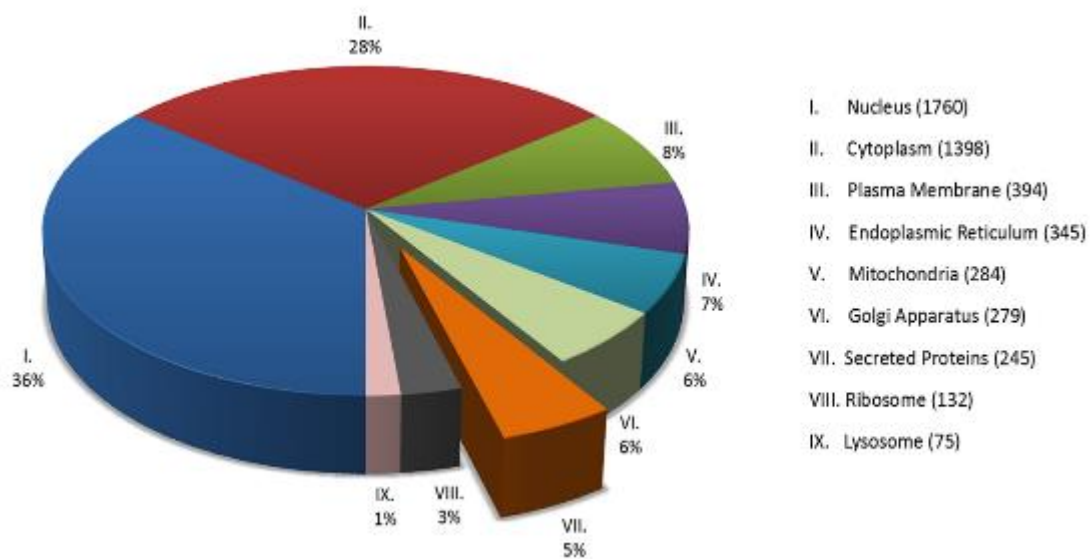


Figura 13 Clasificación por localización de genes expresados en la trompa de Falopio normal (GEO: GSE10971). Se observa la agrupación de genes de acuerdo a la clasificación de la herramienta bioinformática DAVID. Tomado de Mondejar et al. 2012.

El análisis ontológico posterior fue realizado con la herramienta DAVID, este se muestra en la figura 14.

En este mismo trabajo y con datos publicados del oviducto bovino (diestro, estro y metaestro) (Bauersachs et al., 2003, Bauersachs et al., 2004) y datos propios de oviducto porcino, se observó que hay una cierta homología (81 trascritos) entre la expresión génica de las tres especies estudiadas (Fig. 15). Sin embargo, los datos de bovino eran datos de genes que hasta ese momento se había detectado su expresión en el bovino y aunado a la baja anotación de la base de datos porcino se espera que en la actualidad esta homología sea mucho mayor.

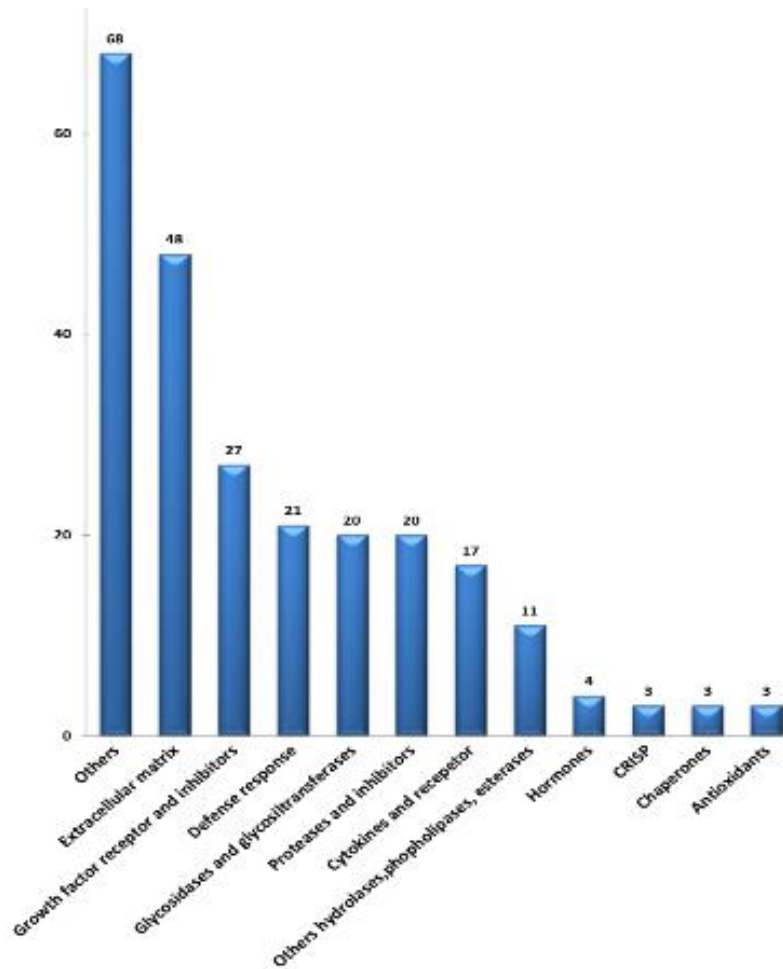


Figura 14 Agrupación funcional de los genes clasificados como "secretados" utilizando DAVID con datos de las trompas de Falopio normales. Tomado de Mondejar et al., 2012.

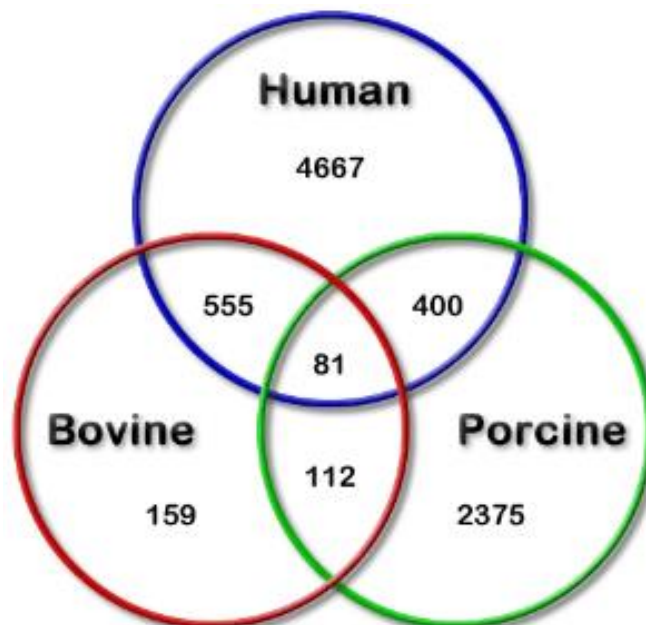


Figura 15 Diagrama de Venn que muestra la superposición de genes expresados oviducto de humano, bovino y porcino. Tomado de Mondejar et al., 2012.

Se ha descrito que el tracto genital femenino tiene un efecto positivo sobre el potencial de fecundación de los espermatozoides que han sido alterados genéticamente (Kawano et al., 2010, Turunen et al., 2012). En el ratón, Kawano et al., en el 2010 describieron la infertilidad *in vitro* de ratones knockout de los genes  $Acr^{-/-}$  y  $Prss21^{-/-}$ , una vez que estos espermatozoides fueron incubados con fluido uterino, estos recuperaron la capacidad fecundante *in vitro* hasta en un 20%. En tanto Turunen et al., en el 2012, también en el ratón observaron una disminución del 80% en la fecundación *in vitro* con espermatozoides knockout  $Crisp4^{-/-}$  en comparación con el tipo salvaje, aunque los ratones permanecen completamente fértiles al apareamiento normal. Estos resultados demuestran que el tracto femenino contribuye a mejorar la calidad de los espermatozoides.

Algunos indicios del papel que desempeña el tracto genital femenino en el rescate de los espermatozoides, se dio al observar que proteínas descritas inicialmente en el tracto masculino también eran sintetizadas en el útero o el oviducto. Tal es el caso de la proteína Spam1 que fue descrita en el oviducto y útero del ratón (Zhang y Martin-DeLeon 2003b). En nuestro laboratorio hemos detectado la expresión de ARNm de SPAM1 en oviducto de cerda y vaca (Acuña et al., 2011), también detectamos la proteína SPAM1 en el fluido oviductal bovino (Acuña et al., 2014a) y en los exosomas aislados del fluido oviductal de esta misma especie (Acuña et al., 2014b).

#### 2.1.2.2.4.- Fluido oviductal

El fluido del oviducto es una mezcla compleja de proteínas específicas secretadas por el oviducto, trasudado del suero sanguíneo y electrolitos (Leese 1988, Avilés et al., 2010, Leese et al., 2008). El fluido de oviducto contiene una variedad de iones, azúcares, proteínas y lípidos (Killian et al., 1989, Hugentobler et al., 2010, Hugentobler et al., 2008). En la vaca el fluido del oviducto se produce a una velocidad de 0,2 ml por día en diestro y en 2,0 ml por día en estro (Roberts et al., 1975), por tanto el volumen del fluido en el lumen del oviducto es

dependiente del ciclo estral (Fig. 16), teniendo mayor volumen durante la fase folicular (Hunter 2012).

La composición del fluido del oviducto ha sido revisada por Leese et al., en 2008 y Avilés et al., en 2010. Las proteínas constituyen un importante componente de este fluido. Muchas proteínas presentes provienen del trasudado del suero, en las que se incluyen albúminas,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -globulinas y lipoproteínas de alta densidad (Tabla 2) (Stanke et al., 1974). Por otro lado, estudios realizados *in vitro* en cultivos celulares de células de epiteliales oviductales han demostrado que el oviducto tiene la capacidad de sintetizar y secretar una gran variedad de proteínas y péptidos.

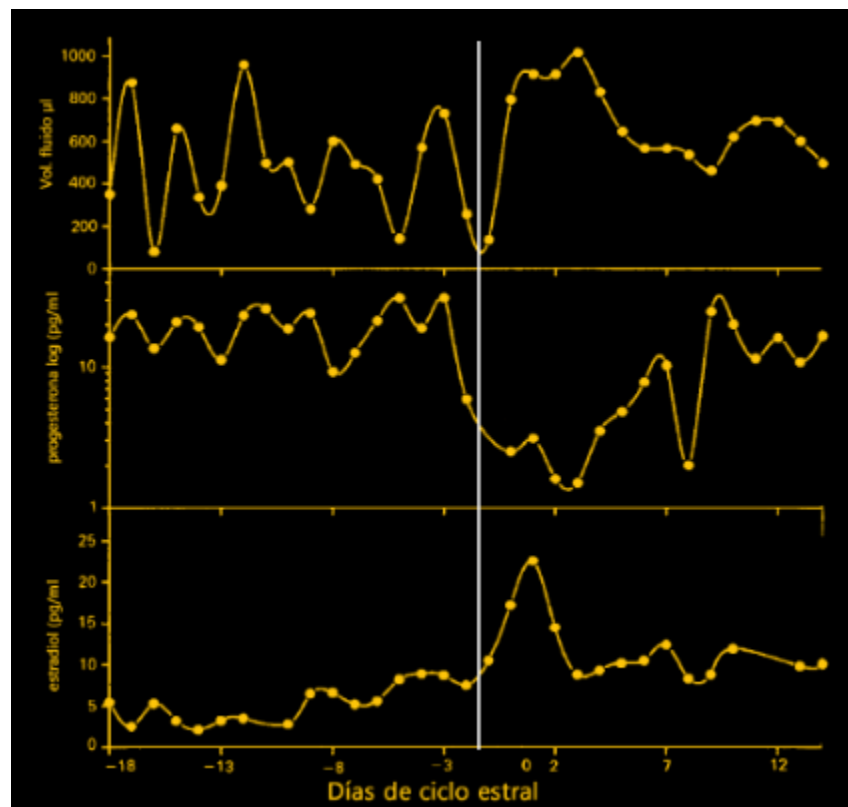


Figura 16 Cambios del volumen fluido del oviducto de las vacas durante el ciclo estral. Los volúmenes máximos de fluido se produjeron inmediatamente después del estro (línea blanca) y correspondían a bajas concentraciones de progesterona, y un pico de estradiol. Modificado de Killian et al., 1989.

Tabla 2 Concentraciones de proteínas totales, albúmina,  $\alpha$ -globulina,  $\beta$ -globulina y  $\gamma$ -globulina en fluido del oviducto bovino.

Estado de ciclo	Proteína total	Albúmina	$\alpha$ -globulina	$\beta$ -globulina	$\gamma$ -globulina	Ratio albúmina globulinas
Estro	5-20 $\pm$ 0-80	2-18 + 0-27	0-67 + 0-09	0-64 + 0-12	1-71 $\pm$ 0-33	0-73 $\pm$ 0-05
Metaestro	4-04 $\pm$ 0-32	1-84 $\pm$ 0-12	0-28 $\pm$ 0-04	0-50 $\pm$ 0-05	1-42 $\pm$ 0-16	0-82 $\pm$ 0-06
Diestro	4-76 $\pm$ 0-20	2-06 $\pm$ 0-08	0-56 + 0-04	0-63 $\pm$ 0-05	1-51 $\pm$ 0-09	0-78 $\pm$ 0-03
Proestro	5-01 $\pm$ 0-60	2-17 + 0-18	0-64 + 0-10	0-64 $\pm$ 0-06	1-56 $\pm$ 0-27	0-78 $\pm$ 0-06

Los valores se expresan en g/100 ml y se expresan como medias  $\pm$  SE modificado de (Stanke et al., 1974).

La mayoría de las proteínas sintetizadas en el oviducto también se encuentran sintetizadas en otros tejidos, pero hay también unas proteínas específicas del oviducto, descritas en diferentes especies, como en el humano (Verhage et al., 1988), cerdo (Buhi et al., 1990) y vaca (Boice et al., 1990, Gerena y Killian 1990). Dentro de este grupo de proteínas sintetizadas por el oviducto están la glicoproteína específica del oviducto (OVGP1 o Muc9), la osteopontina, integrinas (Gabler et al., 2003), haptoglobina (Lavery et al., 2003), catalasa (Lapointe et al., 1998), glutatión peroxidasa (Lapointe et al., 2005), superoxidodismutasa (Roy et al., 2008), proteínas de matriz extracelular, activador e inhibidor del plasminógeno (Gabler et al., 2001), clusterina, IgA, proteína de choque térmico 70 kDa, antioxidantes (Lapointe y Bilodeau 2003) y varios factores de crecimiento (Gandolfi 1995).

### 2.1.2.3 Efecto del tracto genital femenino en el espermatozoide

#### 2.1.2.3.1.- Transporte espermático

El paso de los espermatozoides por el tracto reproductor femenino está regulado para maximizar las posibilidades de fecundación y asegurarse de que los mejores espermatozoides sean capaces de llevar a cabo la fecundación con éxito. Puesto que, la

anatomía del tracto genital femenino y los tiempos diferentes en la duración del estro de los mamíferos, el tiempo que permanece el espermatozoide desde la cópula o la inseminación artificial (IA) hasta la fecundación es muy variable. Así, en la especie bovina, el espermatozoide tiene que recorrer el tracto genital desde el fórnix vaginal donde son depositados tras la cópula; en cambio durante la IA, los espermatozoides pueden ser depositados en el cérvix o en el cuerpo del útero (Ball y Peters, 2004).

Varias regiones anatómicas del tracto femenino representan barreras físicas a la progresión de los espermatozoides a través de su tránsito por este. En la mayoría de las especies de mamíferos el cuello uterino y la UTJ juegan un papel en la selección de los espermatozoides (Druart 2012), especialmente en el bovino el cérvix vaginal se ha sugerido que sirve como depósito de espermatozoides (Mattner 1968, Hawk y Conley 1975) revisado por Suarez y Pacey en 2006. Se observó que hasta después de 12 horas tras la IA se recuperaron espermatozoides del cérvix (Mitchell et al., 1985). Sin embargo, este mecanismo no se ha descrito del todo, pero hasta el momento no se ha informado que se asocie a una interacción directa entre las células epiteliales de cuello uterino y los espermatozoides (Rath et al., 2008).

Se ha demostrado que el moco cervical juega un papel central en el control de la migración de los espermatozoides (Druart 2012). Este moco puede servir para guiar a los espermatozoides a través de su microarquitectura (Suarez y Pacey 2006). Este moco principalmente está compuesto por una fracción acuosa y otra de glicoproteínas (Panicker et al., 2010) como las sialomucinas y en menor medida por sulfomucinas (Heydon y Adams 1979). Sin embargo, se ha comprobado recientemente en el humano que hasta 79 proteínas han sido identificadas en el moco cervical (Panicker et al., 2010). La composición del moco cervical está sujeto a cambios morfológicos y bioquímicos durante el estro (Suarez y Pacey 2006, Pluta et al., 2011). Se observó un aumento en el contenido de mucinas neutras y ácidas 48 horas después del inicio del estro, así

como una mayor actividad de  $\beta$ -galactosidasa y sialidasa 12 horas después del inicio del estro (Pluta et al., 2011). En el período del estro el moco es más hidratado permitiendo así una mayor penetrabilidad de los espermatozoides en la fase preovulatoria (Katz et al., 1997, Suarez y Pacey 2006); contrariamente durante la fase con elevadas concentraciones de progesterona, el moco es menos acuoso y casi impenetrable para los espermatozoides. Además la densidad de este moco durante la fase lútea impide la migración de la microflora vaginal nociva hacia el útero (Pluta et al., 2012).

Los espermatozoides tienen que recorrer el cuerpo del útero y los cuernos uterinos antes de llegar a la UTJ. De acuerdo a la velocidad calculada de nado de los espermatozoides (7 mm/min.) (Suarez et al., 2006) los espermatozoides depositados en el tracto femenino tardarían alrededor de una hora para llegar a la UTJ si estos nadaran directamente hasta ahí; sin embargo, para que haya la cantidad de espermatozoides suficientes para lograr la fecundación es necesario un tiempo de < 8 horas (Hunter y Wilmut 1983, Wilmut y Hunter 1984). A esta forma de transporte se le denomina activa. La forma pasiva de transporte de los espermatozoides involucra las contracciones del miometrio. En vacas y ovejas en estro se demostró con electromiografía del útero que hay una fuerte actividad contráctil en este período, mientras que la actividad disminuye durante la fase luteal (Hawk 1987).

En su paso por tracto genital femenino los espermatozoides deben de sortear la respuesta inmune de la hembra. Los espermatozoides contenidos en eyaculados después del coito, están parcialmente protegidos por el líquido seminal, que los protege de ser fagocitados (Suarez y Oliphant 1982). La cantidad de leucocitos presentes en el útero va en aumento a medida que avanza el tiempo hasta superar en número a los espermatozoides, además estos van perdiendo el recubrimiento del plasma seminal. Por ello es de suma importancia que estos atraviesen rápidamente la cavidad uterina para evitar que sean fagocitados (Suarez et al., 2006). Esta protección del



plasma seminal ante los ataques del útero a los espermatozoides, se observó en el ratón, donde la ausencia de la proteína de secreción de vesícula seminal 2 (SVS2) disminuía enormemente la fertilidad *in vivo* (Kawano et al., 2014). Los espermatozoides muertos en el útero de ratones knockout SVS2<sup>-/-</sup> tenían una membrana ampliamente interrumpida, lo que indicaba que la muerte no había sido provocada por una reacción acrosómica (Kawano et al., 2014).

En la mayoría de las especies, la unión útero tubárica es el principal lugar de almacenamiento de los espermatozoides. Algunos estudios sugieren que el reservorio del oviducto se nutre por un depósito más grande en útero (Pursel et al., 1978). En la especie porcina, se ha demostrado la unión de los espermatozoides a las células epiteliales de la UTJ (Rodríguez-Martínez et al., 1990, Lovell y Getty 1968). Se ha apuntado que los espermatozoides viables se adhieren a las células epiteliales y que esto es parte del proceso de selección del tracto genital femenino (Taylor et al., 2008). Se describió que los espermatozoides que se unían a las células epiteliales mostraban una ultraestructura normal, a diferencia de los espermatozoides que no se unían y presentaban una membrana plasmática dañada (Rodríguez-Martínez et al., 1990).

Otra barrera es la anatomía complicada de la UTJ que evita el mayor ascenso de los espermatozoides; ya que cuenta con pliegues en forma de saco (Yaniz et al., 2000) y un lumen estrecho a forma de válvula (Wrobel et al., 1993). Un factor adicional que los espermatozoides deben sortear, podrían ser las proteínas de superficie del espermatozoide o proteínas de unión, pueden ser requeridos por el espermatozoide para pasar a través de la UTJ; sin embargo, no está del todo esclarecido. En el ratón se ha demostrado que espermatozoides knockout en diferentes genes fueron incapaces para superar la UTJ y perdieron la capacidad de unirse a ZP. Tal es el caso de Calmegin (Ikawa et al., 2001), Calsperin (Ikawa et al., 2011), Adam1a (Nishimura et al.,

2004), Adam2 (Cho et al., 1998), Adam3 (Yamaguchi et al., 2009), PGAP1 (Ueda et al., 2007) y PDILT (Tokuhiko et al., 2012).

#### 2.1.2.3.2.- Reservorio espermático

Se demostró por primera vez en el hámster que los espermatozoides son atrapados al entrar en el istmo oviductal (Yanagimachi y Chang 1963). También fue descrito este reservorio oviductal en otras especies de mamíferos como la vaca (Hunter y Wilmut 1984), cerda (Hunter 1981) y oveja (Hunter y Nichol 1983). El oviducto proporciona una especie de refugio, ya que a diferencia de los otros órganos del aparato reproductor femenino, no hay afluencia de leucocitos (Rodríguez-Martínez et al., 1990). En la vaca, se demostró que los espermatozoides mantienen su viabilidad y su capacidad de fecundación después de permanecer en el reservorio (Pollard et al., 1991, Suarez 2008). Este reservorio tiene un efecto en la reducción de la poliespermia porque evita que un excesivo número de espermatozoides estén presentes en el sitio de la fecundación, debido a que los espermatozoides son liberados muy gradualmente durante el período periovulatorio (Hunter 1973, Hunter y Leglise 1971), permitiendo con ello asegurar que los espermatozoides estén disponibles en un estado fértil en el momento de la ovulación (Suarez 2008).

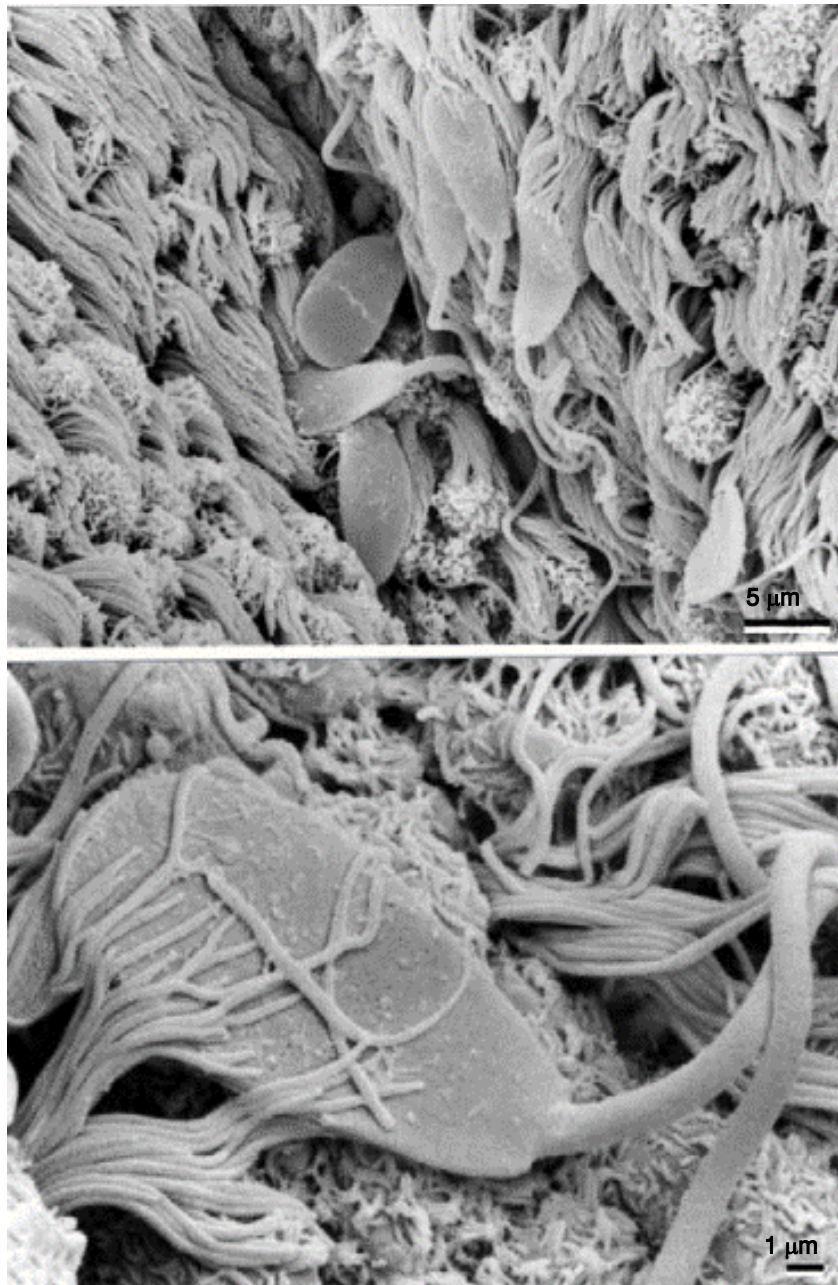
Se ha observado que los espermatozoides móviles se unen con la cabeza a la parte apical de las células epiteliales del oviducto (Fig. 17). Diversos trabajos han estudiado las moléculas implicadas en la unión de los espermatozoides al epitelio del oviducto, se ha observado que las proteínas de unión del espermatozoide o "*binding sperm proteins*" (BSP) están involucradas en este proceso (Gwathmey et al., 2003). Las proteínas BSP están localizadas en la cabeza de los espermatozoides y son adquiridas por los espermatozoides al ser eyaculados; debido a que estas proceden de las vesículas seminales.

Se sabe que las BSP componen aproximadamente el 70% del contenido total del líquido seminal (Nauc y Manjunath 2000, Manjunath y Sairam 1987). Cuando el espermatozoide de toro entra en contacto con las secreciones vesiculares del plasma seminal, las proteínas BSP se adhieren a la superficie de este, mediante la asociación con los fosfolípidos de la membrana plasmática (Desnoyers y Manjunath 1992, Hung y Suarez 2010, Suarez 2008, Gwathmey et al., 2006).

Previamente se ha descrito en la especie bovina que la interacción del epitelio con las células epiteliales del oviducto está mediada por mecanismos de reconocimientos de carbohidratos (Lefebvre et al., 1997). El azúcar fucosa presente en el trisacárido Lewis-a, fue identificado como un componente clave en la unión del espermatozoide al oviducto (Suarez et al., 1998). Utilizando este trisacárido en una cromatografía de afinidad se determinó que la principal proteína de unión fue la proteína PDC-109 o BSP-A1/A2 (Ignotz et al., 2001, Gwathmey et al., 2003) que es una proteína BSP. La proteína BSP-A1 tiene un peso molecular aproximado de 16 kDa y consta principalmente de dos dominios tipo fibronectina II. Posteriormente, en experimentos realizados *in vitro* se demostró que las proteínas BSPA3 y BSP30K, también podían participar la unión de los espermatozoides al epitelio oviductal (Gwathmey et al., 2006).

Se plantea que las diferentes BSP de la superficie de los espermatozoides se unan al epitelio del oviducto con diferentes afinidades y cinéticas (Hung y Suarez 2010). Además de su participación en la unión al epitelio oviductal, se demostró que la BSP-A1/A2 interviene en mantener la fertilidad de los espermatozoides durante su almacenamiento en la mucosa oviductal; ya que reduce la fluidez de la membrana e inmoviliza el colesterol en las membranas de fosfolípidos, incluyendo las de los espermatozoides (Greube et al., 2001). Esta puede contribuir a la estabilidad de la membrana por inhibición de la actividad de la fosfolipasa A2 (Manjunath et al., 1994, Soubeyrand y Manjunath 1997). Por lo tanto, la proteína BSP-A1/A2 puede desempeñar un papel

en la preservación del espermatozoide mientras se almacenan en el reservorio (Suarez et al., 2006).



*Figura 17 SEM de esperma bovino y epitelio oviductal bovino. Los espermatozoides bovinos entre los pliegues del epitelio oviductal (a). Espermatozoide asociado con los cilios del epitelio (b). Tomado de Lefebvre et al., 1995.*

Los receptores en el epitelio oviductal para las proteínas BSP son las llamadas anexinas, esto se demostró cuando se utilizaron las proteínas BSP para ligar a las proteínas extraídas de membranas plasmáticas de células epiteliales del istmo bovino y se reconocieron cuatro anexinas (ANXA1, ANXA2, ANXA4 y ANXA5) (Ignotz et al., 2007). Hasta tres de estas anexinas (ANXA1, ANXA2 y ANXA5) fueron descritas en el oviducto porcino (Teijeiro et al., 2009), por lo que se sugiere que es un mecanismo compartido en diferentes especies. Las anexinas pertenecen a una familia de proteínas que se unen a fosfolípidos y proteínas de unión a membrana en presencia de  $Ca^{2+}$  (Rescher y Gerke 2004).

En la especie bovina, los espermatozoides se almacenan en la región ístmica del oviducto durante 18 a 20 horas antes de ser liberados para ascender a la ampolla. Los espermatozoides son liberados poco antes de que ocurra la ovulación (Hunter y Wilmut 1984). Es probable que los cambios hormonales que desencadenan la ovulación también estimulan la liberación de factores en el oviducto que causan cambios en el espermatozoide, que permiten que se liberen a sí mismos del epitelio oviductal (Hung y Suarez 2010). Hay evidencias que dos mecanismos intervienen para que los espermatozoides sean liberados: la hiperactivación y liberación de proteínas de la superficie de espermatozoides durante la capacitación.

#### 2.1.2.3.3.- Capacitación espermática

Los espermatozoides después de la maduración en el epidídimo aún no tienen la capacidad de fecundar. Los primeros estudios que demostraron esta teoría fueron descubiertos después de descubrir que los espermatozoides requerían de una maduración adicional (Chang 1951), esto se comprobó cuando se observó *in vivo* que los espermatozoides recién eyaculados eran incapaces de fecundar los ovocitos hasta que los espermatozoides hubieran permanecido durante un período de tiempo dentro del tracto femenino (Austin 1951, Austin 1952) y cuando mostrando un serie de cambios en su membrana

plasmática y habían cambiado su patrón de motilidad (hiperactivación); estos espermatozoides pueden ser llamados como "capacitados" (Austin 1952). La capacitación se puede definir como un proceso fisiológico que implica modificaciones, bioquímicas, biofísicas y metabólicas de los dominios del espermatozoide, resultando en modificar la arquitectura y permeabilidad de la membrana plasmática, lo que finalmente modula la actividad flagelar y que hace que la cabeza apical de la membrana plasmática del espermatozoide pueda fusionarse con el ovocito y llevar a cabo la fecundación (Rodríguez-Martínez 2007).

La capacitación espermática *in vivo* es un proceso que es complicado de confirmar; sin embargo, algunos eventos han sido descritos. Se sabe que la capacitación es un proceso que se lleva a cabo en el útero y oviducto en diferentes especies (Yanagimachi 1994b). En el bovino se observó que la capacitación comienza durante la migración de los espermatozoides a través del útero, pero se completa en el oviducto (Parrish et al., 1989).

Los espermatozoides son secuencialmente expuestos a los fluidos del útero y oviducto, estos fluidos son capaces de regular la velocidad del proceso de capacitación. Este es un proceso de coordinación activa y específica de las diferentes regiones del útero y oviducto, cuya finalización está sincronizada al período de ovulación (Hunter y Rodríguez-Martínez 2004). Estudios *in vivo* en la especie porcina demostraron que la capacitación espermática no es un evento que ocurre masivamente en el tracto femenino en el período pre- y peri-ovulatorio; pero si se observó un aumento significativo de espermatozoides capacitados durante el período postovulatorio (Tienthai et al., 2004).

#### 2.1.2.3.3.1.- *Modificación de la membrana plasmática del espermatozoide*

En la especie bovina, las proteínas BSP interactúan específicamente con la heparina y con lipoproteínas de alta densidad, potenciando la capacitación espermática y estimulando la salida de

colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática. La pérdida de colesterol de la membrana espermática es un importante paso en el proceso de capacitación (Manjunath y Therien 2002). Antes de la capacitación, el colesterol se concentra en la membrana plasmática de los espermatozoides en microdominios especializados conocidos como balsas de lípidos. Estos microdominios ricos en esterol, son centros de organización que afectan a la distribución de proteínas de la membrana, a la activación de receptores y a la activación de cascadas de señalización (Simons y Ikonen 1997).

Los componentes de los fluidos del tracto genital femenino como el fluido uterino pero principalmente el fluido oviductal, son capaces de eliminar el colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Visconti et al., 1998). Algunas proteínas que participan en estas modificaciones son la albúmina, se cree que la albúmina actúa durante la capacitación *in vitro* para la eliminación del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Go y Wolf 1985, Davis et al., 1979), otro grupo de proteínas que participan en este proceso de reorganización son los glicosaminoglicanos (GAGs), que son muy similares a la heparina probablemente sulfato de heparan (Parrish et al., 1994). Los GAGs probablemente se encuentran en las células epiteliales del oviducto como proteoglicanos (Parrish 2014), estos pueden promover la capacitación mediante la unión y la eliminación de proteínas del plasma seminal (BSP-A1/A2, BSP-A3 y BSP-30-kDa) contenidas en la membrana plasmática del espermatozoide y se cree que inhiben la capacitación (Miller et al., 1990, Therien et al., 1995).

Las proteínas BSPs también interactúan con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) para apoyar la salida del colesterol desde la membrana de los espermatozoides (Ehrenwald et al., 1990). Trabajos realizados con espermatozoides de toro, demostraron que la incubación de los espermatozoides con fluido oviductal causó la transferencia neta de aproximadamente el 25% del colesterol de los espermatozoides a las HDL (Ehrenwald et al., 1990).

La restructuración de los lípidos de la membrana plasmática, permiten que su permeabilidad se vea incrementada a los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en la cabeza de los espermatozoides (Parrish et al., 1999). La capacitación *in vitro* en presencia de heparina sugiere que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  es crítico para la capacitación durante las primeras dos horas de exposición a la heparina (Parrish et al., 1999).

#### 2.1.2.3.3.2.- Fosforilación de proteínas

La aparición de fosfoproteínas es un evento tardío (> 60 min) en el proceso de capacitación y se correlaciona con el inicio de la fertilidad y con el desarrollo de la capacidad de someterse a la reacción acrosómica (Visconti et al., 1995, Visconti et al., 2002). La capacitación espermática también se asocia con un aumento en la fosforilación de la tirosina (Salicioni et al., 2007), esta fosforilación depende de la albúmina (BSA, *in vitro* en medios capacitantes) y  $\text{Ca}^{2+}$  (Visconti 2009). La capacitación es dependiente de la activación de la vía de señalización de AMP cíclico (cAMP) y la proteína quinasa A (PKA) (Fig.18). Esta fosforilación se ha implicado en la aparición de la hiperactivación de la motilidad, una de las características de la capacitación de los espermatozoides (Naz y Rajesh 2004).

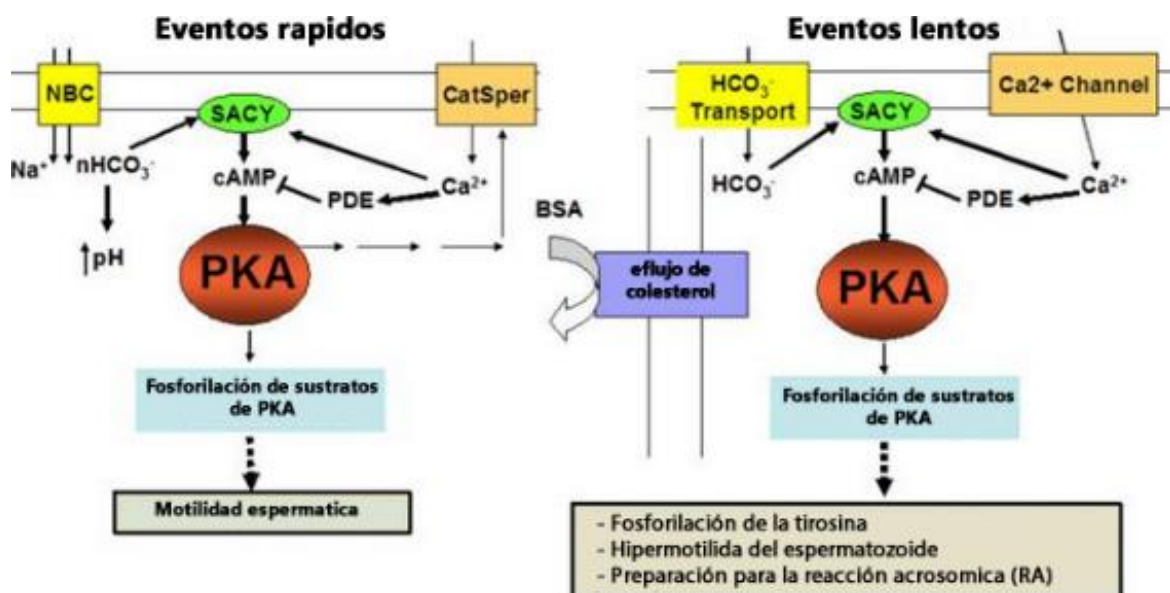


Figura 18 Bases moleculares de procesos rápidos y lentos asociados a la capacitación espermática. Modificado de Visconti, 2009.



### 2.1.2.3.3.3.- Cambios en los patrones de motilidad espermática

Los espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo presentan movimientos flagelares de curvas relativamente simétricas con una amplia longitud de onda, que da como resultado un patrón de natación lineal hacia adelante y progresiva (Florman et al., 2006). En contraste la motilidad de los espermatozoides capacitados, se caracteriza por una alta amplitud de la curva flagelar, un aumento de velocidad y un movimiento lateral de la cabeza (Florman et al., 2006, Yanagimachi 1994b). Esto fue demostrado en el hámster cuando se observó a los espermatozoides capacitados *in vitro* y los que se recuperaron del oviducto al momento en qué estuvieran capacitados *in vivo* (Yanagimachi 1970). La hipermotilidad espermática también se describió en el bovino con espermatozoides capacitados inducidos con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Marquez y Suarez 2007) (Fig. 19).

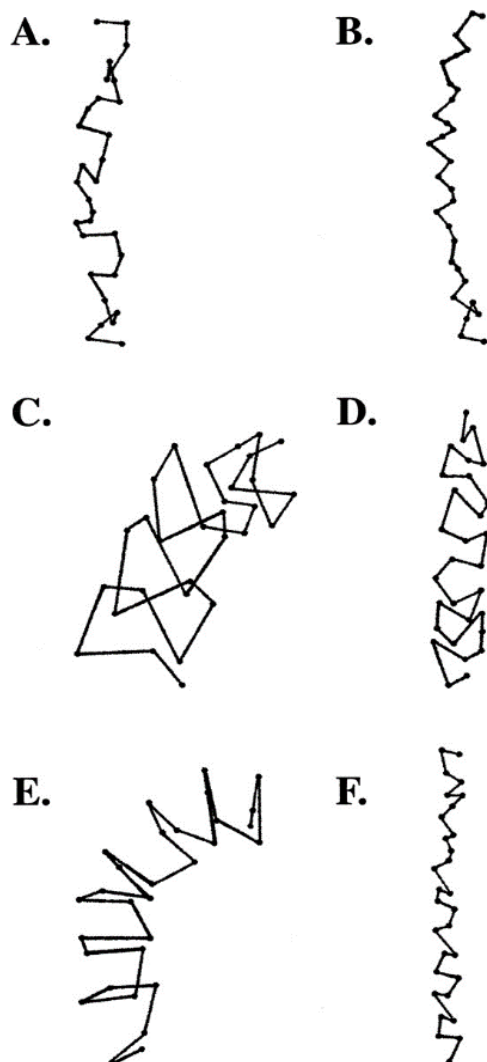


Figura 19 Representación de la hiperactivación espermática. Hiperactivación inducida por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  representación del movimiento espermático control (A, B), tratados con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (C, D) y ionomicina (E, F) medio TALP (A, C, E) y medio con 10 mM BAPTA. Los puntos representan la posición de la cabeza en fotogramas en un video de 5 seg. Tomado de Marquez y Suarez, 2007.

La hiperactividad espermática representa una reacción a la capacitación que se manifiesta en el flagelo (Florman et al., 2006). Se ha comprobado que al hipermotilidad espermática tiene diferentes funciones para la fecundación. La primera es que los espermatozoides adquieren la mayor capacidad para nadar eficientemente en sustancias viscoelásticas (Suarez y Ho 2003). Esta capacidad le permite penetrar el moco del oviducto, penetrar el *cumulus oophorus* rico en hialuronano y penetrar la ZP. Otra característica función de la hiperactivación espermática es la que se asocia a la liberación del espermatozoide del reservorio oviductal (Suarez y Ho 2003, Demott y Suarez 1992), para después ascender al sitio de la fecundación auxiliado por otros mecanismos *in vivo* como el flujo del fluido oviductal y las contracciones del miosalpinx (Rodríguez-Martínez et al., 2005). Todos estos mecanismos deben de estar sincronizados para garantizar que el número adecuado de espermatozoides lleguen al sitio de fecundación.

## 2.2.- ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula altamente especializada, que cuenta con una serie de características estructurales y funcionales que le dotan de la capacidad de ofrecer la carga genética masculina hasta el ovocito, y combinarse con este para dar lugar a un nuevo individuo (Eddy et al., 2006). En este apartado de revisión sobre el gameto masculino se pondrá especial atención sobre el papel que desempeña en la fecundación y la interacción con el tracto genital femenino.

### 2.2.1.- Espermatogénesis

El espermatozoide es el producto final del proceso denominado espermatogénesis. Este proceso se resume en, cómo las células

germinales inmaduras en el testículo se someten a la división, diferenciación y la meiosis para dar lugar a las células espermáticas alargadas haploides.

La espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos de los testículos. En los mamíferos la espermatogénesis se divide en tres fases (Chocu et al., 2012). En la primera fase, células germinales diploides (espermatogonias), localizadas sobre la lámina basal y entre las células de Sertoli, se multiplican por numerosas divisiones mitóticas hasta producir un gran número de células diploides (O'Donnell et al., 2001). Después de la última mitosis de espermatogonias, se forman espermátocitos primarios, estas células replican su ADN para dar comienzo a la meiosis.

La meiosis es la segunda fase, implica la duplicación de los cromosomas, la recombinación genética y luego la reducción de los cromosomas a través de dos divisiones (Hess y de Franca 2008). Después de la primera división meiótica se forma los espermátocitos secundarios, estos rápidamente sufren la segunda división meiótica para producir espermátides haploides esféricas.

En la última fase, las espermátides esféricas pasan a una forma de espermátides alargadas maduras, sin ninguna otra división y se le denomina espermiogénesis (Fig. 20). En esta etapa se remodela la forma de las espermátides, se desarrolla el acrosoma y el flagelo, se condensa la cromatina, se alarga el núcleo y se elimina el citoplasma, todo esto ocurre antes de ser liberadas al lumen de los túbulos seminíferos durante la espermiación (O'Donnell et al., 2001, Hess y de Franca 2008).

El tiempo de duración del proceso de espermatogénesis varía en las diferentes especies de mamíferos. (Tabla 3). Aunque se pueden encontrar diferencias entre cepas o razas de la misma especie, la duración del ciclo de la espermatogénesis en general, se ha considerado que es constante para una especie dada (Franca et al., 2005).

Tabla 3 Duración de espermatogénesis en diferentes especies de mamíferos.

<b>Especie</b>	<b>Días</b>	<b>Referencia</b>
Ratón	34–35	(Clermont y Trott 1969)
Hámster	35–36	(Clermont y Trott 1969, De Rooij 1968)
Cerdo	34–41	(Swierstra 1968, Almeida et al., 2006, Franca et al., 2005)
Toro	54-60	(Hochereau 1963, Franca et al., 2005)
Conejo	48–51	(Swierstra y Foote 1963)
Hombre	64	(Heller y Clermont 1964)

Modificado de Kerr et al., 2006.

### 2.2.2.- Morfología y Estructura

El espermatozoide tiene una morfología única que le permite transportarse por el lumen de los órganos tubulares del tracto genital masculino y femenino, en este último se abre paso hasta su encuentro con el ovocito en el oviducto. Los espermatozoides de mamíferos cuentan con tres regiones altamente especializadas: la cabeza que participa en la interacción entre el espermatozoide y el ovocito, la pieza intermedia o cuello donde se encuentran la mitocondrias y que participa en la producción de energía y la cola o flagelo que participa en la motilidad (Flesch y Gadella 2000) (Fig. 21). Si bien la mayoría de los mamíferos tienen estas características generales, hay especies sustancialmente diferentes en cuanto al tamaño y forma de la cabeza, longitud y la cantidad relativa de los diferentes componentes del flagelo (Eddy et al., 2006).



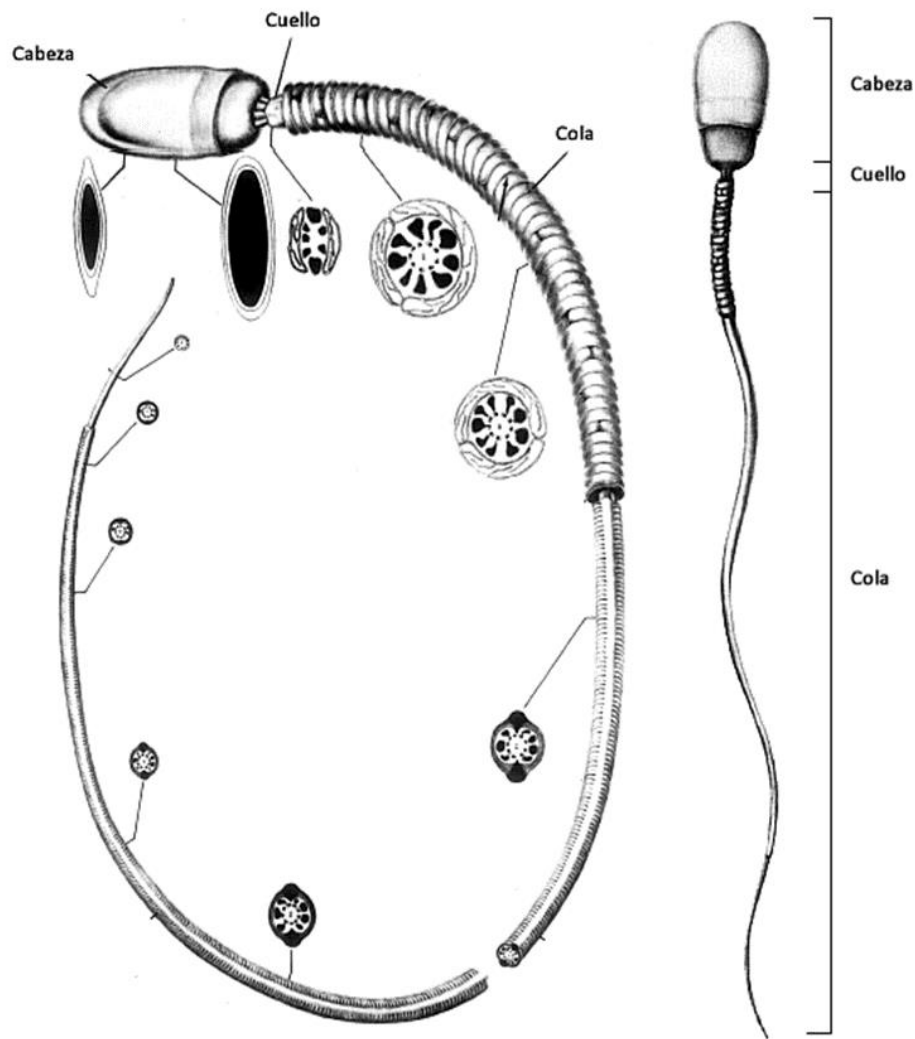


Figura 21 Representación esquemática de un espermatozoide típico de mamífero, señalando las diversas regiones del espermatozoide. Modificado de Fawcett, 1975.

### 2.2.2.1.- Cabeza

En la cabeza del espermatozoide se encuentran el núcleo y el acrosoma, rodeado de cantidades moderadas de los componentes del citoesqueleto y citoplasma, estos están envueltos en la membrana plasmática. En la mayoría de los mamíferos la cabeza tiene una forma de espátula, sin embargo, los espermatozoides de algunos roedores tienen un cabeza de forma falciforme (Eddy et al., 2006). Las regiones principales de la cabeza de los espermatozoides son: la región acrosomal en la parte más apical y la región postacrosomal, estas están divididas por el segmento ecuatorial (Fig. 22).

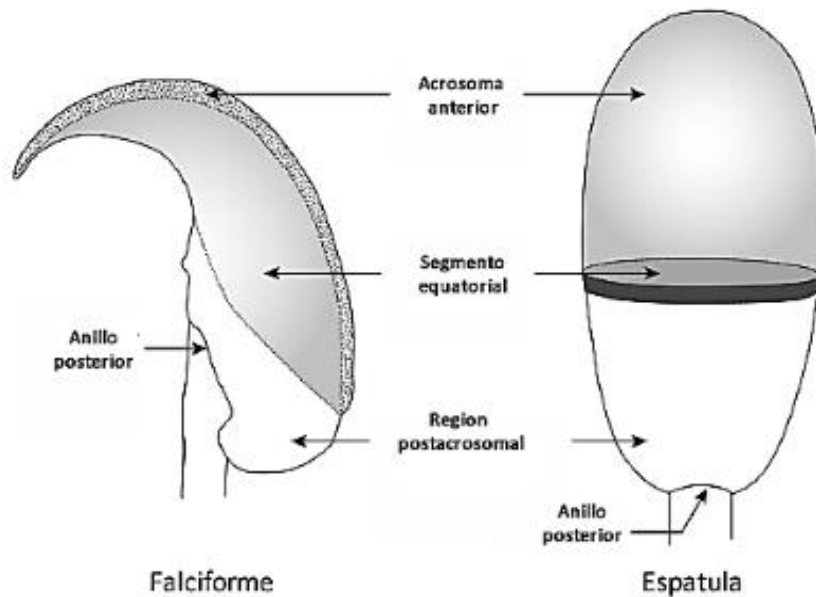


Figura 22 Características generales de la cabeza de espermatozoide de ratón (izquierda) y conejo (derecha). Modificado de Eddy et al., 2006.

#### 2.2.2.1.1.- Acrosoma

El acrosoma es un orgánulo que se origina en el complejo de Golgi y es una estructura ampliamente conservada a lo largo de la evolución de diferentes especies. El acrosoma es una membrana cerrada que se encuentra en la parte anterior de la cabeza de los espermatozoides y está asentado sobre el núcleo del espermatozoide (Eddy et al., 2006). El acrosoma limita el extremo anterior del núcleo y los componentes del citoesqueleto. El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas como acrosina, hialuronidasas, hidrolasas y esterases (Tabla 4), necesarias para que el espermatozoide penetre a través de las envolturas que rodean al óvulo para lograr la fecundación (Eddy et al., 2006, Pesch y Bergmann 2006, Allison y Hartree 1970). La mayor parte del contenido acrosomal se produce durante la espermatogénesis pero algunos empiezan a sintetizarse a finales del paquiteno (Eddy et al., 2006) el contenido acrosomal es liberado durante la reacción del acrosoma (RA).

Tabla 4 Proteínas descritas en el acrosoma de los espermatozoides, en varias especies de mamíferos.

Símbolo oficial	Proteína	Función	Referencia
ACR	Acrosina, proacrosina,	Unión secundaria con la ZP, hidrólisis de la ZP, actividad proteasa serina	(Mao y Yang 2013, Howes et al., 2001, Polakoski y Parrish 1977, Moore et al., 1993, Guyonnet et al.,

ARSA	Arilsulfatasa A	Unión ZP, desulfatación en sulfoglicolipidos, enzima hidrolítica	2012, Honda et al., 2002, Mack et al., 1983) (Tulsiani et al., 1998, Xu et al., 2012, Schenk et al., 2009, Nikolajczyk y O'Rand 1992)
CRISP2	Proteína secretora rica en cisteína 2	Fusión espermatozoide-óvulo	(Foster y Gerton 1996, Nimlamool et al., 2013, Muñoz et al., 2012b, Arangasamy et al., 2011, Cohen et al., 2011, Busso et al., 2007)
CTSB	Catepsina B	La hidrólisis de las proteínas con una amplia especificidad por enlaces peptídicos	(Tulsiani et al., 1998, Srivastava y Ninjoor 1982)
CTSL	Catepsina L	Importante para la degradación global de proteínas en los lisosomas.	(Tulsiani et al., 1998, McDonald y Kadkhodayan 1988)
EQTN	Equatorina asociada al acrosoma de espermatozoide	Se requiere para la RA, unión espermatozoide-óvulo	(Hao et al., 2014)
FUCA1	$\alpha$ -L-Fucosidasa	Hidrólisis de la alfa-1,6 Fucosa	(Tulsiani et al., 1998)
GLA	$\alpha$ -Galactosidasa	hidrólisis de alfa-D-galactosa	(Tulsiani et al., 1998, Mack et al., 1983)
GLB1	$\beta$ -Galactosidasa	Actividad hidrolasas, similares a la lectinas con ligandos ZP	(Majumder y Turkingt.Rw 1974, Nikolajczyk y O'Rand 1992, Tulsiani et al., 1998)
GRN	Acrogranin, granulin	Posible actividad similar a citoquinas, actividad proteína quinasa	(Anakwe y Gerton 1990, Baba et al., 1993)
GUSB	$\beta$ -Glucuronidasa	Degradación de sulfatos de dermatán y queratán	(Tulsiani et al., 1998, Mack et al., 1983)
HEXB	$\beta$ -Hexosaminidasa	Degradación de los gangliósidos GM2	(Tulsiani et al., 1998)
HYAL	Hyaluronidase	Degradar el ácido hialurónico	(Zaneveld et al., 1973, Yang y Srivastava 1975, Gould y Bernstein 1975, Mack et al., 1983)
MAN2B1	$\alpha$ -Manosidasa	La hidrólisis de alfa-D-manosa	(Tulsiani et al., 1998)
MANBA	B-Manosidasa	La hidrólisis de alfa-D-manosa	(Tulsiani et al., 1998)
MC41	Proteínas intraacrosomal	Unión secundaria ZP, penetración ZP	(Tanii et al., 2001, Saxena et al., 1999)
MMP2	Metalloproteínasa 2	Penetración ZP	(Gottlieb y Meizel 1987, Ferrer et al., 2012)
NAGPA	N-acetilglucosaminidasa	Penetración ZP, unión primaria a ZP, actividad glicosidasa	(Miller et al., 1993, Nikolajczyk y O'Rand 1992, Zitta et al., 2006)
NPTX2	Neuronal pentraxin-2	Unión y penetración ZP, actividad glicosidasa	(Noland et al., 1994, Kim et al., 2011)



Sp-10 (ACRV1)	Proteína acrosomal SP-10	Supuesta proteína de unión ZP	(Foster et al., 1994, Wright et al., 1990)
sp32	Proteína acrosomal SP32	Proteína de unión a proacrosina	(Baba et al., 1994, Tardif et al., 2012)
SPACA1	Proteína asociada a la membrana acrosomal de espermatozoides 1	Infertilidad en ratones con gen fragmentado	(Hao et al., 2002, Fujihara et al., 2012, Guyonnet et al., 2012)
SPACA3	Proteína asociada a la membrana acrosomal de espermatozoides 3	Enzima asociada a lisosoma no bacteriolítica	(Mandal et al., 2003, Guyonnet et al., 2012)
SPACA4	Proteína asociada a la membrana acrosomal de espermatozoides 4	Unión y fusión a ZP, similar a Ly6/urokinasa plasminógeno, posible implicación en infertilidad	(Shetty et al., 2003, Malcher et al., 2013, Guyonnet et al., 2012)
SPAM1 (PH-20)	Molécula de adhesión de espermatozoide	Unión a ZP, actividad hialorunidasa	(Morin et al., 2010)
SPESP1	Proteína del espermatozoide segmento ecuatorial 1	Participa en la unión espermatozoide-ovocito	(Wolkowicz et al., 2003, Guyonnet et al., 2012)
SYT4	Sinaptotagmina-IV	Exocitosis acrosomal, proteína de unión a calcio	(Michaut et al., 2001)
TESP1	Proteína TESPA1	Proteasa serina, posible penetración de ZP	(Kohno et al., 1998)
TESP2	Proteína TESPA2	Proteasa serina, posible unión a ZP	(Kohno et al., 1998)
TRY-5 (TESP4)	Proteína TRY-5	Penetración de ZP	(Ohmura et al., 1999)(317)
ZAN	Zonadhesina	Proteína de unión ZP	(Guyonnet et al., 2012, Hardy y Garbers 1994, Olson et al., 2004, Tardif y Cormier 2011)
ZP3R (sp56)	Proteína de unión de espermatozoide-receptor de zona pelúcida 3	Unión ZP, Interacción ZP post reacción acrosómica	(Foster et al., 1997, Kim et al., 2001)
ZPBP1 (sp38)	Proteína de unión de zona pelúcida	Unión ZP	(Lin et al., 2007)
ZPBP2	Proteína de unión de zona pelúcida 2	Unión ZP	(Lin et al., 2007)

#### 2.2.2.1.2.-Membrana plasmática

La membrana plasmática rodea el espermatozoide en su totalidad, las principales regiones de la membrana plasmática en la mayoría de los mamíferos son la región acrosomal y la postacrosomal. Esta membrana se caracteriza por que su composición de glicoproteínas y de lípidos es específica de cada región del espermatozoide, a estas regiones específicas se les denominan dominios de superficie son muy importantes para la función de las diferentes áreas de membrana (Eddy et al., 2006). La mayoría de los dominios de membrana se forman en la

espermiogénesis (Cowan et al., 1997), sin embargo, algunos dominios adquieren su forma final y composición después del espermatogénesis.

Estos dominios se caracterizan por ser dinámicos y se someten a cambios en la organización y la composición durante la vida de la célula espermática (Bearer y Friend 1990, Holt 1984). Sin embargo, los mecanismos específicos responsable de la formación y el mantenimiento de los dominios en la superficie del espermatozoide no están bien esclarecidos. Algunos estudios sugieren que la actina y algunas proteínas asociadas a esta, se ven involucradas en la producción o el mantenimiento de dominios en los espermatozoides de varios mamíferos (Eddy et al., 2006). El mantenimiento de los dominios de superficie, depende de al menos tres factores: el primero está dado debido a la restricción de movilidad de las moléculas de superficie una vez que están en su dominio final, el segundo se asocia a la presencia de barreras que impiden la migración de las moléculas entre los diferentes dominios y por último la partición termodinámica de moléculas en sus regiones específicas (Phelps et al., 1990).

En la composición de la membrana plasmática del espermatozoide se ha descrito la presencia de lípidos, esta composición varía entre las diferentes especies de mamíferos, pero en general se ha podido describir que aproximadamente 70% son fosfolípidos, 25% lípidos neutros y un 5% en glicolípidos (Mann y Lutwak-Mann 1981).

Los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide interactúan directamente con las proteínas de los ductos de los tractos reproductivos. Un ejemplo de esta interacción, es la extracción o reorganización de lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide por las lipoproteínas (Flesch y Gadella 2000). Este proceso juega un papel importante en la modificación de la composición lipídica en el sitio extracelular de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación (Ravnik et al., 1995); como ya fue mencionado en el capítulo de capacitación espermática, algunas de las proteínas que se ha demostrado participar en la movilización y reorganización de lípidos es la albúmina y las proteínas HDL.

Otro tipo de interacción que se da entre la membrana plasmática del espermatozoide y las proteínas presentes en los tractos reproductores del macho y de la hembra son los que intervienen a través del anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). Es bien sabido que las proteínas de membrana pueden estar unidas covalentemente a la membrana de lípido (Flesch y Gadella 2000). Un ejemplo de estas proteínas es la PH-20 o SPAM1 que más adelante se discutirá detalle su participación en los procesos reproductivos. Otro grupo de proteínas ancladas a GPI y que probablemente están implicadas en la resistencia del espermatozoide a los embates sufridos durante su tránsito por el tracto genital femenino son la CD59, CD55 y CDw 52 (Rooney et al., 1996).

#### 2.2.2.2.- Cuello

El cuello es un segmento de unión entre la cola o flagelo y la cabeza espermática, está compuesto de columnas segmentadas y una estructura densa y fibrosa denominada *capitulum*. El cuello sirve como conector y pieza articular (Pesch y Bergmann, 2006).

#### 2.2.2.3.- Cola o flagelo

El flagelo del espermatozoide de mamíferos esta contituido de cuatro segmentos distintos: el de conexión o cuello, la pieza central, la pieza principal, y la pieza final. Los principales componentes estructurales dentro del flagelo los espermatozoides de los mamíferos son, el axonema, la vaina mitocondrial, las fibras densas externas y la vaina fibrosa.

El flagelo proporciona la fuerza necesaria de movilidad para que el espermatozoide alcance al ovulo en el sitio de la fecundación. Los diferentes elementos del flagelo generan y dan forma a las ondas de flexión que producen la fuerza y la propagación de las ondas de la base hasta la punta (Eddy et al., 2006).

Un gran número de proteínas han sido identificadas en las diferentes estructuras de los espermatozoides, estas proteínas están involucradas en diferentes procesos reproductivos, como la capacitación, la reacción acrosómica, la interacción ovocito

espermatozoide, motilidad y metabolismo del mismo espermatozoide (Fig. 23). La localización de una sola proteína en múltiples sitios en la célula espermática indica su potencial implicación en diferentes procesos fisiológicos del espermatozoide (Eddy et al., 2006).

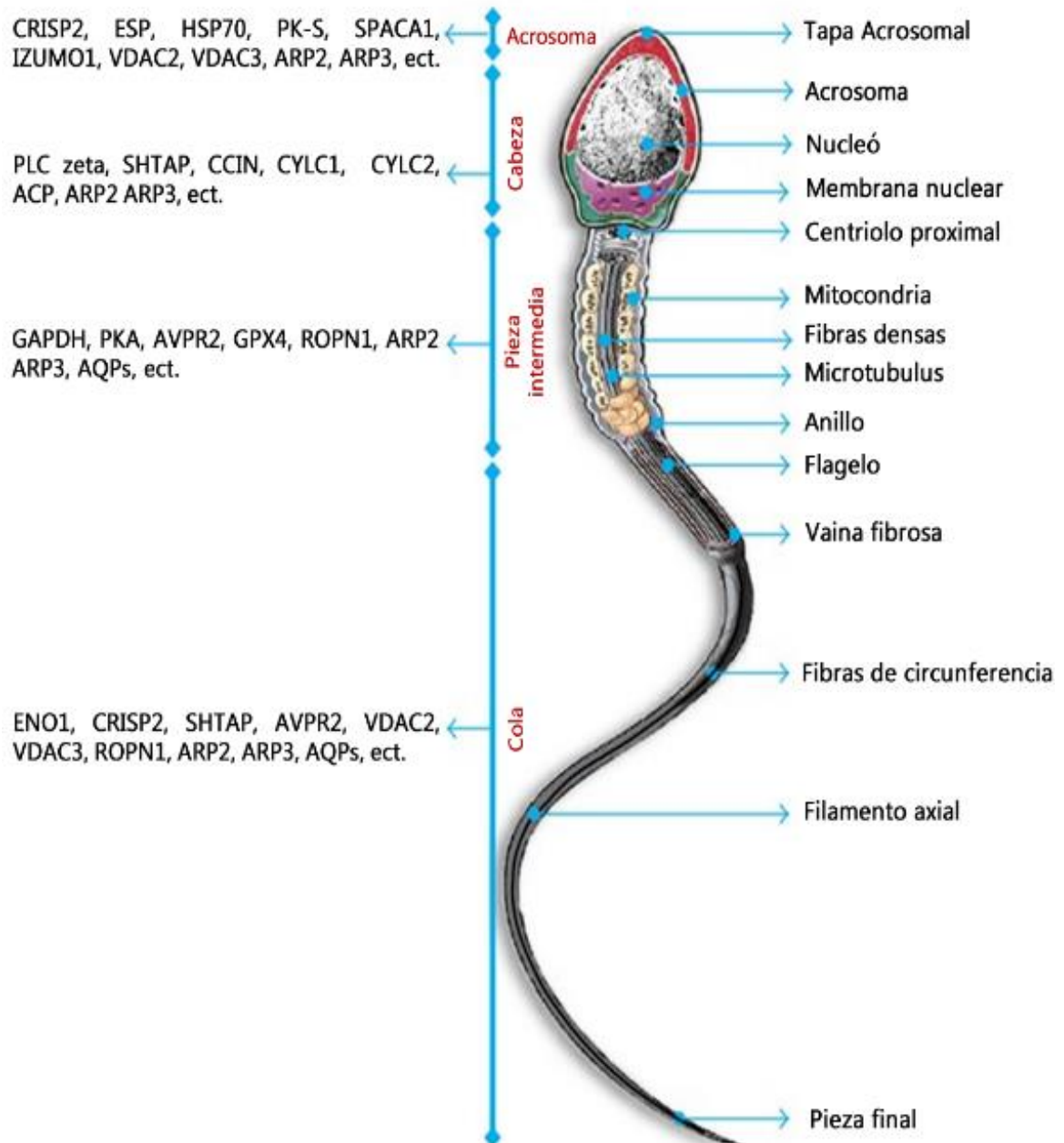


Figura 23 Esquema de las partes del espermatozoide humano maduro con sus diferentes partes. Proteínas localizadas en diferentes regiones, descritas por inmunolocalización en diferentes estudios. Modificado de Rahman et al., 2013.

### 2.2.3.- Maduración espermática

En los mamíferos los espermatozoides liberados de los testículos no son completamente móviles, ni tienen la competencia para fecundar. En el epidídimo los espermatozoides sufren una serie de modificaciones físicas y químicas donde adquieren la capacidad motriz, que les permite migrar a través en el tracto genital femenino, así como poderse someterse a la reacción acrosómica y adquirir la capacidad de unirse y penetrar la ZP del ovocito y así lograr una fecundación exitosa (Robaire et al., 2006, Dacheux y Dacheux 2014, Park et al., 2012). Las proteínas secretadas en el epidídimo están relacionadas directamente con los cambios de la motilidad y la remodelación de la membrana de los espermatozoides y el acrosoma para que puedan penetrar el ovocito (Cornwall 2009, Dacheux et al., 2009).

La modificación física más importante que adquiere el espermatozoide durante la maduración, es la obtener un movimiento progresivo y hacia adelante. Se sabe que el espermatozoide recién liberado del testículo y debido a la inmadurez de la membrana plasmática, sólo tiene una capacidad de movimiento muy débil o nula (Yanagimachi 1994a, Cornwall 2009). Esta modificación se ha descrito en diferentes especies como el cerdo (Dacheux et al., 1979, Bork et al., 1988), bovino (Acott et al., 1983, Pholpramool et al., 1985) y humano (Mooney et al., 1972, Bedford et al., 1973). Otra importante modificación es la de la migración de la gota citoplasmática, esta estructura se pasa desde la base de la cabeza hasta el final de la pieza intermedia del flagelo (Dacheux y Dacheux 2014, Gatti et al., 2004). Esta característica está asociada directamente a la maduración del espermatozoide, ya que se ha observado que cualquier defecto en dicha migración se asocia con una disminución de la fertilidad del espermatozoide, pero no a la activación de la motilidad (Cooper 2005).

Otras modificaciones de los espermatozoides son los numerosos cambios secuenciales que se producen en la membrana espermática, entre los que se encuentra cambios en la composición de lípidos y proteínas durante su tránsito en el epidídimo (Dacheux y Dacheux 2014, Dacheux y Voglmayr 1983, Cooper 1998). A medida que los espermatozoides se transportan en el epidídimo, algunas proteínas son

integradas a la membrana de los espermatozoides y algunas otras son eliminadas gracias a la acción proteolítica de las enzimas contenidas en el líquido epididimario (Dacheux y Voglmayr 1983, Gatti et al., 2004, Dacheux y Dacheux 2014, Lum y Blobel 1997). Estas enzimas están presentes en grandes cantidades en el fluido epididimario, entre estas se encuentran glicosidasas, proteasas; así, como varios inhibidores (Dacheux y Dacheux 2014). Un ejemplo de la acción proteolítica que induce el cambio de dominio de membrana es la que se observa en la fertilina (Phelps et al., 1990, Blobel 2000) o la degradación de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Gatti et al., 1999).

Los cambios en la composición de las proteínas de los espermatozoides se demostró recientemente en el cerdo (Belleannee et al., 2011a) (Tabla 5), ratón (Ijiri et al., 2011) y rata (Baker et al., 2012, Yuan et al., 2006). Mediante la separación por electroforesis DiGE y 2D de proteínas procedentes de espermatozoides capacitados y sin capacitar mostraron que 17 proteínas en el ratón y 60 proteínas en la rata fueron diferencialmente expresadas entre la cabeza y cola del epidídimo. En el cerdo fueron 32 las proteínas que mostraron diferencia en entre ambos grupos. Estos estudios sugieren que cada región en el epidídimo está claramente definida y la mayoría de las proteínas en los espermatozoides de la cabeza y cola tiene funciones específicas de acuerdo a la región en la que se expresan (Park et al., 2013).

*Tabla 5 Identificación de proteínas de espermatozoides porcinos maduros e inmaduros.*

<b>Símbolo oficial</b>	<b>Proteína</b>	<b>Función</b>
ACE	Angiotensina	actividad glucosidasa que libera proteínas ancladas a GPI de la membrana
ACO1	Aconitasa	Sensor de Hierro
ACR	Acrosina	Es la principal proteasa de espermatozoides de mamífero.
AKR1B1	Aldosa reductasa	Cataliza la reducción dependiente de NADPH
ARSA	Arilsulfatasa	Hidroliza sulfato cerebrósido.
CCT2	Proteína de complejo T $\beta$ subunidad 1	Chaperona molecular
CCT4	Proteína de complejo T 1 subunidad $\delta$	Chaperona molecular
CCT8	Proteína de complejo T $\theta$ 1 subunidad	Chaperona molecular
ENO1	$\alpha$ -Enolasa	Tiene capacidad para servir como un receptor y activador de plasminógeno en la superficie celular de varios tipos de células

GSTM5	Glutati3n S-transferasa Mu 5	Actividad glutati3n transferasa
HIP1	Huntingtina 1	Estabilizaci3n de la actina y los microt3bulos de c3lulas de esperm3tides
HK1	Hexoquinasa tipo 1	Prote3na de membrana integral de espermatozoide de rat3n
HSP90AA1	Prote3na de choque t3rmico HSP 90- $\alpha$	Chaperona molecular que promueve la maduraci3n, mantenimiento estructural y la regulaci3n adecuada de prote3nas diana espec3ficas
HSPA1L	Prote3na de choque t3rmico 70 kDa 1	Estabiliza prote3nas preexistentes frente a la agregaci3n y media el plegamiento de polip3ptidos
HSPA2	prote3na de choque t3rmico 70 kDa 2	Estabiliza prote3nas preexistentes frente a la agregaci3n y media el plegamiento de polip3ptidos
HSPA4L	Prote3na de choque t3rmico 70 kDa 4L	Posee actividad chaperona <i>in vitro</i> donde inhibe la agregaci3n de citrato sintasa
IMPA1	Inositol monofosfatasa 1	Responsable de la provisi3n de inositol necesaria para la s3ntesis de fosfatidilinositol y polifosfoinos3tidos
ISYNA1	linositol 1-fosfato sintasa	Enzima clave en la ruta de bios3ntesis de myo-inositol que cataliza la conversi3n de glucosa 6-fosfato
LDHAL6B	L-lactato deshidrogenasa A-6B	Fermentaci3n de piruvato a lactato
LYPD4	Dominio LY6 / PLAUR 4	Componente de membrana
MAN2C1	$\alpha$ -manosidasa	Hidrolisis terminal de alfa-D-Manosa
MDH1	malato deshidrogenasa	Actividad reductasa diiodofenilpiruvato
MFGE8	Lactadherin	Prote3na que puede desempeñar un papel en la interacci3n de gametos zona pel3cida vinculante.
PGAM2	Fosfoglicerato mutasa 2	Promueve el crecimiento muscular embrionario
PGK2	Prote3na espec3fica de test3culo fosfoglicerato quinasa	Posible marcador de infertilidad masculina
PRDX5	Peroxiredoxin-5	Reduce el per3xido de hidr3geno e hidroper3xidos de alquilo
RAB2	Prote3na de uni3n a GTP-	Se requiere para el transporte de prote3nas del ret3culo endopl3smico al aparato de Golgi
TCP1	Prote3na de complejo T 1 subunidad $\alpha$	Chaperona molecular
TUBB	$\beta$ -tubulina	Tubulin is the major constituent of microtubules
VCP	Valosin	Es un modulador potencial de la liberaci3n de SAAF del ovocito
YWHAZ	4-3-3 cadena $\zeta$ prote3na	
ZPBP	Prote3na zona pel3cida 1 vinculante	Pueden estar implicados en la interacci3n de gametos durante la fecundaci3n.

Modificado de Belleanne et al., 2011<sup>a</sup>.

### 2.2.3.1.- Fluido epididimario

La mayor3a de las prote3nas que se encuentran en este fluido se sintetiza y se secretan por el epitelio del epid3dimo (Park et al., 2012). Cientos de prote3nas han sido identificadas en el fluido epididimario (FE). En el bovino hasta 172 prote3nas han sido identificadas en 218

spots diferentes en gel 2D y tinción de coomassie (Belleannee et al., 2011b), sin embargo, en los mamíferos no más de 20 proteínas representan el 80-90 % del total de las proteínas contenidas en FE (Gatti et al., 2004, Dacheux y Dacheux 2014).

En la especie bovina se describió que 13 proteínas constituyen el 95% del total de la proteína del fluido epididimario, la proporción es la siguiente: La lipocalina 5 (LCN5) (17,3%), clusterina (CLU) (14%), glutatión peroxidasa 5 (GPX5) (13,6%), albúmina (ALB) (13,6%), prostaglandina D2 sintasa (PTGDS) (11,7%), transferrina (TF) (7,5%), Proteína secretora del epidídimo E1 (NPC2) (3,6%), Proteína de fosfoetanolamina 4 (PEBP4) (3,3%), beta-N-acetil-hexosaminidasa (HEXB) (3,2%), glutatión S transferasa (GST) (2,3%), gelsolina (Gsn) (2,2%), actina (1,4%), y beta galactosidasa (Glb1) (1%) (Belleannee et al., 2011b). Las concentraciones y su regionalización de estas proteínas en el epidídimo varían dependiendo la especie (Guyonnet et al., 2011).

Las funciones de las proteínas mayoritarias del FE son muy diversas. La CLU, representa alrededor del 30 % de la secreción total del epidídimo (Dacheux y Dacheux 2014). En el porcino esta proteína puede estar involucrada en la protección de los sitios activos de superficie de los espermatozoides, esta misma propiedad la comparte con otras proteínas contenidas en el FE tales como la lactoferrina (LTF), transferrina (TF), apolipoproteína A-1 (APOA1) y algunas otras proteínas que participan en el glycocalix del espermatozoide (Fabrega et al., 2012).

La GPX5 y la LTF debido a su capacidad de interactuar con la heparina y el ácido hialurónico sugiere que estas podrían jugar un papel decapacitante del espermatozoide (Manaskova-Postlerova et al., 2011), además podrían proporcionar un efecto protector contra la peroxidación de las membranas. Algunas otras proteínas secretadas en el epidídimo involucradas en la reducción de especies reactivas del oxígeno (ROS), son la SOD1 (Angrimani et al., 2013, Park et al., 2012), GPX 4-5 (Chabory et al., 2010, Park et al., 2012), PRDX 2-5 (Nagdas et al., 2014, Park et al., 2012).



Se observó que diferentes proteínas del epidídimo participan en las interacciones de membrana de espermatozoide y ovocito. Esta interacción se basa primordialmente en la transformación de los dominios de superficie de los espermatozoides testiculares y la redistribución de algunas proteínas, tal es el caso de la familia de las proteínas ADAM (ADAM1B, ADAM2, ADAM3, ADAM5, ADAM17 y ADAM32) y las proteínas basigin (BSG) y TEX101 (Dacheux y Dacheux 2014) (Fig. 24). La capacidad de unión del espermatozoide al ovocito también está dada por las proteínas que son adquiridas o absorbidas del epidídimo a la membrana de los espermatozoides, por ejemplo, ARSA, CD52, CRISP1, CRISP4, CRISP7, DCX, EPPIN, MFGE8, SPAM1 y SPINK13 (Dacheux y Dacheux 2014). Algunas de estas proteínas han sido descritas también en el tracto genital femenino de diferentes especies de mamíferos. Lo que sugiere que el tracto femenino puede aportar el déficit o ausencia de proteínas de los espermatozoides y que se sabe que juegan un papel en los procesos reproductivos.

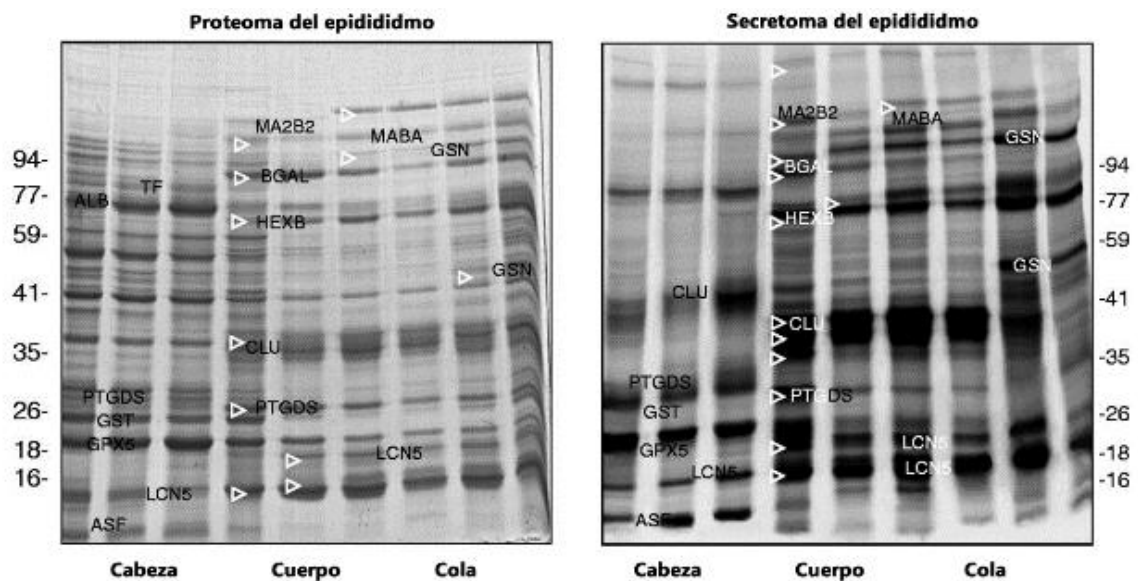


Figura 24 Proteoma y secretoma de epidídimo de bovino en SDS-PAGE. Se cargó la misma cantidad de proteína de nueve zonas del epidídimo correspondientes a las tres regiones principales, se separó por electroforesis en gel 1D y teñido con plata. Modificado de Dacheux y Dacheux, 2014.

La mayoría de estas importantes proteínas secretadas, son solubles en el fluido luminal epididimario; y son secretadas por las vías de secreción merocrina (Sullivan y Saez 2013), que es la forma convencional para secretar las proteínas del epidídimo, la no convencional es para las proteínas que carecen de péptidos señal. Se

demostrado que varias proteínas secretadas que son altamente hidrofóbicas, como algunas proteínas ancladas a GPI, tal es el caso de CD52 (Kirchhoff 1996). El mecanismo de secreción de estas proteínas hidrofóbicas en el fluido luminal todavía no está claro. Algunas de estas proteínas se han encontrado que pueden ser asociarse con vesículas de membrana luminal.

### 2.2.3.2.- Epididimosomas

Estas vesículas se liberan de la superficie de las células como ampollas vesiculares (Gatti et al., 2005) y epididimosomas (Sullivan y Saez 2013, Girouard et al., 2009). Esta secreción apocrina del epidídimo ha sido descrita con anterioridad (Herms y Jacks 2002, Rejraji et al., 2006). Estos epididimosomas son vesículas de entre 20-100 nm, estas aparecen en la superficie del espermatozoide en la porción distal de la cabeza del epidídimo. Se encontró que estos epididimosomas sólo se unen a la región del acrosoma del espermatozoide (Sullivan y Saez 2013).

La composición proteica de los epididimosomas en el bovino es muy variable, incluso de muestras recogidas de la misma porción del epidídimo (Frenette et al., 2002, Frenette et al., 2003). En el bovino, hasta 231 proteínas de epididimosomas son comunes a las regiones de la cabeza y cola del epidídimo (Girouard et al., 2011). Recientemente se realizó una revisión de epididimosomas donde se encontró la función de 12 proteínas después de haber sido transferidas a los espermatozoides tras la maduración (Sullivan y Saez 2013) (Tabla 6). Los mecanismos de transferencia de epididimosomas a la membrana espermática aún no están del todo esclarecidos, por lo tanto están sujeta a la investigación actual.

*Tabla 6 Proteínas de epididimosomas, con funciones conocidas o propuestas una vez transferidas a los espermatozoides durante la maduración.*

<b>Símbolo oficial</b>	<b>Proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>	<b>Referencia en tracto genital femenino</b>
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos	Participa en la motilidad del espermatozoide	(Frenette et al., 2010, Frenette et al., 2006)	(Nahar y Kadokawa 2014, Wang y Goff 2003)

PPFIA3	Liprina $\alpha 3$	Reacción del acrosoma	(Joshi et al., 2013)	
CSRC	Proteína quinasas CSRC	Cascada de señalización de capacitación	(Krapf et al., 2012)	
GPX5	Glutación peroxidasa 5	Protección contra el estrés oxidativo (integridad del ADN)	(Chabory et al., 2010)	
UBC	Ubiquitina	Eliminación de los espermatozoides defectuoso	(Sutovsky et al., 2001)	(Lin et al., 2013)
CD52 (HE5)	Proteína de epidídimo de unión a espermatozoide 5	Protección contra la respuesta inmune	(Kirchhoff 1996)	(Kumamoto et al., 2009)
ELSPBP1	Proteína de epidídimo de unión a espermatozoide 1	Eliminación de los espermatozoides defectuoso	(D'Amours et al., 2012b, D'Amours et al., 2012a)	
P25b / RAB3B	P25b / Proteína Ras Rab-3B	Interacción espermatozoide-ZP	(Girouard et al., 2009, Frenette y Sullivan 2001)	
SPAM1 (PH-20)	Molécula de adhesión del espermatozoide 1	Diferentes roles en la fecundación	(Martin-DeLeon 2006, Griffiths et al., 2008a)	(Griffiths et al., 2008b, Zhang y Martin-DeLeon 2003b, Acuña et al., 2014b, Acuña et al., 2011)
GLIPR1L1	Glioma patogénesis relacionados proteína 1	Fecundación	(Caballero et al., 2012)	
ADAM2, adam3, Adam7	Desintegrin metaloproteasas A	Participa en la fecundación	(Oh et al., 2005)	(Yamaguchi et al., 2009)
MMSDH	Metilmalonato semialdehído deshidrogenasa	desconocido	(Suryawanshi et al., 2012)	

Modificada de Sullivan y Saez 2013.

### 2.2.3.3.- Reacción acrosómica

La cabeza de los espermatozoides tiene un orgánulo llamado acrosoma. Como ya se revisó con anterioridad, su contenido es muy complejo, el acrosoma contiene enzimas lisosomales, hidrolíticas y proteolíticas. La exocitosis de estas enzimas es necesaria para la penetración de las células del *cumulus oophorus* y la zona pelúcida del

ovocito (Florman et al., 2006). Este proceso consiste en la fusión controlada entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática. El resultado es la formación de vesículas que contienen citosol del espermatozoide atrapado en el espacio intravesicular. La matriz acrosomal se dispersa por un proceso estimulado por la actividad de una proteasa y el contenido de proteínas se libera. (Fig. 25).

Se asumió que la reacción acrosómica debe ocurrir cuando el espermatozoide está ya muy próximo al ovocito. Más específicamente, se ha mostrado que la reacción acrosómica no se inicia sino hasta el contacto con la zona pelúcida (Bleil y Wassarman 1983). Esta idea fue apoyada debido a que se observó que la zona pelúcida solubilizada ocasiona la reacción acrosómica (Florman et al., 2006, Cherr et al., 1986, Florman y Storey 1982, Fukami et al., 2001), incluso una secuencia parcial de ZP3 lograba el mismo efecto (Hinsch et al., 1994). Sin embargo, otros autores mostraron que la ZP intacta no es suficiente para inducir la exocitosis acrosomal (Baibakov et al., 2007), además, algunos espermatozoides que pasan a través del *cumulus oophorus* ya han reaccionado antes de llegar a la ZP (Yanagimachi 1994b).

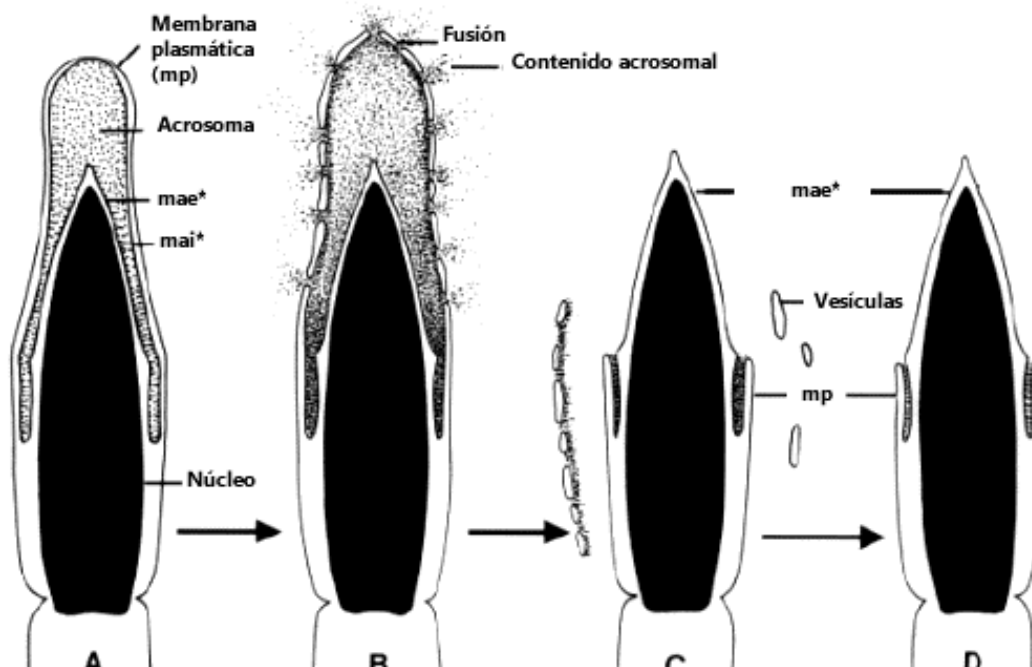


Figura 25 Secuencia de eventos durante la reacción acrosómica del espermatozoide de los mamíferos. Cabeza del espermatozoide con acrosoma intacto (A). Fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática (B). Vesículas de membrana compuestas híbridas, de plasma y de la membrana acrosomal externa, (C) y (D). mae\* membrana acrosomal externa, mai\*\* membrana acrosomal interna. Modificado de Yanagimachi, 1994b.

Con el fin de observar el momento de la reacción acrosómica de los espermatozoides *"in living"*, se creó un cepa de ratones transgénicos con el acrosoma marcado con proteína verde fluorescente (GFP), tras la reacción acrosómica, la fluorescencia desapareció. Se observó también que dentro de los espermatozoides unidos a ZP, había espermatozoides reaccionados y no reaccionados (Nakanishi et al., 1999, Hasuwa et al., 2010). Investigaciones posteriores en fecundación *in vitro*, utilizaron ratones con espermatozoides con el acrosoma GFP; se demostró que la mayor parte de los espermatozoides fecundantes reaccionaban antes de llegar a la ZP (Jin et al., 2011).

Para demostrar si los espermatozoides reaccionados eran capaces de fecundar a otros ovocitos se hicieron investigaciones con ratones knockout Izumo1 (Inoue et al., 2005) y CD9 (Kaji et al., 2000, Le Naour et al., 2000, Miyado et al., 2000), que generan infertilidad debido a que los espermatozoides son capaces de penetrar la ZP pero no de fusionarse con el ovocito. Posteriormente se recuperaron los espermatozoides reaccionados contenidos en el espacio perivitelino y estos después fueron incubados con otros ovocitos y se encontró que fueron capaces de fecundarlos (Inoue et al., 2011). Con estos datos se comprobó que los espermatozoides reaccionados no pierden su capacidad de fecundar. Por lo tanto, una interacción directa entre el espermatozoide y la ZP al parecer no es necesaria para la reacción del acrosoma y por lo tanto puede que no sea "esencial" para la fecundación, incluso *in vivo* (Ikawa et al., 2010) (Fig. 26).

Por otra lado, se sabe en humanos que la progesterona secretada por las células del *cumulus oophorus* pueden inducir la reacción acrosómica (Patrat et al., 2000). La progesterona es inductora a través de un mecanismo de receptores específicos presentes en la membrana espermática de la región acrosomal, causando un transporte de  $Ca^{2+}$  hacia el interior.

La cascada de eventos que acontecen durante la RA no es del todo conocida, pero es un hecho demostrado que se activan ciertas quinasas

de proteínas y aumenta la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , provoca la desactivación de la ATPasas, seguida por un aumento del pH intracelular debido al aumento intracelular de  $\text{Na}^+$  y la salida de  $\text{H}^+$ . La unión del espermatozoide capacitado a la zona pelúcida (ZP) del ovocito activa determinados canales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  provocando un aumento intracelular sostenido de este ión (Lievano et al., 1996). El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  conduce a la activación de la fosfolipasa C (PLC), esta se activa e hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), produciendo inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> abre los canales de calcio sensibles a IP<sub>3</sub> y libera el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de depósitos del acrosoma, mientras la DAG media la activación de la proteína quinasa C (PKC), la fosforilación de las proteínas sustrato promueve la exocitosis acrosomal (Lopez et al., 2012). Estos primeros eventos originan una afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , a través del receptor de potencial transitorio de canales de cationes (TRPCs), que induce la reacción del acrosoma completa (Ikawa et al., 2010).

Para llevar a cabo la fusión de membranas hay que tener en cuenta que la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática son independientes, mediante una estructura de filamentos de F-actina. Antes de la reacción acrosómica, la F-actina debe ser sometida a despolimerización, un proceso necesario que permite la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática espermática (Breitbart et al., 2005).

Los estudios con espermatozoides con acrosoma GFP, demostraron que la reacción acrosómica es un evento que se va dando gradualmente, mientras la GFP se dispersa en cuestión de segundos (Nakanishi et al., 1999), otros componentes del acrosoma se liberan de forma gradual. Por ejemplo, los antígenos acrosomales MN7 y MC41 permanecen unidos a la cabeza del espermatozoide durante al menos 15 minutos (Nakanishi et al., 2001).

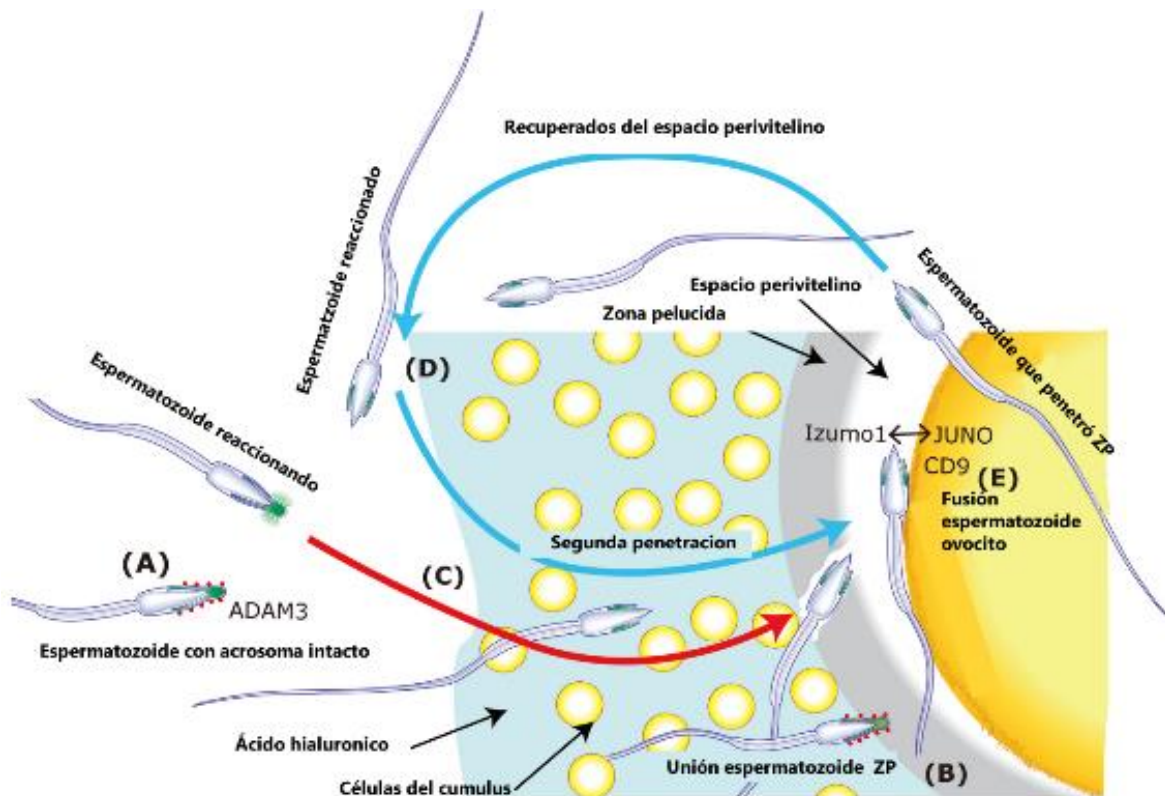


Figura 26 Fecundación desde un punto de vista moderno.

A) La proteína ADAM3 permite a los espermatozoides migrar en el oviducto. B) La expresión de ADAM3 en la superficie de los espermatozoides se consideran esencial para la capacidad fecundante del espermatozoide, ya que permite que se unan a ZP, sin embargo, se encontró que esta capacidad de unión era prescindible. Los espermatozoides que perdieron la denominada capacidad de "unión zona" todavía son capaces de fecundar los óvulos *in vivo*, una vez que han pasado por el oviducto. C) Los espermatozoides debe experimentar la reacción acrosómica. Tomando las observaciones en B); la reacción acrosómica se considera cuando el espermatozoide se une a ZP. Sin embargo, recientemente se demostró que los espermatozoides reaccionan antes del contacto con la ZP. D) Se observó que los espermatozoides reaccionados recuperados del espacio perivitelino podrían penetrar la ZP por segunda vez y fecundar los ovocitos. E) La proteína IZUMO1 en espermatozoides participa en la fusión espermatozoide-ovulo. Esta proteína IZUMO1 se oculta debajo de la membrana plasmática en los espermatozoides intactos, una vez reaccionados migra a la superficie de los espermatozoides. La proteína CD9 en el ovocito juega un papel importante en la fecundación, pero CD9 no parece interactuar directamente con IZUMO1. Recientemente, la proteína JUNO fue identificada como un factor que interactúa con IZUMO1. Modificado de Okabe 2014.

## 2.3.- MOLÉCULA DE ADHESIÓN DEL ESPERMATOZOIDE 1 (SPAM1)

La molécula de adhesión del espermatozoide 1, del inglés "*Sperm adhesion molecule one*" (SPAM1) también conocida como PH-20 (en

ratón Spam1). Es una proteína de superficie del espermatozoide de los mamíferos, es la proteína más ampliamente conservada de la membrana del espermatozoide. SPAM1 fue identificada por primera vez en el conejillo de indias (Myles y Primakoff 1984), además de haber sido descrita en ratón (Thaler y Cardullo 1995), rata (Zheng y Martin-DeLeon 1999), macaco, humano (Lin et al., 1993, Evans et al., 2003), caballo (Meyers et al., 2000), cerdo (Day et al., 2002; Yoon et al., 2014) y bovino (Lalancette et al., 2001). Esta proteína ha sido descrita en diferentes órganos de mamíferos como el testículo (Zhang y Martin-DeLeon, 2001; Yoon et al., 2014), epidídimo (Deng et al., 2000, Zhang y Martin-DeLeon 2003a), útero, vagina (Zhang y Martin-DeLeon 2003b) y riñón (Grigorieva et al., 2007).

### 2.3.1.- Estructura de la proteína SPAM1

Se describió en el ratón que Spam1 se puede definir como una glicoproteína de cadena única. En el extremo N-terminal se encuentran los dominios de hialuronidasas que son dos: el que se activa en un pH neutro (forma insoluble) y de pH ácido (forma soluble) (Cherr et al., 2001). El dominio hialuronidasa también contiene un sitio de unión al ácido hialurónico (HA), que juega un papel de señalización en el evento que conduce a la exocitosis acrosomal. El otro dominio funcional de la proteína es el que se encuentra en el extremo C-terminal y es el glicosilfosfatidilinositol ancla (GPI-ancla) (Fig. 27). Gracias a esto se sabe que la proteína al menos participa en tres funciones del proceso de fecundación en los mamíferos.



- SS: Secuencia de señales.
- NH: Dominio de hialuronidasa neutra.
- HA: Receptor del ácido hialurónico.
- AH: Dominio de hialuronidasa ácido.
- ZP: Dominio de unión a zona pelúcida.
- GPI: Glicosilfosfatidilinositol-ancla.

*Figura 27 Esquema de la proteína Spam1 del ratón en forma madura. Es una glicoproteína de cadena única que está ligada al GPI-ancla. Las flechas cerca de la N-y C-terminal indican los lugares de corte de la secuencia de señal. Modificado de Martin-DeLeon, 2006.*



La proteína SPAM1 en la especie bovina tiene dos isoformas diferentes, una con un peso molecular de 70 kDa y otra de 80 kDa (Morin et al., 2010). En otras especies como en los seres humanos, conejillo de indias, macacos y ratones oscila entre los 64 a 68 kDa. La longitud de la proteína SPAM1 en el bovino es de 553 aa y en el cerdo es de 493 aa. La proteína SPAM1 es codificada por un gen que se encuentra entre los miembros de la familia hialuronidasas, en el cromosoma 4 en la especie bovina y en el porcino en el cromosoma 18 (Day et al., 2002). Las variaciones de peso molecular entre especies pueden atribuirse a la división endoproteolítica de la molécula (Lathrop et al., 1990).

El análisis de la secuencia de aminoácidos en la especie bovina sugiere que en los espermatozoides, SPAM1 carece de GPI-ancla, pero contiene un dominio transmembrana que separa el dominio hialuronidasa desde el sitio de unión de la zona pelúcida en la estructura de SPAM1 (Morin et al., 2010) (Fig. 28).

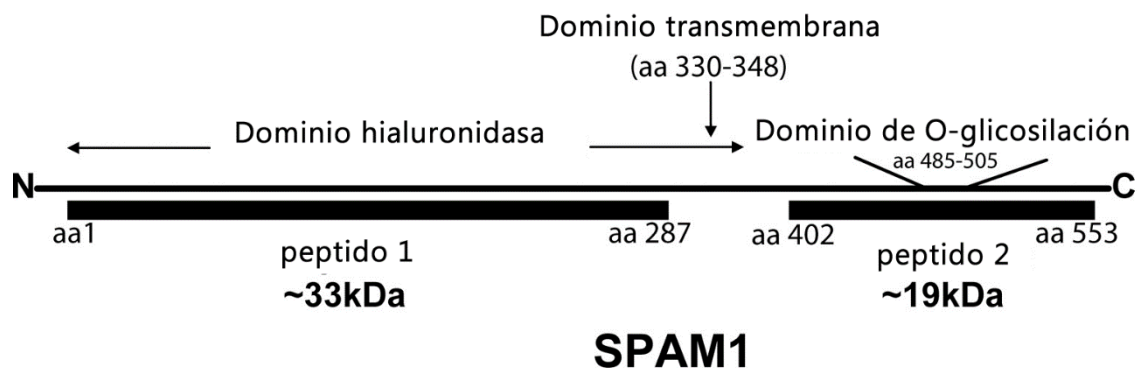


Figura 28 Esquema de la proteína SPAM1 bovino. Modificado de Morin et al., 2010.

### 2.3.2.- Localización de SPAM1 en el espermatozoide

La proteína SPAM1 se detectó por primera vez en el complejo de Golgi de espermátidas redondas (espermiogénesis) de conejillo de indias, se observó que comienza a producir vesículas que contienen SPAM1 y una abundante cantidad de carbohidratos (Phelps y Myles 1987). Estas vesículas se fusionan para producir el acrosoma naciente.

A partir de ahí, una segunda población de la SPAM1 se inserta directamente en la membrana plasmática del espermatozoide (SPAM1pm). Posteriormente se distribuye en la membrana acrosomal (SPAM1am) y se limita a la membrana acrosomal interna, durante el paso por el epidídimo SPAM1pm se localiza en la superficie posterior de la cabeza (Phelps y Myles 1987).

Se ha observado que dos isoformas de SPAM1 están presentes en los espermatozoides eyaculados de toros. Utilizando el anticuerpo que reconoce el dominio hialuronidasa, se observó una señal positiva en la región postacrosómica en células sin permeabilizar. Cuando las células espermáticas fueron permeabilizadas este anticuerpo también dio señal positiva en el acrosoma. Esta isoforma se detecta en la superficie de los espermatozoides, con su dominio hialuronidasa hacia el medio extracelular. La otra isoforma reconocida con el anticuerpo que reconocer la porción C-terminal detecto señal sólo en la región del acrosoma, en células permeabilizadas incluso después de la reacción del acrosoma (Morin et al., 2010). La electroforesis en 2D reveló que las dos isoformas tienen masas diferentes una de 80 kDa y otra de 70 kDa (Morín et al., 2010).

### 2.3.3.- Expresión de SPAM1 en testículo y epidídimo

En la espermiogénesis se controla la expresión génica en el nivel de traducción. La abundancia de ARN del gen que sintetiza SPAM1 en los testículos condujo a la noción de que el gen es específico del testículo; sin embargo, se ha demostrado la expresión de ARNm en otros tejidos donde es menos abundante y es detectable usando técnicas de biología molecular e hibridación *in situ* (Zhang et al., 2004). La localización por hibridación *in situ* muestra un patrón de expresión equivalente a un área en forma de anillo dentro de los túbulos seminíferos. Ninguna expresión fue encontrada cerca de la lámina basal (Morales et al., 2004).

La expresión de SPAM1 en testículo y epidídimo es regulada de manera diferente, según lo indicado por diferentes sitios de inicio de transcripción del ARNm (Zhang y Martin-DeLeon 2003a), además de tener diferente cantidad de aminoácidos, la proteína de origen epididimario y testicular tiene diferentes patrones de glicosilación, produciendo dos isoformas. Este hallazgo indica que hay modificaciones postraduccionales específicas de los tejidos de Spam1 (Zhang y Martin-DeLeon 2003a).

En las tres regiones del epidídimo, se observa que SPAM1 es sintetizada por el epitelio epididimario. En ratones, macacos y seres humanos (Chen et al., 2006), se libera al líquido luminal del epidídimo como proteína GPI anclada en vesículas de membrana que presenta actividad hialuronidasa a un pH neutro (típico de la forma insoluble).

Es posible que pueda haber dos fuentes de SPAM1 en el fluido luminal del epidídimo. Las primeras moléculas provienen de espermatozoides y las segundas se sintetizan directamente desde el epidídimo (Zhang y Martin-DeLeon 2003a). Dado que en el epidídimo los espermatozoides adquieren la motilidad y su capacidad fecundante, es probable que la SPAM1 desempeñe un papel en la maduración de los espermatozoides, además este órgano participaría en su almacenamiento (Chen et al., 2006). La ventaja que proporciona el ser una proteína doblemente expresada (testículos y epidídimo), podría ser el aumentar y/o sustituir las isoformas testiculares existentes a través de los lípidos de anclaje.

Cabe señalar que en el ratón, las isoformas del epidídimo y la testicular de Spam1 comparten la misma masa molecular (67 kDa). Sin embargo, en electroforesis en gel de 2D, Spam1 testicular tiene un rango de punto isoeléctrico más amplio, que va desde 6,6 hasta 9,0, en comparación con las isoformas del epidídimo (7.3-9.0) (Zhang y Martin-DeLeon 2003a). En bovino fue demostrado que la SPAM1 obtenida de espermatozoides tenía dos isoformas de 70 y 80 kDa, en el mismo

estudio la proteína SPAM1 que se obtuvo a partir de fluido epididimario se encontró la banda de 80 kDa, además se observó claramente una banda de aproximadamente 55 kDa (Fig. 29) pero desconocemos por qué los autores no discutieron la presencia de esta (Morin et al., 2010).

Investigaciones en el ratón demostraron que Spam1 es depositada en el fluido luminal del epidídimo y del útero en exosomas, llamados epididimosomas y uterosomas respectivamente (Griffiths et al., 2008a). En este mismo trabajo se demostró que los espermatozoides incubados con epididimosomas y uterosomas adquirieron la Spam1, al mirar los espermatozoides en microscopía electrónica se observó que la Spam1 fue localizada en los lugares donde habitualmente se localiza la proteína endógena.

En la especie bovina investigaciones de la proteína P25b demostraron que está contenida en epididimosomas y al incubarse con espermatozoides está se transfiere a los espermatozoides (Frenette y Sullivan 2001, Frenette et al., 2002). Resultados posteriores del mismo laboratorio demostraron, que la incubación de espermatozoides de ratón nulos de Spam1 en fluido oviductal adquirieron la proteína por vía exógena (Griffiths et al., 2008b).

La superficie de los espermatozoides en los mamíferos está muy bien organizada en subdominios (Sullivan y Saez 2013). Las proteínas de los espermatozoides, incluidas las adquiridas en el epidídimo se encuentran en regiones específicas del espermatozoide dependiendo directamente de la funcionalidad de estas (Cooper 1998). La transferencia de las proteínas de los epididimosomas al espermatozoide debe ocurrir de forma tal que las proteínas recién adquiridas son segregadas a subdominios relevantes para cada función por proteína específica (Sullivan y Saez 2013). Los dominios de membrana resistentes a detergentes "*detergent-resistant membrane*" (DRM) enriquecidos en colesterol y enfingomielina, son los que agregan especialmente proteínas ligadas a un anclaje GPI, como es el caso de

SPAM1 (Sullivan y Saez 2013). Con esto se demuestra que los espermatozoides a lo largo del tracto genital masculino y femenino van adquiriendo la proteína SPAM1.

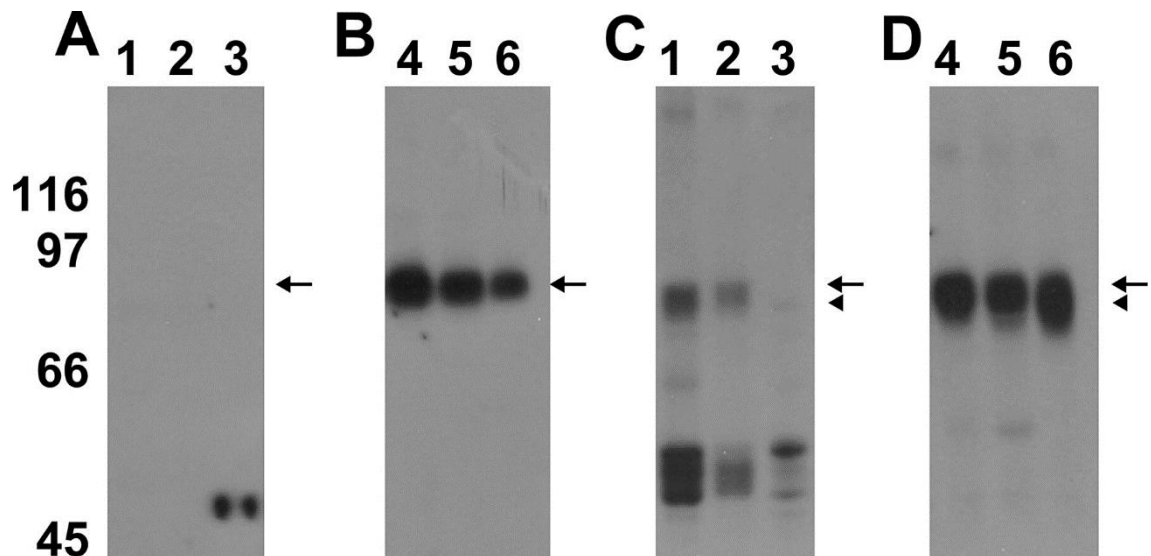


Figura 29 Detección por Western-blot de las dos isoformas de SPAM1 en el fluido epididimario. (1, 2 y 3) 20  $\mu$ g de las porciones de cabeza, cuerpo, y cola del epidídimo y espermatozoides bovinos (4, 5 y 6). Anticuerpo C-terminal (A y B) y el anticuerpo N-terminal (C y D). Las flechas indican la posición de 80 kDa, la posición de la isoforma de 70 kDa se indica mediante una punta de flecha. Tomado Morin et al., 2010.

### 2.3.4.- Funciones reproductivas de SPAM1

Se ha demostrado que SPAM1 juega un papel en por lo menos tres funciones importantes durante la fecundación, la primera es la dispersión del *cumulus oophorus* (Gmachl et al., 1993, Lin et al., 1994, Cherr et al., 2001, Yoon et al., 2014), otra actividad es la unión secundaria a la zona pelúcida después de la RA (Primakoff et al., 1985, Gmachl et al., 1993) y por último la señalización asociada a la exocitosis acrosómica vinculada al dominio del receptor HA (Cherr et al., 2001).

#### 2.3.4.1.- Actividad hialuronidasa de SPAM1

La proteína SPAM1 marca una notable diferencia con respecto a las hialuronidasas comunes (a excepción de Hyal5); y es que SPAM1 se activa en un pH neutro y ácido, mientras que las otras hialuronidasas sólo pueden ser activas en un medio con pH ácido, (Cherr et al., 2001),

Estas actividades enzimáticas diferentes se atribuyen a la forma insoluble y soluble, respectivamente, de la proteína.

La actividad hialuronidasa ácida (forma soluble) de SpAM1, con un dominio receptor HA, después de la RA, se pierde el extremo C-terminal para que así pueda participar en la penetración de la zona y el espacio perivitelino (Martin-DeLeon 2006). Se han identificado dos regiones de la molécula de macaco SPAM1 que son los sitios catalíticos responsables de la actividad de hialuronidasa uno de  $142 \pm 172$  aa y otro  $277 \pm 297$  aa; denominados péptidos 1 y péptidos 3, respectivamente (Yudin et al., 2001). Los primeros trabajos en el humano demostraron que la proteína SPAM1 (PH-20) tenía actividad hialuronidasa (Gmachl et al., 1993), así en el ratón se demostró que los espermatozoides incubados con anti-PH-20 perdió la capacidad de penetrar el *cumulus oophorus* (Lin et al., 1994).

En la especie bovina el dominio hialuronidasa de SPAM1 se expresa en la superficie de la región post-acrosomal de la cabeza de los espermatozoides, esto para facilitar su interacción con el HA presente en la *cumulus oophorus* que rodea el ovocito (Morin et al., 2010). Recientes investigaciones *in vitro* enfocadas para determinar la actividad hialuronidasa con proteína recombinante SPAM1 porcina, confirmaron la capacidad de esta para disgregar el cumulus oophorus. En este mismo trabajo se demostró que al anticuerpo policlonal anti-SPAM1 inhibe la interacción espermatozoide-ovocito en la fecundación *in vitro* (FIV) (Yoon et al., 2014).

#### 2.3.4.2.- Capacidad de unión a ZP de SPAM1

La proteína SPAM1 en el espermatozoide que ha experimentado la RA tiene una actividad de unión a ZP (enlace secundario). Debido a la presencia de HA en la ZP, la adherencia espermatozoide-ZP parece depender de la de la hidrólisis de HA por SPAM1, actuando como una hialuronidasa (Hunnicuttt et al., 1996). El dominio de enlace ZP-vinculante, se encuentra en la parte C-terminal de SPAM1. Una vez el

espermatozoide reaccionado SPAM1 es alterada en dos formas principales: 1) el polipéptido (64-kDa) sufre una reacción proteolítica y se divide en dos polipéptidos (un fragmento de 41-kDa y uno de 27 kDa); y 2) las moléculas de SPAM1 migran de la membrana plasmática de la cabeza posterior del espermatozoide, hacia la membrana acrosomal interna, uniéndose a la otra población de moléculas de SPAM1 preexistentes la membrana acrosomal interna (Fig. 30). El enlace espermatozoide-ZP puede ser inhibido por ciertos bloqueos de función anti-SPAM1 por anticuerpos monoclonales y policlonales anti-SPAM1 (Hunnicut et al., 1996).

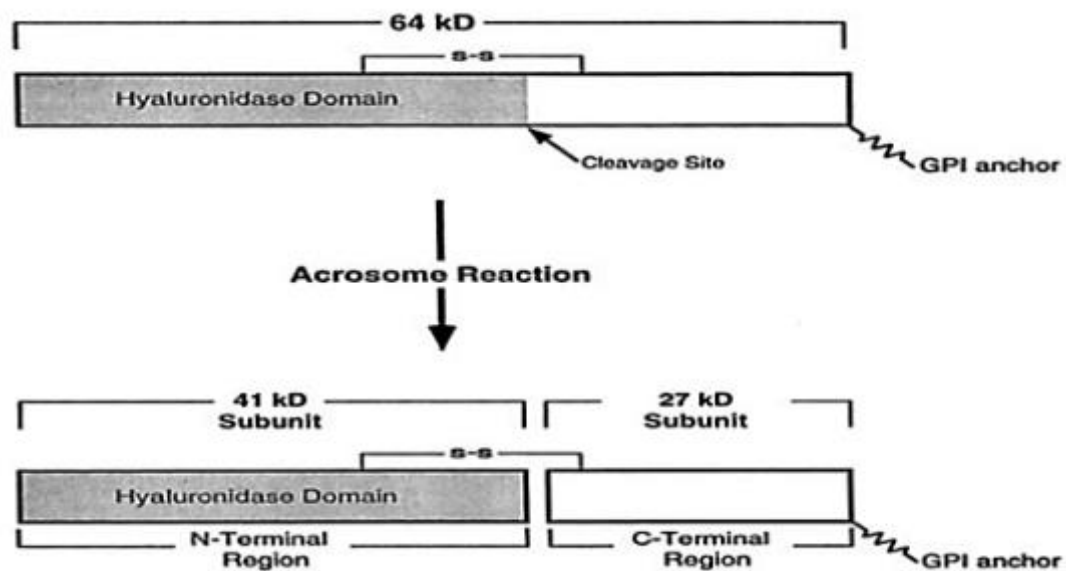


Figura 30 Esquema de la proteína SPAM1 de conejillo de indias antes y después de la RA. Arriba: SPAM1 intacto antes de la RA. Abajo SPAM1 tras la RA, fragmentación de polipéptidos (41-kDa y 27 kDa) se mantienen juntos por los puentes di-sulfuro. Tomado de Hunnicutt et al., 1996.

Estudios de delección de genes no han podido confirmar la importancia exclusiva de mediación de reconocimiento de espermatozoide-óvulo (Redgrove et al., 2012). Por lo tanto se asume que la importancia biológica de la unión espermatozoide ovulo es tan grande que ninguna sola molécula puede asumir la responsabilidad de mediar la unión a la ZP espermatozoide (Asquith et al., 2004, Nixon et al., 2007).

En el ratón se ha propuesto que el reconocimiento de espermatozoide-ovulo se lleva a cabo bajo un proceso mediado por el

montaje de un complejo de receptores de ZP, bajo la influencia de proteínas chaperonas. Un modelo descrito recientemente en humano implica la participación de la proteína chaperona HSPA2 y las proteínas ARSA y SPAM1 (Redgrove et al., 2012) formando un complejo, donde se sugieren que la HSPA2 mantiene orientada a SPAM1 en la superficie de los espermatozoides no capacitados y por lo tanto expuesta a la SPAM1 al exterior, mediando así, los mecanismos de unión y la dispersión de la matriz de HA en el *cumulus oophorus*. Una vez completada la capacitación el complejo se reorienta para exponer a la superficie a la ARSA (Redgrove et al., 2012, Redgrove et al., 2013) (Fig. 31), que se sabe participa en la mediación de unión a ZP (Rattanachaiyanont et al., 2001) y la dispersión del *cumulus oophorus* (Wu et al., 2007), características funcionales que comparte con la SPAM1.

#### 2.3.4.3.- Actividad de señalización celular de SPAM1

El HA es un polisacárido del tipo de N-glucosaminoglicano y está altamente conservado en las matrices extracelulares (ECM) de los mamíferos. Se cree que la señalización celular inducida por HA puede estar involucrada en la locomoción celular, la angiogénesis, cicatrización de heridas y embriogénesis (Volpi et al., 2009). Numerosas investigaciones están ahora en curso para identificar las proteínas de superficie celular que interactúan con HA y regulan su actividad de transducción de señal.

El ovocito en mamíferos está rodeado de ECM que debe atravesar el espermatozoide antes de la fecundación. La matriz del *cumulus oophorus* rica en HA, cumple diferentes funciones, facilita la recogida y transporte en el oviducto del ovocito, excluye los patógenos potenciales, reduce el estrés mecánico, estimula la motilidad espermática, mejora la selección espermática, mejora la fecundación y promueve la supervivencia del embrión (Talbot 1985, Talbot et al., 1999, Talbot et al., 2003). Las interacción entre el HA y los componentes de superficie del espermatozoide durante la penetración del *cumulus oophorus* pueden tener efectos directos sobre las funciones del flagelo



del espermatozoide y el acrosoma, para maximizar la probabilidad de la fecundación (Vines et al., 2001).

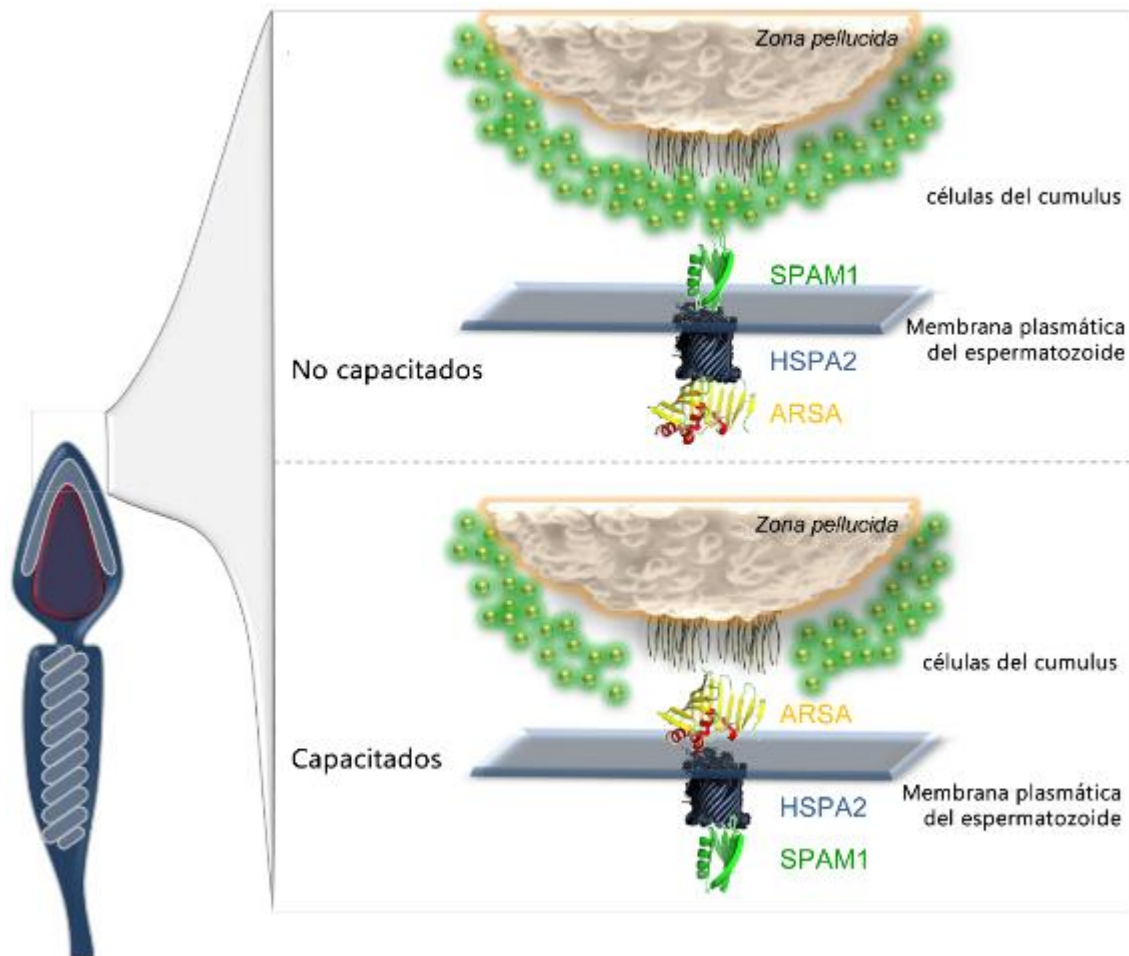


Figura 31 Modelo de expresión de HSPA2, SPAM1 y ARSA en la superficie de los espermatozoides humanos. Se propone que HSPA2 coordina la formación de un complejo receptor de ovocitos multimérica con SPAM1 y ARSA en los espermatozoides humanos. Este complejo está orientado de tal manera que la hialuronidasa, SPAM1, se expresa en la superficie de la mayoría de los espermatozoides no capacitados y por lo tanto se posiciona para mediar la unión y la dispersión de la masa del cumulus. Cuando los espermatozoides penetran el cumulus y completan su capacitación, el complejo receptor se reorienta; del tal forma que los espermatozoides expresan ahora que ARSA se expresa en la superficie expuesta como uno de los receptores putativos para la ZP. Este proceso implica la reorientación de la mediación de HSPA2. Modificado de Redgrove et al., 2013.

SPAM1 interactúa con el HA para aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  interno en el espermatozoide a través de GPI-ancla durante la penetración espermática en los cúmulos. Se ha propuesto que la unión de HA (incluido en el cumulus oophorus) y la superficie del espermatozoide, da como resultado la agregación de SPAM1, causando el evento de señalización para incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El aumento en  $\text{Ca}^{2+}$

no es suficiente para desencadenar la RA, pero si facilita su inducción, después de la unión del espermatozoide a la ZP. SPAM1 contiene un dominio funcional para la actividad de señalización celular inducida por HA, (G3, 143–510 aa) en el cual se localiza la región del péptido 2 (aa 205-235), que actúa como un potente enlace entre SPAM1 y HA. El péptido 2 representa el sitio catalítico de la actividad de señalización de SPAM1 (Vines et al., 2001).



# 3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS



### 3.1.- Objetivo general:

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es identificar diferentes mecanismos moleculares presentes en el tracto genital femenino implicados en el proceso de maduración del espermatozoide tras la inseminación.

### 3.2.- Objetivos específicos:

.- Analizar las similitudes y diferencias de expresión del transcriptoma de estos tejidos mediante el uso de micromatrices con especial referencia a los transcritos implicados en la secreción.

.- Analizar las similitudes y diferencias existentes en el fluido oviductal y uterino mediante electroforesis bidimensional-DiGE y espectrometría de masas.

.- Análisis de SPAM1 en el oviducto de diferentes mamíferos con especial referencia a la especie bovina.



# 4 MATERIALES Y MÉTODOS





## 4.1.- MATERIALES

### 4.1.1.- Anticuerpos

Inmunógeno	Casa comercial	Referencia	Procedencia
SPAM1	ATCC®	203-7D10	Manassas, EUA
Anti-OVGP1	Abcam®	Ab118590	Cambridge, GRB
Anti-Annexin I	SIGMA-ALDRICH	SAB2500072	Madrid, España
Anti-AKR1B1	Novus Biologicals	NBP1-53144	Littleton, EUA
Donkey anti-goat Ig-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2020	Heidelberg, Alemania
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	sc-2004	Heidelberg, Alemania
Donkey anti-mouse IgG-HRP	Thermo Fisher	SA1100	Rockford, EUA
Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488	Molecular Probes®	A-11029	Eugene, EUA

### 4.1.2.- Hormonas

Sustancia activa /concentración	Nombre comercial	Casa comercial	Procedencia
Cloprostenol 250µg/ml	Estrumate®	MSD Animal Health	Múnich, Alemania
Buserelina 0,004 mg/ml	Receptal®	MSD Animal Health	Múnich, Alemania

## 4.1.3.- Reactivos y Kits

Nombre	Nombre comercial	Referencia	Casa comercial	Procedencia
Albúmina sérica bovina	Bovine Serum Albumin	A2153	SIGMA	Madrid, España
Agarosa	Agarose	A9539	SIGMA	San Luis, EUA
Azul de coomassie	PageBlue Protein Staining Solution	24620	Thermo Scientific	Rockford, EUA
Azul de tripano	Trypan Blue	145-0022	Bio-Rad	Hercules, EUA
Bicarbonato de sodio	Sodium bicarbonate powder	S5761	SIGMA	San Luis, EUA
Bromuro de etidio (BrEt)	Ethidium bromide solution	E1510	SIGMA	San Luis, EUA
Cloroformo	Chloroform solution	611778	SIGMA	Madrid, España
Cóctel inhibidor de proteasas	cOmplete®	11697498001	Roche®	Mannheim, Alemania
Detergente Tween 20	TWEEN® 20	P1379	SIGMA-ALDRICH	San Luis, EUA
Enzima PCR	Taq DNA Polymerase	EP0281	Fermentas	San Leon-Rot, Alemania
Estreptomicina	Streptomycin sulfate salt	S9137	SIGMA	Madrid, España

Etanol 99.8%	Ethanol for molecular biology	1085430250	Millipore	Darmstadt, Alemania
Formaldehído	Formaldehído 30-36%	253572	Panreac	Barcelona, España
Glutamina	L-Glutamine	G8540	SIGMA	Madrid, España
Glutaraldehído	Glutaraldehyde 25 % solution in water	23114	Serva	Heidelberg, Alemania
Heparina	Anticuaagulante de Heparina	7A00144	Analema	
Hepes	HEPES $\geq 99.5\%$	H4034	SIGMA	Madrid, España
Isopropanol	2-Propanol	I9516	SIGMA	Madrid, España
Kit de aislamiento de exosomas	ExoQuick-TC™	EXOQ20A-1	System Biosciences	Mountain View, EUA
Kit de amplificación y marcado de un color	Agilent RNA Spike-In Kit, One Color	5188-5282	Agilent	Victoria, Australia
Kit de hibridación para expresión génica	Gene Expression Hybrid. Kit	5188-5242	Agilent	New Castle, EUA
Kit de etiquetado de muestras para microarray	Agilent Low-Input QuickAmp Labeling Kit	5190-2331	Agilent	Victoria, Australia
Kit de etiquetado mínimo Cydye DIGE Fluor	Amersham CyDye DIGE Fluor Minimal	25-8010-65	GE Healthcare	Buckinghamshire, Reino Unido

	Labeling Kit (5 nmol)			
Kit de lavado de microarray	Agilent Gene Expression, Wash Buffer Kit	5188-5327	Agilent	New Castle, EUA
Kit de purificación de ADN	DNA Clean & Concentrator™-5	D4003	Zymo Research	Irvine, EUA
Kit de purificación de ARN	RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen	Austin, EUA
kit de tampones crooslink	Protein A/G HP SpinTrap Buffer kit	28-9135-67	GE Healthcare	Uppsala, Suecia
Kit para cuantificación de proteína	Pierce™ BCA Protein Assay Reagent	23225	Pierce®	Rockford, EUA
Kit para la el aislamiento de ARN	RNAqueous® Total RNA Isolation Kit	AM1912	Ambion®	Carlsbad, EUA
Kit para revelado de membranas	Pierce ECL Western-blotting Substrate	32106	Pierce®	Rockford, EUA
LR-White	L.R. White Embedding Media	17411E	Polysciences Europe GmbH	Eppelheim, Alemania
Marcador de ADN	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	SM0241	Thermo Fisher	Vilnius, Lituania
Marcador estándar de proteína	Precision Plus Protein™	161-0374	Bio-Rad	Hercules, EUA

Medio de montaje anhidro para microscopía	DPX	1005790500	Millipore	Darmstadt, Alemania
Medio de montaje de fluorescencia	Dako Fluorescence Mounting Medium	S3023	Dako	Gostrup, Dinamarca
Paraplast	Leica-Paraplast PLUS	39602004	Leica Biosystems Richmond, Inc.	Richmond, EUA
Penicilina	Penicillin G sodium salt	P3032	SIGMA	Madrid, España
Peróxido de hidrogeno	Hydrogen Peroxide 30%	121076	Panreac	Barcelona, España
Polivinil alcohol	Poly(vinyl alcohol)	P8136	SIGMA-ALDRICH	San Luis, EUA
Proteína G	Protein G Mag Sepharose	28-9440-08	GE Healthcare	Uppsala, Suecia
Reactivo para el aislamiento de ARN	TRIzol® Reagent	15596-018	Ambion®	Karlsruhe, Alemania
Reversa transcriptasa	SuperScript® III	18080-051	Invitrogen™	Karlsruhe, Alemania
Solución estabilizadora de ARN	RNAlater® Stabilization Solution	AM7020	Ambion®	Huntington, Reino Unido
Triton	Triton™ X-100	X100	SIGMA-ALDRICH	San Luis, EUA
Xileno	Xileno, mezcla de isómeros	161769	Panreac	Barcelona, España

---

## 4.1.4.- Tampones y soluciones

Nombre	Nombre comercial	Referencia	Casa comercial	Procedencia
Agua para biología molecular	Water Molecular Biology Reagent	W4502	SIGMA	San Luis, EUA
Agente reductor	NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X)	NP0009	Novex®	Paisley, Reino Unido
Medio de cultivo DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	D5796	SIGMA	San Luis, EUA
Medio 199	Medium 199, With Hanks' salts and L-glutamine	M0393	SIGMA	San Luis, EUA
Solución salina fosfatada (PBS)	Phosphate buffered saline	P5493	SIGMA	Madrid, España
Solución salina fosfatada Dulbecco (DPBS)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	D8662	SIGMA	San Luis, EUA
Solución salina tamponada de Tris (TBS)	Tris Buffered Saline 10 ×, solution	T5912	SIGMA	Madrid, España
Suero Fetal Bovino	Fetal Bovine Serum	16000-044	Gibco®	Carlsbad, EUA

Tampón de carga para electroforesis SDS	SDS Sample Buffer (4X)	NP0007	Novagen®	Madison, EUA
Tampón de recorrido	NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (20X)	LA0041	Novex®	Carlsbad, EUA
Tampón de transferencia	NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	NP0006-1	Novex®	Carlsbad, EUA
Tampón Tris.Acetato, EDTA (TAE)	Tris Acetate-EDTA buffer (10×)	T8280-1L	SIGMA	San Luis, EUA

#### 4.1.5.- Varios

Descripción	Nombre comercial	Casa comercial	Procedencia
Cámara de hibridación	Microarray hybridization chamber assemblies	Agilent	Santa Clara, EUA
Geles poliacrilamida	NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris	Novex®	Carlsbad, EUA
Kit de juntas de hibridación	Hybridization Gasket Slide Kit	Agilent	Santa Clara, EUA
Membrana de transferencia PVDF	Immobilon-P	Millipore	Billerica, EUA
Porta objetos para hibridación	Superfrost™ Microscope Slides	Thermo Scientific	Waltham, EUA



Termobloque	AccuBlock™	Labnet	Woodbridge, EUA
Tiras IPG pH 3-10	ReadyStrip™ IPG Strips	Bio-Rad	Hercules, EUA
Tubos de colección de suero sanguíneo	Primavatte® Serum (Z) 10 ml	Kabe Labortechnik	Wiehl, Alemania
Tubos de colección de plasma sanguíneo	Primavatte® S EDTA 10 ml	Kabe Labortechnik	Wiehl, Alemania

#### 4.1.6.- Equipos

Nombre	Modelo	Casa comercial
Bioanalizador	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Centrifuga	GS-15R	Beckman, Múnich
Cámara de conteo celular	Neubauer	VWR Internacional, Haasrode
Contador automático de células	TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad, Hercules
Cromatógrafo líquido HPLC	Agilent 1100 Series HPLC Value System	Agilent Technologies, Waldbronn
Cubeta de electroforesis	XCell SureLock® Mini-Cell	Invitrogen™, Carlsbad
Escáner de alta definición	Image Scanner	Amersham
Escáner de micromatrices	Agilent G2565CA Microarray Scanner System	Agilent Technologies,

Espectrofotómetro NanoDrop	ND-1000	PEQLAB, Erlangen
Espectrómetro de masas	Agilent 1100 Series LC/MSD Ion Trap	Agilent Technologies, Alpharetta
Histoquinete	Shandon Citadel 1000	Thermo Scientific
Homogeneizador de tejidos	DIAX 900	ART Labortechnik, Mühlheim
Horno de hibridación	Herahybrid12	Kendro, Langenselbold
Incubadora de cultivos celulares	Steri-Cult 3310	Thermo Scientific, EUA
Liofilizador	ALPHA 1-2 / LD Plus	Martin Christ, Osterode am Harz
Microcentrífuga	5417R	Eppendorf®, Hamburgo
Microcentrífuga	5418R	Eppendorf®, Hamburgo
Microscopio confocal	LEICA TCS-SP2	Leica Microsystems, Heidelberg
Microscopio electrónico de transmisión	PHILIPS TECNAI 12	PHILIPS
Micrótomo de rotación	Microm HM 310	MICROM International GmbH, Walldorf
Rack magnético	MagRack 6	GE Healthcare, Uppsala
Sistema de isoelectroenfoque	PROTEAN® i12™ IEF Cell	
Termociclador	Mastercycler® personal thermal cyclor	Eppendorf®, Foster City

Termo mezclador	Thermomixer®	Eppendorf®, Hamburgo
Typhoon™	Typhoon™ 9410	GE Healthcare, Uppsala
Ultramicrótomo	Ultracut Reichert jung	
Visualizador de Fluorescencia UV	AlphaImager Mini System	ProteinSimple™, Santa Clara

---

## 4.2.- MÉTODOS

### 4.2.1.- Animales

La mayor parte de los animales utilizados para la obtención de muestras objeto de esta tesis, procedieron del matadero de Orihuela (Alicante). Adicionalmente, se obtuvieron muestras de novillas compradas exclusivamente para la realización de la parte de micromatrices y electroforesis diferencial en gel (DiGE). En todos los casos los animales fueron sacrificados bajo la normativa europea de bienestar animal.

#### 4.2.1.1.- Novillas

Seis novillas cíclicas *Bos taurus* raza Simmental Fleckvieh, de entre 15 a 18 meses de edad, fueron utilizadas para la obtención de muestras para la extracción de ARN y de los fluidos oviductales y uterinos, así como para los tejidos procedentes del oviducto y del útero. Las novillas fueron compradas a un ganadero local en el estado de Baviera (Alemania). Después de la compra, los animales fueron transportados a las instalaciones de la estación experimental de Veitshof de la Universidad Tecnológica de Múnich (TUM) ubicadas en el poblado de Freising en Alemania. Los animales tuvieron un período de adaptación de dos semanas antes del inicio de la sincronización. A las novillas se les practicó una exploración rectal y todas presentaron tractos

reproductivos normales sin ningún tipo de malformación, ni indicios de patologías reproductivas. A su vez, mediante la palpación ovárica, se reveló la presencia de cuerpos lúteos o folículos, confirmando que se encontraban ciclando.

#### 4.2.1.2.- Sincronización del ciclo estral de novillas

La sincronización se inició con la aplicación de una inyección intramuscular (IM) de 500  $\mu\text{g}$  de cloprostenol (Fig. 32), análogo de  $\text{PGF}_2$  que estimula la regresión del cuerpo lúteo (día 0). Pasadas 48 horas (día 2) y tras la aplicación de estrumate vía IM, se inyectó IM 0,01 mg de buserelina, que es un análogo de GnRH, que estimula la síntesis de gonadotropinas desencadenando el crecimiento y desarrollo folicular. Doce horas después de la aplicación de buserelina, el celo se detectó a través de la observación de la conducta sexual (inquietud, bramado, tolerancia a la monta e intento de monta a otras novillas y la presencia de moco vaginal). Para determinar el estado folicular se realizó una exploración rectal (día 8), encontrando en todas las novillas la presencia de cuerpos lúteos. Una segunda dosis de 500  $\mu\text{g}$  de cloprostenol fue inyectada IM a las novillas en el día 12. Los animales fueron sacrificados en la fase periovulatoria (día 15) en un matadero de investigación, bajo la normativa europea de bienestar animal.



Figura 32 Inyección de hormonas a novillas. Se realizó vía intramuscular en la región de la anca.

## 4.2.2.- Obtención de material biológico

### 4.2.2.1.- Suero y plasma sanguíneo bovino

Las muestras de sangre fueron tomadas a partir de sangre periférica por corte del pabellón auricular inmediatamente después del sacrificio. Para coleccionar las muestras, fueron utilizados tubos de colección de sangre primavette® suero y primavette® EDTA, estos para la obtención de suero y plasma sanguíneo respectivamente. Una vez en el laboratorio las muestras fueron centrifugadas a 2000g, por 10 minutos a 4°C en una centrifuga de Beckman, el sobrenadante fue colocado en tubos Eppendorf de 1,5 ml y centrifugadas a 13000g a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, los sobrenadantes fueron colocados en nuevos viales y congelados a -80°C.

### 4.2.2.2.- Fluido oviductal bovino (FOB)

Inmediatamente después del sacrificio, los oviductos fueron retirados y disecados eliminando el mesosalpinx (Fig. 34A), con cuidado para no perforarlos. Después fueron lavados en PBS para retirar la sangre por la posible ruptura de los vasos sanguíneos. El fluido oviductal se colectó por medio de aspiración con micropipeta como anteriormente fue descrito (Carrasco et al., 2008a) (Fig. 33) para evitar en la medida de lo posible la proteólisis, el FOB se colocó en un tubo Eppendorf® de 1,5 ml que contenía 500 µl de inhibidor de proteasas que fue diluido a razón de una pastilla, en 50 ml de PBS, según lo recomendado por el fabricante. Posteriormente, se colocaron en hielo para transportarlos al laboratorio. Una vez en el laboratorio, para eliminar los detritus celulares los FOBs fueron centrifugados a 7000g, desechando el precipitado y colocando los sobrenadantes en tubos Eppendorf® de 1,5 ml, posteriormente se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.



Figura 33 Extracción de fluido oviductal con micropipeta.

#### 4.2.2.3.- Fluido uterino bovino (FUB)

Los cuernos uterinos fueron retirados con dos cortes transversales, el primero, 2 cm a partir de la unión útero-tubárica y el segundo a partir de la bifurcación uterina (Fig. 34B).



Figura 34 Disección de tracto genital de vaca. (A) Oviducto ipsilateral (B) Cuerno uterino ipsilateral.

El fluido uterino (FUB) se obtuvo mediante la técnica de "flushing", con una jeringuilla de 20 ml que contenía 10 ml de PBS con inhibidor de proteasas. El pivote de la jeringuilla se colocó en el orificio de la parte distal del cuerno uterino (región próxima al istmo de la trompa uterina), para aplicar el flujo en dirección distal a proximal. El

FUB fue colectado en vaso de precipitado estéril y posteriormente colocado en un tubo Falcon de 15 ml. Los FUBs fueron transportados en hielo y centrifugados a 7000g durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman, el precipitado con el moco no fue utilizado en los experimentos, el sobrenadante se colocó en tubos nuevos y fueron congelados a -80°C hasta su procesamiento.

#### 4.2.2.3.1 Extracción de proteínas de exosomas de fluido oviductal

Los exosomas fueron aislados de muestras de fluido oviductal con Exoquick™ (System Biosciences, Inc.), una solución de precipitación patentada y diseñada para aislar los exosomas de fluidos corporales. Se transfirieron 62,5 µl de fluido, que previamente se había centrifugado 10 min a 7500 rpm para eliminar restos celulares, a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml más la misma cantidad de agua libre de nucleasas y se agregaron 31,5 µl del tampón del kit comercial (Exoquick™). Se realizó una homogenización suave para asegurar una mezcla adecuada del fluido y del tampón, luego se incubó a 4° C durante toda la noche. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 30 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se retiró cuidadosamente, y el sedimento que contenía los exosomas se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasas.

#### 4.2.3.4.- Extracción de proteínas de espermatozoides bovinos

Los espermatozoides bovinos fueron empleados como control de la técnica puesto que se ha descrito previamente la presencia de la proteína SPAM1 en estos gametos (Lalancette et al., 2001). Los espermatozoides utilizados fueron obtenidos a partir de pajuelas comerciales de semen congelado bovino utilizadas para la inseminación artificial. Las pajuelas fueron descongeladas en baño a 37°C durante 1 minuto para la eliminación de los restos de medio de congelación y líquido seminal, los espermatozoides fueron lavados y centrifugados a 4°C, 3 veces con PBS Dulbecco (DPBS) a 800g durante 10 min en una microcentrífuga Eppendorf® 5418R. La concentración espermática fue calculada mediante el empleo de una cámara de recuento celular de

Neubauer. Para la extracción de las proteínas espermáticas, los espermatozoides (136x10<sup>6</sup>/ml) fueron incubados durante 30 minutos a 37°C en una solución de DPBS con 0,5% de Triton™ X-100 e inhibidor de proteasas (concentración). Una vez terminada la incubación, se obtuvieron dos fracciones (solubles y precipitadas) mediante centrifugación (14000g, 10 min a 4°C). El sobrenadante fue alicuotado y congelado a -80°C hasta su utilización.

#### *4.2.3.5.- Extracción de proteínas de células epiteliales del oviducto bovino*

Adicionalmente se extrajo la proteína de células epiteliales del oviducto bovino, estas células se obtuvieron a partir de raspados del epitelio oviductal con portaobjetos de cristal estéril en un ángulo de 45°. El resultado del raspado se incubó en una solución de DPBS con 0,5% de Triton™ X-100 e inhibidor de proteasas (concentración), una vez terminada la incubación, las muestras se centrifugaron a 14000g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue recolectado y congelado a -80°C hasta su utilización.

#### *4.2.3.6.- Determinación de la concentración de proteínas*

La concentración de proteína de las muestras se determinó utilizando el método colorimétrico del ácido bicinonínico-BCA™, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La detección colorimétrica de las muestras se midió en el espectrofotómetro, a 562 nm de longitud de onda. Los resultados se analizaron en el software GraphPad Prism® versión 4.0. Se realizó una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA.

#### *4.2.2.7.- Muestras de tejido para biología molecular*

Las muestras fueron obtenidas de diferente origen. Para la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR), se obtuvieron de animales procedentes de matadero, para la obtención de ARN para análisis mediante micromatrices en la especie bovina se obtuvieron de novillas sincronizadas. Las muestras procedentes de matadero fueron recogidas inmediatamente después del sacrificio, se colocaron en



criotubos se sumergieron en nitrógeno líquido para su congelación, luego se dejaron en nieve carbónica para su transporte hasta el laboratorio, una vez en el laboratorio se colocaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Adicionalmente se obtuvieron muestras de oviducto humano, estas se obtuvieron mediante salpinguectomía bilateral en el transcurso de una histerectomía abdominal total con doble anexectomía por útero miomatoso de una paciente mujer de 49 años, en fase folicular, en la que al momento de la extracción de la muestra se visualizó un folículo pre-ovulatorio en ovario izquierdo. Una vez fuera del campo quirúrgico, la muestra fue transportada hasta el laboratorio donde se seccionó la zona ampular de la trompa contralateral del ovario izquierdo que fue la incluida en este estudio. Los procedimientos experimentales para el uso y recogida de las muestras de humanos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía de Murcia, España, de acuerdo a la Ley española 14/2006 relativa a las técnicas de reproducción humana asistida (TRA).

#### 4.2.2.7.1 Muestras de oviducto y endometrio bovino

Las muestras de las novillas sincronizadas se obtuvieron una vez terminada la obtención de los fluidos. Los oviductos fueron cortados longitudinalmente para realizar el raspado epitelial, colocados en cajas de Petri fueron dispuestos con el epitelio hacia la parte superior, utilizando portaobjetos de cristal estériles se realizó el raspado epitelial en ángulo de  $45^{\circ}$ , el tejido obtenido fue colocado en Eppendorf® de 1,5 ml libres de enzimas degradadoras de ARN y ADN. Las muestras fueron tomadas y clasificadas de acuerdo a la región del oviducto de la que procedían (Fig. 35). Para el estudio de micromatrices, las muestras que fueron utilizadas se corresponden a las regiones de la ampolla y de la unión istmo-ampular.

Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf® que contenían RNAlater®, posteriormente se colocaron en hielo para su traslado al laboratorio, se mantuvieron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche para

impregnarse de RNAlater® y después fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento.

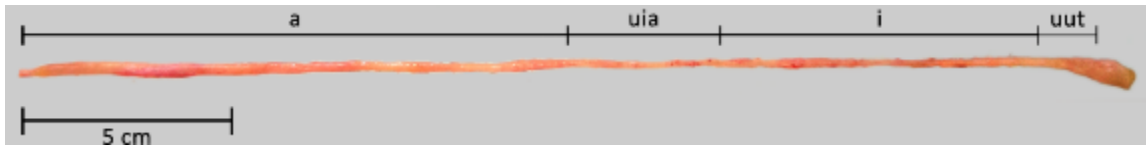


Figura 35 Imagen del oviducto bovino posterior a la disección donde se indican sus diferentes regiones. (a) ampolla, (uia) unión ístmo ampular, (i) ístmo y (uut) unión útero tubárica.

#### 4.2.2.8.- Obtención de ovocitos bovinos ováricos

Los ovarios para la obtención de ovocitos procedieron de vacas de matadero. Estos fueron recogidos en tampón DPBS y transportados en hielo hasta el laboratorio. Una vez en el laboratorio, fueron lavados para eliminar los restos de sangre. Posteriormente se procedió a la extracción de los complejos *cumulus oophorus* de los folículos antrales (3-6 mm de diámetro), mediante aspiración con jeringa y aguja de 18 G. Los CCOs de las especies bovina, se seleccionaron en un medio de colección que consiste medio TCM-199 con sales de Hanks y L-Glutamina a pH 7,4 suplementado (Tabla 7).

Tabla 7 Tabla de complementos del medio de colección de ovocitos (TCM).

Componente	Concentración
Bicarbonato sódico	4,20 mM
Hepes	10,00 mM
Suero fetal bovino	2,00 % (v/v)
Glutamina	200,00 mM
Penicilina	10 000 UI/ml
Estreptomicina	10 000 UI/ml
Polivinilalcohol	0,005 g/l
Heparina	6 µl/ml

#### 4.2.3.- Análisis proteico

En esta tesis, pusimos especial énfasis en la detección de proteínas, contenidas en los fluidos reproductivos de la especie bovina, mediante diferentes técnicas de separación e identificación de proteínas. La selección de estas técnicas se basó en la especificidad y sensibilidad para identificar el contenido proteico de mezclas

complejas (FOB y FUB), así como su similitud y sus diferencias, la identificación de proteínas mayoritarias y el contenido proteico aportado por el suero sanguíneo como trasudado.

#### 4.2.3.1.- Producción de anticuerpos

##### 4.2.3.1.1.- Cultivo de hibridomas para la obtención de anticuerpo SPAM1

bovino

El anticuerpo anti-SPAM1 bovino fue obtenido por el cultivo de hibridomas de ratón (linfocitos B de mieloma) (203-7D10, ATCC®, Manassas, VA, USA). Este anticuerpo, dirigido contra los aminoácidos 2-17 de p60 v-src, se demostró que reconoce específicamente a SPAM1 en el espermatozoide bovino (Lalancette et al., 2001). Las células una vez descongeladas fueron resuspendidas en medio de Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) adicionado con 10% de suero Fetal Bovino (SFB) cultivándose en una incubadora de cultivos celulares a 37°C con una presión de CO<sub>2</sub> del 7-10%. Se determinó la viabilidad tiñiendo las células con azul de tripano, el conteo celular se realizó con un contador automático.

Las células fueron incubadas por varios días, el medio de cultivo fue cambiado cada 24 horas, el sobrenadante para la obtención del anticuerpo se colectó cuando se alcanzó una densidad de  $2 \times 10^6$  de células viables. El medio que contenía el anticuerpo monoclonal anti-SPAM1 fue alicuotado en criotubos de 1,8 ml y congelado a -80°C. Los criotubos fueron colocados en un liofilizador para concentrar el anticuerpo siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto del liofilizado fue conservado a -80°C hasta su utilización. Antes de ser utilizado el anticuerpo fue resuspendido en 180 µl de agua libre de proteasas. La concentración de trabajo fue de una dilución de 1:10.

#### 4.2.3.2.- Inmunohistoquímica para microscopía óptica (MO)

##### 4.2.3.2.1.- Fijación de muestras

Las muestras de tejido para inmunohistoquímica fueron recolectadas después de haber tomado las muestras para biología molecular. Los tejidos tubulares para MO fueron abiertos longitudinalmente y cortados en trozos pequeños e introducidos en PBS con 4% formaldehído, se mantuvieron a RT toda la noche, después fueron colocadas en PBS a 4°C hasta su posterior procesamiento.

##### 4.2.3.2.2.- Inclusión de tejidos en bloques de paraplast

La inclusión de los tejidos se realizó de manera automática en un histocineta, los tejidos fueron deshidratados gradualmente con etanol desde un 50% hasta llegar al 100%, el medio de aclaramiento de los tejidos se llevó a cabo en tolueno, finalmente la inclusión se hizo en paraplast plus (Sigma). Los tejidos fueron montados en moldes para formar los bloques, una vez secos los bloques fueron cortados (5  $\mu\text{m}$ ) en micrótopo de rotación y montados en portaobjetos de cristal tratados con una solución de poly-L-lisina.

##### 4.2.3.2.3.- Inmunohistoquímica en portaobjetos

Los portaobjetos que contenían los cortes fueron desparafinados en xilol y rehidratados en soluciones decrecientes de alcoholes. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena, los portaobjetos fueron embebidos en una solución de PBS y 1% de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 30 minutos, después de 3 lavados con PBS, los portaobjetos fueron incubados con los anticuerpos primarios (anticuerpos primarios y secundarios diluidos en PBS y 1 % de BSA). La incubación se realizó en cámara húmeda a RT durante 1 hora. Después se lavaron tres veces con PBS y se procedió a la incubación con anticuerpos secundarios HRP con las mismas condiciones de la incubación primaria. Después de tres lavados con PBS se procedió al revelado utilizando como sustrato 3,3'-diaminobencidina (DAB) que al oxidarse por la hidrólisis del agua oxigenada añadida al tampón forma

un producto marrón insoluble. El contraste se realizó con hematoxilina y se montaron con un medio de montaje anhidro (DPX) para su posterior visualización. La visualización fue realizada en microscopio óptico con cámara digital acoplada y las imágenes extraídas con el software de imagen. Los controles utilizados para esta técnica fueron la incubación de portaobjetos en medio de incubación sin anticuerpo primario y posteriormente la incubación con el anticuerpo secundario.

#### *4.2.3.3.- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)*

##### *4.2.3.3.1.- Fijación*

La fijación de las muestras para la realización de técnicas inmunocitoquímicas a nivel ultraestructural usando el TEM se realizó 0,5% de glutaraldehído diluido en PBS durante 2 horas a 4°C y se lavaron en PBS, posteriormente se mantuvieron a 4°C en PBS hasta su posterior procesamiento.

Adicionalmente se colectaron muestras para realizar un estudio de TEM convencional para un análisis morfológico. Para ello, las muestras fueron fijadas en PBS y 2,5% glutaraldehído por 2 horas a 4°C, después fueron postfijados con 1% de tetraóxido de osmio en tampón PBS durante 1 hora a RT.

##### *4.2.3.3.2.- Inclusión de tejidos en LR-White*

Los tejidos fijados para TEM fueron incluidos en LR-White que es una resina que una vez polarizada es hidrófila, por lo tanto, los reactivos de inmunocitoquímica penetran fácilmente en los tejidos incluidos. Los tejidos fueron deshidratados en soluciones graduales de etanol (50-70%) y embebidos en LR-White en condiciones de oscuridad y agitación. Las muestras fueron montadas en capsulas que contenían LR-White y polimerizadas a 50°C en estufa durante 24 horas. Los cortes ultrafinos (50 nm) fueron realizados en un ultramicrotomo (REICHERT) y montados en rejillas de níquel recubiertas con Formvar.

#### 4.2.3.3.- Inmunocitoquímica en rejillas

Esta técnica fue realizada mediante la incubación de las rejillas en gotas por flotación. Que consiste en la colocación de gotas de incubación (15-20  $\mu$ l) y lavados sobre un parafilm sobre superficie plana y la colocación de las rejillas sobre dichas gotas. El primer paso fueron 2 lavados en PBS seguido del bloqueo de uniones inespecíficas mediante la incubación en PBS y 1% de BSA durante 1 hora. Posteriormente se realizó la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en PBS y 1% de BSA durante 1 hora. Se hicieron tres lavados con PBS antes de la incubación con los anticuerpos secundarios (ver tabla de materiales), dicha incubación también fue de 1 hora, al terminar la incubación, se lavaron nuevamente y se procedió a la incubación de 1 hora con proteína A conjugada con partículas de oro de 15 nm de diámetro. Tras los lavados con PBS, las rejillas se lavaron con agua bidestilada y se dejaron secar en papel filtro.

Previa a su visualización al TEM, las rejillas fueron contrastadas mediante la incubación de 7 min de las rejillas en una solución de 2% de acetato de uranilo, tras el lavado con agua bidestilada corriente y secado en papel filtro, las rejillas fueron incubadas por 1 minuto en citrato de plomo. Posteriormente, las rejillas fueron lavadas con agua bidestilada y secadas en papel filtro antes de ser observadas en el microscopio electrónico PHILIPS TECNAI 12.

#### 4.2.3.4.- Inmunoprecipitación de proteínas

La inmunoprecipitación de proteínas en este estudio se realizó con la finalidad de precipitar proteínas minoritarias a partir de mezclas complejas como el FOB. La técnica que elegimos fue el uso de perlas magnéticas recubiertas de proteína G separosa, la cual tiene alta afinidad para anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos inmovilizados en las esferas magnéticas capturan por afinidad a las proteínas diana contenidas en el FOB (inmunoprecipitación). El protocolo de nuestra elección fue el llamado "Crosslink", este protocolo se caracteriza por mantener la unión covalente del anticuerpo a la

perlas magnéticas después del eluido, permitiendo con ello sólo la elución de las proteínas inmunoprecipitadas (Fig. 36).

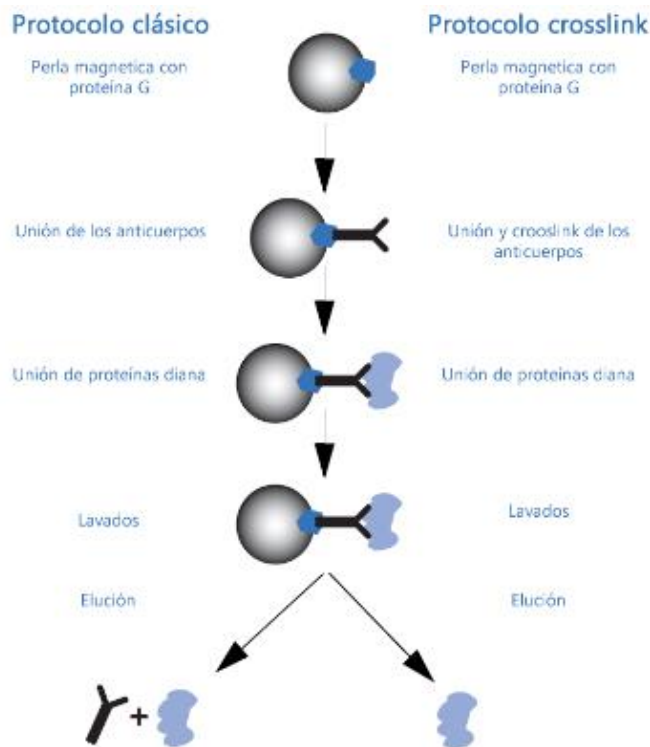


Figura 36 Representación esquemática del protocolo de inmunoprecipitación. Modificado del manual de instrucciones 28-9537-63 AA GE Healthcare.

Para la realización de esta técnica se eligieron las perlas de proteína G separosa y el kit de tampones para el protocolo crosslink (GE Healthcare), así como un rack magnético, que inmoviliza las perlas y permite la colección de las soluciones utilizadas en este protocolo. La técnica de inmunoprecipitación se inicia con la dilución de los anticuerpos (5  $\mu$ l) en 495  $\mu$ l de solución de unión TBS (50 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,5 y 2M de urea). Las perlas magnéticas contenidas en un medio de conservación, son lavadas con el medio de unión TBS que a su vez equilibra el pH, los viales que contienen las perlas son colocados en el rack magnético, para eliminar el medio de lavado, inmediatamente después se coloca el medio de unión que contiene el anticuerpo, se incuba 1 hora a RT en agitación suave. El sobrenadante es eliminado y se procede al lavado.

Para el crosslink del anticuerpo, las perlas son lavadas con la solución crosslink A (200 mM trietanolamina, pH 8,9) del kit de tampones. Posteriormente, las perlas son incubadas con la misma solución adicionada con dimetil-pipelimidato (DMP) a una concentración final de 50 mM y se incubaron 1 hora a RT en agitación suave. Se retiró el medio y para realizar el bloqueo que evita las posteriores uniones inespecíficas, las perlas fueron incubadas con la solución de crooslink B (100 mM etanolamina, pH 8,9) 15 min a RT. Se retiró el medio y se añadió el medio de eluido (0.1 M Glycine-HCl, 2 M urea, pH 2,9) para retirar el anticuerpo no acoplado. Se lavaron las perlas con solución de unión (x2).

Aproximadamente 500 µg de proteína total contenido en el FOB (aproximadamente 12,5 µl de fluido) fue diluido en solución de unión (475,5 µl). Las perlas son incubadas con el FOB diluido a 4°C en agitación suave durante toda la noche. La porción no unida es recolectada y congelada (en principio no es relevante puesto que no es lo que vas a estudiar, luego vemos si lo quitamos). Las perlas son incubadas con el FOB diluido a 4°C en agitación suave durante toda la noche, la porción no unida es recolectada y congelada. Las perlas fueron lavadas con solución de unión (x3), posteriormente fueron incubadas en solución de eluido (50 µl) sin urea, se incubaron durante 2 minutos y se colectaron en el medio de elución, adicionado con un medio de amortiguación (1M tris-HCl pH 9.0) para ajustar el pH a 7.

También se realizaron algunas pruebas con el protocolo clásico de inmunoprecipitación que consiste básicamente en el mismo protocolo de crosslink omitiendo los pasos de fijación del anticuerpo, con este protocolo eluimos a la vez el anticuerpo acoplado a las perlas magnéticas y las proteínas inmunoprecipitadas. La proteína inmunoprecipitada de ambos protocolos fue congelada a -80°C hasta su posterior uso.



#### 4.2.3.6.- Determinación de la unión de SPAM1 oviductal a ZP de ovocitos bovinos

Los ovocitos ( $n=19$ ) fueron incubados 1 hora con la proteína SPAM1 inmunoprecipitada de FOB, a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Los ovocitos fueron lavados 3 veces con PBS antes de ser fijados en una solución PBS al 4% de formalina por 10 minutos. Los anticuerpos fueron diluidos con PBS y 1% BSA. Los ovocitos se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-SPAM1 a una dilución de 1:10 en tampón PBS-1% BSA durante 1 hora a RT, posteriormente se lavaron con PBS de 5 minutos (3x) y se incubaron con un anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado con fluorescencia (FITC) durante una hora a RT y en oscuridad. Tras lavar en PBS, se montaron con medio de fluorescencia (Dako, Glostrup, Dinamarca) y guardados en oscuridad hasta su observación al microscopio confocal (LEICA TCS-SP2).

#### 4.2.3.7.- Análisis por electroforesis

##### 4.2.3.7.1.- Electroforesis

Las concentraciones de proteína fueron cuantificadas utilizando el método colorimétrico del ácido bicinonínico-BCATM siguiendo las instrucciones del fabricante. Las electroforesis se realizaron con el sistema NuPAGE® SDS-PAGE, los geles utilizados fueron los de 4-12% de poliacrilamida Bis-Tris de 1 mm. La cantidad de fluidos oviductales y uterinos que se cargó en cada calle fue aproximadamente de 10-15  $\mu\text{g}$  de proteína. Las muestras fueron preparadas en tampón de carga y en condiciones reductoras, posteriormente fueron colocadas en termobloque a 95°C por 5 min para su desnaturalización y después fueron centrifugadas. En la cubeta de electroforesis se colocaron los geles y el tampón de recorrido y las muestras fueron cargadas en los geles junto a un marcador de proteínas estándar. Las condiciones de las electroforesis fueron las siguientes 200 V durante 50 minutos, en este punto algunos de los geles fueron utilizados para la identificación de proteínas, por lo tanto no se transfirieron, sino fueron teñidos con azul

de coomassie para su posterior recorte e identificación por espectrómetro de masas.

#### 4.2.3.7.2.- Western-blot

La transferencia de proteínas a membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se realizó en un sistema de transferencia de tipo húmedo siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron activadas por 30 segundos en metanol, lavadas en agua y mantenidas durante 5 minutos en tampón de transferencia. Las condiciones de transferencia fueron de 30 V durante 1 hora. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas en una solución salina tamponada de Tris con 0,05% de tween 20 (TBST) conteniendo 1% de albúmina sérica bovina (BSA) durante 1 hora a RT.

#### 4.2.3.7.3.- Inmunodetección en membrana

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las inmunodetecciones fueron comerciales (ver tabla en apartado de materiales), a excepción del anticuerpo anti-SPAM1 bovino que fue obtenido a través del cultivo de hibridomas.

Todos los anticuerpos fueron diluidos en TBST con 1% BSA, la incubación con los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4°C en movimiento, después se procedió a 3 lavados con TBST antes de la incubación de los anticuerpos secundarios correspondientes, esta incubación se realizó a RT durante una hora y en movimiento. La visualización de las bandas se realizó mediante la incubación de la membrana con ECL plus y los revelados se hicieron con el equipo Typhoon™, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron obtenidas con el software ImageQuant™.

#### 4.2.3.7.4.- Electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y Electroforesis

bidimensional diferencial en gel (DiGE)

La electroforesis 2D-PAGE es una técnica de alta resolución, que tiene como objetivo la separación de proteínas en mezclas complejas

en base al peso molecular de la proteína y a su punto isoeléctrico (Fig. 37).

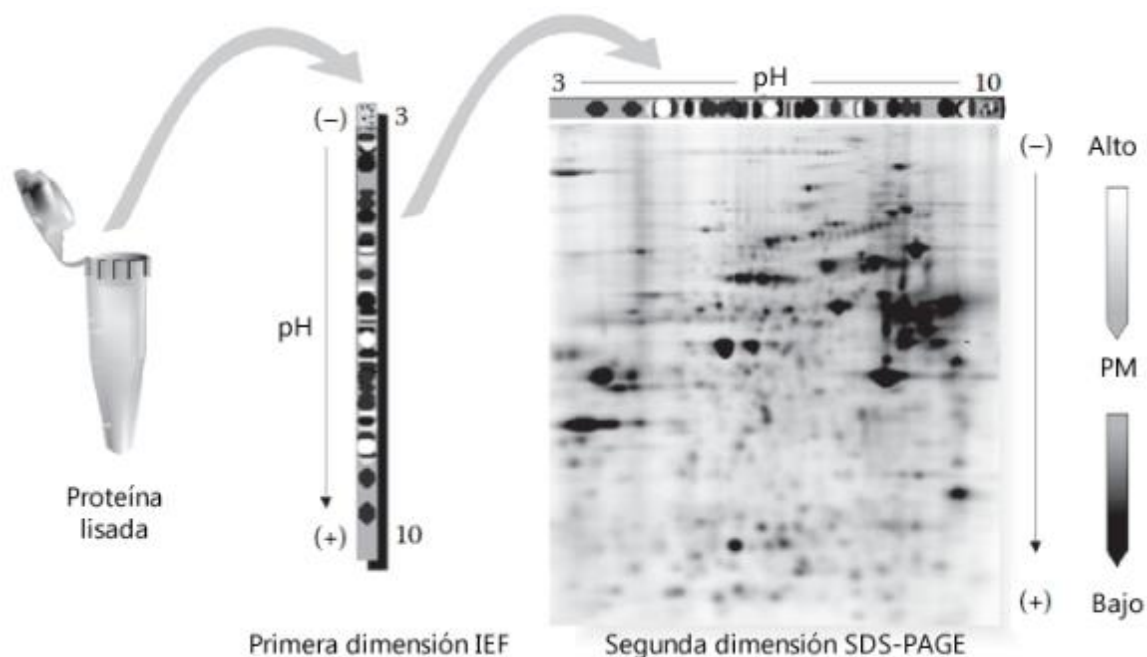


Figura 37 Representación esquemática del protocolo de electroforesis en dos dimensiones 2D-PAGE. Modificado de Díez et al., 2010.

La primera dimensión es cuando las proteínas son separadas de acuerdo a su punto isoeléctrico o isoelectroenfoco (IEF). Las proteínas son separadas en unas tiras con gradiente de pH (ReadyStrip™ IPG, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) en condiciones desnaturizantes. Las tiras (17 cm) que se usaron tienen un gradiente no lineal de pH 3 a 10. La cantidad de proteína utilizada para cada uno de los análisis fue de 100  $\mu$ g por muestra y otros 100  $\mu$ g de una mezcla de ambas muestras. Las muestras fueron preparadas en una solución de 8 M de urea, 2% CHAPS, 50 mM ditiotreitól (DTT), 0.2% anfolitos, y azul de bromofenol. Las tiras fueron hidratadas en esta solución durante toda la noche cubiertas con aceite mineral para evitar la evaporación. El IEF se realizó en un equipo Protean®, las condiciones de recorrido fueron como se describen a continuación: 250 V por 20 min, 10000 V por 2,5 horas, y por último 10000 V por 5,5 horas no superando los 40000 V/hora.

La segunda dimensión es la separación de las proteínas de acuerdo con su masa molecular por electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Las tiras fueron equilibradas por 15 min en una solución 6M de urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl (pH 8,8), 20% glicerol, y 2% DTT, un segundo equilibrio se realizó en las mismas condiciones sin DTT. Para la segunda dimensión se utilizó un maxigel (18,3 x 19,3) al 12%, las tiras se colocaron en los geles y se ensamblaron en un equipo Protean II XL. Las condiciones de recorrido fueron las siguientes 16 mA/gel durante 30 minutos, a continuación, 24 mA/gel durante 5.5 horas.

Para visualizar las proteínas, los geles fueron teñidos con azul de coomassie listo para su uso (SimplyBlue™ SafeStain, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) 1 hora a temperatura ambiente en agitación. El lavado se hizo en agua destilada, por 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Para la adquisición de las imágenes, los geles fueron escaneados en escáner de alta definición (Image scanner II Amersham Biosciences), la extracción de la imagen se hizo mediante el software ImageMaster 2D Platinum 7.0.

Adicionalmente, algunas de las muestras de fluido oviductal y uterino se marcaron con sonda fluorescente (CyDyes 2) para determinar si había diferencia entre estas y las teñidas con coomassie. Estos geles fueron escaneados en el equipo Thyphoon (GE Healthcare). Las imágenes también fueron analizadas con el software ImageMaster 2D Platinum 7.0. Para determinar el volumen (%) que representan en el total del gel y así calcular las más abundantes. Una vez seleccionados las diferentes "spots" se recortaron y fueron procesadas para su posterior identificación mediante análisis proteómico.

Para la electroforesis diferencial las muestras de proteína son marcadas antes del IEF, se utilizan sondas fluorescentes (CyDyes 2, 3 y 5). Los CyDyes son fluoróforos de cianina que llevan un grupo reactivo éster de N-hidroxisuccinimidilo que se une covalentemente a los

grupos- $\epsilon$ -amino de residuos de lisina en las proteínas. El aspecto importante de la tecnología DiGE es su capacidad para marcar dos o más muestras con diferentes fluoróforos y separarlos en el mismo gel, eliminando la variabilidad de gel a gel (Fig. 38) (Diez et al., 2010).

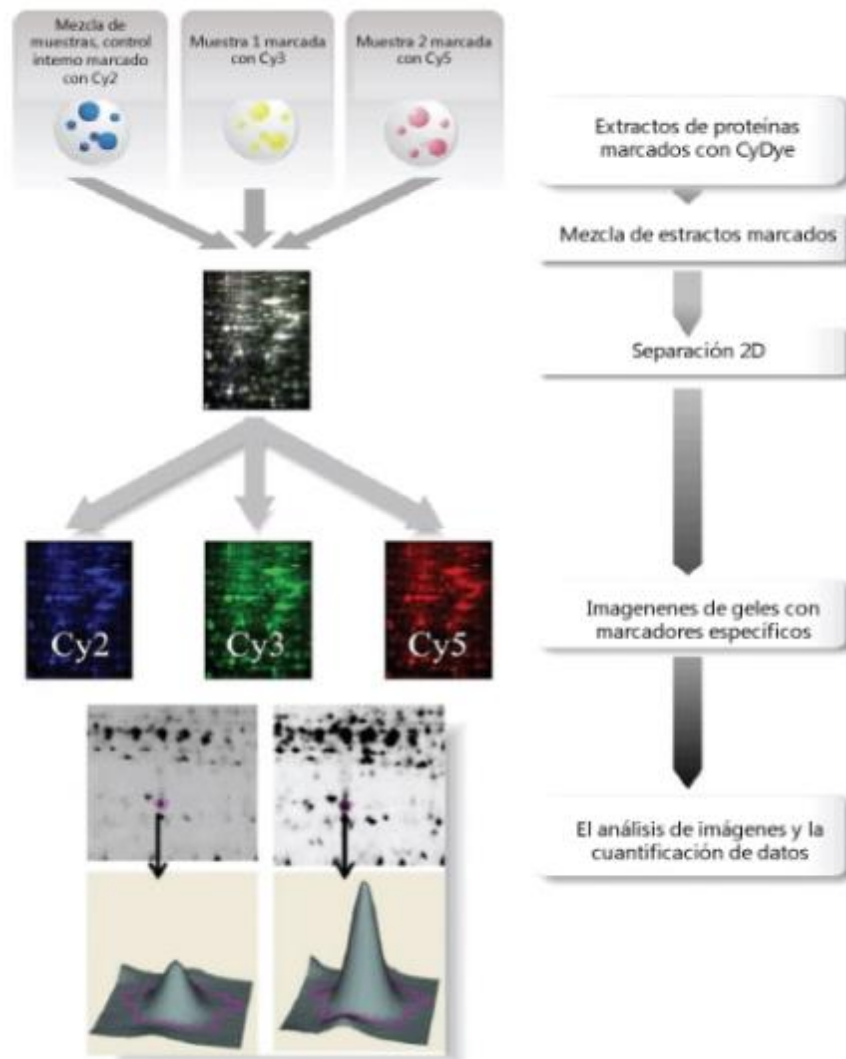


Figura 38 Representación esquemática del protocolo de electroforesis diferencial DiGE. Modificado de Diez et al., 2010.

En nuestra investigación trabajamos con tres tipos de muestras, FOB ( $n=6$ ), FUB ( $n=6$ ), y suero sanguíneo bovino (SSB) ( $n=6$ ). Las muestras fueron agrupadas en dos por cada tipo, para hacer tres replicados por gel. En todos los casos el FOB bovino fue marcado con Cy3 y el marcador Cy5 se usó alternativamente para marcar FUB o SSB. (Tabla 8).

Tabla 8 Marcaje de muestras con sondas fluorescentes y diseño de geles DiGE.

Gel tipo	Cy2	Cy3	Cy5	Proteína total	(n=)
1	50 µg FOB	100 µg	100 µg	300 µg	3
	50 µg FUB	FOB	FUB		
2	50 µg FOB	100 µg	100 µg	300 µg	3
	50 µg SSB	FOB	SSB		
3	50 µg FUB	100 µg	100 µg	300 µg	3
	50 µg SSB	FUB	SSB		

Como se recomienda el marcador Cy2 es utilizado para marcar la mezcla de las muestras. La cantidad de proteína marca fue de 100 µg para cada uno de los marcadores. Para Cy2 se utilizó 50 y 50 µg de cada en cada experimento. Los marcadores fueron resuspendidos en una solución de dimetilformamida (DMF) quedando como solución de trabajo al 0,04 mM para el marcaje de las muestras. La cantidad de marcador para cada muestra fue de 400 pmol por cada 100 µg de proteína, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Una vez marcadas, las muestras fueron mezcladas con una cantidad igual de solución de rehidratación (7 M de urea, 2% CHAPS, 50 mM ditiotreitilo (DTT), 0.2% anfolitos). A partir de este punto se procedió de la misma manera que la electroforesis en 2D-PAGE, mantenido en condiciones de escasa luz para evitar la pérdida de fluorescencia de los marcadores.

El escaneo del gel se realizó en un equipo Typhoon™, para las diferentes sondas de marcaje se utilizaron diferentes ondas de excitación y de emisión. Para Cy2 480 nm y 520 nm, Cy3 532 nm y 580 nm y para Cy5 633 nm y 670 nm. La adquisición de la imagen se hizo con el software ImageQuant™. Una vez adquirida la imagen los geles fueron teñidos con tinción azul de coomassie para la detección de "spots" y posterior recorte para su identificación por MS/MS.

#### 4.2.3.8- Análisis proteómico

##### 4.2.3.8.1.- Análisis por proteómica de fluidos oviductales y uterinos bovinos

La identificación de proteínas se hizo a partir de muestras de diferentes fuentes. La principal fuente fueron los "spots" identificados con tinción de coomassie, a partir de geles DiGE y 2D-SDS, otra fuente fueron las bandas identificadas con tinción de coomassie en geles SDS-PAGE de una dimensión. Por último se identificaron proteínas de exosomas aislados de FOB, proporcionadas por una colaboración con el Laboratorio Andaluz de Reprogramación Celular (LARCEL).

Las muestras que procedían de geles fueron desteñidas para eliminar los restos de tinción de coomassie. Las muestras fueron tratadas para la reducción de puentes disulfuro (tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8,5 con 25 mM DTT) y después tratadas en un medio con iodoacetamida (tampón bicarbonato amónico 25 mM de pH 8,5 con 55 mM iodoacetamida) que es una sustancia que alquila los átomos de azufre para impedir la renaturalización de las proteínas. Las muestras posteriormente fueron incubadas en un medio con tripsina y un potenciador de la actividad proteolítica, durante 10 min a RT (tampón bicarbonato amónico 25 mM, pH 8,5 con ProteaseMax Surfactant 0,01% y 2% de tripsina). La digestión se hizo a 37°C durante tres horas y una vez terminada, la actividad enzimática se detuvo en una solución con 0,5% de trifluoroacético (TFA) y las muestras se lavaron en un medio con 50% de acetonitrilo y 0,5% de TFA.

La separación de las muestras tripsinizadas y análisis de las digestiones se realizaron mediante cromatografía líquida HPLC de alta resolución. Este equipo dispone de un accesorio para cromatografía capilar, inyector automático termostatzado, detector tipo DAD y compartimento termostatzado para las columnas, además, está conectado a un espectrómetro de masas tipo trampa de iones Trap XCT Plus a través de una interface tipo electrospray (ESI).

Los datos fueron analizados mediante el software LC/MSD Trap Data Analysis Versión 3.3, para su búsqueda y comparación de los péptidos identificados se utilizó el software Spectrum Mill. Esta comparativa se hizo utilizando las bases de datos de NCBI. El criterio de selección y descarte de los péptidos identificados está dado por dos puntajes que otorga el software Spectrum Mill, el primero es básicamente la intensidad y precisión de la señal (score) y el segundo tiene que ver con el porcentaje de señales detectadas experimentalmente de cada fragmento respecto al número de señales teóricas que debería producir (SPI). Los péptidos considerados como aceptables son los que poseen un score mayor a 7,0 y un SPI superior a 70%.

#### 4.2.3.8.2.- Análisis funcional de datos de proteómica

Una vez identificadas las proteínas por MS/MS de los diferentes "spots", se procedió a clasificarlas. Para determinar las redes de interacción de las proteínas se utilizó la herramienta bioinformática STRING 9.1. Para estas redes la clasificación que se utilizó fue la de evidencias, esto significa que sólo se presentaron las interacciones de las cuales se tiene referencias de artículos publicados. La especie para estas redes siempre fue la bovina. Otra herramienta bioinformática para agrupar las proteínas por funcionalidad o *Gene Ontology* (GO) fue el DAVID, con esta herramienta se elaboraron las tablas de funcionalidad.

### 4.2.4.- Análisis molecular

#### 4.2.4.1.- Aislamiento y análisis de ARN

La extracción de ARN de muestras para PCR se realizó mediante la utilización del kit RNAqueous®. El aislamiento de ARN se consiguió siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, lisamos los tejidos en la solución de lisis en una proporción de 10 µl de solución por 1 mg de muestra. La elución final se realiza con agua para biología molecular libre de RNasas. El eluido se congeló a -80°C hasta su procesamiento.



El método de Trizol® fue utilizado para el aislamiento de ARN para las técnicas de micromatrices. El aislamiento se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante con pequeñas variaciones en los tiempos de centrifugación.

Las muestras contenidas en RNeasy® fueron descongeladas y secadas para eliminar los restos del reactivo. Una vez secas se colocaron los tejidos en el Trizol® en una proporción de 50 mg/ml de reactivo. La homogenización se realizó con el equipo modelo DIAX 900. Para la fase de separación, a las muestras homogenizadas se les agregó cloroformo (200 µl por cada 1 ml de Trizol®) se mezcló por 15 segundos y después de 5 min a RT las muestras fueron centrifugadas a 12000g por 15 min a 4°C en una microcentrífuga Eppendorf® 5417R. Las fases acuosas e incoloras que contienen el ARN fueron colocadas en viales nuevos. Para la fase de precipitación se les agregó a los viales alcohol isopropílico (isopropanol) 500 µl/ml de Trizol® se mezclaron en agitador y después de 10 min a RT, las muestras fueron centrifugadas a 25000g durante 45 min a 4°C en una microcentrífuga Eppendorf® 5417R, con cuidado de no perder los precipitados, el sobrenadante fue retirado y se procedió a lavar en dos ocasiones con etanol al 75%. La elución final se hizo en un volumen de 60 µl en agua para biología molecular. La incubación final se hizo a 37°C durante 20 minutos en un termo mezclador. La determinación de la pureza de ARN se midió con un espectrofotómetro (NanoDrop, SACE, UMU).

Con las muestras de ARN para el estudio de micromatrices se procedió de la siguiente manera: Para determinar si no hubo contaminación por ADN, se hicieron electroforesis en geles de agarosa al 1%, los fragmentos se visualizaron incubando los geles en bromuro de etidio y fueron observados en el sistema de fluorescencia UV, la imagen se obtuvo por medio del software AlphaSnap™.

La integridad del ARN se evaluó mediante análisis con chips de micro fluidos Agilent® RNA Nano 6000 en un Bioanalizador Agilent

2100. Los números de integridad de ARN (RIN) para las muestras utilizadas en este estudio fueron superiores a 7,9.

#### 4.2.4.2.- Síntesis de ADN complementario para PCR

La síntesis *in vitro* de ADN complementario (ADNc) se realizó con el kit SuperScript® III según el protocolo descrito por el fabricante. La desnaturalización del ARN molde, se realizó empleando una cantidad de ARN total de partida de 250 ng, durante 5 min a 65°C y en presencia de oligo (dT) 12-18 y dNTPs (desoxinucleósidos-trifosfato). La muestra se deja enfriar en hielo por 1 minuto, se añade la segunda mezcla (tampón, DTT, inhibidor de las RNAsas, MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de la enzima SuperScript® III) hasta completar 20 µl. La síntesis de ADNc tuvo lugar a 50°C durante 50 min, la reacción se detiene a 85°C por 5 min y se terminó por hidrolizar el ARN incubando las muestras a 37°C durante 20 min con la enzima RNasa H suministrada en el kit.

#### 4.2.4.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se utilizó para la amplificación de fragmentos de ADNc obtenido a partir oviductos de diferentes especies (mujer, cerda y yegua), para determinar la expresión de ARNm de SPAM1.

El diseño de cebadores se realizó con las siguientes indicaciones: una longitud de 15 a 30 nucleótidos, un contenido de G y C de 40-60%, una o dos G o C en el extremo 5', la diferencia de temperatura *melting* o de fusión (T<sub>m</sub>) de los dos cebadores usados no fue mayor a 5°C (Tabla 9). El cálculo de la T<sub>m</sub> se hizo mediante la siguiente fórmula:

$$T_m (\text{°C}) = 2(A+T) + 4(C+G).$$

La enzima utilizada para esta técnica fue la misma para todas las muestras, *Taq DNA Polymerase* (Fermentas), el protocolo fue el recomendado por el fabricante (2 µl del ADN, 5 µl de tampón, 2,5 µl de cada cebador a 100 µM, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> al 2 mM, 4 µl dNTPs a 10 mM, 29 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q, y 1 µl de enzima) obteniendo un volumen final de 50 µl. Las amplificaciones de PCR se hicieron en un termociclador de

Eppendorf®, las condiciones de amplificación fueron iguales para todas las muestras con la única variación de la temperatura de fusión de los cebadores. Básicamente consistió en 29 ciclos, cada ciclo de PCR constó de tres pasos: 45 segundos a 95°C (desnaturalización), 1 min entre 56-60°C (hibridación) y 1 min a 72°C como extensión de la cadena naciente y al final de los ciclos una extensión de 10 min a 72°C.

Tabla 9 Cebadores utilizados para amplificar SPAM1 por PCR en diferente especies de mamíferos.

Muestra	Tamaño de	Secuencia de cebador	Dirección
Vaca	210	5'-CCTATTACATACCAAATGACA-3'	Directo
		5'-CTTGCATGAAACTCTTTCCTG-3'	Reverso
Yegua	755	5'-GGGAGTGCTAAGGATCCAG-3'	Directo
		5'-CAGTGCTTTCCTTCCACAAC-3'	Reverso
Cerde	262	5'-CTAACAGACTTGGCTACTATC-3'	Directo
		5'-GCTGAACCAACTCAATAGAC-3'	Reverso
Mujer	771	5'-GGGTAAACCAAAGTGTGTAGG-3'	Directo
		5'-GCAACTTCCATTGTAACCGG-3'	Reverso

#### 4.2.4.4.- Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los productos amplificados por PCR, se cargaron en geles de agarosa, 4 µl del producto de PCR. La preparación del gel fue con tampón comercial TAE 1X (Tris Acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8,3) y 1% de agarosa para biología molecular. Una vez polimerizado los geles fueron colocados en una cubeta de recorrido con medio TAE. 4 µl de producto de PCR, fue preparado con 2 µl de tampón de carga 6X (Tris-HCl 10 mM, azul de bromofenol 0,03%, xileno-cianol 0,03%, glicerol 60% y EDTA 60 mM) y 6 µl de agua de biología molecular. En las calles de los extremos se cargaron marcadores de ADN utilizados como referencia. Los 12 µl totales fueron cargados en cada calle de los geles. Las condiciones de recorrido fueron de 60 V por 15 min y 100 V por 35 min a RT.

La visualización se hizo en un equipo con rayos UV, para ello los geles fueron incubados en un medio con bromuro de etidio (2 µg/ml)

durante 20 min a RT. Si las bandas se observaron limpias, los productos de PCR restante, fueron purificados y concentrados con un kit comercial (ZYMO) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La secuenciación se realizó de manera automática en el servicio central de biología molecular de la Universidad de Murcia. Las secuencias fueron comprobadas una a una, haciendo un alineamiento automático, utilizando la herramienta *blast*<sup>®</sup> disponible en la página web de NCBI y con el software Chromas lite versión 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd, Queensland, Australia).

#### 4.2.4.5.- *Análisis de micromatrices (Microarray)*

##### 4.2.4.5.1.- Preparación de muestras y el procesamiento de microarray

La técnica de microarray es una técnica que nos permite medir los niveles de expresión de un gran número de transcritos simultáneamente. En este trabajo utilizamos esta técnica para detectar la expresión génica del epitelio oviductal y del endometrio, esto para determinar las similitudes y diferencias de expresión de genes en ambos tejidos, así, nos dio una idea general mediante el transcriptoma de la funcionalidad de estos tejidos en la fase periovulatoria del bovino. La plataforma de Agilent Technologies de un color, que utiliza la cianina 3 como marcador. Esta técnica de un color nos indica la expresión génica de los genes en una muestra dada y una comparación con otras muestras en condiciones de igualdad en su procesamiento e hibridación.

El protocolo a seguir de la técnica de microarray se describe brevemente en la figura 39. Se inicia con la preparación de las muestras. Para el etiquetado de las muestras se utilizó un kit de etiquetado y el kit amplificación y marcado de un color de Agilent Technologies.

El primer paso fue diluir la mezcla que contiene el marcador de cianina 3, para ello, se procedió a descongelar el vial de la mezcla a 37°C durante 5 minutos, las diluciones seriadas (1:20, 1:25 y 1:20) se

hicieron con el tampón de dilución contenido en el kit. Para marcar 100 ng de ARNc (en 1,5  $\mu$ l) se necesitaron 2  $\mu$ l de la dilución final. A esta muestra se le añade la enzima T7 (0,8  $\mu$ l de T7 en 1  $\mu$ l de agua) que amplifica e incorpora simultáneamente la cianina 3 al ADNc. Teniendo un volumen final de 5,3  $\mu$ l, se incubaba a 65°C por 10 min, la reacción se detuvo poniendo el vial en hielo por 5 minutos. Se le agregan 4,7  $\mu$ l del mix de ADNc (5  $\mu$ l del tampón 5 $\times$  First Strand, 1  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 10 mM dNTP Mix y 1,2  $\mu$ l de Affinity Script RNase Block Mix), se incubaba a 40°C por 2 horas y después a 70°C por 15 minutos. A esta mezcla se le agrega 6  $\mu$ l del mix de transcripción (0,75  $\mu$ l de agua, 3,2  $\mu$ l de 5 $\times$  Transcription Buffer, 0,6  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 1  $\mu$ l de NTP Mix, 0,21 de T7 RNA Polymerase Blend y 0,24  $\mu$ l de Cyanine 3-CTP) y se incubaba por 2 horas a 40°C. La purificación de ARNc se hizo con las columnas del kit comercial Qiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante.



Figura 39 Diagrama de flujo de trabajo para la preparación de muestras y su procesamiento para el análisis de micromatrices (microarray).

La concentración de ARNc, el ratio de absorbancia y la concentración de cianina 3 etiquetada en el ARNc se midieron con un nanodrop, para determinar el rendimiento y la actividad específica de cada reacción, se calculó del siguiente modo:

- a) Se utilizó la concentración de ARNc (ng/μl) para determinar el rendimiento de ARNc de la siguiente manera:

$$(\text{Concentración de ARNc}) \times 30 \mu\text{l (volumen de elución)} \div 1000 = \mu\text{g de ARNc}''$$

- b) Se utilizó la concentración de ARNc (ng/μl) y la concentración de cianina 3 (pmol/μl) para determinar la actividad específica de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de Cy3} \div \text{Concentración de ARNc} \times 1000 = \text{pmol por } \mu\text{g ARNc}$$

#### 4.2.4.5.2.- Análisis de la integridad del ARN

Para realizar el análisis de micromatrices se seleccionaron hasta un total de 16 muestras, todas ellas de la región ipsilateral del oviducto y útero de 6 novillas (45, 54, 55, 60, 73 y 92). Seis de estas muestras fueron de la región de la ampolla (O\_a), 5 de la unión istmo ampular del oviducto (O\_u) y 5 más de la región craneal del endometrio (U\_cr). El ARN total se aisló de estas muestras. 50 ng de ARN total fueron corridas en un gel de agarosa (TAE, agarosa 1%) para comprobar la calidad del ARN. (Fig. 40) Se observaron dos bandas de intensa fluorescencia, que representan el ARN ribosomal (ARNr) 28 S y 18 S. La banda que representa el ARNr 28 S muestra mayor intensidad, lo que es indicativo de la integridad del ARN total.

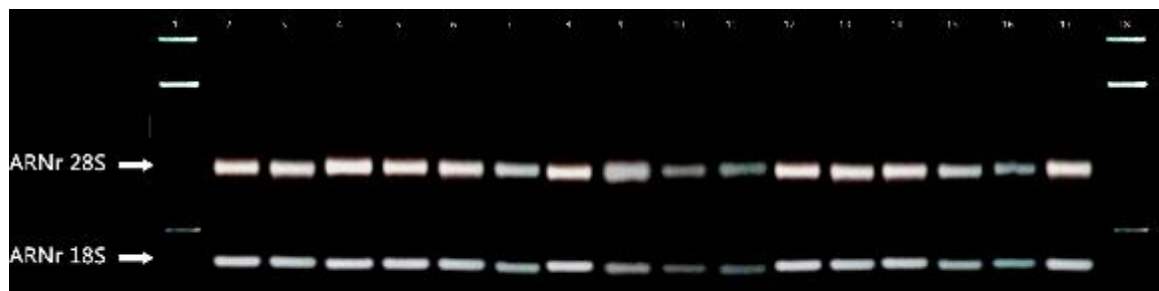


Figura 40 Visualización de ARN ribosomal en gel de agarosa (1%) incubado en bromuro de etidio. Muestras de la región de la ampolla oviductal (calle 2-7), de la unión istmo ampular (calle 8-12) y de la región craneal del endometrio (calle 13-17) de vaquillas. Marcador (carril 1 y 18).

Adicionalmente a la visualización del ARN en gel de agarosa se determinó la integridad del ARN de las muestra mediante nano chips de ARN en bioanalizador. (Bioanalyzer 2100, Agilent ®). La imagen de la electroforesis obtenida con el bionalizador se muestra en la figura 41.

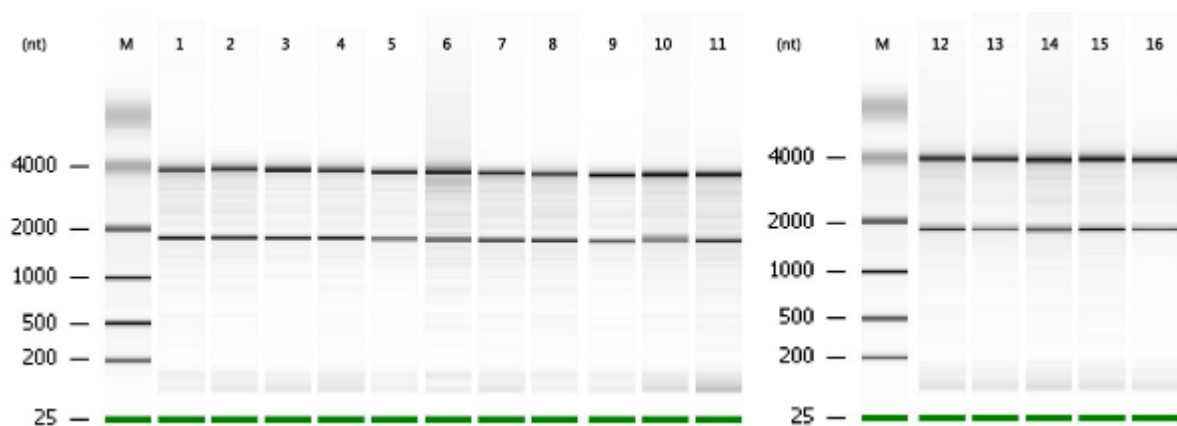


Figura 41 Imagen de electroforesis de ARN, generada por bionalizador Agilent. Muestras de ARN total de muestra obtenidas de región ampular (calle 1-6), y unión istmo ampular del oviducto (7-11). ARN total de muestras obtenidas de endometrio en su región craneal. Marcador (M), nucleótidos (nt).

Los datos de calidad de ARN arrojados por el bioanalizador mostraron que todas las muestras tenían un "RNA Integrity Number" (RIN) mayor al 7,9; por lo tanto, todas ellas fueron utilizadas para la posterior hibridación en los "slides" del microarray.

#### 4.2.4.5.3.- Hibridación

Para la hibridación en el formato que utilizamos de microarray fue el de 8x60K, en un formato personalizado con la base de datos de *Bos taurus*. Las muestras debían de superar un rendimiento de 1.65 µg y una actividad específica de al menos 6,0 pmol de Cy3 por µg de ARNc.

Para la hibridación se utilizó el kit de Agilent, se preparó la mezcla de hibridación con 600 ng de ARNc hasta completar 19 µl con agua para biología molecular, 5 µl de 10× Blocking Agent y 1 µl de 25× Fragmentation Buffer, teniendo con esto un volumen final 25 µl. Esta mezcla se incubó a 60°C por 30 minutos para la fragmentación del ARN. La fragmentación se detiene con el enfriamiento en hielo (1 min) de las muestras y la adición de 25 µl de 2× Hi-RPM Hybridization Buffer. Para evitar las burbujas en la solución, ésta se mezcla por pipeteo y se

centrifuga a 13000g por 1 min a RT. Las muestras se colocaron en hielo dejando pasar el menor tiempo posible antes del cargado de la muestra en los “slides”.

Para el montaje de la cámara de hibridación (Fig. 42a) se siguieron las instrucciones del fabricante incluidas en la guía G2534-90002 (Agilent G2534A Microarray Hybridization Chamber User Guide). De la mezcla de hibridación (50  $\mu$ l) sólo se cargaron 40  $\mu$ l de cada muestra, estas se cargaron lentamente para evitar tocar la goma y las múltiples burbujas (Fig. 42c). Los “slides” ya montados se introdujeron en un horno de hibridación por 17 horas a 65°C y a una velocidad de 10 rpm.

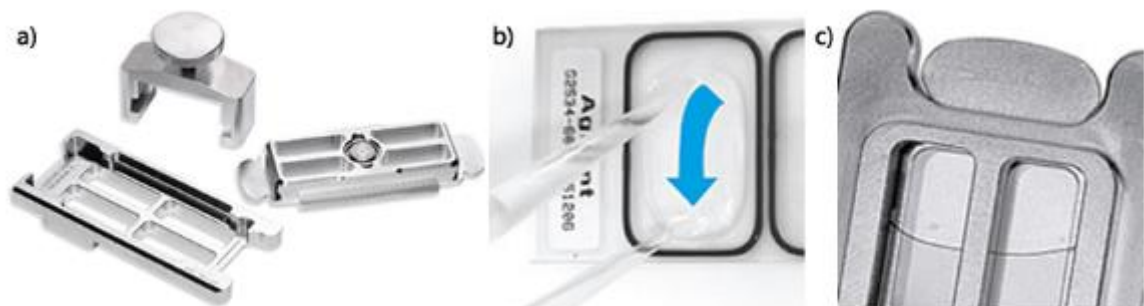


Figura 42 Cámara de hibridación de micromatrices Agilent a). Ejemplo de carga de muestras en los slides b). Burbujas deseables una vez montados los slides en la cámara de hibridación c).

#### 4.2.4.5.4.- Lavado y escaneo de Microarray

El kit utilizado para el lavado de los “slides” de microarray fue de Agilent Technologies, antes del inicio hay que verificar que el Triton 102 incluido en el kit ha sido agregado a los tampones de lavado I y II, para así tener una concentración de Triton 102 de 0,005%. El protocolo de lavado fue un primer lavado con el tampón I, el siguiente lavado se hizo con el tampón I por 1 min a RT. Posteriormente, se lavó con el tampón II a 31°C tras los lavados, se procedió inmediatamente al escaneo.

Los “slides” fueron escaneados con una resolución de 2  $\mu$ m con un escáner de micromatrices de Agilent Technologies. El procesamiento de imágenes se realizó con el software de extracción de Agilent Technologies versión 10.7.3.1.



#### 4.2.4.5.5.- Análisis de Microarray

Las señales obtenidas con el escáner fueron filtradas por *flags* o banderas en base a “*que están muy por encima del background*”. Las banderas se utilizan entonces para el filtrado de las señales, es decir, se eliminaron todas las sondas que no fueron detectables (bandera = 0) por lo menos 4 muestras en uno de los grupos experimentales. Posteriormente, los datos filtrados fueron normalizados con el paquete VSN (Bioconductor). El análisis estadístico se realizó con el paquete Limma (Bioconductor), con el software Microsoft Excel se realizó el filtrado de falsos descubrimientos (FDR 1%) para la comparativa entre las muestras de oviducto *versus* útero.

Los conjuntos de transcritos expresados diferencialmente fueron seleccionados bajo estrictas condiciones (valor umbral de la expresión diferencia de  $\geq 2$  veces), los transcritos con reducidas diferencias de expresión no se consideraron como diferencialmente expresados. Para determinar el agrupamiento de las sondas según su perfil expresión, se utilizó el algoritmo SOTA (Herrero et al., 2001). Este algoritmo del tipo jerárquico divisivo se encarga de examinar todos los perfiles de expresión de las diferentes muestras y en base a su comportamiento de expresión génica asigna los grupos de muestras en grupos con el mismo perfil de expresión. Este tipo de análisis ha sido utilizado y publicado anteriormente (Mitko et al., 2008, Merkl et al., 2010) por el grupo de investigación del laboratorio de análisis de genómica funcional (LAFUGA) donde fue realizado el microarray de esta tesis.

#### 4.2.4.5.6.- Análisis funcional de datos de Microarray

El análisis de los datos obtenidos y la clasificación funcional se hizo con la herramienta “Functional annotation clustering” de la base de datos DAVID (Huang et al., 2009b, Huang et al., 2009a). Estos datos nos permitieron elaborar los listados de funcionalidad (GO). Para elaborar las redes de interacción por evidencia se utilizó la herramienta bioinformática de STRING 9.1 (Franceschini et al., 2013).

# 5 RESULTADOS PREFUNDIZADOS



## 5.1.- ANÁLISIS DEL OVIDUCTO Y ÚTERO BOVINO EN FASE PERIOVULATORIA

### 5.1.1.- Análisis de micromatrices

Después del procesamiento de los datos y la normalización de ellos, se observó que una de las muestras de endometrio y otra de la unión istmo ampular, mostraban un patrón de expresión que difería con las otras muestras de su mismo tipo. Por lo tanto, se determinó excluirlas del análisis de microarray. Posterior a esta exclusión se realizó la normalización de los datos (Fig. 43) y una representación gráfica de la agrupación jerárquica por colores "Heatmap" (Fig. 44) con el fin agrupar los conjuntos de datos de las muestras individuales de acuerdo a sus correlaciones de expresión.

El análisis estadístico de datos de microarray reveló más de 8000 transcritos con diferencias significativas en la intensidad de señal en las regiones del oviducto y útero estudiadas (datos obtenidos a través del paquete bioinformático BioConductor, multiclase FDR 1%). Lo que equivale a 5509 genes diferentes.

Para clasificar estos genes en función de su expresión génica en los tejidos estudiados se elaboraron una agrupación basada en la similitud de los perfiles de expresión (SOTA) (Herrero et al., 2001). Que es un tipo de análisis jerárquico divisivo, esto para identificar los genes regulados de manera similar. Este análisis reveló seis principales perfiles de expresión (Fig. 45).

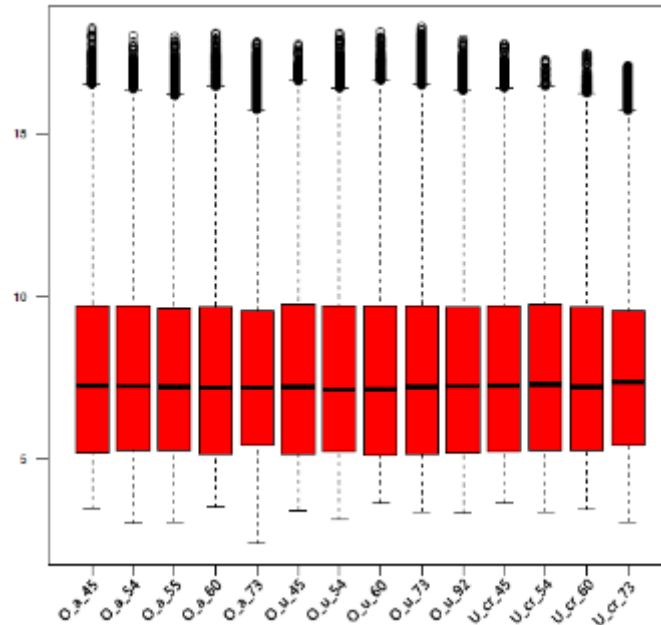


Figura 43 Diagrama de caja de las 14 muestras filtradas para sondas detectables y normalizadas con el paquete VSN de BioConductor. Muestras de ampolla oviductal (O\_a), unión istmo ampular del oviducto (O\_u) y endometrio en su porción craneal (U\_cr).

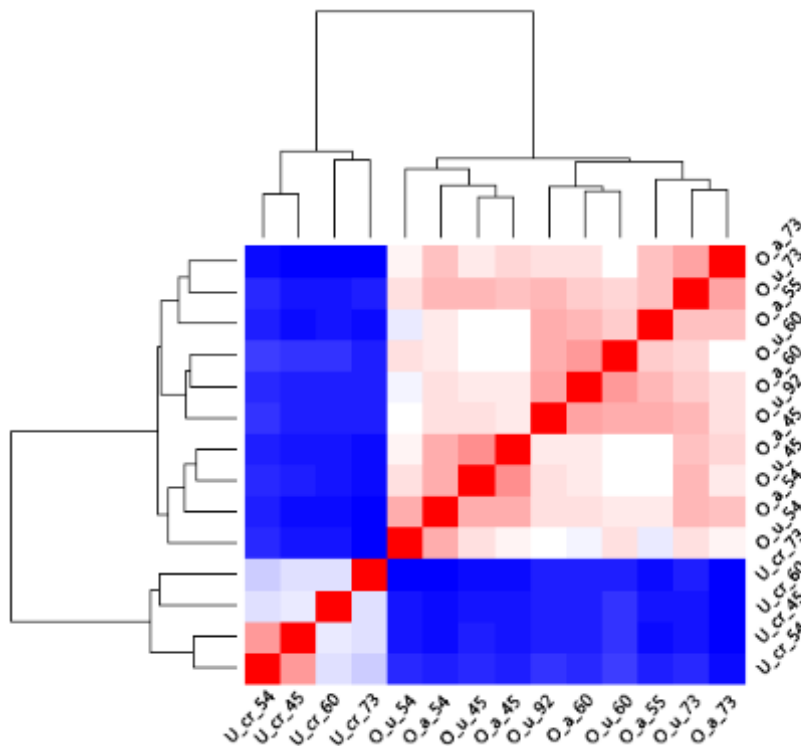


Figura 44 Heatmap de correlación de pares de conjunto de datos de normalizados de micromatrices. Generado con el paquete geneploater de BioConductor. Muestras de ampolla oviductal (O\_a), unión istmo ampular del oviducto (O\_u) y endometrio en su porción craneal (U\_cr).

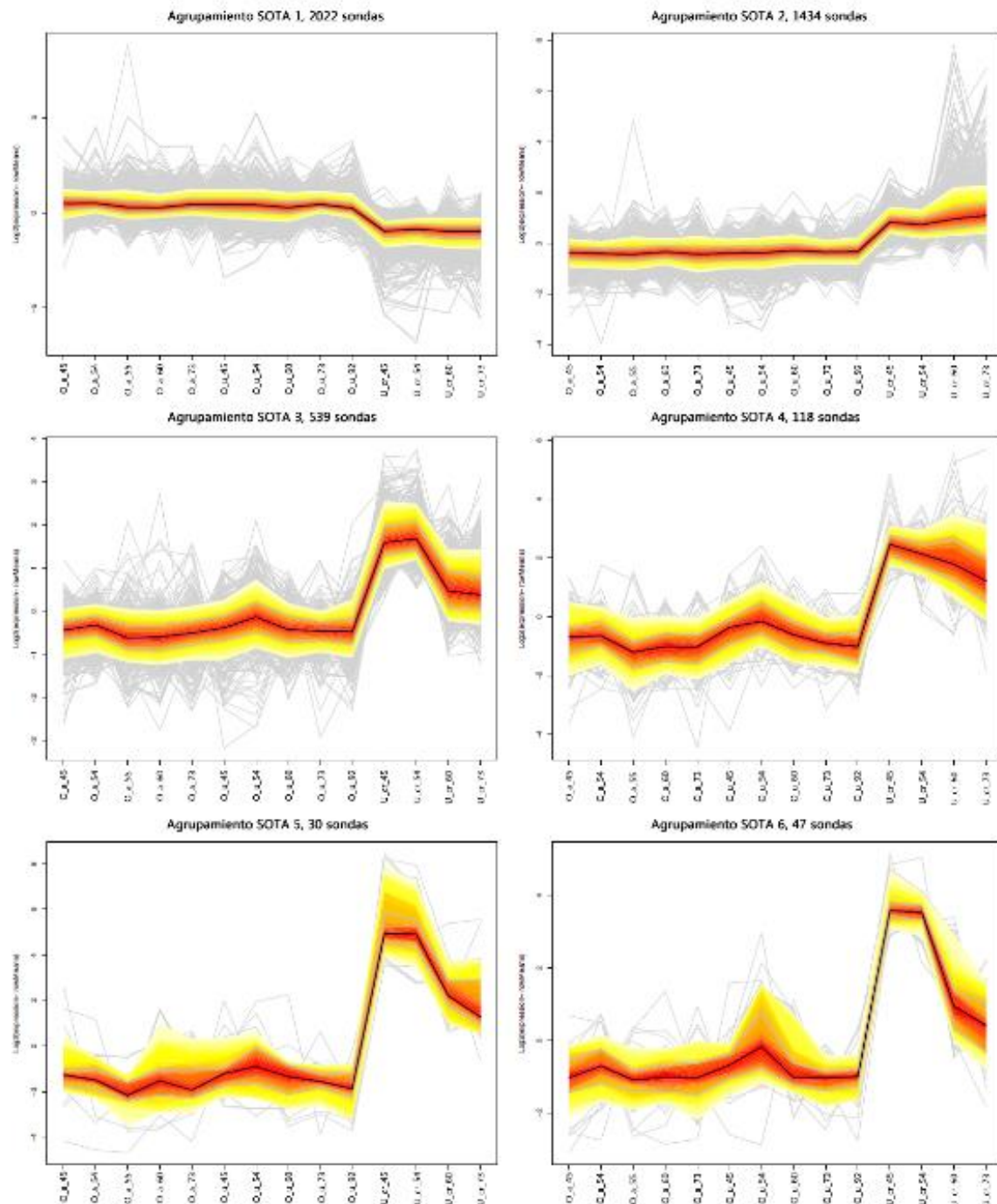


Figura 45 Seis agrupamientos tipo SOTA basados en la similitud en los perfiles de expresión génica en los tejidos estudiados. Los valores presentados fueron obtenidos después de la normalización de los datos (escala  $\log_2$ ). En el eje vertical se muestran en escala  $\log_2$ . El eje horizontal muestra los diferentes tejidos empleados en este estudio [ampolla oviductal [ampolla oviductal (O\_a), unión istmo ampular del oviducto (O\_u) y endometrio en su porción craneal (U\_cr)].

El primer agrupamiento SOTA1 incluía 2022 sondas, al eliminar las sondas duplicadas se identificaron 1523 transcritos diferentes (Anexo II). Este grupo se caracteriza por mostrar una expresión diferencial incrementada entre las muestras de oviducto (O\_a y O\_u) y una

expresión disminuida en las muestras de endometrio (U\_cr). Los datos de este grupo fueron clasificados con la herramienta bioinformática DAVID, pero sólo fueron identificados 1062. Posteriormente se realizó la clasificación de los GO (Tabla 10).

Tabla 10 GO de genes pertenecientes al agrupamiento SOTA1, obtenidos con la herramienta DAVID

GO id	Nombre	Número de genes	p-valor*
GO:0003824	Actividad catalítica	221	0.027931
GO:0016740	Actividad transferasa	79	0.034415
GO:0005215	Actividad de transportador	56	0.017446
GO:0005509	Unión de iones de calcio	46	0.000553
GO:0022892	Actividad del transportador específico del sustrato	46	0.022656
GO:0022857	Actividad del transportador transmembrana	44	0.021674
GO:0022891	Actividad del transportador transmembrana-sustrato	41	0.024299
GO:0015075	Actividad del transportador transmembrana de iones	38	0.019023
GO:0030001	El transporte de iones de metal	22	0.063836
GO:0022803	Actividad del transportador transmembrana pasiva	22	0.045349
GO:0032879	Regulación de la localización	21	0.012978
GO:0022838	Actividad del canal específico sustrato	21	0.065865
GO:0005216	La actividad del canal de iones	20	0.097029
GO:0007154	Comunicación celular	19	0.039934
GO:0032989	Morfogénesis componente celular	15	0.005393
GO:0030246	Unión de hidratos de carbono	15	0.020092
GO:0007017	Proceso basado en microtúbulos	14	0.019755
GO:0003774	La actividad motora	13	0.010058
GO:0030030	Organización proyección celular	12	0.033154
GO:0019637	Proceso metabólico organofosforados	11	0.046759
GO:0051094	Regulación positiva del proceso de desarrollo	11	0.066616
GO:0030182	Diferenciación de las neuronas	11	0.095084
GO:0043623	Proteína celular complejo montaje	10	0.030733
GO:0006644	Metabolismo de fosfolípidos	10	0.059301
GO:0009100	Glicoproteína proceso metabólico	10	0.062534
GO:0048666	El desarrollo de las neuronas	10	0.072895

\*P valor calculado con DAVID

El segundo agrupamiento SOTA2 incluía 1434 sondas, al eliminar las sondas duplicadas se identificaron 1079 transcritos diferentes (Anexo III). Este grupo se observó una expresión disminuida en las muestras de oviducto (O\_a y O\_u) y una expresión incrementada en las muestras de tejido endometrial (U\_cr). Estos datos fueron clasificados con la herramienta bioinformática DAVID, pero sólo fueron identificados 824. Posteriormente se realizó la clasificación de los GO (Tabla 11).

Tabla 11 GO de genes pertenecientes al agrupamiento SOTA2, obtenidos con la herramienta DAVID

GO id	Nombre	Número de genes	p-valor*
GO:0005488	Unión	390	0.003509
GO:0005515	Proteína de unión	245	0.000000
GO:0065007	Regulación biológica	211	0.000000
GO:0050794	Regulación del proceso celular	198	0.000000
GO:0032501	Proceso de organismo multicelular	99	0.000009
GO:0060089	Actividad transductor molecular	91	0.062040
GO:0032502	Proceso de desarrollo	83	0.000014
GO:0007165	Transducción de señales	77	0.000006
GO:0050896	Respuesta al estímulo	76	0.004798
GO:0048856	Desarrollo de la estructura anatómica	67	0.000044
GO:0048731	Desarrollo del sistema	60	0.000235
GO:0048513	Desarrollo de órganos	50	0.000755
GO:0030528	Transcripción regulador de la actividad	43	0.049284
GO:0010646	Regulación de la comunicación celular	42	0.000041
GO:0007242	Cascada de señalización intracelular	40	0.000876
GO:0048869	Proceso de desarrollo celular	39	0.049415
GO:0030154	Diferenciación celular	38	0.044237
GO:0005509	Unión de iones de calcio	37	0.009398
GO:0005102	Unión al receptor	36	0.000454
GO:0002376	Proceso del sistema inmune	33	0.011052
GO:0006629	Metabolismo lipídico	32	0.007624
GO:0003700	Actividad del factor de transcripción	31	0.025281
GO:0042127	Regulación de la proliferación celular	31	0.000011
GO:0009653	Estructura anatómica morfogénesis	31	0.014260
GO:0051239	Regulación de los procesos del organismo	29	0.012803
GO:0008092	Unión a proteína del citoesqueleto	28	0.000002
GO:0032879	Regulación de la localización	27	0.000017
GO:0007155	La adhesión celular	26	0.004264
GO:0043565	Secuencia específica de unión al ADN	25	0.009606
GO:0009605	Respuesta a estímulo externo	25	0.008605
GO:0009893	Regulación positiva del proceso metabólico	25	0.020457
GO:0022607	Montaje de componentes celulares	25	0.062480
GO:0050793	Regulación del proceso de desarrollo	24	0.002582
GO:0042981	Regulación de la apoptosis	24	0.010297
GO:0010941	Regulación de la muerte celular	24	0.011964
GO:0031325	Regulación positiva del proceso metabólico	24	0.018356
GO:0065009	Regulación de la función molecular	24	0.041715
GO:0007399	Desarrollo del sistema nervioso	23	0.018419
GO:0019752	Proceso metabólico ácido carboxílico	23	0.045952
GO:0043436	Proceso metabólico oxoácido	23	0.045952
GO:0006082	Proceso metabólico ácido orgánico	23	0.047236
GO:0042180	Proceso metabólico cetona celular	23	0.061809



GO:0006952	Respuesta de defensa	22	0.001601
GO:0006955	Respuesta inmune	22	0.031447
GO:0010557	Regulación positiva del proceso de biosíntesis	20	0.020257
GO:0031328	Regulación positiva del proceso de biosíntesis	20	0.030366
GO:0009891	Regulación positiva del proceso biosintético	20	0.034014
GO:0050790	Regulación de la actividad catalítica	20	0.094301

\*P valor calculado con DAVID

El tercer agrupamiento SOTA3 incluía 539 sondas, al eliminar las sondas duplicadas se identificaron 412 transcritos diferentes (Anexo IV). Este grupo se observó una expresión disminuida en las muestras de oviducto (O\_a y O\_u) y una expresión incrementada en las muestras de tejido endometrial (U\_cr). Estos datos fueron clasificados con la herramienta bioinformática DAVID, pero sólo fueron identificados 312. Posteriormente se realizó la clasificación de los GO (Tabla 12).

Tabla 12 GO de genes pertenecientes al agrupamiento SOTA3, obtenidos con la herramienta DAVID

GO id	Nombre	Número de genes	p-valor*
GO:0005515	Proteína de unión	83	0.043262
GO:0051179	Localización	42	0.015361
GO:0032501	Proceso del organismo multicelular	41	0.000371
GO:0016787	Actividad hidrolasa	38	0.044778
GO:0006810	Transporte	36	0.061009
GO:0051234	Establecimiento de la localización	36	0.065621
GO:0050896	Respuesta al estímulo	35	0.001660
GO:0007275	Desarrollo del organismo pluricelular	26	0.031512
GO:0032502	Proceso de desarrollo	26	0.086115
GO:0048518	Regulación positiva de proceso biológico	21	0.033090
GO:0002376	Proceso del sistema inmune	20	0.000208
GO:0006950	Respuesta al estrés	18	0.043908
GO:0005509	Unión de iones de calcio	15	0.073775

\*P valor calculado con DAVID

El cuarto agrupamiento SOTA4 incluía 118 sondas, al eliminar las sondas duplicadas se identificaron 97 transcritos (Anexo V). En este grupo se observó una expresión disminuida en las muestras de oviducto (O\_a y O\_u) y una expresión incrementada en las muestras de endometrio (U\_cr). Estos datos fueron clasificados con la herramienta bioinformática DAVID,

pero sólo fueron identificados 81. Posteriormente se realizó la clasificación de los GO (Tabla 13).

Tabla 13 GO de genes pertenecientes al agrupamiento SOTA4, obtenidos con la herramienta DAVID

GO id	Nombre	Número de genes	p-valor*
GO:0065007	Regulación biológica	25	0.015431
GO:0050789	Regulación de proceso biológico	24	0.013209
GO:0050794	Regulación del proceso celular	23	0.013422
GO:0032501	Proceso del organismo multicelular	12	0.067662
GO:0031323	Regulación de los procesos metabólicos celulares	12	0.096001
GO:0048856	Desarrollo de la estructura anatómica	11	0.008416
GO:0007275	Desarrollo del organismo pluricelular	11	0.021512
GO:0032502	Proceso de desarrollo	11	0.040500
GO:0051171	La regulación de los procesos metabólicos compuesto de nitrógeno	11	0.072816
GO:0009889	Regulación del proceso biosintético	11	0.093598

\*P valor calculado con DAVID

El quinto agrupamiento SOTA5 incluía 30 sondas, al eliminar las sondas duplicadas se identificaron 97 transcritos (Anexo VI). En este grupo se observó una expresión disminuida en las muestras de oviducto (O\_a y O\_u) y una expresión incrementada muy evidente en las muestras de endometrio (U\_cr). Estos datos fueron clasificados con la herramienta bioinformática DAVID, fueron identificados 17 transcritos. Posteriormente se realizó la clasificación de los GO (Tabla 14).

Tabla 14 GO de genes pertenecientes al agrupamiento SOTA5, obtenidos con la herramienta DAVID

GO id	Nombre	Número de genes	p-valor*
GO:0007166	Receptor de superficie celular de transducción	5	0.053997
GO:0005102	Unión al receptor	4	0.009326
GO:0050793	Regulación del proceso de desarrollo	3	0.030081
GO:0051239	Regulación de los procesos del organismo	3	0.060508
GO:0043270	Regulación positiva de transporte de iones	2	0.013707
GO:0007178	Serina proteína del receptor transmembrana /	2	0.043677
GO:0007218	Vía de señalización neuropéptido	2	0.052810

\*P valor calculado con DAVID

El sexto y último agrupamiento SOTA6 incluía 47 sondas, al eliminar las sondas duplicadas se identificaron 40 transcritos (Anexo VII). En este grupo se observó una expresión disminuida en las muestras de oviducto (O\_a y O\_u) y una expresión incrementada muy evidente en las muestras

de endometrio (U\_cr). Debido al bajo número de genes no fue posible realizar la tabla de GO.

Otro tipo de análisis que se realizó con los datos obtenidos del análisis de micromatrices nos indicó que hasta en un total de 8042 sondas presentaron una variación significativa de expresión en los tejidos estudiados. Estas sondas se corresponde con 5509 genes. Para nuestro análisis estos genes fueron filtrados (fold change  $\text{Log}_2 \geq 2$ ). Después del filtrado un total de 1191 transcritos diferentes fueron los que presentaron una variación estadísticamente significativa entre las muestras de oviducto y endometrio. Los datos obtenidos indican que la comparativa entre el endometrio (U\_cr) y la ampolla oviductal (O\_a) hasta 1078 genes suben en endometrio y 751 bajan en la ampolla. Los datos entre el endometrio (U\_cr) y la unión istmo ampular (O\_u), indicaron que en el endometrio suben hasta 1041 genes y 732 genes bajan en el oviducto (Fig. 46).



Figura 46 Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados entre las muestras de endometrio (U\_cr) y las dos regiones del oviducto (O\_a y O\_u). En verde se muestran el número de genes con expresión incrementada en el endometrio y en rojo la expresión disminuida en comparación con el oviducto.

Para determinar los transcritos expresados específicos de endometrio y oviducto se consideraron el total 5509 genes. El filtro para determinar a qué grupo pertenecían se fijó en un fold change  $\text{log}_2 \geq 4$ . Todos los transcritos que se encontraron por debajo de este corte se consideraron como expresados en ambos tejidos. De estos genes 5160

fueron identificados como comunes para ambos tejidos, 61 del oviducto (Anexo VIII) y 288 (Anexo IX) del endometrio (Fig. 47).



Figura 47 Diagrama de Venn del transcriptoma de las muestras de endometrio y el oviducto.

La clasificación de los genes que no tenían una expresión diferencial ( $\text{fold change } \log_2 \leq 4$ ) pero que sí se habían detectados como expresados en el endometrio y el oviducto les denominamos "comunes". Con estos genes se realizó la clasificación con la herramienta bioinformática DAVID. Los datos fueron clasificados por localización celular incluyendo además los que fueron clasificados como secretados. Esta clasificación nos mostró que 775 genes son de citoplasma, 406 del núcleo, 355 de la membrana plasmática y las que a nosotros más nos interesan son los genes clasificados como que sintetizan proteínas secretadas fueron 144 y 84 más del espacio extracelular (Fig. 48).

Para determinar los GO de los transcritos clasificados como secretados y del espacio extracelular (175 genes diferentes), fue utilizada la herramienta STRING 9.1. Los resultados obtenidos de los procesos biológicos y de funciones moleculares se muestran en la tabla 17. Adicionalmente con esta misma herramienta se realizó las redes de interacción por evidencia (Fig. 49).

### Clasificación de genes expresados comunes entre endometrio y oviducto de la vaca

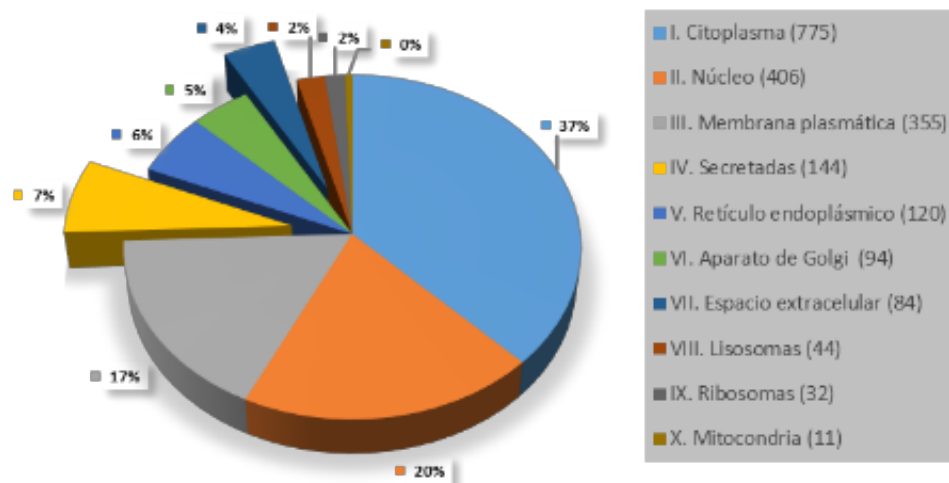


Figura 48 Gráfica de tarta de genes expresados comunes entre el endometrio y oviducto de la vaca. Clasificación realizada con la herramienta bioinformática DAVID.

Tabla 15 Gene Ontology (GO) de procesos biológicos y funciones moleculares de genes comunes de endometrio y oviducto, identificados como secretados y del espacio extracelular

GO id	Nombre	Número de genes	p-valor
GO:0008150	Proceso biológico	124	0.000045
GO:0003674	Función molecular	112	0.006000
GO:0005488	Unión	95	0.000014
GO:0065007	Regulación biológica	89	0.000002
GO:0050896	Respuesta al estímulo	87	0.000000
GO:0005515	Proteína de unión	63	0.000000
GO:0048856	Desarrollo de la estructura anatómica	58	0.000000
GO:0048522	Regulación positiva del proceso celular	57	0.000000
GO:0044238	Proceso metabólico primario	57	0.017000
GO:0019222	La regulación de los procesos metabólicos	56	0.000010
GO:0006950	Respuesta al estrés	45	0.000000
GO:0023051	Regulación de la señalización	41	0.000000
GO:0010646	Regulación de la comunicación celular	41	0.000000
GO:0019538	Proceso metabólico de proteínas	41	0.000040
GO:0032879	Regulación de la localización	40	0.000000
GO:0007154	La comunicación celular	39	0.014500
GO:0005102	Unión al receptor	38	0.000000
GO:0010468	La regulación de la expresión génica	38	0.000613
GO:0042221	Respuesta a la química	37	0.000004
GO:0046872	Ión de metal de unión	33	0.030800
GO:0003824	Actividad catalítica	33	0.806000

GO:0030154	La diferenciación celular	33	0.000020
GO:0048869	Proceso de desarrollo celular	33	0.000057
GO:0007166	Superficie de la célula vía de señalización	33	0.000075
GO:0006952	Respuesta de defensa	32	0.000000
GO:0002682	Regulación de proceso del sistema inmune	31	0.000000
GO:0009653	Estructura anatómica morfogénesis	31	0.000001
GO:0031325	Regulación positiva del proceso metabólico	31	0.000003
GO:0065008	Regulación de la calidad biológica	31	0.000009

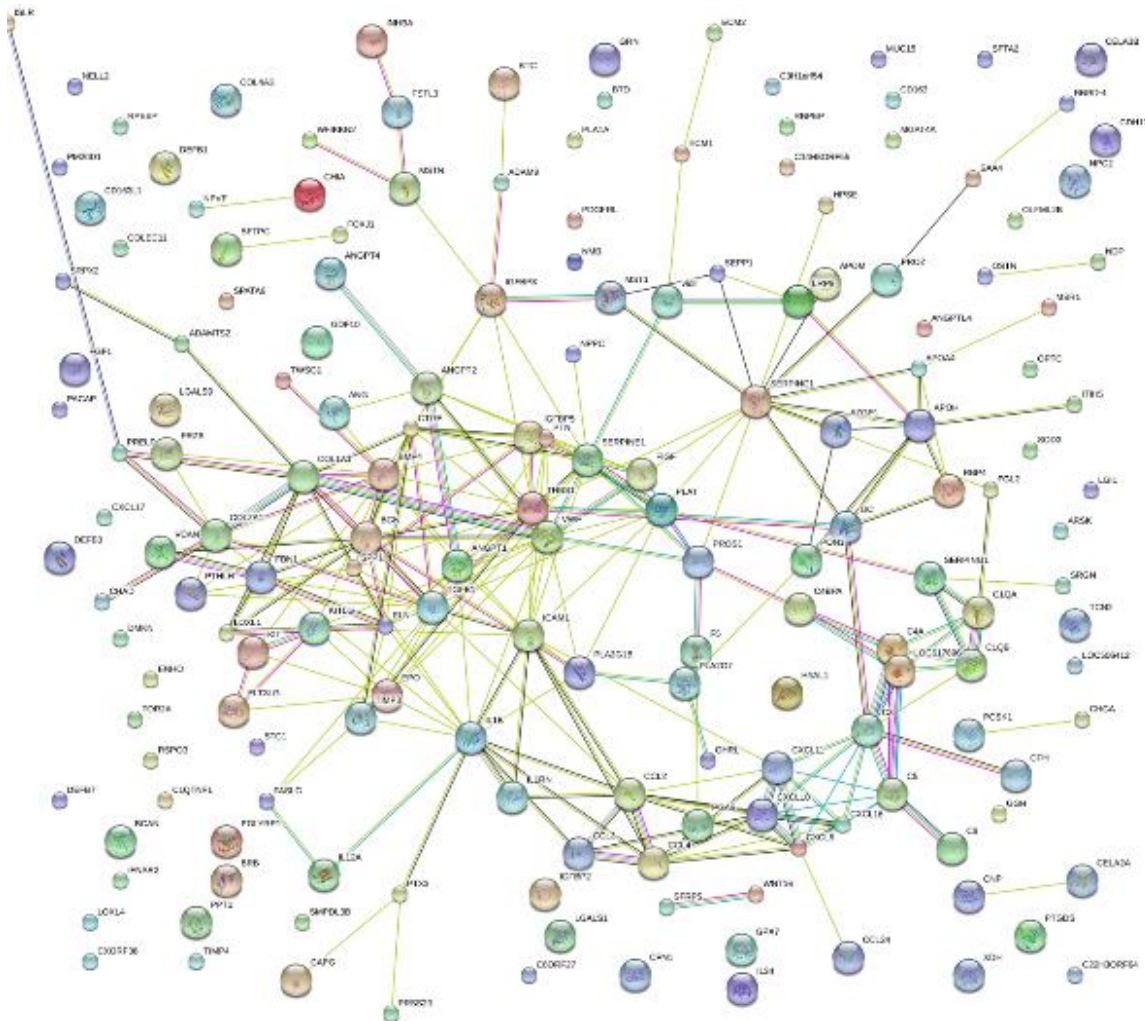


Figura 49 Redes de interacción por evidencia de los 175 genes clasificados como secretados y del espacio extracelular expresados comunes entre el endometrio y el oviducto de vaca *STRING 9.1* (Franceschini et al., 2013).

Los transcritos clasificados como secretados y del espacio extracelular únicos del oviducto se muestran en la tabla 16 y los del endometrio en la tabla 17.

Tabla 16 Proteínas únicas identificadas como secretadas y del espacio extracelular del oviducto de vaca.

Número de acceso	Símbolo	Nombre	FC*(log2) U_cr/O_a	FC* (log2) U_cr/O_i	P-valor U_cr/O_a	P-valor U_cr/O_i	Media de señal
XM_003585814.2	OVGP1	Oviductal glycoprotein 1, 120kda	-13.08	-13.10	0.0000	0.0000	13.23
NM_001033936.1	CFH	Complement factor H	-7.80	-7.90	0.0000	0.0000	11.71
NM_001100374.1	MSLN	Mesothelin	-6.94	-6.72	0.0000	0.0000	9.05
XM_002690022.1	CD109	CD109 molecule	-6.19	-6.36	0.0000	0.0000	12.66
NM_001080219.1	CHI3L1	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	-5.96	-6.15	0.0000	0.0000	9.88
NM_001102054.1	SERPINI2	Serpin peptidase inhibitor, clade I (pancpin), member 2	-5.91	-5.19	0.0000	0.0000	8.33
XM_001253283.2	PDYN	Prodynorphin	-5.69	-5.46	0.0000	0.0000	8.67
XM_002688785.2	MUC16	Mucin 16, cell surface associated	-5.58	-5.71	0.0001	0.0001	10.55
NM_173877.1	F2	Coagulation factor II (thrombin)	-5.57	-5.48	0.0000	0.0000	10.62
XM_866224.2	UTS2D	Urotensin 2 domain containing	-5.31	-6.51	0.0000	0.0000	7.80
XM_003585238.1	PI3	Peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	-5.13	-4.85	0.0000	0.0000	11.15
XM_003585390.1	BTRAPPIN-4	Trappin 4	-5.08	-4.75	0.0000	0.0000	11.00
XM_003582989.1	BTRAPPIN-5	Elafin-like	-5.02	-4.84	0.0000	0.0000	11.00
NM_001205278.1	EXPI	Extracellular proteinase inhibitor	-5.00	-6.23	0.0003	0.0000	9.26
XM_614095.6	FCGBP	Fc fragment of igg binding protein	-4.92	-5.29	0.0000	0.0000	12.43
NM_001101980.1	COL17A1	Collagen, type XVII, alpha 1	-4.73	-5.17	0.0000	0.0000	7.42
NM_001075923.1	ENPP3	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	-4.42	-4.40	0.0000	0.0000	11.14
NM_173883.2	TG	Thyroglobulin	-4.35	-4.80	0.0000	0.0000	8.41

Tabla 17 Proteínas únicas identificadas como secretadas y del espacio extracelular del endometrio de vaca.

Número de acceso	Símbolo	Nombre	FC*(log2) U_cr/O_a	FC* (log2) U_cr/O_i	P-valor U_cr/O_a	P-valor U_cr/O_i	Media de señal
NM_001076831.1	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1	10.81	10.23	0.0000	0.0000	7.99
NM_001101239.1	GRP	Gastrin-releasing peptide	9.34	5.29	0.0000	0.0000	11.10
NM_174520.2	COL1A2	Collagen, type I, alpha 2	9.22	9.05	0.0000	0.0000	7.11
NM_001143865.1	COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1	9.10	8.46	0.0000	0.0000	9.82
NM_205786.1	PTI	Spleen trypsin inhibitor	8.71	7.94	0.0000	0.0000	6.35
XM_597117.5	LAMC3	Laminin, gamma 3	7.88	7.95	0.0000	0.0000	6.38
NM_001080358.1	TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1	7.87	7.50	0.0000	0.0000	7.77
NM_173934.1	LUM	Lumican	7.81	7.79	0.0000	0.0000	6.05
XM_003584958.1	HTRA3	Htra serine peptidase 3	7.76	7.36	0.0000	0.0000	7.01
NM_001099053.1	LOXL2	Lysyl oxidase-like 2	7.69	7.26	0.0000	0.0000	6.26
NM_001166511.1	COL4A1	Collagen, type IV, alpha 1	7.64	7.04	0.0000	0.0000	8.16
NM_001098134.1	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	7.63	6.91	0.0000	0.0000	9.38
ENSBTAT00000008743	PIP	Prolactin-induced protein	7.36	6.32	0.0000	0.0000	7.20
NM_001100299.1	CRISPLD2	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	7.13	7.56	0.0000	0.0000	8.20
NM_173950.2	PGF	Placental growth factor	7.09	6.78	0.0000	0.0000	5.30
NM_001163778.1	FN1	Fibronectin 1	7.06	6.21	0.0000	0.0000	7.83
NM_174140.3	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	7.05	6.51	0.0000	0.0000	7.79
NM_001034227.1	MPTX	Putative mucosal pentraxin homolog	6.96	5.99	0.0000	0.0000	6.42
NM_001078026.1	TNC	Tenascin C	6.91	7.19	0.0000	0.0000	5.93
XM_002688974.1	FBN2	Fibrillin 2	6.91	5.00	0.0000	0.0000	6.04
NM_001143869.1	EMILIN2	Elastin microfibril interfacer 2	6.90	7.14	0.0000	0.0000	7.46



NM_174460.2	SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	6.78	7.00	0.0000	0.0000	7.33
NM_174141.2	PENK	Proenkephalin	6.77	6.47	0.0000	0.0000	5.48
NM_174669.2	SERPINE2	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	6.73	5.86	0.0000	0.0000	7.05
NM_174707.2	MGP	Matrix Gla protein	6.70	6.13	0.0001	0.0002	11.72
NM_001101979.1	EDN3	Endothelin 3	6.66	6.37	0.0000	0.0000	5.61
NM_001013001.1	WNT2	Wingless-type MMTV integration site family member 2	6.50	6.72	0.0000	0.0000	6.37
NM_174087.3	IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	6.46	6.32	0.0000	0.0000	10.19
NM_173903.3	CPE	Carboxypeptidase E	6.42	4.37	0.0000	0.0000	7.54
XM_002686570.2	COL6A3	Collagen, type VI, alpha 3	6.42	6.01	0.0000	0.0000	9.72
NM_001015642.2	CPXM1	Carboxypeptidase X (M14 family), member 1	6.33	6.40	0.0000	0.0000	5.90
NM_174388.2	MFAP2	Microfibrillar-associated protein 2	6.32	6.18	0.0000	0.0000	8.75
NM_001014845.2	NPY	Neuropeptide Y	6.28	5.93	0.0000	0.0000	5.41
NM_174183.2	SELP	Selectin P (granule membrane protein 140kda, antigen CD62)	6.25	5.79	0.0000	0.0000	5.45
XM_002685618.1	COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1	6.23	6.37	0.0000	0.0000	8.80
NM_001076301.1	APOD	Apolipoprotein D	6.18	6.43	0.0000	0.0000	6.71
NM_001101044.2	PLBD1	Phospholipase B domain containing 1	6.01	6.25	0.0000	0.0000	7.26
NM_001075126.1	COL6A2	Collagen, type VI, alpha 2	6.00	5.91	0.0000	0.0000	6.02
XM_005206031.1	SYT1	DKFZP459P193 protein-like	6.00	5.72	0.0000	0.0000	4.96
XM_002692011.1	COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2	5.94	5.59	0.0000	0.0000	8.66
NM_001015590.2	ITIH4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family, member 4	5.94	6.11	0.0000	0.0000	6.75
NM_174118.2	MYOC	Myocilin, trabecular meshwork inducible glucocorticoid response	5.80	5.72	0.0000	0.0000	7.11
NM_181667.1	ADAMTS4	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 4	5.79	5.41	0.0000	0.0000	5.01

NM_001205320.1	OLFM2	Olfactomedin 2	5.77	5.70	0.0000	0.0000	5.05
NM_001102065.1	NID2	Nidogen 2 (osteonidogen)	5.76	5.64	0.0000	0.0000	6.62
XM_003588045.3	CD248	CD248 molecule, endosialin	5.71	5.88	0.0000	0.0000	6.09
NM_001098982.1	CCDC80	Coiled-coil domain containing 80	5.70	5.09	0.0000	0.0000	9.41
NM_174703.2	TNXB	Tenascin XB	5.70	5.61	0.0000	0.0000	7.53
NM_001012519.1	AKR1B1	Aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	5.69	4.67	0.0000	0.0000	6.26
XM_592756.4	FNDC1	Fibronectin type III domain containing 1	5.66	5.06	0.0000	0.0000	8.58
NM_001075983.1	MMP19	Matrix metalloproteinase 19	5.66	5.80	0.0000	0.0000	7.06
NM_001101165.1	CRISPLD1	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 1	5.58	5.29	0.0000	0.0000	4.83
NM_001076201.2	C1QTNF7	C1q and tumor necrosis factor related protein 7	5.55	5.58	0.0000	0.0000	5.67
NM_001075197.1	OLFML3	Olfactomedin-like 3	5.45	5.58	0.0000	0.0000	9.32
NM_173888.3	ADM	Adrenomedullin	5.41	5.29	0.0000	0.0000	7.85
NM_001076550.1	C1S	Complement component 1, s subcomponent	5.40	6.06	0.0000	0.0000	8.72
NM_001035385.2	OLFML1	Olfactomedin-like 1	5.30	5.19	0.0000	0.0000	5.43
NM_001075879.1	CHST9	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 9	5.29	5.15	0.0000	0.0000	5.29
NM_001076049.1	EFEMP2	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	5.27	5.47	0.0000	0.0000	6.17
XM_002696468.1	NKD2	Naked cuticle homolog 2 (Drosophila)	5.20	5.30	0.0000	0.0000	8.40
NM_001102382.1	NOV	Nephroblastoma overexpressed gene	5.20	6.43	0.0000	0.0000	6.90
XM_001787671.3	COL9A3	Collagen, type IX, alpha 3	5.13	5.10	0.0000	0.0000	5.04
NM_001001156.1	ADAM12	ADAM metalloproteinase domain 12	5.04	5.00	0.0000	0.0000	5.86
NM_173946.2	OGN	Osteoglycin	5.04	5.03	0.0000	0.0000	5.59
NM_001098029.1	FBLN1	Fibulin 1	5.03	4.67	0.0000	0.0000	9.90
NM_001034309.1	ASPN	Asporin	5.03	5.00	0.0000	0.0000	5.46

NM_001034407.1	C1R	Complement component 1, r subcomponent	5.02	5.60	0.0000	0.0000	7.99
NM_001205624.1	COL5A3	Collagen, type V, alpha 3	4.92	5.11	0.0000	0.0000	5.80
XM_003585388.1	COL4A4	Collagen, type IV, alpha 4	4.90	4.78	0.0000	0.0000	5.20
NM_001014946.1	FBLN5	Fibulin 5	4.85	4.60	0.0000	0.0000	7.24
NM_001078150.2	LRRC17	Leucine rich repeat containing 17	4.84	5.30	0.0000	0.0000	6.98
XM_001787662.3	CTHRC1	Collagen triple helix repeat containing 1	4.83	4.56	0.0000	0.0000	4.61
NM_175801.2	FST	Follistatin	4.77	4.99	0.0000	0.0000	7.31
NM_174557.3	IGFBP4	Insulin-like growth factor binding protein 4	4.74	4.12	0.0000	0.0000	7.97
NM_001206114.1	ADAMTS19	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 19	4.72	4.68	0.0000	0.0000	5.08
XM_001254148.3	FSTL1	Follistatin-like 1	4.72	4.90	0.0000	0.0000	10.08
NM_181010.2	EDN1	Endothelin 1	4.70	4.41	0.0000	0.0000	4.75
NM_001206519.1	LAMB1	Laminin, beta 1	4.68	4.96	0.0000	0.0000	8.90
NM_001101176.1	COL8A1	Collagen, type VIII, alpha 1	4.63	4.20	0.0000	0.0000	4.62
NM_001102528.1	MATN2	Matrilin 2	4.59	4.56	0.0000	0.0000	6.33
NM_001101180.1	APOLD1	Apolipoprotein L domain containing 1	4.54	4.62	0.0000	0.0000	6.94
NM_001191132.2	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	4.52	4.17	0.0000	0.0000	6.01
NM_001113174.1	CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	4.51	4.25	0.0000	0.0000	5.29
XM_003587266.1	LTBP4	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 4-like	4.47	4.48	0.0000	0.0000	8.89
NM_174464.2	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	4.46	4.50	0.0001	0.0001	9.96
NM_176608.1	GHR	Growth hormone receptor	4.45	4.64	0.0000	0.0000	6.15
NM_001080307.1	ABI3BP	ABI family, member 3 (NESH) binding protein	4.45	4.02	0.0000	0.0000	6.06
NM_001046585.1	CCL14	Chemokine (C-C motif) ligand 14	4.42	4.40	0.0000	0.0000	5.20
XM_581642.5	WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	4.40	4.94	0.0000	0.0000	9.29

NM_001206785.1	IGSF10	Immunoglobulin superfamily, member 10	4.31	4.36	0.0000	0.0000	4.82
NM_001167894.1	F13A1	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide	4.28	4.38	0.0000	0.0000	5.69
NM_001098056.1	TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	4.23	4.05	0.0000	0.0000	4.97
NM_001046616.1	HSD17B13	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13	4.23	4.94	0.0000	0.0000	6.51
NM_173991.2	APOE	Apolipoprotein E	4.21	4.86	0.0000	0.0000	7.65
NM_001034220.2	LOC504773	Regakine 1	4.18	4.48	0.0000	0.0000	5.54
NM_001035457.3	PRSS35	Protease, serine, 35	4.16	4.13	0.0000	0.0000	6.58
NM_174745.2	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kda gelatinase, 72kda type IV collagenase)	4.15	4.10	0.0000	0.0000	7.22
NM_001077828.1	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	4.09	4.09	0.0000	0.0000	4.70
XM_002702778.2	COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1	4.08	4.52	0.0000	0.0000	10.35
NM_001192742.1	PI15	Peptidase inhibitor 15	4.06	4.10	0.0000	0.0000	4.86
NM_174743.2	SPON1	Spondin 1, extracellular matrix protein	4.01	4.11	0.0000	0.0000	9.31

## 5.1.2.- Análisis proteómico de fluido oviductal y uterino en la especie bovina

El análisis proteómico del contenido de los fluidos oviductales y uterinos de la vaca se hizo a partir de la identificación de "spots" de geles en 2D. Como se menciona en los materiales y métodos, los geles fueron de dos tipos; por un lado los geles que contenían sólo una de las muestras, ya sea fluido uterino o fluido oviductal y por otro los geles en 2D diferenciales (DiGE) que contenían ambas muestras. En ambos casos estos "spots" fueron recortados para su identificación por espectrometría de masas. A continuación se detallarán los resultados obtenidos por cada una de estas técnicas.

### 5.3.1.2.- Análisis por electroforesis

#### 5.3.1.2.1.- Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

A partir de los resultados obtenidos de estos geles pudimos observar como las proteínas migraban en un gel en 2D y así comprobar su distribución, de acuerdo a su peso molecular y punto isoeléctrico, esto para las muestras de fluido oviductal (Fig. 50) y fluido uterino (Fig. 51). En estos geles se resolvieron hasta 300 µg de proteínas, lo que nos permitió observar un mayor número de "spots" en comparación con los geles DiGE, que contenían sólo 150 µg de proteína. La comparativa entre geles teñidos con coomassie y los marcados con las sondas fluorescentes Cy2 (ambos con 300 µg) no mostraron diferencia en el número de "spots" detectados. Los geles elegidos para determinar la media de "spots" para cada tipo de muestra fueron los marcados con sonda fluorescente Cy2. Para el fluido oviductal ( $n=4$ ) la media de "spots" detectados fue de 458 (Fig. 52a). Adicionalmente se realizó una representación gráfica en tres dimensiones para visualizar el volumen que representa cada "spot" en la muestra total (Fig. 52b). En esta figura tridimensional destaca la alta aportación de la proteína albúmina sérica bovina (ALB), que representa en el fluido oviductal más del 21% del total de proteína.

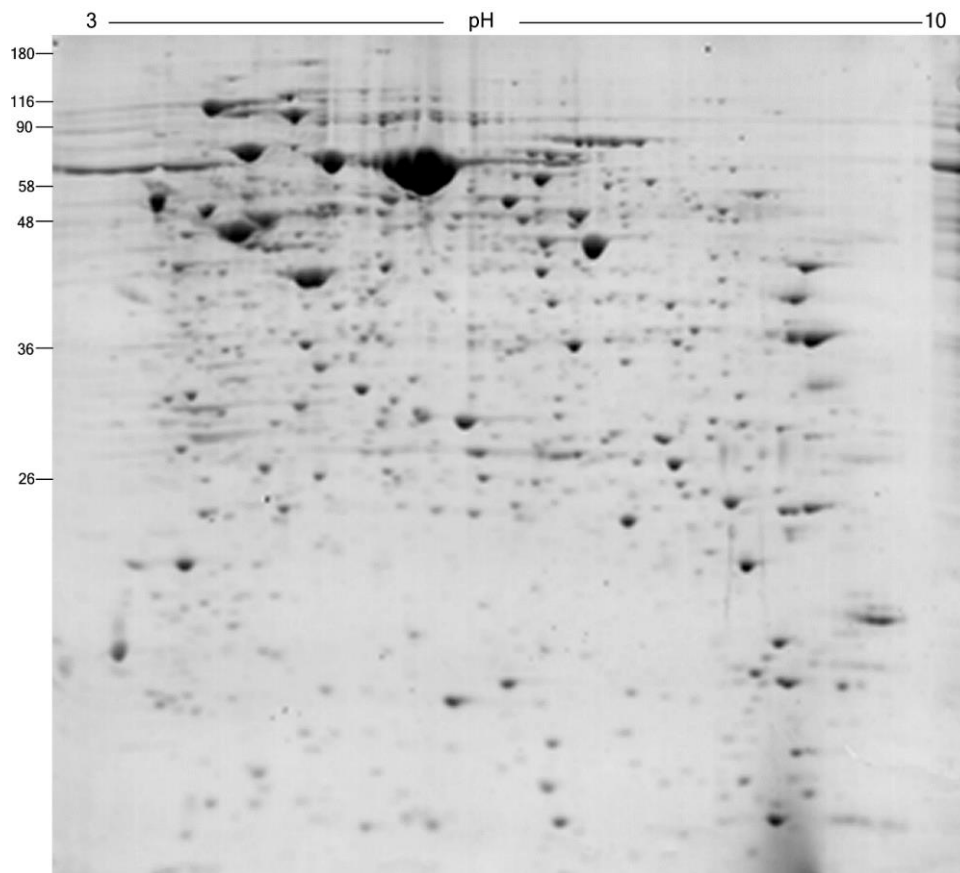


Figura 50 Electroforesis en 2D de FOB en fase periovulatoria. Resolución de 300  $\mu$ g de FOB en maxigel con tiras reactiva de gradiente no lineal de pH (3-10), teñido con azul de coomassie.

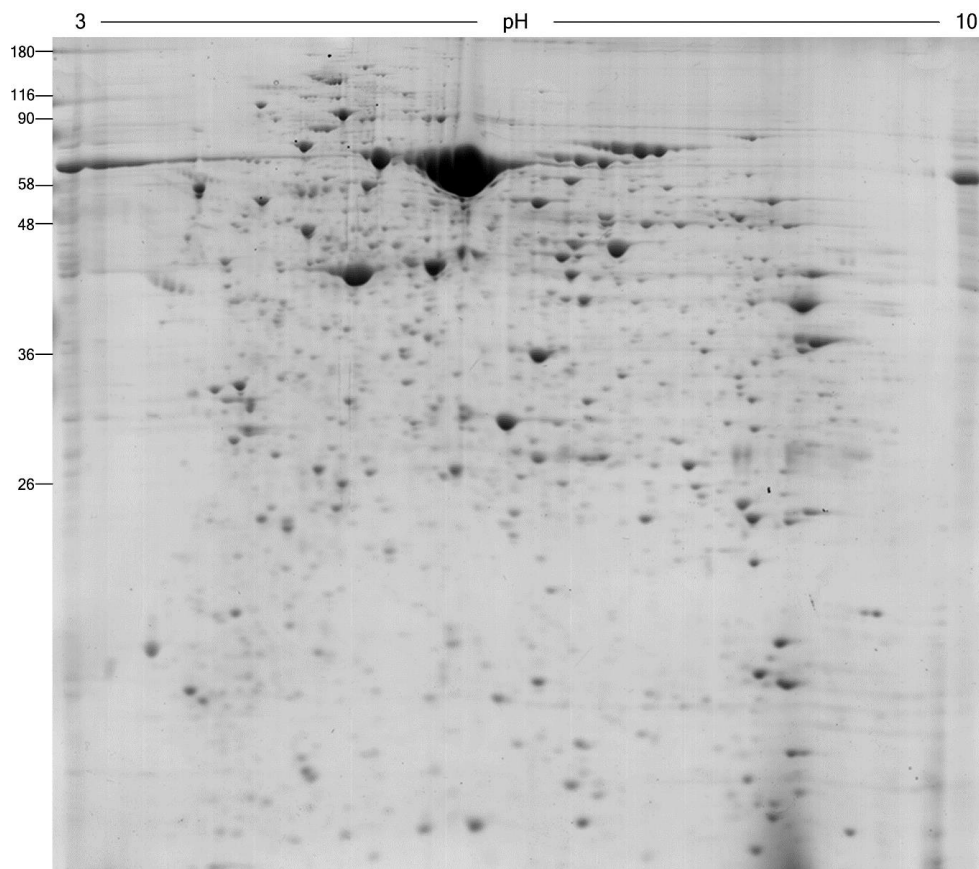


Figura 51 Electroforesis en 2D de FUB en fase periovulatoria. Resolución de 300  $\mu$ g de FUB en maxigel con tiras reactiva de gradiente no lineal de pH (3-10), teñido con azul de coomassie.

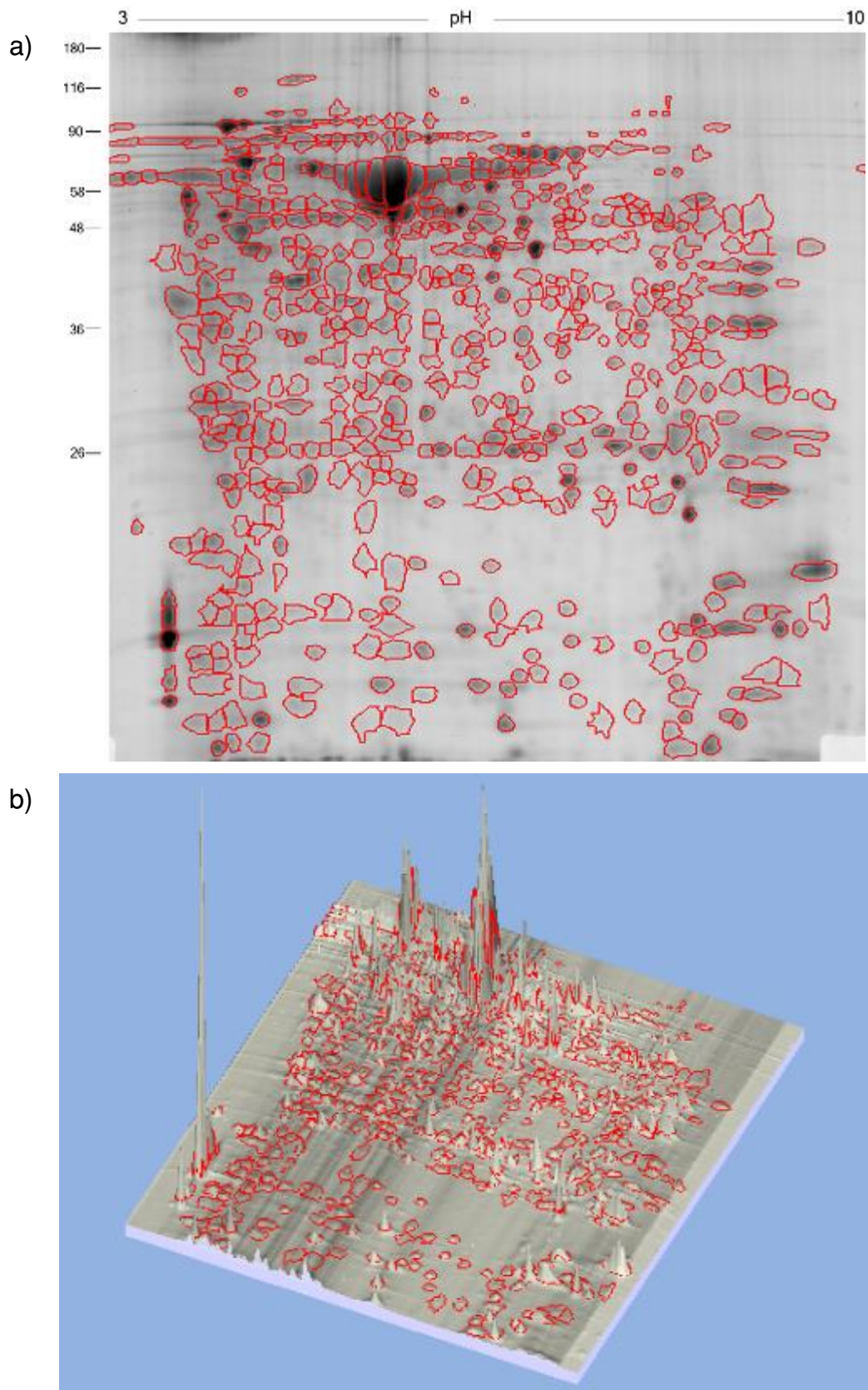


Figura 52 Electroforesis en 2D de FOB en fase periovulatoria marcado con sonda fluorescente Cy2. Resolución de 300  $\mu$ g de FOB en maxigel, con tiras de gradiente no lineal de pH (3-10). Imagen obtenida del escaneo con Thypoon (a). Representación esquemática 3D, "spots" detectados con el software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (b).

Para las muestras de fluido uterino ( $n=3$ ) la media de "spots" identificados fue de 242 (Fig. 53a) también para esta muestra se realizó la imagen tridimensional (Fig. 53b).

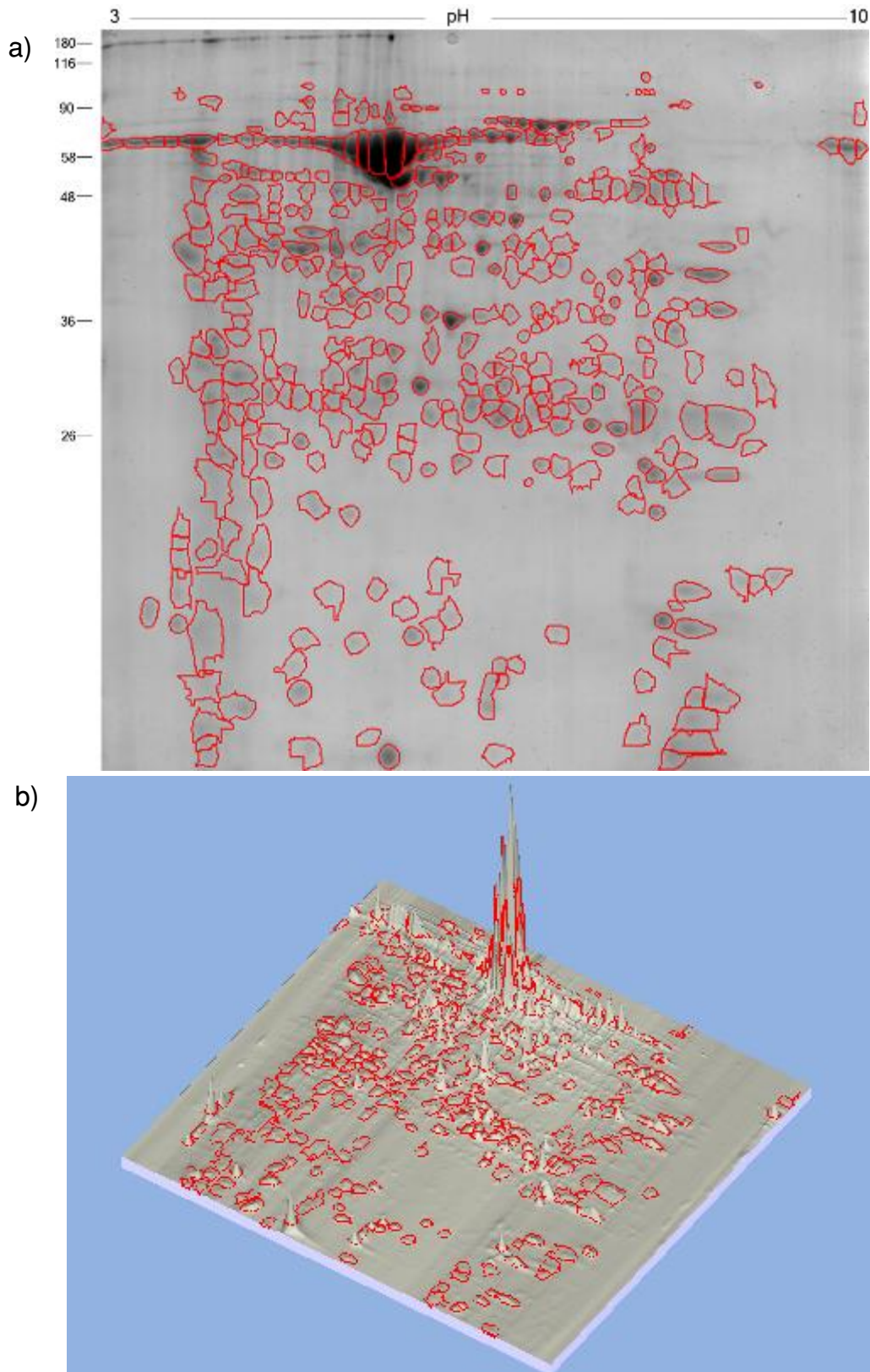


Figura 53 Electroforesis en 2D de FUB en fase periovulatoria marcado con sonda fluorescente Cy2. Resolución de  $300 \mu\text{g}$  de FUB en maxigel, con tiras de gradiente no lineal de pH (3-10). Imagen obtenida del escaneo con Thyphoon (a). Representación esquemática 3D, "spots" detectados con el software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (b).



La ALB en el fluido uterino representa más del 42% en el volumen total de proteína contenida en este fluido.

Uno de los primeros criterios para la selección de "spots" a identificar por proteómica fue la abundancia. Que fue determinado mediante el análisis de imagen con el software ImageMaster Platinum 7.2. Estos "spots" fueron secuenciados e identificados en el fluido oviductal (Fig. 54, Tabla 18) y uterino (Fig. 56, Tabla 19). Adicionalmente se elaboraron las redes de interacción por evidencia de las proteínas más abundantes en el fluido oviductal (Fig. 55) y uterino (Fig. 57).

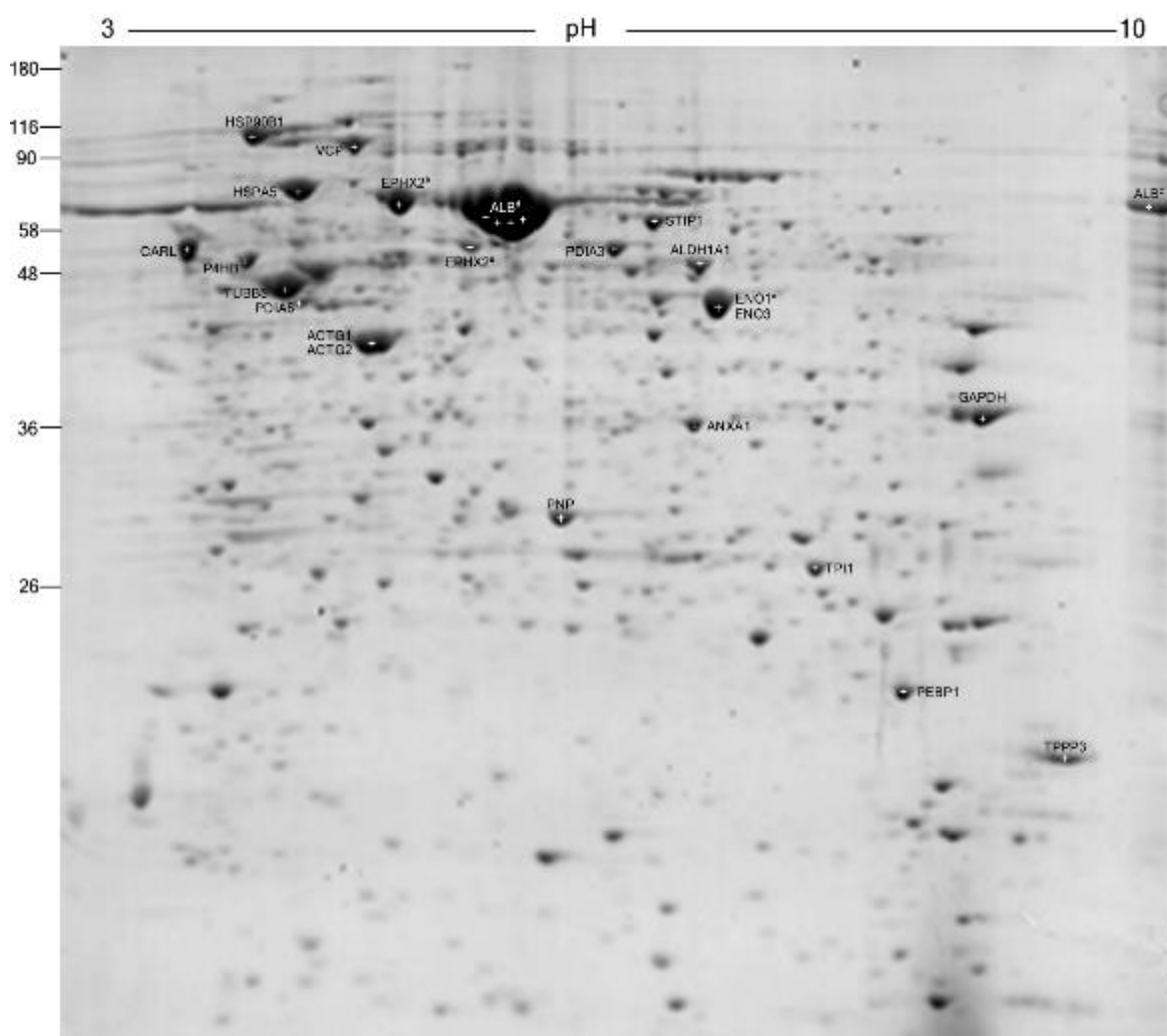


Figura 54 Proteínas más abundantes del fluido oviductal de la vaca. Electroforesis en 2D de FOB en fase periovulatoria. Resolución de 300  $\mu$ g de FOB en maxigel con tiras reactiva de gradiente no lineal de pH (3-10), teñido con azul de coomassie.

Tabla 18 Proteínas más abundantes del fluido oviductal de la especie bovina.

Símbolo	Nombre	Acceso	Vol (%)
ALB <sup>d</sup>	Serum albumin	P02769	21.131538
ENO1 <sup>a</sup>	Alpha-enolase	Q9XSJ4	1.729888
ENO3	Beta-enolase	Q3ZC09	1.729888
TPPP3	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	Q3ZCC8	1.534906
HSPA5	78 kda glucose-regulated protein	Q0VCX2	1.431596
HSP90B1	Endoplasmin	Q95M18	1.181098
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	0.905705
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	P63258	0.883473
ACTG2	Actin, gamma-enteric smooth muscle	Q5E9B5	0.883473
TUBB5	Tubulin beta-5 chain	Q2KJD0	0.882556
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	P38657	0.715439
EPHX2	Epoxide hydrolase 2	Q17QK4	0.639033
CALR	Calreticulin	P52193	0.629642
TPI1	Triosephosphate isomerase	Q5E956	0.567540
PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P13696	0.507784
PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6 precursor	A6QNL5	0.447726
STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1	Q3ZBZ8	0.435986
P4HB	Protein disulfide-isomerase	P05307	0.415748

Las letras en superíndice indican diferentes "spots" de la misma proteína.

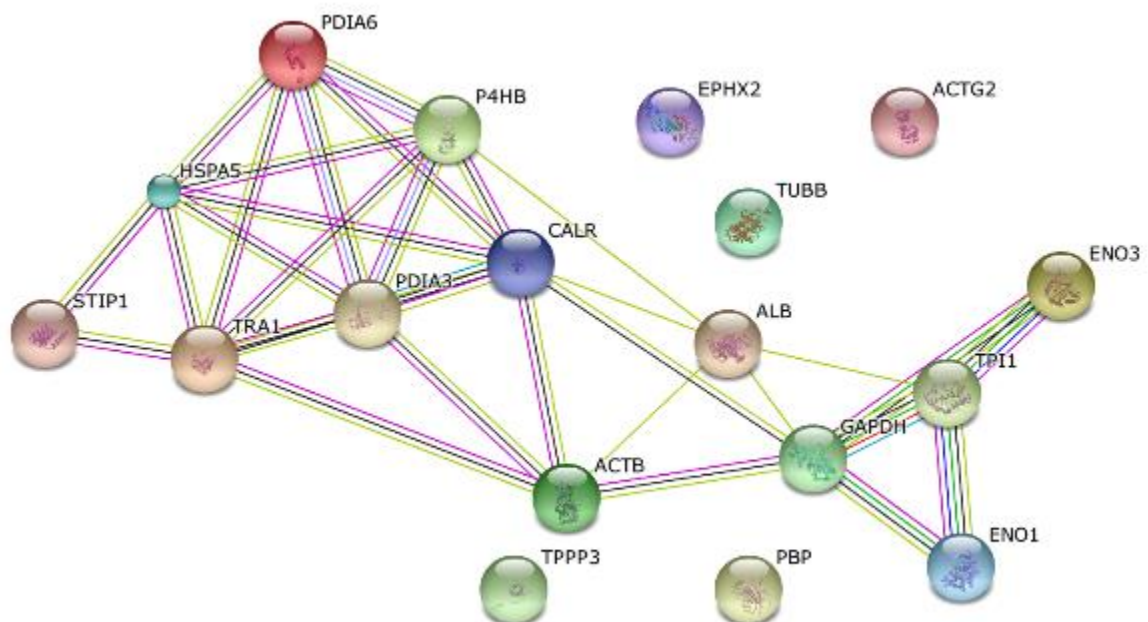


Figura 55 Red de interacción por evidencia de las proteínas más abundantes del FOB en fase periovulatoria, donde se detectaron hasta 32 interacciones. Este gráfico se elaborado con la herramienta bioinformática STRING 9.1 (Franceschini et al., 2013).

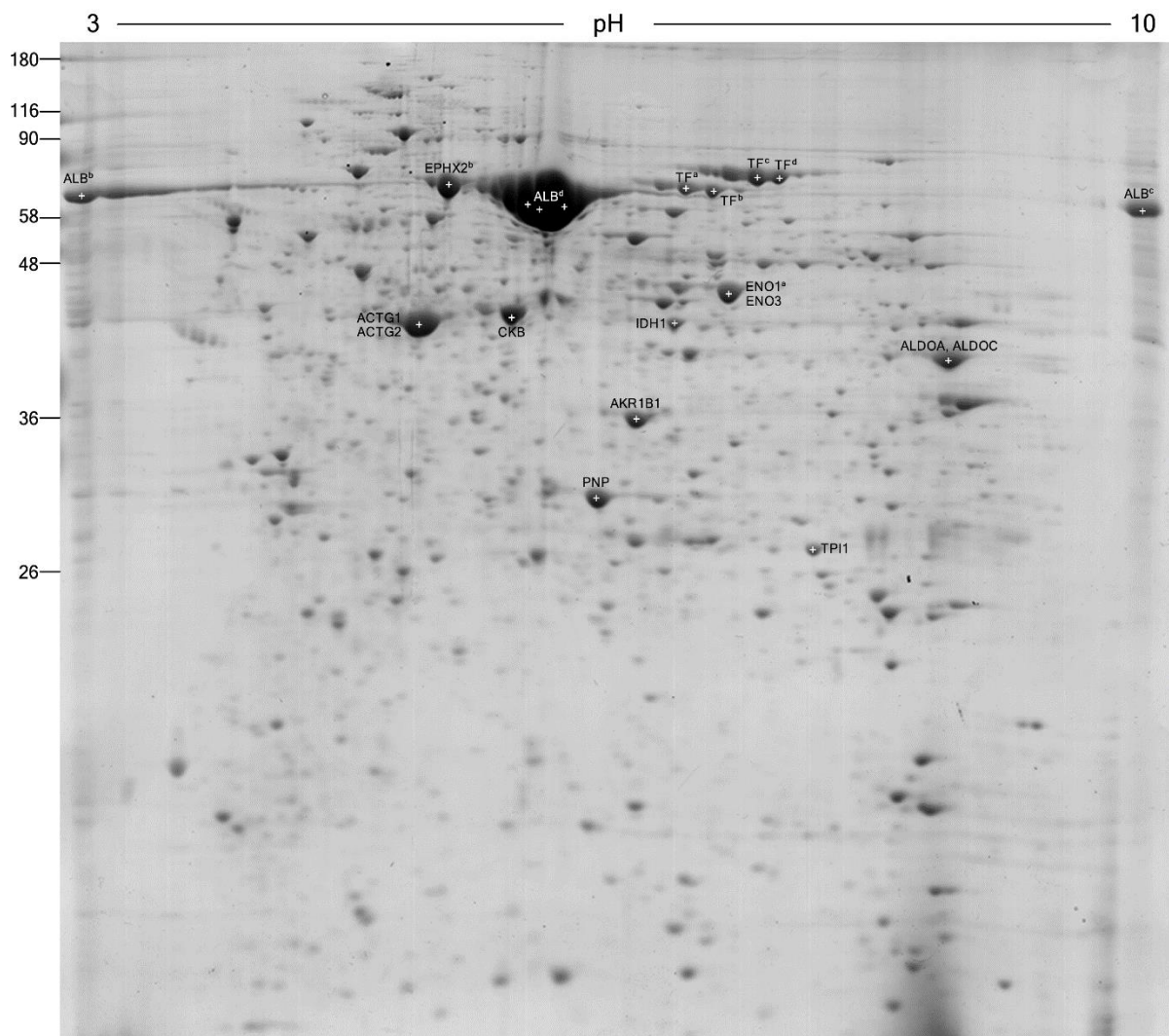


Figura 56 Proteínas más abundantes del fluido oviductal de la vaca. Electroforesis en 2D de FUB es fase periovulatoria. Resolución de 300  $\mu$ g de FUB en maxigel con tiras reactiva de gradiente no lineal de pH (3-10), teñido con azul de coomassie.

Tabla 19 Proteínas más abundantes de fluido uterino de la especie bovina.

Símbolo	Nombre	Acceso	Vol (%)
ALB <sup>d</sup>	Serum albumin	P02769	42.840677
AKR1B1	Aldose reductase	P16116	1.272226
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	P63258	0.947259
ACTG2	Actin, gamma-enteric smooth muscle	Q5E9B5	0.947259
TF <sup>c</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	0.789324
TF <sup>a</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	0.700539
IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Q9XSG3	0.649181
TF <sup>d</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	0.630819
TF <sup>b</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	0.625038
ALB <sup>b</sup>	Serum albumin	P02769	0.567432
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	A6QLL8	0.504118
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	Q3ZBY4	0.504118

ENO1 <sup>a</sup>	Alpha-enolase	Q9XSJ4	0.438016
ENO3	Beta-enolase	Q3ZC09	0.438016
ALB <sup>c</sup>	Serum albumin	P02769	0.407473
TPI1	Triosephosphate isomerase	Q5E956	0.364798
PNP	Purine nucleoside phosphorylase	P55859	0.363296
CKB	Creatine kinase B-type	Q5EA61	0.315712

Las letras en superíndice indican diferentes "spots" de la misma proteína.

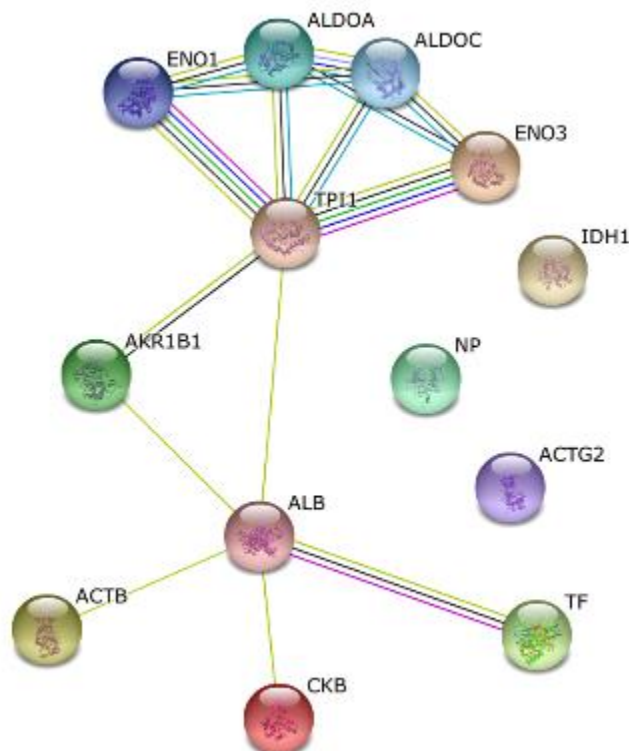


Figura 57 Red de interacción por evidencia de las proteínas más abundantes del FUB en fase periovulatoria, donde se detectaron hasta 15 interacciones. Este grafico se elaborado con la herramienta bioinformática STRING 9.1 (Franceschini et al., 2013).

#### 5.1.1.2.2.- Electroforesis bidimensional diferencial en gel (DiGE)

Los geles en 2D diferenciales nos permitieron observar las diferencias que se encuentran entre los distintos tipos de muestras (Fig. 58). Nuestro estudio estuvo basado en la comparativa de FOB *versus* FUB (Fig. 59), FOB *versus* Suero (Fig. 60) y FUB *versus* Suero (Fig. 61). Una vez analizados los geles por triplicado fueron seleccionados los "spots" que mostraban una diferencia por arriba de las 2 veces entre las muestras de fluido oviductal (Tabla. 20) y uterino (Tabla 21).

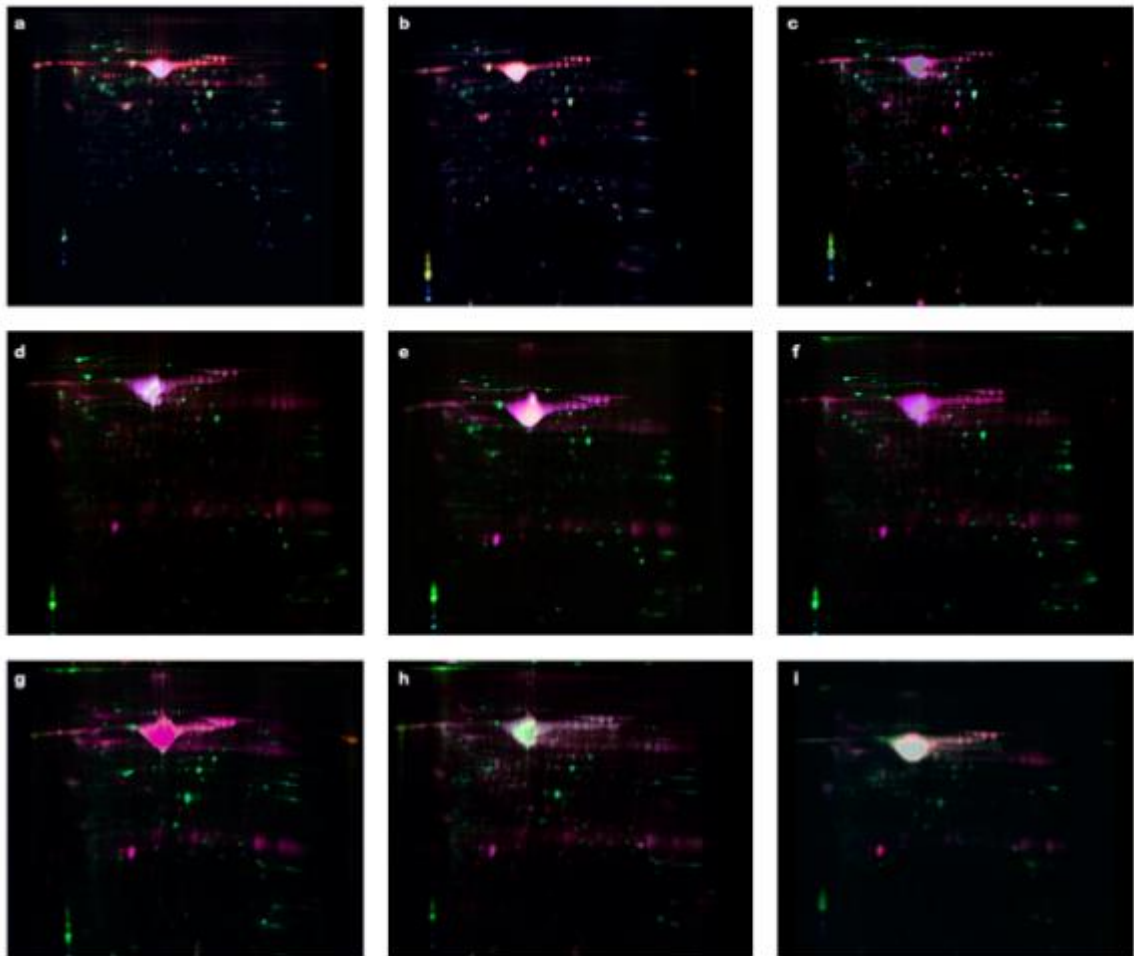


Figura 58 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FOB, FUB y SSB en fase periovulatoria. Comparativa entre FOB (verde) y FUB (rojo) y la mezcla (azul) imágenes a, b y c. Comparativa entre FOB (verde) y SSB (rojo) y la mezcla (azul) imágenes d, e y f. Comparativa entre FUB (verde) y SSB (rojo) y la mezcla (azul) imágenes g, h y i.

Tabla 20 Proteínas diferencialmente expresadas del oviducto bovino.

Símbolo	Nombre de proteína	Acceso	Vol Ratio
TPPP3	Tubulina miembro de la familia de proteínas que promueven la polimerización 3	Q3ZCC8	-421.86
HSPA5	Proteína regulada por glucosa de 78 kda	Q0VCX2	-7.62
ANXA8	Anexina A8	Q95L54	-6.06
HSP90B1	Endoplasmina	Q95M18	-5.50
LZTFL1	Proteína leucina zipper factor de transcripción como 1	Q3ZBL4	-4.46
PDIA6	Proteína disulfuro isomerasa-A6 precursor	A6QNL5	-2.95
PRDX6 <sup>b</sup>	Peroxiredoxin-6	O77834	-2.91
ANXA1	Anexina A1	P46193	-2.41
TUBB5	Tubulina beta-5 chain	Q2KJD0	-2.20
P4HB	Proteína disulfuro isomerasa-	P05307	-2.11
PDIA3	Proteína disulfuro isomerasa-A3	P38657	-2.05

Las letras en superíndice indican diferentes "spots" de la misma proteína

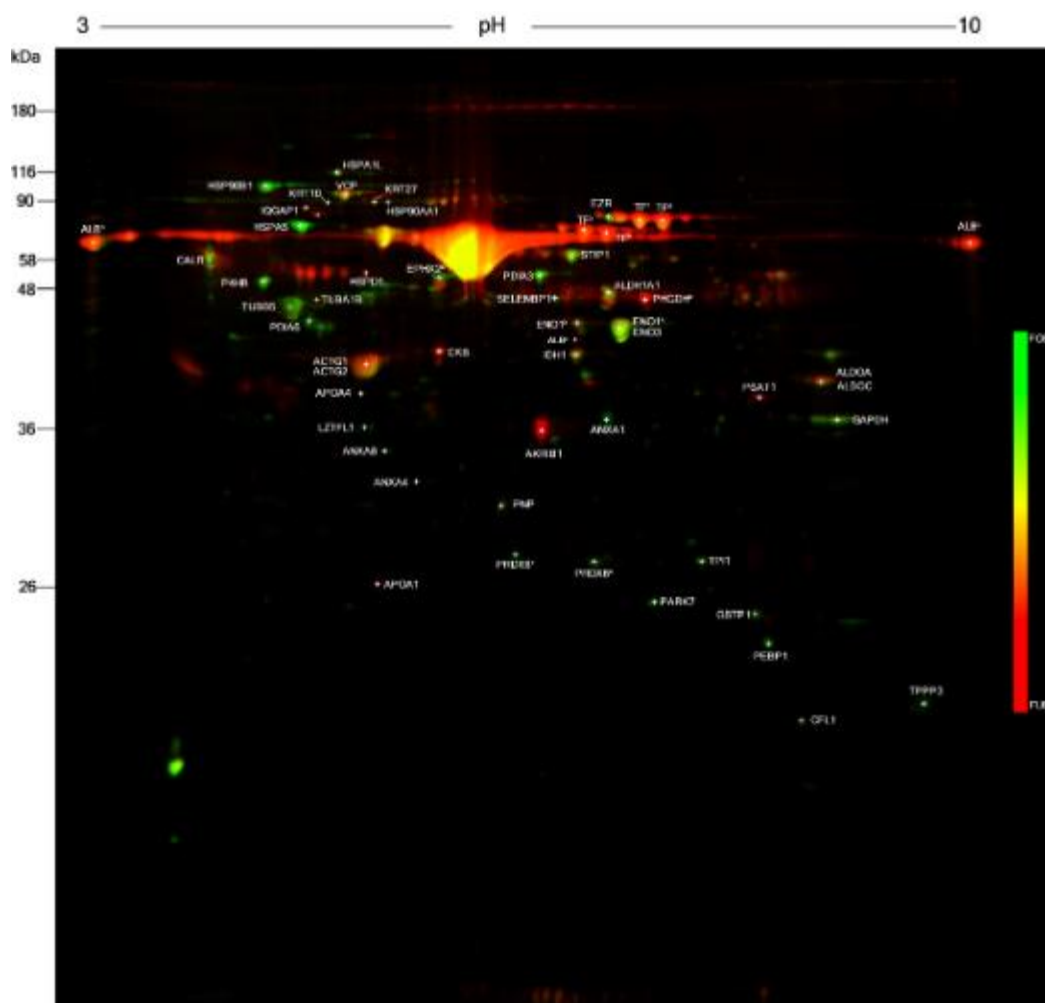


Figura 59 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FOB y FUB en fase periovulatoria. Se observan sólo las muestras marcadas con Cy3 (verde) y Cy5 (rojo). En verde los "spots" mayormente expresados en el FOB, en rojo los mayormente expresados en FUB y en amarillo

Tabla 21 Proteínas diferencialmente expresadas del útero bovino.

Símbolo	Nombre de proteína	Acceso	Vol Ratio
AKR1B1	Aldosa reductasa	P16116	59.73
IQGAP1	Proteína IQGAP1	P46940	41.85
PSAT1	Phosphoserine aminotransferasa	PSAT1	29.00
PHGDH <sup>b</sup>	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	Q5EAD2	16.20
TF <sup>d</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	13.30
PHGDH <sup>a</sup>	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	Q5EAD2	12.92
TF <sup>b</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	12.17
TF <sup>c</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	9.26
TF <sup>a</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	8.23
CKB	Creatina quinasa de tipo B	Q5EA61	6.61
HSPD1	Proteína de choque térmico 60 kda, mitocondrial	P31081	5.03
ACTG1	Actina, citoplásmica 2	P63258	2.91
ACTG2	Actina, del músculo liso-gamma entérico	Q5E9B5	2.83
PEBP1	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1-	P13696	2.72

ALDOA	Fructosa bifosfato aldolasa A	A6QLL8	2.53
ALDOC	Bisfosfato fructosa aldolasa C	Q3ZBY4	2.53
SELENBP1	Proteína 1 de unión Selenio	Q2KJ32	2.18

Las letras en superíndice indican diferentes "spots" de la misma proteína

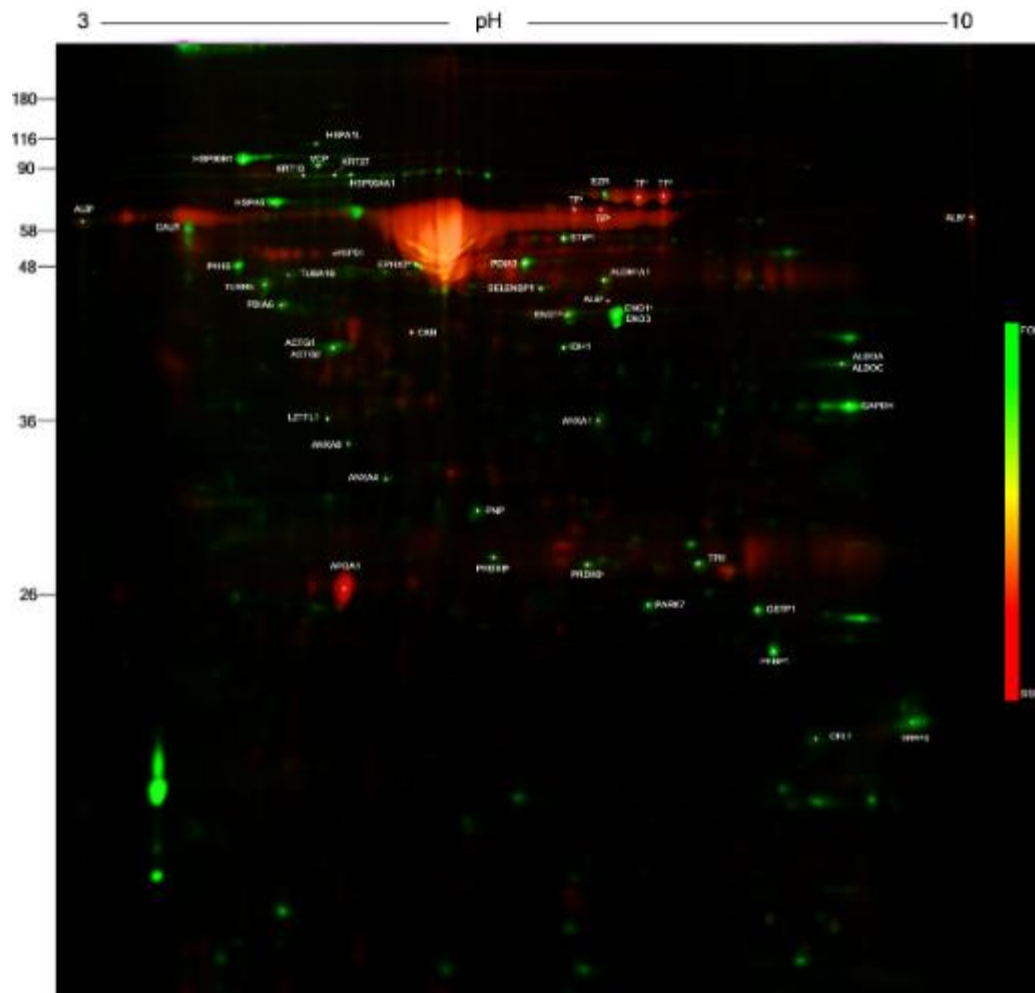


Figura 60 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FOB y SSB en fase periovulatoria. Se observan sólo las muestras marcadas con Cy3 (verde) y Cy5 (rojo). Proteínas identificadas por espectrometría de masas. En verde los "spots" mayormente expresados en el FOB, en rojo los mayormente expresados en SSB y en amarillo los comunes para ambas muestras

Una vez seleccionados los "spots" hasta un total de 52 fueron identificados, estos se correspondían a 47 proteínas diferentes (Tabla 22). Se observa que 2 proteínas son comunes para los tres tipos de muestras FOB, FUB y SSB, 29 de ellas son comunes al FOB y FUB. Ninguna de ellas fue común a FOB y SSB, 2 comunes a FUB y SSB. Nueve fueron únicas en FOB, cinco únicas para FUB y ninguna fue única para el SSB (Fig. 62).

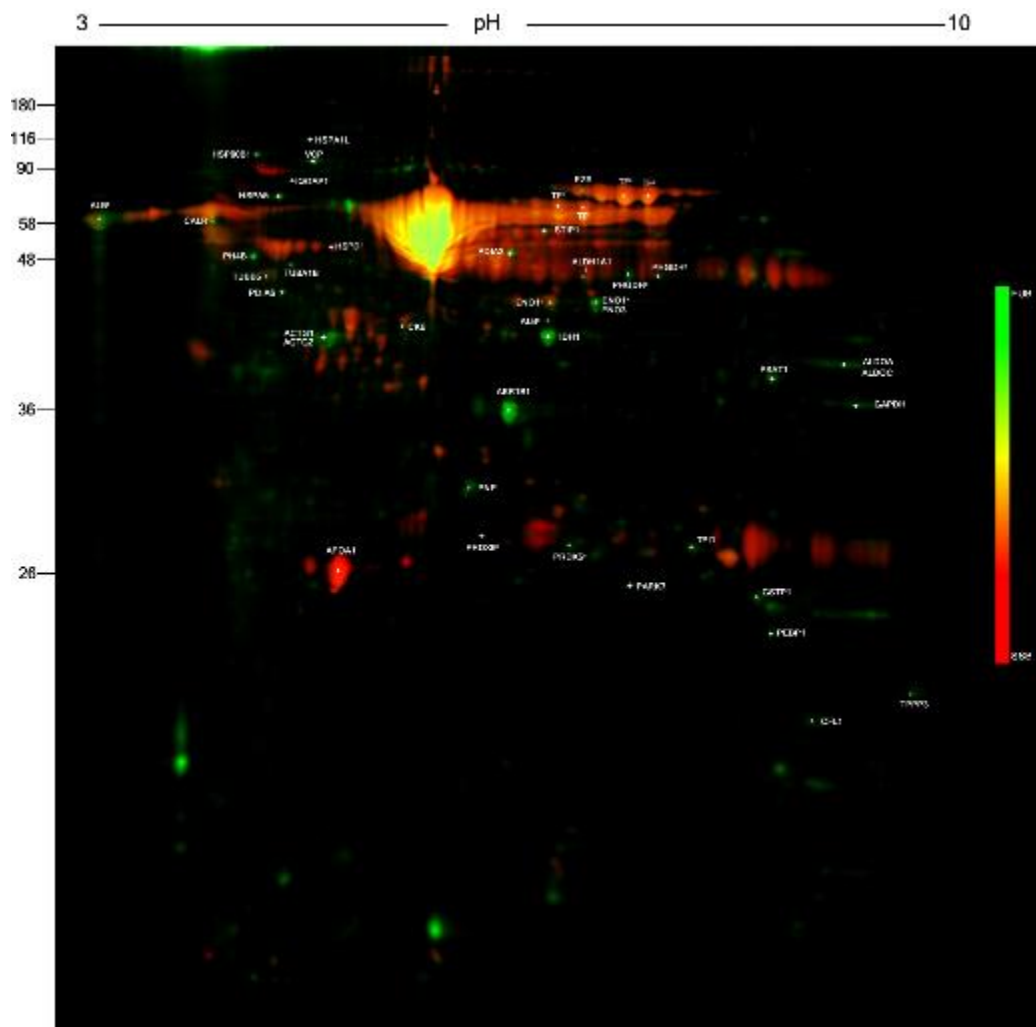


Figura 61 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FUB y SSB en fase periovulatoria. Se observan sólo las muestras marcadas con Cy3 (verde) y Cy5 (rojo). Proteínas identificadas por espectrometría de masas. En verde los "spots" mayormente expresados en el FOB, en rojo los mayormente expresados en SSB y en amarillo los comunes para ambas muestras.



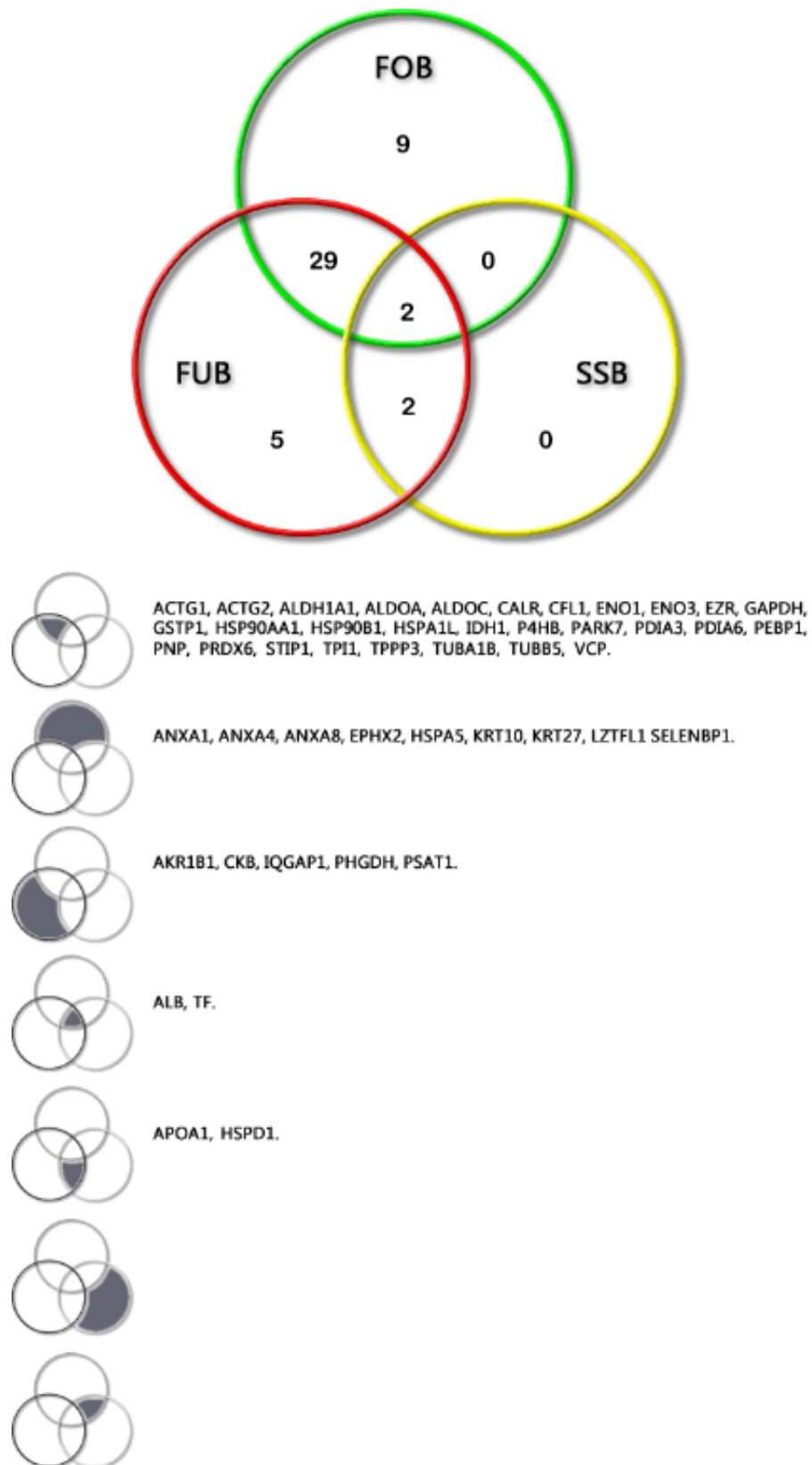


Figura 62 Diagrama de Venn de las proteínas identificadas por espectrometría de masas de fluido oviductal bovino (FOB), fluido uterino bovino (FUB) y suero sanguíneo bovino (SSB).

Tabla 22 Proteínas identificadas de FOB, FUB y SSB en fase periovulatoria.

Símbolo	Nombre	Acceso	PM* (kDa)	Péptidos únicos	Núm. péptidos	Score	SPI	Cobertura (%)
ACTG1	Actin, cytoplasmic 2	P63258	41.8	4	10	134.81	91.62	24.53
ACTG2	Actin, gamma-enteric smooth muscle	Q5E9B5	41.9	5	15	189.18	88.06	14.36
AKR1B1	Aldose reductase	P16116	35.9	8	25	299.60	87.11	34.92
ALB <sup>a</sup>	Serum albumin	P02769	69.3	4	8	148.81	93.33	9.72
ALB <sup>b</sup>	Serum albumin	P02769	69.3	5	16	131.37	89.39	10.05
ALB <sup>c</sup>	Serum albumin	P02769	69.3	5	13	108.23	89.19	9.56
ALDH1A1	Retinal dehydrogenase 1	P48644	54.8	3	3	44.66	93.17	12.00
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	A6QLL8	39.4	4	18	209.75	88.73	20.05
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	Q3ZBY4	39.4	2	2	17.36	79.05	9.34
ANXA1	Annexin A1	P46193	39.0	3	11	139.12	93.63	16.47
ANXA4	Annexin A4	P13214	35.9	2	2	24.55	96.95	9.00
ANXA8	Annexin A8	Q95L54	36.8	4	9	141.35	96.38	25.99
APOA1	Apolipoprotein A-I	P15497	30.3	2	3	21.38	97.30	6.00
CALR	Calreticulin	P52193	48.0	5	10	88.73	86.94	15.00
CFL1	Cofilin-1	Q5E9F7	18.5	2	7	85.33	92.99	18.07
CKB	Creatine kinase B-type	Q5EA61	42.7	5	7	69.73	91.31	17.85
ENO1 <sup>a</sup>	Alpha-enolase	Q9XSJ4	47.3	6	18	199.35	89.02	25.35
ENO1 <sup>b</sup>	Alpha-enolase	Q9XSJ5	47.3	6	13	106.85	92.58	15.00
ENO3	Beta-enolase	Q3ZC09	47.1	3	10	171.51	97.60	12.21
EPHX2 <sup>a</sup>	Epoxide hydrolase 2	Q17QK4	62.7	8	20	226.41	92.87	20.90
EZR	Ezrin	P31976	68.8	5	11	80.45	91.35	8.00
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P10096	35.9	5	12	115.06	95.97	24.62
GSTP1	Glutathione S-transferase P	P28801	23.6	7	14	152.73	88.18	55.71
HSP90AA1	Heat shock protein HSP 90-alpha	Q76LV2	84.7	7	23	257.78	93.13	6.00

Las letras en superíndice indican diferentes "spots" de la misma proteína. \*PM= peso molecular teórico de la proteína en base a su secuencia de aminoácidos.

Continuación...Tabla 22 Proteínas identificadas de FOB, FUB y SSB en fase periovulatoria.

Símbolo	Nombre	Acceso	PM* (kDa)	Péptidos únicos	Núm. péptidos	Score	SPI	Cobertura (%)
HSP90B1	Endoplasmin	Q95M18	92.4	7	18	76.87	91.89	9.83
HSPA1L	Heat shock 70 kDa protein 1-like	P34931	70.4	1	2	18.88	87.15	2.34
HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	Q0VCX2	72.4	10	26	316.67	93.93	23.51
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P31081	61.1	5	7	68.15	95.78	17.28
IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Q9XSG3	46.8	11	29	360.23	89.57	36.00
IQGAP1	Protein IQGAP1	P46940	182.8	5	14	164.85	94.60	5.38
KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10	P06394	54.8	2	3	20.30	89.10	4.00
KRT27	Keratin, type I cytoskeletal 27	Q0P5J6	49.9	2	2	31.58	92.53	4.78
LZTFL1	Leucine zipper transcription factor-like protein 1	Q3ZBL4	34.6	3	12	194.62	91.33	15.05
P4HB	Protein disulfide-isomerase	P05307	57.3	3	11	145.39	91.28	6.00
PARK7	Protein DJ-1	Q5E946	20.0	6	11	59.45	95.58	42.00
PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3	P38657	56.9	1	2	25.96	88.80	5.15
PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6 precursor	A6QNL5	48.1	3	4	45.34	83.05	11.48
PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P13696	21.0	2	9	87.46	96.47	20.32
PHGDH <sup>a</sup>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Q5EAD2	56.5	6	26	381.68	93.18	16.88
PHGDH <sup>b</sup>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Q5EAD2	56.5	2	6	53.03	95.62	6.00
PNP	Purine nucleoside phosphorylase	P55859	32.0	11	57	781.70	87.90	48.78
PRDX6 <sup>a</sup>	Peroxiredoxin-6	O77834	25.1	4	8	46.80	88.28	20.54
PRDX6 <sup>b</sup>	Peroxiredoxin-6	O77834	25.1	4	6	67.27	89.03	22.32
PSAT1	Phosphoserine aminotransferase	A6QR28	40.5	6	12	125.30	92.86	19.46
SELENBP1	Selenium-binding protein 1	Q2KJ32	52.6	9	16	205.62	90.75	31.57
STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1	Q3ZBZ8	62.5	1	3	19.96	99.40	2.76
TF <sup>a</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	77.7	5	7	67.42	92.47	9.52

Las letras en superíndice indican diferentes "spots" de la misma proteína. \*PM= peso molecular teórico de la proteína en base a su secuencia de aminoácidos.

Continuación...Tabla 22 Proteínas identificadas de FOB, FUB y SSB en fase periovulatoria.

<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>Acceso</b>	<b>PM* (kDa)</b>	<b>Péptidos únicos</b>	<b>Núm. péptidos</b>	<b>Score</b>	<b>SPI</b>	<b>Cobertura (%)</b>
TF <sup>b</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	77.7	2	2	19.73	94.00	3.55
TF <sup>c</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	77.7	8	14	145.72	92.02	13.49
TF <sup>d</sup>	Serotransferrin precursor	Q29443	77.7	11	23	260.04	93.27	21.88
TPI1	Triosephosphate isomerase	Q5E956	26.7	5	12	117.63	96.12	33.33
TPPP3	Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	Q3ZCC8	18.9	3	13	163.49	94.01	27.84
TUBA1B	Tubulin alpha-1B chain	P81947	50.2	8	45	600.20	94.82	30.60
TUBB5	Tubulin beta-5 chain	Q2KJD0	49.7	7	15	199.53	90.17	23.87
VCP	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	Q3ZBT1	89.3	20	35	376.38	92.42	39.20

Las letras en superíndice indican diferentes "spots" de la misma proteína. \*PM=Peso molecular teórico de la proteína en base a su secuencia de aminoácidos

Para determinar las relaciones funcionales que mantienen estas proteínas entre sí (redes), se utilizó la herramienta informática STRING 9.1 (Franceschini et al., 2013) y el resultado obtenido se observa en la figura 63. Hasta un total de 91 interacciones fueron detectadas. En base a estas evidencias se logró elaborar una tabla de GO de funciones moleculares y procesos biológicos en las cuales estas proteínas están involucradas (Tabla 23.)

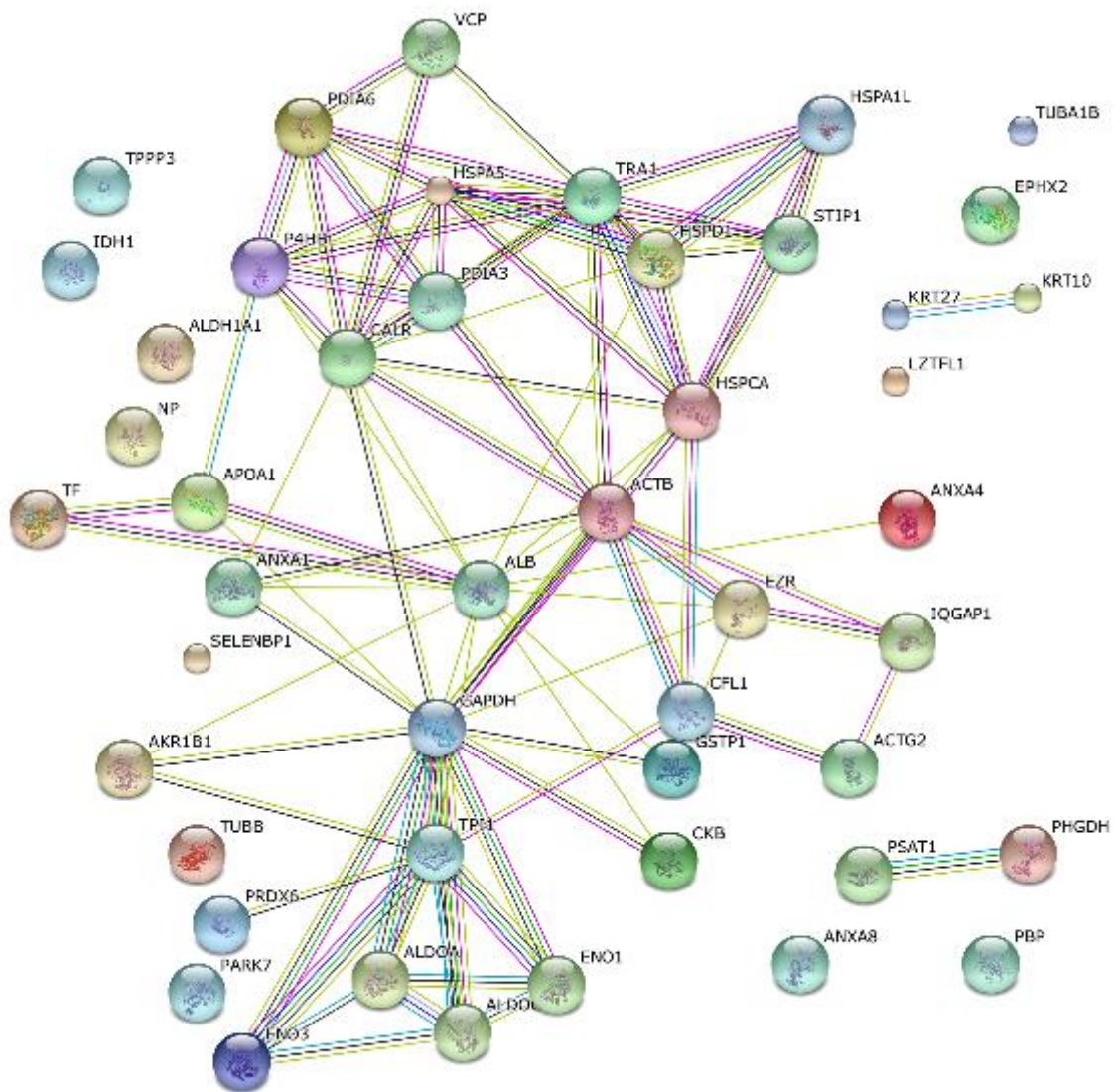


Figura 63 Red de interacción por evidencia de las 47 proteínas identificadas por MS/MS de FOB y FUB en fase periovulatoria, se observan 91 interacciones. Elaborado con la herramienta bioinformática STRING 9.1 (Franceschini et al., 2013).

Tabla 23 Gene Ontology (GO) de procesos biológicos y funciones moleculares de proteínas identificadas de FOB y FUB en fase periovulatoria.

GO id	Nombre	Número de proteínas	p-valor
GO:0005515	Proteína de unión	28	8.44E-05
GO:0050896	Respuesta al estímulo	28	5.11E-07
GO:0042221	Respuesta química	27	2.61E-12
GO:0005488	Unión	26	2.58E-02
GO:0044707	Proceso celular de organismo simple multicelular	25	9.74E-07
GO:0032501	Proceso de organismo multicelular	24	6.46E-06
GO:0006950	Respuesta al estrés	22	3.47E-09
GO:0065007	Regulación biológica	22	3.58E-02
GO:0044763	Proceso celular de organismo simple	22	4.85E-02
GO:0097159	Unión a compuesto orgánica	21	2.19E-04
GO:0043167	Unión a ion	21	1.73E-03
GO:0051716	Respuesta celular al estímulo	21	1.64E-04
GO:0065008	Regulación de la calidad biológica	20	1.43E-08
GO:0008150	Proceso biológico	20	3.59E-01
GO:1901363	Unión a compuesto heterocíclico	19	1.59E-03
GO:0044710	Proceso metabólico de organismo simple	18	8.00E-05
GO:0071704	Proceso metabólico sustancia orgánica	18	9.50E-02
GO:0050794	Regulación del proceso celular	18	1.80E-01
GO:0043168	Unión a aniones	17	2.08E-06
GO:0036094	Pequeña molécula de unión	17	3.27E-06
GO:0006796	Proceso metabólico de compuestos que contienen fosfato	17	3.36E-08
GO:0006793	Proceso metabólico del fosforo	17	4.32E-08
GO:0010033	Respuesta a la sustancia orgánica	17	1.84E-07
GO:0044281	Proceso metabólico de pequeñas moléculas	17	5.43E-07
GO:0016043	Organización de componentes celulares	17	7.11E-04
GO:0071840	Biogénesis de componentes celulares	17	9.62E-04
GO:0044238	Procesos metabólicos primarios	17	1.39E-01
GO:0050789	Regulación de procesos biológicos	17	3.20E-01
GO:0048583	Regulación de respuesta al estímulo	16	3.99E-05
GO:0051234	Establecimiento de la localización	16	6.27E-05
GO:0007275	Desarrollo de organismo multicelular	16	1.19E-03
GO:0044237	Proceso metabólico celular	16	1.94E-01
GO:0003723	Unión a ARN	14	3.35E-07
GO:1901265	Unión a nucleósidos de fosfato	14	8.61E-05
GO:0003676	Unión de ácidos nucleicos	14	3.98E-03
GO:0003674	Función molecular	14	9.65E-01
GO:0042802	Unión a proteína idéntica	12	7.72E-07
GO:0001882	Unión nucleósido	12	1.28E-04
GO:0097367	Unión derivados de carbohidratos	12	6.34E-04

GO:0019899	Unión a enzimas	11	3.43E-05
GO:0032550	Unión a purinas ribonucleósida	11	5.12E-04
GO:0001883	Unión purina nucleósida	11	5.20E-04
GO:0035639	Unión purina nucleósida trifosfato	11	5.36E-04
GO:0032553	Unión ribonucleótido	11	6.25E-04
GO:0017076	Unión purina nucleótido	11	6.34E-04
GO:0046872	Unión ion de metal	11	1.69E-01
GO:0005524	Unión ATP	9	2.06E-03
GO:0032559	Unión adenilribonucleótido	9	2.30E-03
GO:0030554	Unión adenilnucleótido	9	2.50E-03
GO:0030234	Regulación de actividad enzimática	8	1.31E-04
GO:0005102	Unión al receptor	8	1.58E-03
GO:0016787	Actividad hidrolasa	8	1.89E-02
GO:0003824	Actividad catalítica	8	4.54E-01
GO:0008289	Unión a lípidos	7	6.89E-05
GO:0046983	Actividad de dimerización de proteínas	7	3.95E-03
GO:0042803	Actividad homodimerización de proteínas	6	1.61E-03
GO:0032403	Unión a complejo de proteínas	6	3.65E-03

Datos obtenidos con la herramienta bioinformática STRING 9.1, p-valor calculado con dicha herramienta

Adicionalmente a las proteínas identificadas por espectrometría de masas se realizó otra búsqueda de proteínas anteriormente descritas en suero (Wait et al., 2002) y plasma sanguíneo (D'Ambrosio et al., 2005), así, como de fluido uterino (Muñoz et al., 2012a, Cohen et al., 2011, Gómez et al., 2013) en la especie bovina. Esto se realizó con el objetivo de perfeccionar los datos del proteoma de FOB y FUB, basado en las proteínas identificadas en nuestro análisis y las anteriormente descritas en el suero y plasma sanguíneo, así como en algunas de fluido uterino, se amplió la descripción del proteoma del FOB y del FUB (Fig. 64).

Con nuestros datos de proteínas identificadas complementados con las proteínas descritas con anterioridad, realizamos las redes de interacción, para el FOB, en este se observaron hasta 80 interacciones (Fig. 65) y en el FUB se encontraron 107 interacciones (Fig. 66). El paso siguiente fue el hacer la clasificación funcional para cada uno de los fluidos (Tabla 24 y Tabla 25).

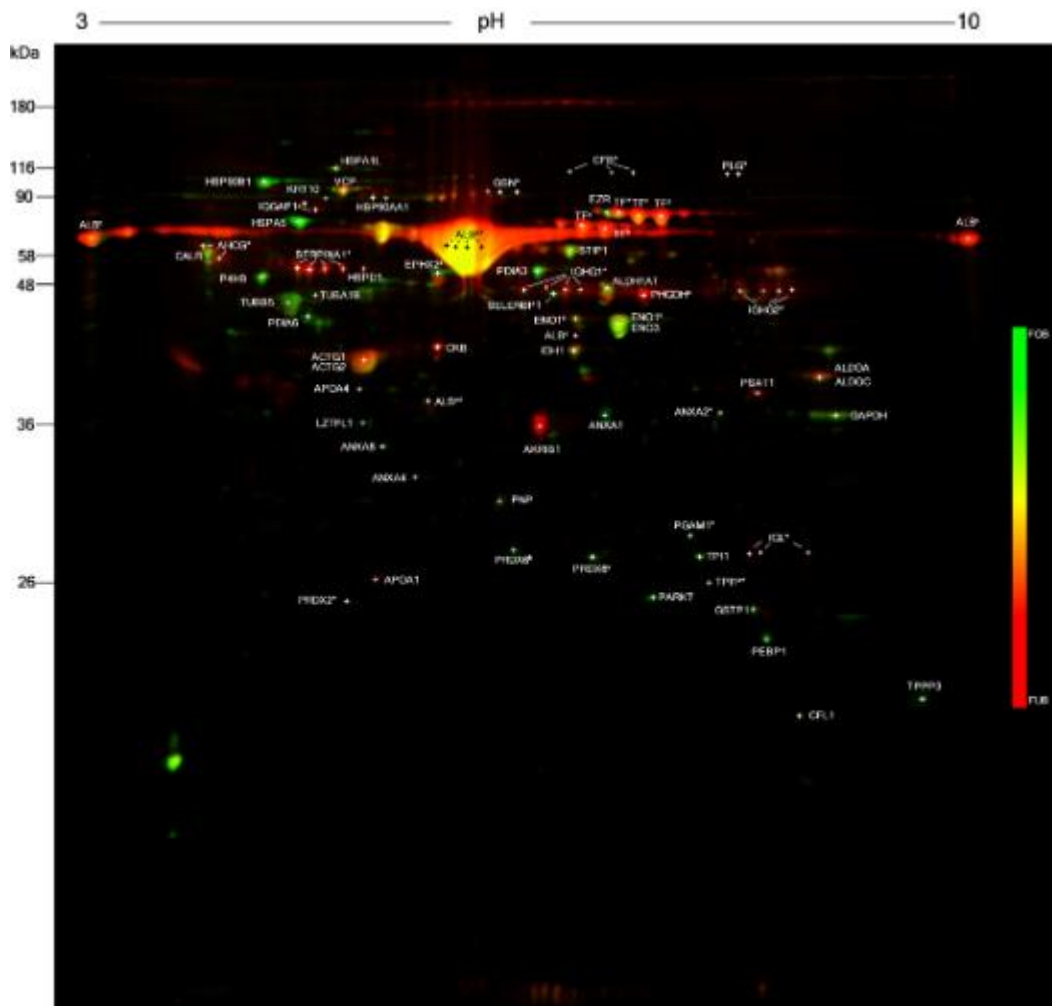


Figura 64 Electroforesis en 2D diferencial (DiGE) de FOB y FUB en fase periovulatoria. Proteínas identificadas por espectrometría de masas. En verde los "spots" mayormente expresados en el FOB, en rojo los mayormente expresados en FUB y en amarillo los comunes para ambas muestras. El asterisco indica las proteínas identificadas por otros autores.

Tabla 24 Gene Ontology (GO) de procesos biológicos y funciones moleculares de proteínas identificadas de FOB.

GO id	Nombre	Número	p-valor
GO:0050896	Respuesta a estímulos	28	1.52E-08
GO:0005515	Unión a proteínas	26	6.03E-05
GO:0042221	Respuesta química	25	5.65E-12
GO:0005488	Unión	25	8.88E-03
GO:0044707	Proceso de organismo multicelular simple	23	1.35E-06
GO:0044699	Proceso de organismo simple	23	9.01E-03
GO:0006950	Respuesta al estrés	22	2.19E-10
GO:0032501	Proceso de organismo multicelular	22	9.17E-06
GO:0008150	Proceso biológico	21	9.68E-02
GO:0051716	Respuesta celular al estímulo	20	7.85E-05
GO:0065007	Regulación biológica	20	3.64E-02
GO:0050794	Proceso de regulación celular	19	3.75E-02



GO:0065008	Regulación de calidad biológica	18	6.59E-08
GO:0051234	Establecimiento de localización	18	4.59E-07
GO:0051179	Localización	18	7.62E-06
GO:0006810	Transporte	17	1.79E-06
GO:0016043	Componentes de organización celular	17	1.49E-04
GO:0071840	Biogénesis	17	2.06E-04
GO:0050789	Proceso de regulación biológica	17	1.56E-01
GO:0009987	Proceso celular	17	5.27E-01
GO:0043167	Unión a Ion	17	1.47E-02
GO:0071704	Proceso metabólico de sustancia orgánica	16	1.16E-01
GO:1901363	Compuestos heterocíclicos vinculante	16	7.18E-03

Datos obtenidos con la herramienta bioinformática STRING 9.1, p-valor calculado con dicha herramienta

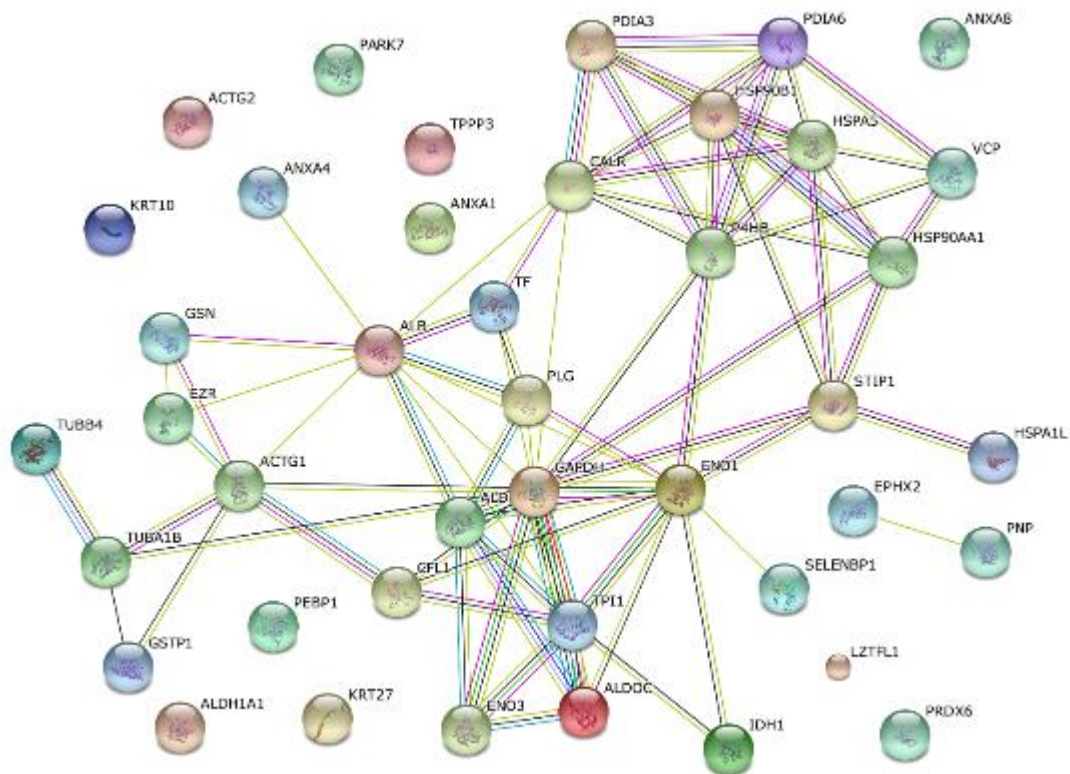


Figura 65 Red de interacción por evidencia de las 42 proteínas de FOB. Elaborado con la herramienta bioinformática STRING 9.1 (Franceschini et al., 2013)

Tabla 25 Gene Ontology (GO) de procesos biológicos y funciones moleculares de proteínas identificadas de FUB.

GO id	Nombre	Número	p-valor
GO:0050896	Respuesta a estímulos	29	1.25E-08
GO:0005515	Unión proteínas	27	5.45E-05
GO:0042221	Respuesta química	26	2.69E-12
GO:0006950	Respuesta al estrés	25	1.12E-12

GO:0044707	Proceso organismo multicelular simple	24	8.74E-07
GO:0065007	Regulación biológica	24	2.80E-03
GO:0032501	Proceso de organismo multicelular	23	6.02E-06
GO:0044763	Proceso de organismo celular simple	22	2.14E-02
GO:0065008	Regulación de la calidad biológica	21	4.61E-10
GO:0097159	Compuesto orgánico cíclico vinculante	20	2.32E-04
GO:0050794	Regulación de procesos celular	20	3.16E-02
GO:0043167	Unión a Ion	19	4.49E-03
GO:0016043	Componentes de organización celular	19	2.07E-05
GO:1901363	Compuestos heterocíclicos vinculante	18	1.79E-03
GO:0010033	Respuesta a la sustancia orgánica	18	8.26E-09
GO:0006810	Transporte	18	7.38E-07
GO:0051179	Localización	18	1.66E-05
GO:0044710	Proceso metabólico de organismo simple	18	2.83E-05
GO:0071704	Proceso metabólico de sustancia orgánica	18	5.24E-02
GO:0008150	Proceso biológica	18	4.53E-01
GO:0009987	Proceso celular	18	5.02E-01
GO:0044238	Proceso metabólico primario	17	8.25E-02
GO:0036094	Pequeña molécula de unión	16	5.85E-06
GO:0016192	Transporte medido por vesículas	16	4.19E-12
GO:0007275	Desarrollo del organismo multicelular	16	5.19E-04

Datos obtenidos con la herramienta bioinformática STRING 9.1, p-valor calculado con dicha herramienta

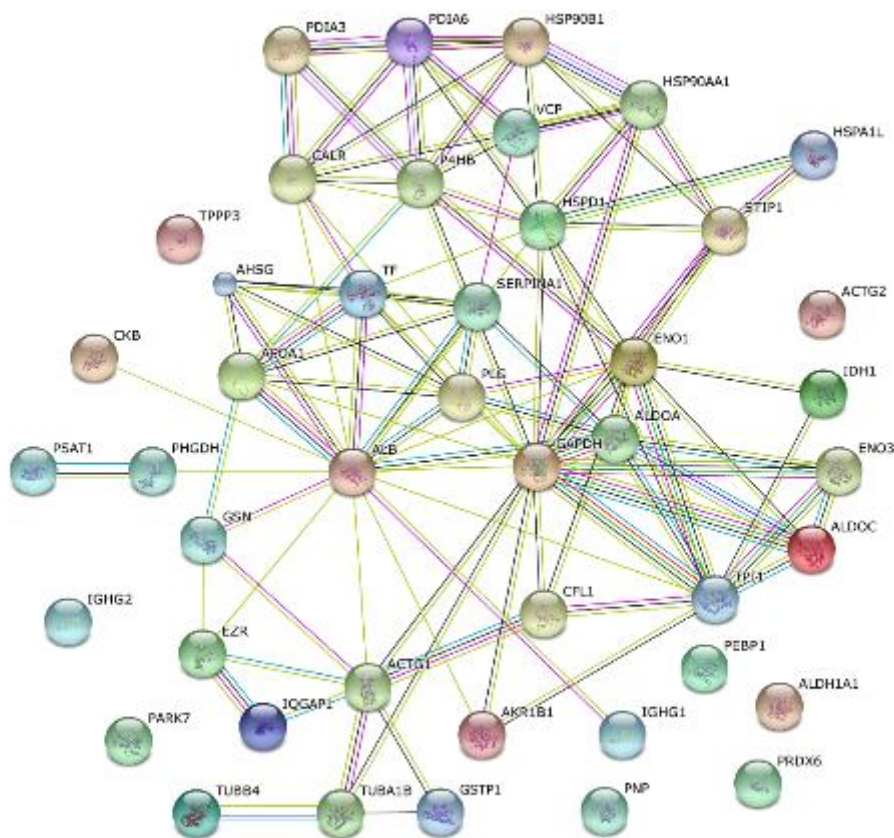


Figura 66 Red de interacción por evidencia de las 44 proteínas de FUB. Elaborado con la herramienta bioinformática STRING 9.1 (Franceschini et al., 2013).

## 5.1.1.2.3.- Western-blot

En este apartado se muestran los resultados de Western-blot, que fueron realizados para confirmar algunas proteínas encontradas como diferencialmente expresadas en el fluido oviductal y uterino. Las proteínas seleccionadas fueron la OVGP1, ANXA1 con alta expresión en el oviducto y la AKR1B1 como mayormente expresada en el fluido uterino.

Para la Inmunodetección de la OVGP1 se muestra una banda de aproximadamente 80 kDa en el fluido oviductal, en contraste en el fluido uterino se aprecia una banda sumamente débil de 80 kDa (Fig. 67a). Para la proteína ANXA1 los resultados fueron de una banda de 37 kDa en el fluido oviductal y la ausencia de esta banda en el fluido uterino (Fig. 67b). En contraste la proteína AKR1B1 mostró una banda muy evidente y abundante en el fluido uterino y la ausencia de ella en la muestra de fluido oviductal (Fig. 67c).

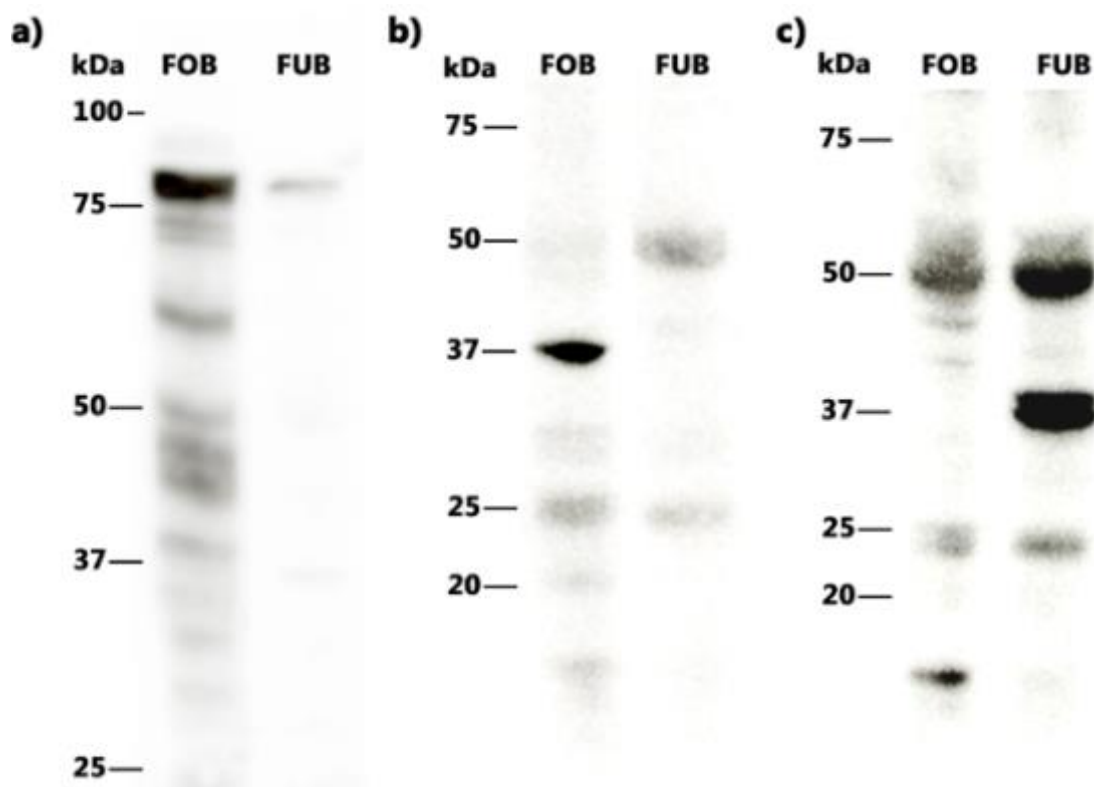


Figura 67 Inmunodetección por Western-blot en membrana en FOB y FUB con anticuerpo anti-OVGP1. Se observa detección positiva en una banda de 80 kDa aproximadamente en FOB (a). Inmunodetección en FOB y FUB con anticuerpo anti-ANXA1, se observa detección positiva en una banda de 37 kDa aproximadamente en FOB (b). Inmunodetección en FOB y FUB con anticuerpo anti-AKR1B1, se observa detección positiva en una banda de 37 kDa aproximadamente en FOB (c).

## 5.2.- SPAM1

### 5.2.1.- Análisis molecular

#### 5.2.1.1- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los resultados obtenidos de las amplificaciones por PCR con ADNc de oviducto bovino, dieron como resultado amplicones que se correspondían con la secuencia de SPAM1 bovina. Adicionalmente a los amplicones de bovino se utilizaron cebadores y ADNc de diferentes especies de mamíferos, incluido los de humano, que dio como resultado la amplificación de productos en las diferentes especies bajo estudio (mujer, yegua, vaca y cerda) (Fig. 68). Los productos obtenidos fueron secuenciados automáticamente en el servicio central de esta universidad. Las secuencias se correspondieron con las publicadas en la base de datos de GenBank para las diferentes especies.

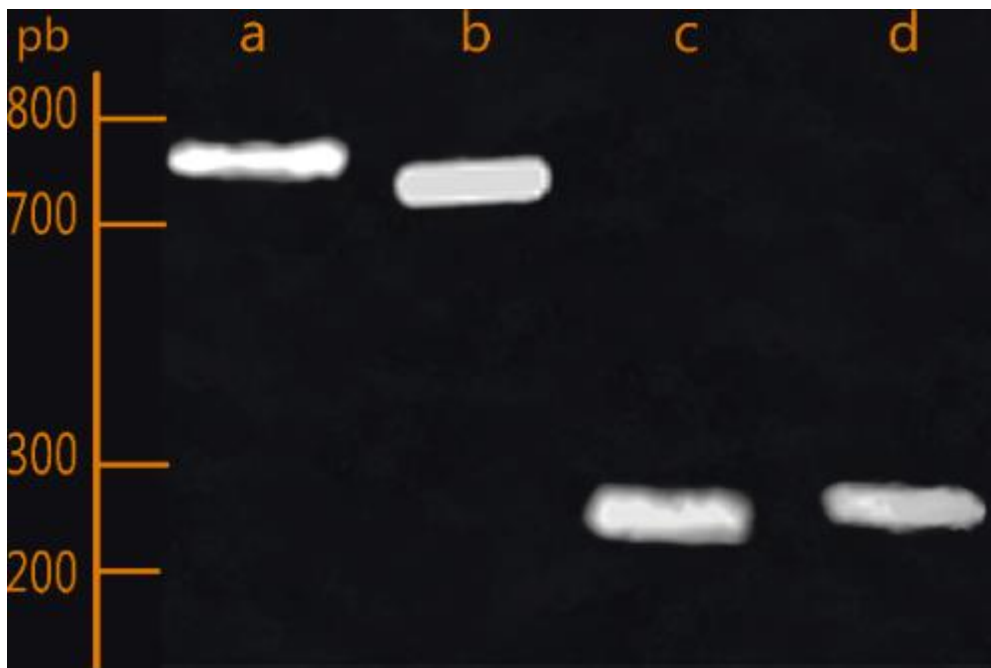


Figura 68 Expresión por PCR de SPAM1 en oviducto de diferentes especies de mamíferos. Mujer (a), yegua (b), vaca (c) y cerda (d).

## 5.2.2.- Análisis Bioquímico

### 5.2.2.1.- Western-blot

Los resultados obtenidos nos muestran claramente dos patrones de expresión en los diferentes FOBs. El primero es donde el anticuerpo monoclonal anti-SPAM1 muestra especificidad por 3 bandas, una de 80 kDa que coincide con el control positivo y otra banda doble de entre 55 y 60 kDa (Fig. 69 b y d). El otro patrón es el que sólo muestra la banda doble de 55 y 60 kDa (Fig. 69 c, e y f). Sin embargo, en el lisado de células epiteliales del oviducto de vaca, el anticuerpo mostró especificidad por la banda de 55 kDa (Fig. 69g).

Como control positivo se utilizaron los espermatozoides bovinos. El anticuerpo monoclonal anti-SPAM1 reconoció específicamente una banda de aproximadamente 80 kDa (Fig. 69a), que concuerda con los resultados descritos previamente en la bibliografía (Morin et al., 2010, Lalancette et al., 2001).

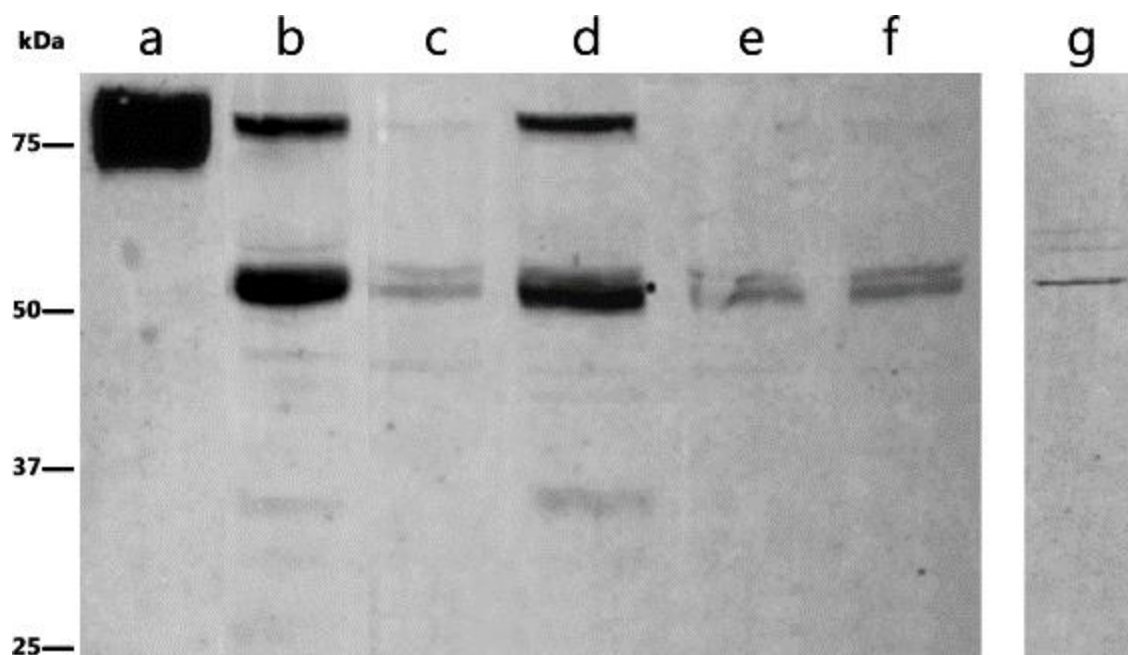


Figura 69 Inmunodetección por Western-blot de SPAM1 en espermatozoides y FOBs bovinos. Proteína obtenida de  $1 (x10^6)$  espermatozoides bovinos (a).  $10 \mu\text{g}$  de diferentes pools de FOB's en fase preovulatoria (b-f).  $10 \mu\text{g}$  de proteína obtenida a partir de lisado de células epiteliales de oviducto de vaca (g). (Anticuerpo anti-SPAM1 bovino a una concentración 1:100).

### 5.2.2.2- Inmunoprecipitación

Debido a la gran cantidad de proteínas contenidas en el FOB, se optó por inmunoprecipitar SPAM1 contenida en el FOB para su posterior identificación por espectrofotometría de masas (MS). Como se describió en los materiales y métodos se utilizaron dos protocolos de inmunoprecipitación con perlas magnéticas. El protocolo de crosslink y el protocolo clásico.

#### 5.2.2.2.- Tinción de coomassie

La inmunoprecipitación de SPAM1 con el protocolo crosslink y posterior a la electroforesis y tinción con coomassie, nos dio como resultado una única banda de aproximadamente 50 kDa (Fig. 70b). En cambio el protocolo clásico se observaron bandas de 60, 50 y 25 kDa aproximadamente (Fig. 70c) aunque la de mayor intensidad fue la de 50 kDa. Estas bandas fueron recortadas e identificadas como SPAM1 bovina por MS. Otra información relevante que aportó este resultado, fue que el anticuerpo anti-SPAM1 no reconoció la forma nativa de la proteína en la banda de 70 y 80 kDa (anteriormente publicada Morin et al., 2010) ya que esta no fue inmunoprecipitada.

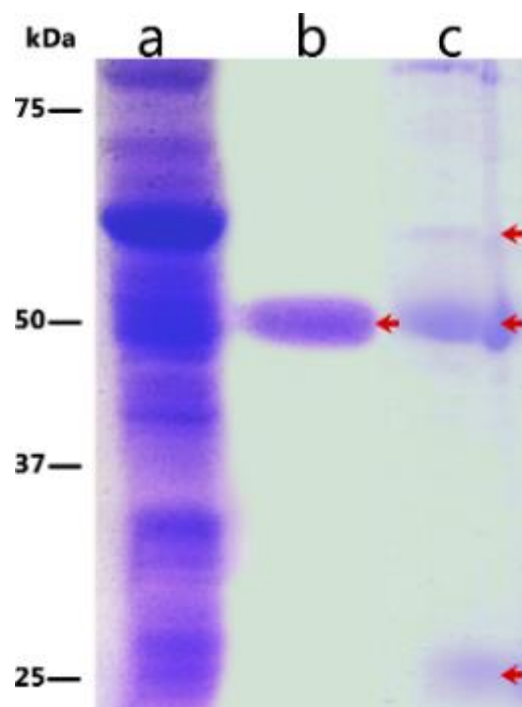


Figura 70 Gel SDS-PAGE de inmunoprecipitación de SPAM1. Resolución de 10  $\mu$ g aprox. de FOB (a), inmunoprecipitación con el protocolo de crosslink (b) y clásico (c) Teñido con azul de coomassie.

### 5.2.2.2.- Western-blot

Al hacer la inmunodetección en membrana con el anticuerpo monoclonal anti-SPAM1 bovino, se observaron patrones diferentes de inmunoprecipitación dependiendo del protocolo utilizado. En la inmunoprecipitación mediante el protocolo de *crosslink* se observa una banda única de entre 55 y 60 kDa, sin embargo, con el protocolo clásico se observaron bandas mayoritarias de 80, 60 y 25 kDa (Fig. 71).

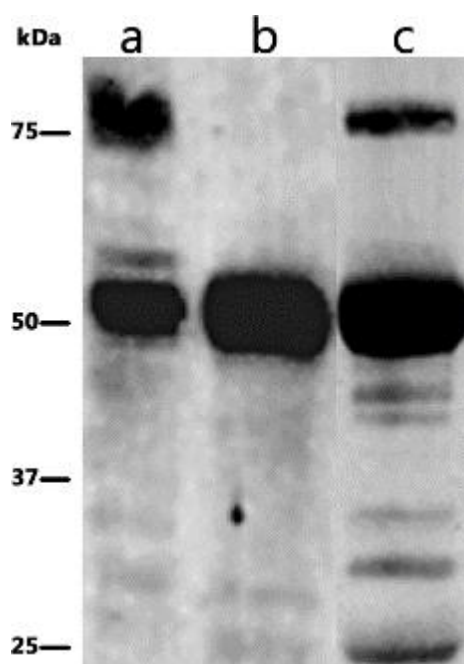


Figura 71 Inmunodetección por Western-blot de SPAM1 de proteína inmunoprecipitada de FOB. Control de FOB total 10 µg (a). Proteína Inmunoprecipitada de FOB mediante protocolo *crosslink* (b). Proteína Inmunoprecipitada de FOB mediante protocolo clásico de inmunoprecipitación (c).

## 5.2.3.- Análisis proteómico

### 5.2.3.1.- Análisis proteómico

Los resultados obtenidos después de recortar las diferentes bandas de los gels de coomassie (flechas rojas, figura 70) y su posterior secuenciación por MS/MS nos dieron como resultado hasta 13 diferentes péptidos. En las bandas que se encontraron secuencias correspondientes a la secuencia publicada de SPAM1 en la especie bovina (GenBank AAI10184) fueron principalmente las de 50 y 75 kDa.

Adicionalmente también fueron identificados péptidos de SPAM1 en las bandas de 60, 35 y 25 kDa (Tabla 27).

Tabla 26 Secuencias de péptidos identificados de SPAM1 bovino inmunoprecipitado del FOB.

Detectado en (kDa)	Secuencias	Score	SPI%
50 y 75	(K)SFMQEtLKLGLLRPNHLWGYLFPDCYNHNNHQPTYNGNCPDVEK(R)	32.96	89.87
35, 50 y 75	(K)VRCSEVIPNVTQkAcQSVK(L)	17.54	67.98
35 y 75	(K)ACQSVKLNISYQSPIQNIKNQTTY(-)	13.20	69.67
25	(K)HSPECLKVRCSEVIPNVTQKACQsVKLNISYQSPIQNIK(N)	13.06	63.60
50 y 75	(K)kRVDIk(N)	11.24	50.93
35 y	(R)cSEVIPNVTQKAcQSVK(L)	9.68	81.45
25 y 50	(K)RRNDDEWLWkEsTALFPSVYLNIRLSTQNAALYVR(N)	9.31	60.75
35 y 50	(R)LGYYPHIDEktGK(T)	7.88	72.65
75	(K)VDFETAGKSFmQETLKLgk(L)	4.26	53.50
25	(K)NPQLSFPEASKIAKVDFETAGKSFmQEtLK(L)	4.07	62.10
60	(K)VRCSEVIPNVTQKACQSVK(L)	4.00	59.60
25	(R)kHWNSSDYLHLNPMNFAIQTGEGGkyTVPGLTLLEDLQK(F)	3.09	57.40
50	(K)DVYRDESVELVLQKNPQLSFPEASK(I)	3.04	60.60

Adicionalmente se obtuvieron resultados positivos de la identificación por MS/MS de exosomas aislados de fluido oviductal. De estos se identificaron hasta 12 péptidos diferentes con un score >7 y un SPI > 70 (Tabla 28).

Tabla 27 Secuencias de péptidos identificados de SPAM1 a partir de exosomas aislados de FOB.

Secuencias	Score	SPI%
(S)LGASGIIMWGSNLNLSMQSCmNLGTyLNT(T)	11.14	76.9
(T)YLSQGLVNSVGEIVSLGAsGIIMWGsLN(L)	10.65	77.3
(S)MQSCmNLGTyLNTTLNPyII(N)	9.49	81.8
(S)GIImWGSNLNLSmMQSCMNLGTyLNTTLNPyIIN(V)	8.4	96
(V)cmaEDICIDSPVKLQPSDHsSQEASTTFFSS(I)	8.37	73.9
(T)TLNPyIINVTLaAKmCSQVLCHNEGVcTRkHWNS(D)	8.22	72.7
(L)NPyIINVTLaAKmCsQVLCHNEGVCTRk(H)	8.16	71.8
(I)IMWGSNLNLSmQSCMNLGt(Y)	8.14	90.4
(L)VNSVGEIVSLGASGIIMWGSNLNLSMQsCMNL(G)	7.53	70.2
(E)VIPNVtQKACQSVKLNIsYQSPIQNIKNQTTY(-)	7.5	77.9
(I)DWENWRPTWARNWkPKDVyRD(E)	7.43	77.2
(Q)sCmNLGTyLNTT(L)	7.12	89.1



## 5.2.4.- Análisis Histoquímico

### 5.2.4.1.- Microscopia Óptica (MO)

Los resultados inmunohistoquímicos para la detección de SPAM1 en el oviducto de la especie bovina nos mostraron presencia de la proteína en el epitelio oviductal del istmo. La presencia de SPAM1 se localizó en el citoplasma de las células epiteliales, en la región apical. En los resultados obtenidos no se pudo apreciar una expresión diferencial entre células secretoras y ciliadas del epitelio oviductal (Fig. 72).

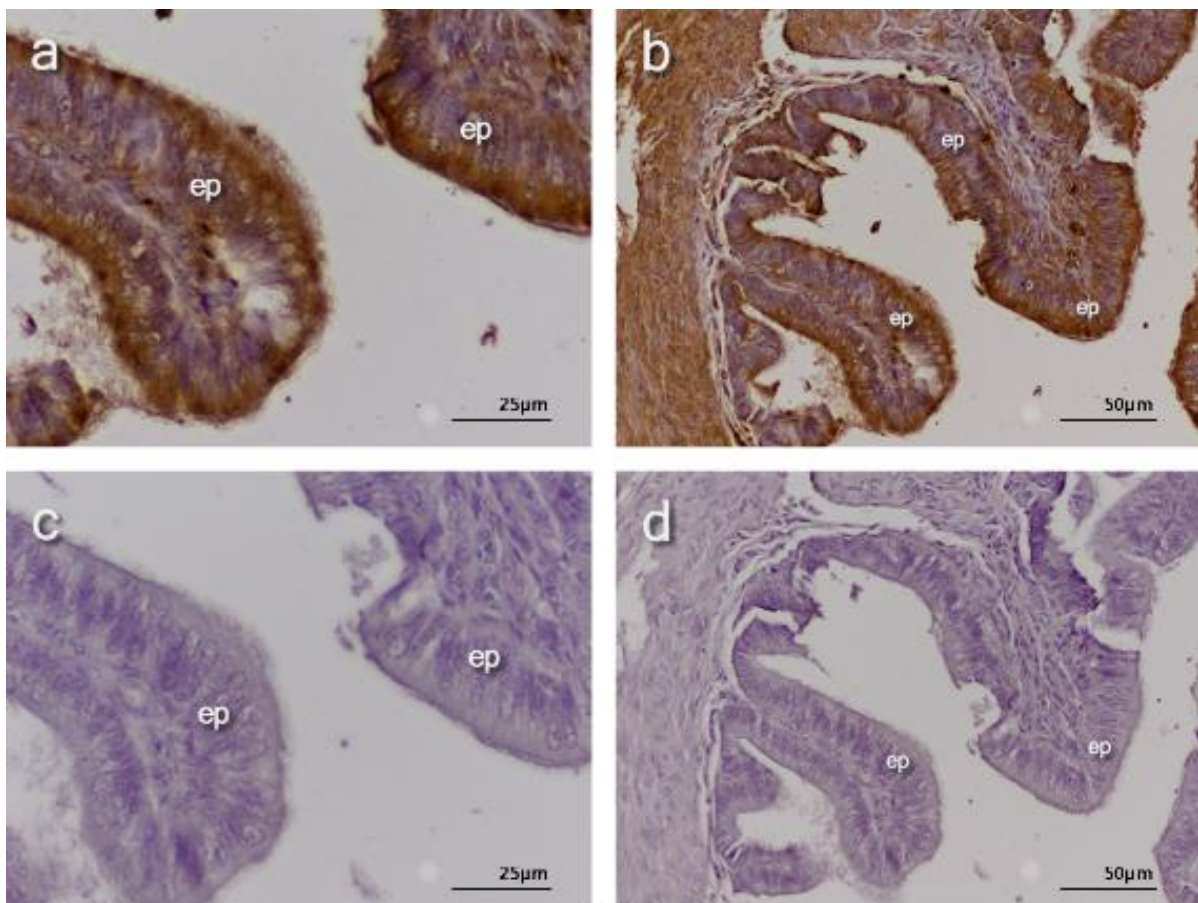
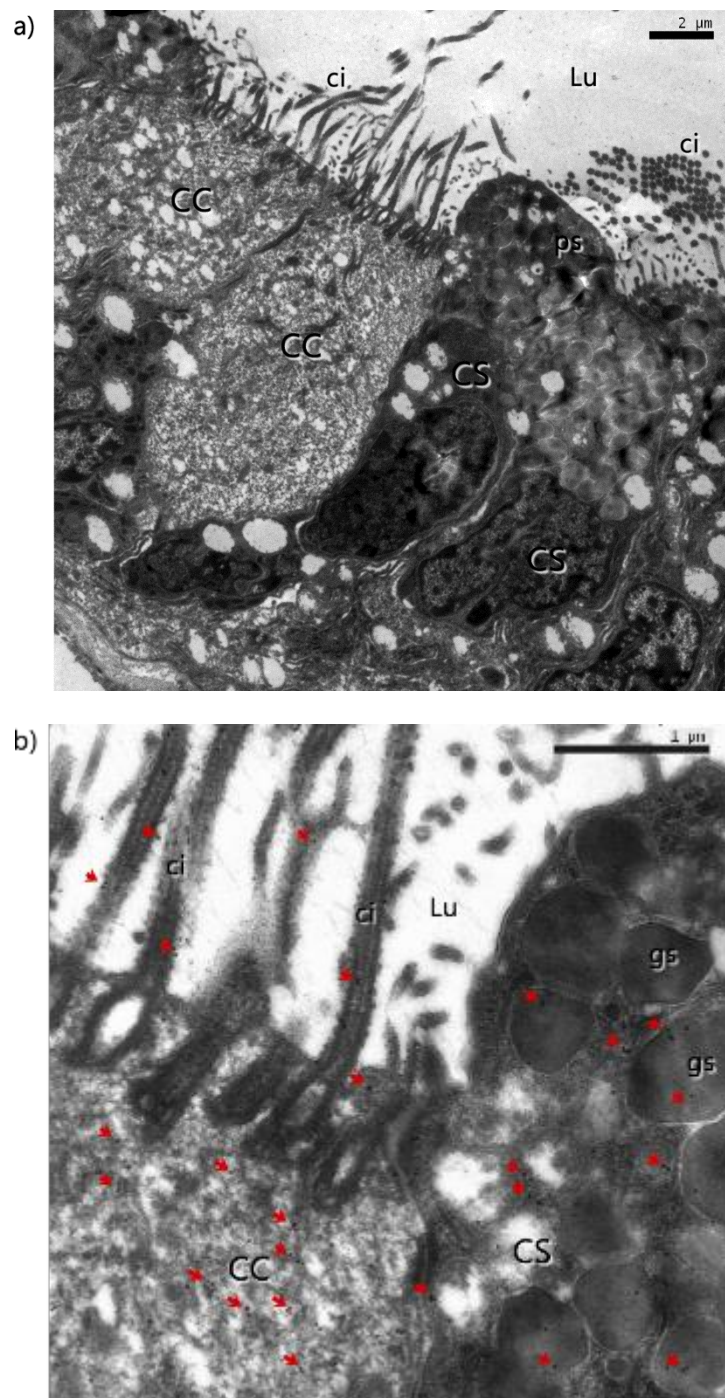


Figura 72 Inmunodetección con anti SPAM1 bovino (1:100) en corte histológico de istmo oviductal de vaca, visto al microscopio óptico, revelado con DAB (a y b). Control de técnica incubación sin anticuerpo primario (c y d).

#### 5.2.4.2.- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Mediante microscopía electrónica pudimos observar un débil inmunomarcaje en el citoplasma de las células ciliadas y células secretoras. Este marcaje no se asoció a ninguna estructura citoplasmática. No se observa un marcaje específico de los gránulos secretores de células secretoras. Se observa un escaso marcaje a nivel de la membrana plasmática de los cilios así como en el lumen del oviducto (Fig. 73).



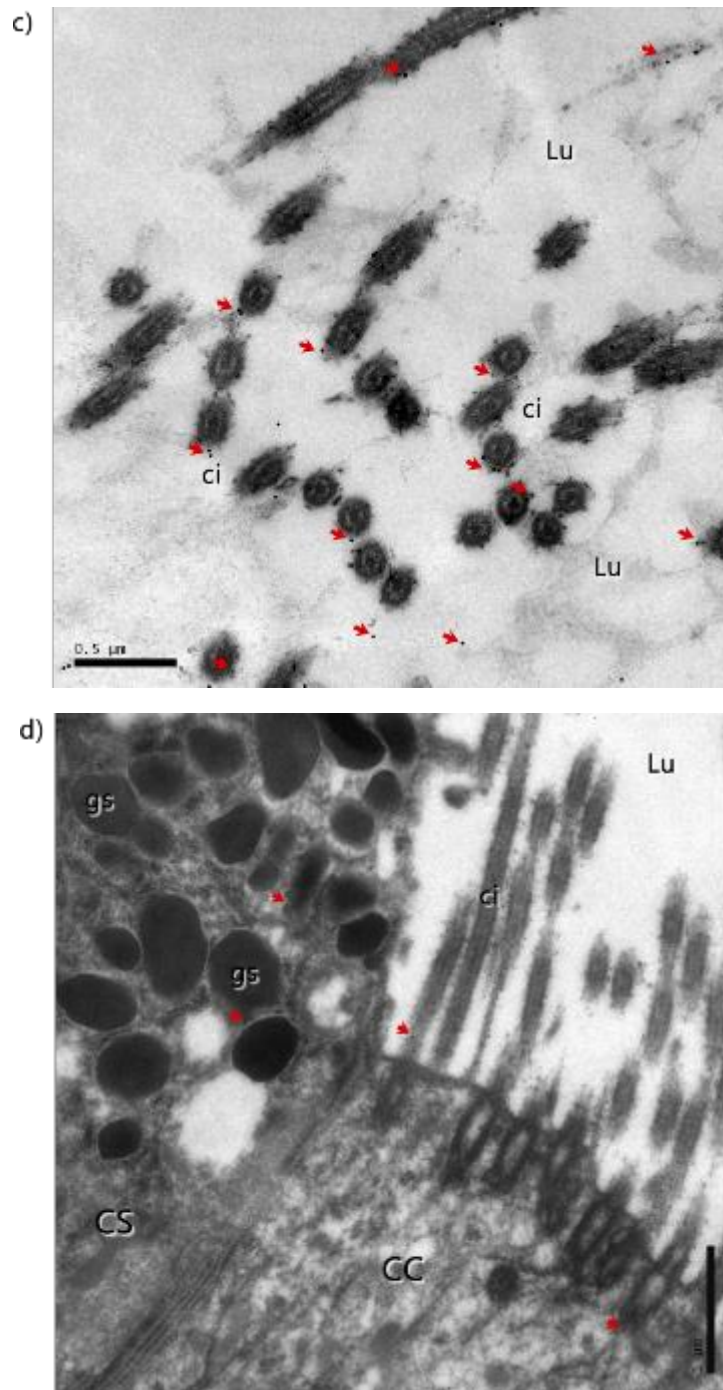


Figura 73 TEM de inmunocitoquímica ultraestructural de oviducto bovino con anti-SPAM1. Apariencia general del epitelio de la ampolla oviductal (6000x), se muestran las células ciliadas (CC), células secretoras (CS) y el lumen (Lu) del oviducto bovino (a). Muestras incubadas con anticuerpo monoclonal anti-SPAM1. Se observa marcaje (flechas rojas) en CC en citoplasma y membrana de los cilios (ci), además se marca las CS en citoplasma, polo secretor (ps), sin ser exclusivo el marcaje en gránulos secretores (gs) (20000x) (b). Se observa la membrana de los Ci marcados con partículas de oro (señalados flechas rojas), así como en la luz del órgano (c). Control de la técnica de inmunoprecipitación sin anti-SPAM1. Se observan CC y CS se muestran algunas partículas de oro localizadas de forma aleatoria (d).

Se utilizó un anticuerpo anti-OVGP, que es la proteína más abundante secretada por el oviducto. Se observa un marcaje intenso y específico a nivel de los gránulos secretores presentes en las células secretoras. No se observa marcaje en las células ciliadas. Se detecta un marcaje escaso a nivel del lumen oviductal (Fig. 74).

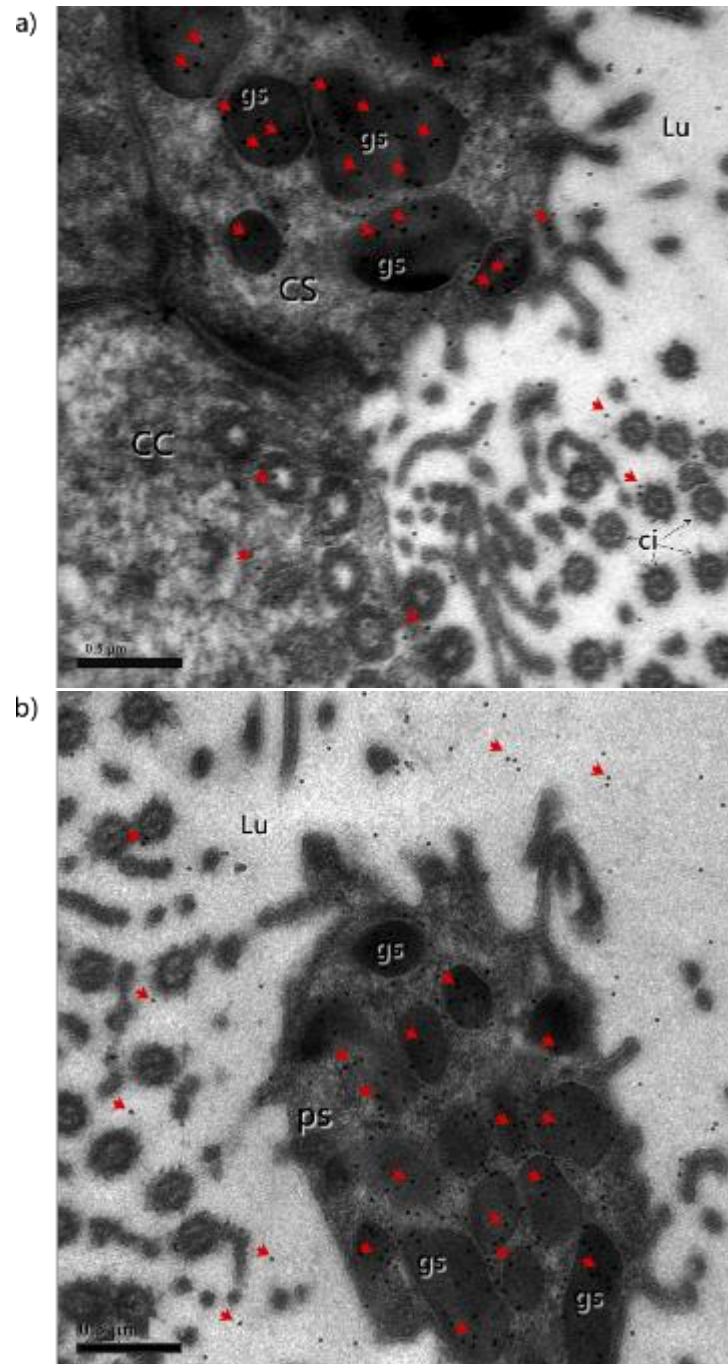


Figura 74 TEM de inmunocitoquímica ultraestructural de oviducto bovino con anti-OVGP1. Se observan células epiteliales de la región de la ampolla del oviducto (40000x), se muestran las células ciliadas (CC), células secretoras (CS), el lumen (Lu) y cilios (ci). Muestras incubadas con anticuerpo monoclonal anti-OVGP1. Se observa marcaje (flechas rojas) en CS en los granulos de secreción (gr) y lumen del oviducto (a). Se observa el polo secretor (ps) de un CS en corte trasversal (40000x), se observa marcaje localizado en gr y lumen del oviducto (b)

### 5.2.5- Unión de SPAM1 oviductal a la ZP de ovocitos bovino

Una vez que los ovocitos bovinos fueron incubados con la proteína SPAM1 inmunoprecipitada de FOB, fueron fijados y observados al microscopio confocal. Se observó inmunomarcaje positivo en la ZP de los ovocito y en el espacio perivitelino (Fig. 75d).

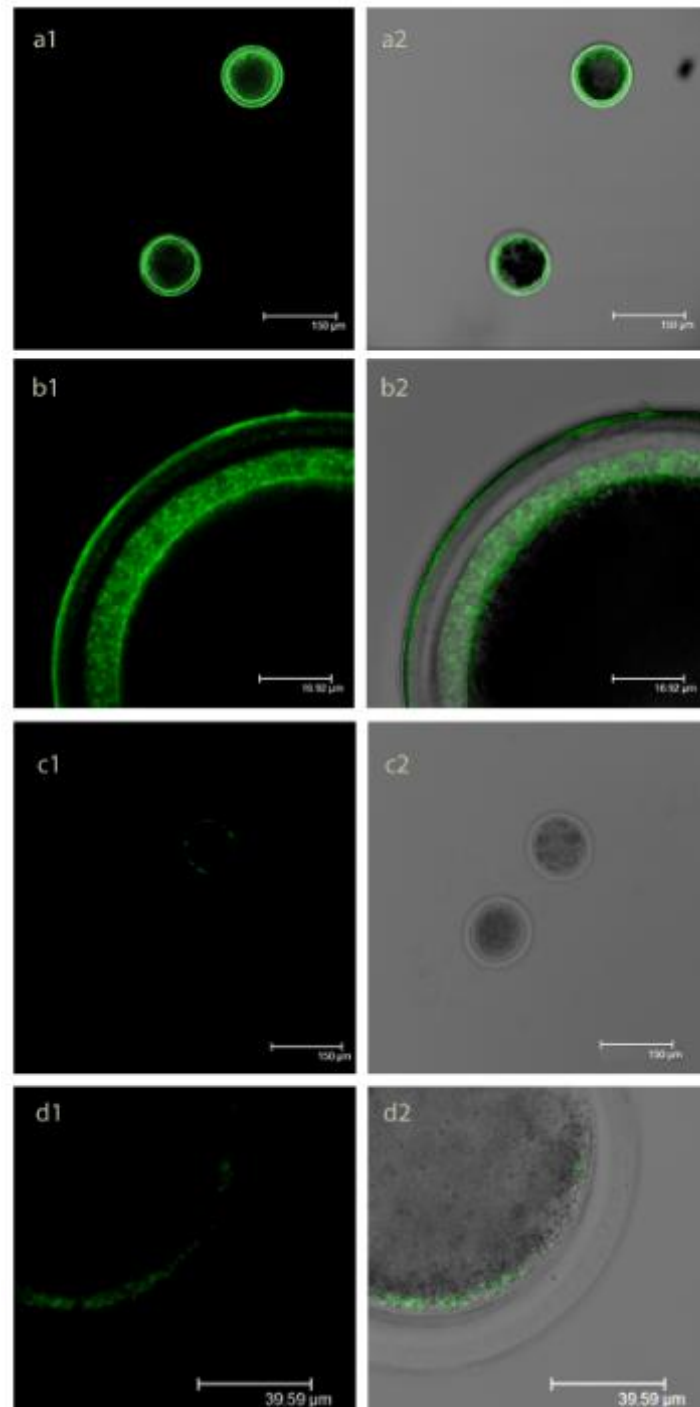


Figura 75 Inmunodetección con anti SPAM1 en ovocitos de vaca, observación microscópica confocal. Los ovocitos se incubaron con SPAM1 aislada de FOB, imagen de fluorescencia (a1 y b1) y la imagen de interpolación (a2 y b2) se observa fluorescencia en ZP y en el espacio perivitelino. Los ovocitos control (c1, c2, d1 y d2) no fueron incubados con la proteína SPAM1.

# 6 DISCUSIÓN

## 6 DISCUSIÓN



El epitelio del oviducto es importante para diferentes procesos reproductivos y se ha observado que este sufre cambios morfológicos y funcionales durante el ciclo estral. En la especie bovina se ha demostrado que la población de células epiteliales sufren modificaciones que dependen de las diferentes fases del ciclo estral. Así, en el estro el epitelio se compone principalmente de células secretoras y en el diestro de células ciliadas (Yaniz et al., 2000), siendo dichos cambios más evidentes en la ampolla.

En el endometrio los cambios en la células epiteliales, son inducidos principalmente por el influjo de la progesterona (P4), los estrógenos y la oxitocina en las diferentes fase del ciclo estral (Spencer et al., 2004). Estos datos fueron corroborados en vacas ovariectomizadas y después tratadas con P4 y estradiol (Shimizu et al., 2010). En el preestro y el estro, los niveles de P4 son más bajos y el folículo dominante produce grandes cantidades de estrógenos que conduce a la proliferación celular y al aumento de la síntesis de ARN ribosomal y de ADN (Jackson y Chalkley 1974). Este fenómeno fue observado en el endometrio de la vaca donde se observó una expresión de hasta dos veces más en el estro respecto al diestro (Bauersachs et al., 2005).

La respuesta a estos estímulos hormonales se ve reflejada en los cambios del transcriptoma en ambos órganos. Esto ha sido demostrado en diferentes trabajos de estudios comparativos de la expresión génica entre las diferentes fases del ciclo estral en el oviducto (Bauersachs et al., 2003) y endometrio de la vaca (Mitko et al., 2008). Sin embargo, nuestros resultados no pueden ser comparados del todo con estos estudios, ya que, estos fueron realizados con una plataforma de micromatrices diseñada por el propio laboratorio (Bauersachs et al., 2003; Bauersachs et al., 2007). Esta plataforma sólo cuenta con 1440 sondas de ADNc, que representan 950 genes diferentes.

Otras investigaciones publicadas por nuestro laboratorio (Mondejar et al., 2012) se encargaron del análisis *in silico* de datos



publicados en la trompa de Falopio humana en la fase folicular (Tone et al., 2008). Los resultados de este estudio *in silico* demostraron que hasta 5703 genes son expresados en la fase estudiada. Nuestros resultados en la especie bovina indicaron que hasta 2707 genes diferentes (datos normalizados,  $\log_2 \leq -0,11$ ) fueron detectados en el oviducto bovino. Esta diferencia en el número de genes expresados es debido a la falta de anotación de los genes en la especie bovina. Sin embargo, al comparar estos datos se encontró que hasta 664 fueron comunes entre los genes de la especie humana y los de nuestro estudio en el oviducto bovino. Estos datos son muy similares a los publicados anteriormente (Mondejar et al., 2012), donde 636 genes fueron comunes entre los datos de la trompa de Falopio humana (Tone et al., 2008) y los del oviducto de la vaca (Bauersachs et al., 2004).

## 6.1.- EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE EL OVIDUCTO Y EL ENDOMETRIO DE LA VACA

En este apartado cabe destacar que el transcrito con mayor expresión diferencial entre el oviducto y endometrio fue OVGP1, tres sondas que pertenecen a este gen fueron las mayormente expresadas por el oviducto. A nivel molecular este es uno de los pocos genes o proteínas que se conoce que tiene un cambio en su expresión durante las diferentes fases del ciclo estral. Esto fue demostrado emulando las condiciones del ciclo estral *in vitro* en cultivos celulares de células epiteliales en la especie bovina (Sun et al., 1997) y porcina (Novak et al., 2002, Chen et al., 2013), revisado por Buhi en 2002.

Nuestros datos demuestran una alta expresión de ARNm del gen OVGP1 en la fase periovulatoria coincidiendo con los datos anteriormente publicados en la vaca (Bauersachs et al., 2004), donde se observó que la hibridación con sondas de ADNc para el ARNm bovino del gen OVGP1 expresa niveles muy altos, especialmente en el estro. En el estro, la concentración de ARNm fue de 371 pg/ $\mu$ g de ARN total,

mientras que, en el diestro la concentración sólo fue de 70 pg/ $\mu$ g de ARN total (Bauersachs et al., 2004). También se describió la expresión de este transcrito, que fue ligeramente mayor en el epitelio del oviducto contralateral bovino, en comparación con el oviducto ipsilateral (Bauersachs et al., 2003).

Se ha descrito que esta proteína influye en la capacitación, motilidad espermática y la interacción entre gametos en la fecundación, revisado por Buhi 2002. Sin embargo, la mutación de este gen en ratones knockout, no mostró variaciones en los índices de fertilidad (Araki et al., 2003), lo que indica que OVGP1 no es esencial para la fecundación en algunas especies.

Otro transcrito altamente expresado por el oviducto (12 sondas), y dentro de los que tienen los mayores datos de expresión diferencial entre el oviducto y el endometrio, fue el factor de complemento H (CFH).

Este gen se ha descrito previamente que se expresa en las células epiteliales de las vesículas seminales del cerdo (Sakaue et al., 2010). Estos autores demostraron que el CFH está presente en la membrana de los espermatozoides eyaculados, que es capaz de inhibir directamente la activación del complemento. Esto se demostró cuando se midió la actividad del complemento en diferentes fluidos reproductivos masculinos y femeninos, se mostró que la actividad del complemento fue hasta 6.1 veces mayor en los fluidos femeninos (vagina, útero y cuerno uterino), comparado con los fluidos del tracto reproductor masculino (fluido epididimario de cabeza, cuerpo y cola; fluido seminal) (Sakaue et al., 2010). Estos hallazgos indican que CFH se une a la región acrosomal externa y CFH soluble en los fluidos reproductivos juegan un papel importante en la protección de los espermatozoides contra el ataque del complemento en los tractos genitales masculinos y femeninos, función que podría ejercer en el oviducto.

Por otro lado, los transcritos de genes con mayor expresión en el endometrio bovino en nuestro estudio fueron un grupo perteneciente

a la familia de los colágenos (COL3A1, COL1A1, COL1A2, COL6A1, COL4A1). Estos colágenos en nuestro trabajo se clasificaron como secretados únicos en el endometrio. Por lo menos cuatro de estos colágenos fueron anteriormente descritos en el endometrio bovino en la fase de estro (Mitko et al., 2008). Se observó que estos genes, una vez clasificados por funcionalidad participan en la adhesión focal de las células y la remodelación de la matriz extracelular (EMC). La ECM juega un papel importante en algunos procesos celulares, tales como migración, adhesión, proliferación y diferenciación; así en el endometrio actúa como la base para la generación del tejido endometrial (Harrington et al., 1999, Yamada et al., 2002). Por lo tanto, la expresión de estos genes sugieren una remodelación de la ECM en el endometrio bovino (Yamada et al., 2002).

### 6.1.1.- Agrupamiento de las sondas detectadas por el análisis de micromatrices según su perfil expresión

#### 6.1.1.1.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA1)

El primer grupo incluye hasta 1523 transcritos diferentes, este grupo se caracteriza por tener un aumento de expresión en los tejidos oviductales y una menor expresión en el endometrio. Después de la clasificación por funcionalidad, los resultados del análisis mostraron que 221 genes tenían una actividad catalítica. Dentro de este grupo de transcritos que codifican a enzimas pudimos identificar la heparanasa (HPSE), glutatión peroxidasa 2 (GPX2) y la serina quinasa específica de testículo 3 (TSSK3).

Existen evidencias de que el glicosaminoglicano heparina presente en el fluido oviductal estaría implicado en cambios de la ZP previos a la fecundación. Estos cambios contribuyen a la regulación de la poliespermia (Coy et al., 2008). Así, la enzima HPSE podría estar implicada en la regulación de la presencia de la heparina en el fluido oviductal. La HPSE es la principal endoglicosidasa que degrada en heparán sulfato en la especie porcina (Rempel et al., 2011). Así participa

en la remodelación y degradación de la matriz extracelular y en la remodelación de la membrana basal de las estructuras del ovario (Haimov-Kochman et al., 2005).

La enzima GPX2 pertenece a una familia (GPX) cuya principal función es proteger el organismo del daño oxidativo. Hasta el momento sólo GPX5 se había descrito como una enzima de interés reproductivo, habiéndose descrito en el epidídimo de diferentes especies de mamíferos (Drevet 2006). La enzima GPX5 se relaciona con la protección de los espermatozoides durante el tránsito y el almacenamiento en el epidídimo. La enzima GPX5 es secretada por el epidídimo y se encuentra asociada a la membrana plasmática del espermatozoide, esta transferencia desde el epidídimo de rata ocurre a través de epididimosomas (Taylor et al., 2013). Este mismo estudio demostró que GPX5 protege las células CHO-K1 (in vitro) de la peroxidación lipídica. La detección de la expresión de ARNm de GPX2 en el oviducto concuerda a lo encontrado en el oviducto de cerda en la fase postovulatoria (Izquierdo Rico MJ, comunicación personal). La presencia de esta proteína en el oviducto sugiere su participación en la protección de los gametos frente al daño oxidativo durante su tránsito en el oviducto y que la familia de estas proteínas puede ser transferida mediante exosomas a la membrana espermática.

La TSSK3 fue descrita en el testículo de ratón y humano (Visconti et al., 2001). Los miembros de esta familia desempeñan papeles importantes en la espermatogénesis y la espermiogénesis (Wei et al., 2013). Sin embargo, no hay ninguna referencia que sea de nuestro conocimiento, que haya detectado una funcionalidad en el tracto femenino. Se requiere del estudio más a fondo para determinar el papel que desempeña esta proteína en el tracto femenino.

#### *6.1.1.2.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA2)*

En la clasificación SOTA2 se identificaron hasta 1079 transcritos, los cuales se caracterizaron por tener una expresión menor en el tejido oviductal y una sobre expresión en el endometrio. Dentro de este grupo

se encontraron algunos colágenos, que como se mencionó con anterioridad participan en la remodelación del ECM en el endometrio. Tras su clasificación por función molecular, el mayor grupo fue los que se involucran en la unión, hasta 245 genes fueron clasificados que sintetizan proteínas de unión.

Una de las proteínas que se encuentra en esta agrupación es la proteína de unión a la acrosina (ACRBP o sp32). Se sabe que esta proteína de la matriz acrosomal junto con proacrosina actuaría como el sustrato fisiológicamente relevante para la liberación acrosina (Baba et al. 1994). En el cerdo, se observó que los espermatozoides capacitados tienen esta proteína fosforilada en sus aminoácidos tirosina (Dube et al. 2005). Esto también fue observado en el humano (Ficarro et al. 2003). En el cerdo, los espermatozoides después del tratamiento con ionóforo para inducir la reacción acrosómica, perdieron la proteína ACRBP. En los espermatozoides del cerdo se encontró que esta proteína estaba mayormente expresada después de la capacitación (Kwon et al. 2014).

En esta misma especie, se demostró recientemente que junto con la proteína trifosfato isomerasa (TPI) se describen como los dos más importantes marcadores de congelabilidad de los espermatozoides del porcino (Vilagran et al. 2013). En este estudio ACRBP es más abundante en los espermatozoides con mejores índices de congelabilidad. Esta característica puede estar relacionada a la regulación de la reacción acrosómica y en conjunto con la participación que tiene en la maduración de la acrosina. La hipótesis de estos investigadores sugieren que esta proteína regula la capacitación prematura y una excitosis acrosomal degenerativa (Vilagran et al. 2013). La posible función que podría ejercer esta proteína en el útero sería el de la regulación de la reacción acrosómica, ya que participa en la maduración de la acrosina.

Dada la expresión de este gen tanto en el oviducto como en el útero y su implicación en la liberación de la acrosina tras la RA, esta proteína podría estar implicada en favorecer la RA a nivel del oviducto

en la proximidad del gameto femenino. Sin embargo, desconocemos el posible papel biológico a nivel del útero. Estudios previos han demostrado que el espermatozoide reaccionado es capaz de atravesar el cúmulo ovífero, la ZP y fecundar el ovocito. Este proceso podría ser facilitado a nivel del oviducto. Posiblemente, esta proteína podría acelerar la muerte de los espermatozoides que hayan reaccionado prematuramente a nivel del endometrio.

Dos proteínas de la familia de las anexinas (ANXA5 y ANXA6) se identificaron en esta agrupación. Como se mencionó ya en la revisión bibliográfica, la familia de estas proteínas, participan en la unión a las proteínas BSP de los espermatozoides. Esta familia de proteínas se une a fosfolípidos y proteínas de unión a membrana en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rescher y Gerke, 2004).

El papel que podrían desempeñar en el útero estas anexinas sería probablemente, el del reclutamiento de espermatozoides en la unión útero tubárica como se ha descrito en la especie porcina (Rodríguez-Martínez et al., 1990, Lovell y Getty 1968). Algo similar a lo sucedido en el istmo oviductal (Suarez et al., 1997). Incluso podrían participar en un proceso de selección de espermatozoides viables, como anteriormente se describió en el porcino (Taylor et al., 2008). Otro estudio describió que los espermatozoides porcinos que se unían a las células epiteliales del útero mostraban una ultraestructura normal, a diferencia de los espermatozoides que no se unían y presentaban una membrana plasmática dañada (Rodríguez-Martínez et al., 1990).

La apolipoproteína AI (APOA1) también fue identificada en esta agrupación SOTA2. Anteriormente se había descrito la expresión de este gen en el útero bovino, en el estro y en novillas gestantes (día 13 a 19) que es la fase de elongación del embrión (Forde et al., 2013). La proteína APOA1 como la ACRBP también fue identificada por electroforesis en dos dimensiones como altamente (> 3 veces) expresada en espermatozoides capacitados del verraco (Kwon et al., 2014).

Se informó en el bovino que APOA1 induce la pérdida del colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides (Ehrenwald et al., 1990), esta pérdida del colesterol regula múltiples procesos como la motilidad, la hiperactivación y capacitación (Travis y Kopf 2002). También fue descrito que APOA1 esta asociada a la lipoproteína de alta densidad (HDL) que desencadena la reacción acrosómica (Therien et al., 1997). Se conoce como una proteína contenida en el plasma seminal que afecta a la unión del espermatozoide, de ovocitos y la fertilidad masculina. Estudios en el porcino demostraron que la proteína APOA1 se encontró en los espermatozoides maduros una vez que se había eliminado completamente el plasma seminal (Kwon et al., 2014). Nuestra hipótesis sugiere que la presencia de esta proteína en el tracto femenino podría estar relacionada con la regulación de la pérdida de colesterol y por tanto participar en los procesos de motilidad, hiperactivación y la capacitación espermática.

Otra proteína de interés reproductivo identificada en SOTA2 fue la enzima glutatión peroxidasa 4 (GPX4). Se ha descrito que esta proteína protege a las células de la peroxidación lipídica. Además participa en la maduración del espermatozoide humano mediante la inhibición de la lipoxigenasa (Li y Zhang 2013). Se sabe que las proteínas de esta familia (GPXs) han sido descritas en la cabeza de los espermatozoides y las mitocondrias de la cola (Puglisi et al., 2005). Al ser proteínas estructurales de los espermatozoides, explicaría que la baja expresión en humanos deriva en oligoastenozoospermia. Se observó que esta disminución en la expresión de GPX4 en los espermatozoides produce una disminución en la fertilidad del 10% (Williams y Ford 2005).

La enzima GPX4 protege a la membrana mitocondrial y mantiene la producción de ATP bajo condiciones de estrés oxidativo. El estrés oxidativo disminuye la producción de ATP y como consecuencia la disminución en la motilidad y viabilidad espermática (O'Flaherty et al.,

2006); por lo tanto, GPX4 podría estar participando de forma indirecta en mantener la motilidad del espermatozoide.

Se encontró que la GPX4 (Florian et al., 2001) y la GPX2 (Banning et al., 2008b, Banning et al., 2008a) tienen un efecto inhibitor de la ciclooxigenasa 2 (COX2). Esta enzima es la principal responsable de la producción de la prostaglandina PGE2 por el endometrio bovino a partir del ácido araquidónico. Es junto con la PGF2 $\alpha$  las prostaglandinas primarias que son producidas en el endometrio bovino, durante el ciclo estral (Arosh et al., 2002). Se observó en los espermatozoides humanos que la incubación con PGE2 con bajos niveles fisiológicos indujo un aumento en los niveles de calcio intracelulares de los espermatozoides y aumentó en el porcentaje de espermatozoides unidos a ZP (Rios et al., 2014).

Por tanto, se puede asumir que alguna de las proteínas de la familia GPXs están asociadas a diferentes procesos reproductivos y que pueden llevarse a cabo en el endometrio, de manera que mantendría la viabilidad de los espermatozoides en condiciones de estrés oxidativo y actuarían de manera indirecta regulando la producción de prostaglandinas en el endometrio bovino.

Las diferencias de expresión de los diferentes tipos de GPXs en los tejidos reproductivos; sugieren que cada una de estas enzimas, tienen una funcionalidad específica de acuerdo a su localización en los diferentes órganos reproductivos. Esta proteína y otras de la familia de las GPX han sido descritas en exosomas presentes en la orina de humano (Prunotto et al., 2013), por lo que se sugiere que pueden ser secretados por la vía de exosomas en los fluidos del tracto reproductor femenino y conferir protección ante la oxidación lipídica.

#### *6.1.1.3.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA3)*

El agrupamiento SOTA3 refleja una mayor diferencia entre la baja expresión observada en las muestras de oviducto en comparación con las de endometrio. En este grupo se identificaron 412 transcritos, una



vez hecha la clasificación por funcionalidad se obtuvieron 83 genes que sintetizan a proteínas de unión, 42 de localización y 41 de proceso de organismo multicelular. Estos grupos no se discutirán debido a lo general de su clasificación; Sin embargo, el siguiente grupo fue el de hidrolasas (38 transcritos). Este grupo se analizará con más profundidad, cabe destacar la presencia de algunas hidrolasas lisosomales como FUCA1, HYAL1, GNS y RNASE6.

La proteína alfa-L-fucosidasa tisular (FUCA1) permite la liberación de los residuos fucosa unidos a la cadena oligosacáridica. Se ha descrito que la deficiencia de esta enzima en el humano produce la acumulación de glicoconjugados que contienen fucosa, que conducen a la acumulación de estos en diversos tejidos llevando a la denominada fucosidosis (Willems et al., 1999).

Desde el punto de vista reproductivo este gen se ha descrito anteriormente por nuestro laboratorio en el testículo y oviducto de la especie porcina (Genbank: JF932294.2); así, como en los espermatozoides en esta misma especie (De Ondiz 2011) y en la rata (Abascal et al., 1998, Avilés et al., 1996). En trabajos realizados en cerdo (*in vitro*) se pudo observar que los residuos de alfa-L-fucosidasa de la ZP y espermatozoides interactúan. Se ha propuesto que FUCA1 de los espermatozoides tiene una actividad hidrolítica durante la penetración de la ZP en la fecundación (Song et al., 2007). Recientemente se observó en los espermatozoides del cerdo *in vitro* que alfa-L-fucosidasa puede actuar sobre los espermatozoides mediando los eventos asociados a la capacitación y así aumentar su capacidad para penetrar la ZP (Romero-AguirreGómezcorta et al., 2015). En este mismo trabajo, se observaron aumentos significativos en la fosforilación, en el segmento ecuatorial y en la cabeza del espermatozoide porcino después del tratamiento con alfa-L-fucosidasa. Este patrón se había observado con anterioridad en los espermatozoides capacitados en la especie bovina (Gualtieri et al. 2005).

Esta enzima también ha sido descrita en el fluido oviductal de bovino (Carrasco et al. 2008a) y porcino (Carrasco et al. 2008b). Estas investigaciones sugieren la posible actuación de la alfa-L-fucosidasa sobre los residuos de fucosa y por la liberación de los espermatozoides en el reservorio del oviducto (Hunter 2005). Algo similar podría ocurrir en el endometrio donde podría participar en la liberación de los espermatozoides de la unión útero tubárica (Rodríguez-Martínez et al., 1990, Lovell y Getty 1968, Taylor et al., 2008). Otra posible función en el útero bovino, estaría dada por su participación en la activación de la motilidad de los espermatozoides mediante la captación de bicarbonato como se describió con anterioridad (Brandt et al. 2006) y por último participar en los eventos de fosforilación y mediar en la capacitación de los espermatozoides, eventos que anteriormente se han descrito y pueden suceder en el útero (Parrish et al., 1989).

El ácido hialurónico (HA), es un componente habitual de la matriz extracelular del tejido conjuntivo. Este glicosaminoglicano es degradado por una familia de enzimas llamadas hialuronidasas (HYALs) (Raheem et al., 2013, Martín-DeLeon 2011). Se ha descrito en el ratón y en la especie humana que HYAL1, HYAL2 y HYAL3 participan en varias funciones de la reproducción femenina especialmente en la atresia folicular ovárica. Esta función también fue descrita en la especie porcina además de su participación en la apoptosis de las células de la granulosa (Orimoto et al., 2008).

Otra función reproductiva que se ha descrito a esta familia es la dispersión de las células del *cumulus oophorus*, tal es el caso de la enzima hialuronidasa Spam1 del ratón (revisado por Martín-DeLeon 2011). Previamente, se ha descrito la presencia de esta hialuronidasa en la vagina y útero de ratón (Zhang y Martín-DeLeon 2003b) y se demostró que son adquiridas por los espermatozoides en el tracto femenino. Por tanto, nuestra hipótesis es que estas proteínas serían adquiridas por los espermatozoides en el tracto femenino y

enriquecerían o podrían cubrir las posibles deficiencias de las hialuronidasas.

Otro de los transcritos agrupados en SOTA3 es el inhibidor plasmático de serín proteasas (SERPINA5 o PCI), este gen sintetiza a una proteína que pertenece a la familia de las proteínas que inactivan las serín proteasas (Uhrin et al., 2007). La proteína SERPINA5 inhibe gran cantidad de proteasas, algunas de estas que son de interés reproductivo, son la acrosina del espermatozoide (Hermans et al., 1994, Zheng et al., 1994), urokinasa (PLAU) (España et al., 1989, Geiger et al., 1989, España et al., 1993) y el activador tisular del plasminógeno (PLAT) (España et al., 1989, España et al., 1993). Este último también agrupado en esta clasificación SOTA3.

PLAU y PLAT se han descrito como proteínas contenidas en semen de ratones (Huarte et al., 1987) y de humano (Vandreden et al., 1991). La SERPINA5 en conjunto con PLAU y PLAT forma complejos. Se presume que la SERPINA5 regula la actividad proteolítica en el fluido seminal inhibiendo la actividad proteolítica de PLAT (Uhrin et al., 2007). SERPINA5 ha sido descrita en el aparato genital masculino como en los túbulos seminíferos del testículo y epidídimo (Zheng et al., 1994, Laurell et al., 1992, Uhrin et al., 2007). Se demostró que los ratones knockout homocigotos de SERPINA5 eran infértiles, presentaban espermatozoides malformados e incapaces de fecundar a los óvulos (Uhrin et al., 2000). Esto se demostró cuando se detectó la presencia de una SERPINA5 carente de función para inhibir la actividad proteasa de PLAU y PLAT (He et al., 1999) y se observó que esta falta de funcionalidad de SERPINA5 estaba asociada a la infertilidad. Sin embargo, también se descubrió que ratones nulos en PLAT y PLAU no revertían la infertilidad (Carmeliet et al., 1994).

Por lo tanto, hasta el momento se desconoce si SERPINA5 puede participar por otra vía que afecte la capacidad fecundante; independientemente de sólo el bloqueo de la actividad proteolítica de PLAT y PLAU. Además, desconocemos el efecto de la inhibición de

acrosina a nivel uterino mediado por SERPINA5. Esta inhibición podría evitar el daño producido por acrosina y otras proteasas acrosomales a nivel uterino por aquellos espermatozoides que sufren una RA espontánea y prematura (Yamagata et al. 1998).

#### *6.1.1.4.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA4)*

El cuarto agrupamiento tipo SOTA, identificó 97 transcritos diferentes. Este grupo se caracterizó por una menor expresión en los tejidos oviductales en comparación con el tejido endometrial. Una vez hecha la clasificación por funcionalidad, los grupos más numerosos fueron los genes involucrados en la regulación de procesos biológicos.

Dentro de este grupo se identificó el ARNm de BMP4. El gen BMP4 pertenece a un grupo de genes que codifican proteínas que son miembros de la súper familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF). Se ha detectado la expresión de ARNm en la teca, cuerpo lúteo, y el epitelio superficial del ovario de rata (Erickson y Shimasaki 2003). En el tracto femenino del ratón se detectó su expresión en el epitelio oviductal y uterino; sin embargo, el análisis inmunohistoquímico mostró una mayor expresión en el epitelio endometrial especialmente en la fase del estro (Tanwar y McFarlane 2011).

En la especie bovina se describió la presencia de ARNm en las células de la granulosa y células de la teca (Fatehi et al., 2005). Otra investigación sugirió que BMP4 participa activamente en el mantenimiento del endometrio (Tanwar y McFarlane 2011). En el tracto masculino BMP4 se expresa en el testículo y epidídimo de ratón. Los ratones machos BMP4 knockout mostraron una fertilidad comprometida, una disminución en el número de los espermatozoides y de su motilidad, así como una degeneración de las células epiteliales del epidídimo (Hu et al., 2004). Todo ello sugiere que la familia de BMPs y la BMP4 en particular, intervienen en algunos procesos de la reproducción masculina y femenina, Sin embargo, se requiere de investigaciones a fondo que esclarezcan su participación en la reproducción.

#### 6.1.1.5.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA5)

El penúltimo grupo de clasificación es el SOTA5 se caracteriza por tener una baja expresión en los transcritos del oviducto y una sobreexpresión muy evidente en el endometrio, este contiene 21 genes.

Dentro de este grupo se identificó el ARNm de un gen que codifica la proteína carboxipeptidasa E (CPE), es una proteína secretada que se encuentra en el plasma seminal humano y en el lisado de espermatozoides (Kumar et al., 2014). Sin embargo, se desconoce el origen del tejido que la produce en el varón. Se ha observado que la presencia de esta proteína en el semen humano cumple con una función antibacteriana contra *Escherichia coli* (Kumar et al., 2014), donde se observó que a una concentración de 20-100  $\mu\text{g/ml}$  tiene una alta capacidad para matar a esta bacteria.

Se ha demostrado igualmente que esta proteína tiene alta afinidad por heparina siendo incluso mayor que la observada con lactoferrina (LF) y la semenogelina (SGI) (Kumar et al., 2012). Esta unión a heparina ha sido descrita en otras proteínas de las glándulas accesorias del tracto masculino, se observó que cuando son aisladas por cromatografía de afinidad y posteriormente son incubadas con los espermatozoides, potencian la capacitación y la capacidad de responder a la ZP durante la reacción acrosómica (Miller et al., 1990). Se asume que esta misma interacción puede tenerla en el tracto femenino debido a la presencia de heparina y por lo tanto intervenir en regular algunos procesos de la fecundación. Así como proporcionar un ambiente libre de bacterias después de la monta o IA.

#### 6.1.1.6.- Agrupamiento basado en los perfiles de expresión (SOTA6)

El sexto y último grupo SOTA, también incluía a transcritos con una mayor expresión en el endometrio en comparación con el tejido oviductal. Esta clasificación está formada por 40 genes.

Uno de los genes identificados en este grupo fue el péptido natriurético tipo C (NPPC). En ratas se observó una mayor expresión en

el útero en la fase del proestro (Huang et al., 1996). Respecto al papel que desempeña en el ovario, se sugiere que podría modular la atresia folicular. Se descubrió que fue capaz de disminuir la atresia, que aparece en la transición de folículos preantrales a antrales (McGee et al., 1997). Igualmente se ha descrito en el tracto masculino, así, tanto NPPC como su receptor se expresan en el testículo humano (Middendorff et al., 2000).

Algunas acciones paracrinas de esta proteína incluyen la relajación de los túbulos seminíferos para facilitar el transporte de los espermatozoides (Middendorff et al., 1997). En conjunto con su receptor y guanósín monofosfato cíclico (cGMP), NPCC conduce a una variedad de efectos en el testículo, tales como la modulación de la motilidad de los espermatozoides, el desarrollo testicular de células germinales y la síntesis de testosterona (Middendorff et al., 2000).

Recientemente, se ha descrito el papel que desempeña esta proteína en la espermatogénesis de la rata, regula la barrera dinámica del paso de la sangre al testículo y también promueve la función endocrina de las células de Sertoli (Huang et al., 2011). Hasta el momento no se ha descrito su presencia en los fluidos reproductivos. Las funcionalidades de esta proteína estarían asociadas al mantenimiento de la homeostasis de los fluidos reproductivos debido a su capacidad vaso reguladora.

### 6.1.2.- Expresión diferencial entre la ampolla y la unión istmo-ampular del oviducto.

Los resultados obtenidos del análisis de datos de micromatrices de las células epiteliales de las dos regiones del oviducto (ampolla y

unión istmo-ampular) no mostraron grandes diferencias en el transcriptoma en comparación los genes expresados a nivel endometrial. Estos resultados nos indican que la similitud es muy alta entre las porciones del oviducto estudiadas. Hasta la fecha no existe ningún estudio similar que nos permita realizar una comparación con nuestros datos. No hay evidencias de trabajos realizados que determinen una expresión diferencial entre diferentes regiones del oviducto.

Se puede asumir que las escasas diferencias de expresión entre la región ampular y la unión istmo-ampular podrían darse por el cambio de relación entre el número células secretoras y ciliadas en dichas regiones. Sin embargo, este dato tampoco puede ser fundamentado por falta de referencias en el análisis de la caracterización y de porcentajes que representas en el tejido oviductal las células secretoras y ciliadas en las regiones del oviducto.

### 6.1.3.- Clasificación funcional de transcritos identificados que sintetizan a proteínas secretadas

Otro enfoque de este estudio fue el determinar mediante el análisis de micromatrices la expresión del transcriptoma del endometrio y del oviducto, esto con la finalidad de establecer los genes que codifican para proteínas secretadas. Pero debido a la diferente composición celular de los tejidos de estudio, se tuvieron que considerar algunos factores. Las muestras de oviducto están compuestas por células epiteliales y la mayoría de ellas son de secreción activa durante el estro. En contraste las células luminales y glandulares del endometrio contribuyen a las secreciones dentro del lumen uterino. Adicionalmente en el endometrio se encuentran otro tipo de células, tales como los fibroblastos (secretoras de colágenos y ECM), células endoteliales y varias células inmunes que también pueden mostrar actividad secretora. Así, el porcentaje de células secretoras de proteínas en el oviducto y útero es probablemente diferente. Por

ejemplo, se estimaría una relación de células secretoras de 1:2 (útero: oviducto). En base a estas reflexiones, se determinó que el corte para determinar los transcritos exclusivos de cada tejido y los compartidos fue de un fold change  $\log_2 \geq 4$ .

Un total de 5509 transcritos fueron los que se expresaban en el oviducto y endometrio bovino, 5160 fueron comunes. Se determinó que la mayoría después de su clasificación por funcionalidad, pertenecían a funciones vitales de las propias células. 61 genes fueron descritos como expresados únicamente por los tejidos oviductales y 288 por el endometrio. De los 5160 genes, 175 fueron clasificados como que sintetizan a proteínas secretadas y de matriz extracelular. Estas son en las que prestamos más atención debido a la posible función que tienen en la interacción con el espermatozoide una vez en tracto genital femenino.

Dentro de los grupos más numerosos de categoría funcional se encuentran los clasificados como respuesta a estímulos, aquí se agrupan diferentes quimiocinas. Esta familia de proteínas se ha descrito que participa en la inmunidad innata conferida por el tracto genital femenino (Amjadi et al., 2014). Se conoce que cumple una función de reclutar y activar leucocitos en sitios de inflamación (Salamonsen et al., 2007). Las concentraciones de citocinas y quimiocinas pueden variar en el endometrio durante los procesos fisiológicos normales, así como las condiciones patológicas, como la infección y la endometriosis (Fahey et al., 2005).

Una de estas enzimas, la quimiocina ligando 2 (CCL2 o MCP1) en el útero puede inducir la expresión de ATP6V0A2 (Jaiswal et al., 2012). Esta proteína se describió en el líquido seminal del hombre como la proteína mayormente expresada en los varones fértiles en comparación con los infértiles, característica compartida con la proteína 2NTD (Ota et al., 2013). Adicionalmente, esta misma investigación determinó que la expresión del ARNm y la proteína ATP6V0A2 en los espermatozoides de varones infértiles era significativamente menor en comparación con los



espermatozoides de varones fértiles. Las conclusiones sugieren que ATP6V0A2 puede ser necesaria para las funciones normales de los espermatozoides, por lo tanto, podría servir como un marcador de fertilidad masculina (Ota et al., 2013). Este gen, en nuestro estudio fue clasificado como expresado en el oviducto y endometrio, por su localización encontramos que está presente en la membrana plasmática y en los lisosomas.

La clasificación de los transcritos que sintetizan proteínas secretadas y que consideramos como exclusivos del endometrio fueron 101, de los cuales 13 han sido descritos con anterioridad que participan en la vía de adhesión focal (COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL5A3, COL6A1, COL6A2, FN1, LAMC3, PGF, COL6A3, TNC, TNXB) y con la vía de la interacción ECM-receptor. Estas dos vías se habían discutido con anterioridad. Estas funciones coinciden con los anteriormente publicados en la fase del estro de la especie bovina (Mitko et al., 2008), así como en el endometrio de la yegua en el día 0 del ciclo estral (Gebhardt et al., 2012).

La clasificación de los transcritos que sintetizan proteínas secretadas y que consideramos como exclusivos del oviducto fueron 18, dentro de los que se incluye la proteína mayormente expresada en el oviducto, OVGP1 y CFH.

## 6.2.- PROTEOMA DEL OVIDUCTO Y ENDOMETRIO EN LA ESPECIE BOVINA

Se ha demostrado que la mucosa oviductal bovina sufre cambios sustanciales dependiendo de la fase del ciclo estral (Yaniz et al., 2000). Esta mucosa ofrece un complejo sistema de regulación que puede influir no sólo en el paso de los gametos y embriones, sino también, en la producción del fluido para períodos específicos antes y después de la ovulación, para proporcionar el microambiente necesario de la

capacitación del espermatozoide, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Buhi 2002).

Durante la fase folicular, los estrógenos son esenciales para la diferenciación del epitelio y la maduración de las células secretoras. El contenido luminal o fluido oviductal es el resultado de la producción de proteínas por el epitelio secretor del oviducto y del trasudado del suero sanguíneo (revisado por Leese 1988, Buhi et al., 2000, Avilés et al., 2010). El proteoma del fluido uterino está compuesto de proteínas derivadas de la sangre y también secretadas por el epitelio uterino (Roberts y Parker 1974, Faulkner et al., 2013, Alavi-Shoushtari et al., 2006). Al igual que en el oviducto, en el endometrio las variaciones en la producción de fluido son dependientes de los niveles hormonales de las diferentes fases del ciclo estral.

La fase del ciclo estral de nuestro estudio, es la fase periovulatoria, de manera que podríamos determinar el microambiente que proporciona el tracto femenino a los espermatozoides tras la monta o la inseminación y cómo este interactúa con los espermatozoides, desde que son depositados, hasta el momento de la fecundación.

Los resultados obtenidos a partir de geles SDS-PAGE en dos dimensiones (2D) nos permitieron calcular la media de proteínas presentes en el fluido oviductal y fluido uterino en la fase periovulatoria. La media de "spots" presentes en el fluido oviductal fue de 458 y para el fluido uterino de 242. Como se mencionó en la revisión bibliográfica, existen escasos estudios que se hayan realizado para establecer el proteoma general de estos fluidos reproductivos. Y aún menos los que hayan abordado la identificación de proteínas a partir de geles en 2D. Algunos estudios a partir de células epiteliales oviductales porcinas identificaron 40 proteínas por electroforesis en geles de 2D y 276 proteínas por la técnica de identificación de proteínas multidimensional (MudPIT) (Sostaric et al., 2006). Sin embargo, sí que hay numerosas revisiones que se han encargado de describir y detallar

el contenido del fluido oviductal de los mamíferos (Buhi et al., 2000, Killian 2004, Avilés et al., 2010).

En contraste, en el útero, si que se pueden encontrar algunos trabajos en la especie bovina donde se describe el proteoma del fluido uterino, sin embargo, todos ellos estudian el proteoma en las fases cercanas a la implantación (Faulkner et al., 2013, Beltman et al., 2014, Forde et al., 2014). Algunos otros del proteoma en la fase del desarrollo embrionario temprano (Muñoz et al., 2012a) y algunos el efecto de los embriones sexados sobre las modificaciones el proteoma del útero bovino (Gómez et al., 2013). Estos dos últimos utilizaron la técnica de electroforesis en 2D. Estos trabajos nos permitieron comparar en medida de lo posible, nuestros datos con los anteriormente publicados. Cabe mencionar que algunas de las proteínas identificadas en nuestro estudio, HSPA5, ENO1, ENO2, PEPB1, PRDX6, PARK7 y GSTP1 habían sido ya identificadas en los por otros autores (Muñoz et al., 2012a, Gómez et al., 2013).

Otros trabajos que tomamos como referencia fueron los que describen el proteoma del plasma (D'Ambrosio et al., 2005) y del suero sanguíneo de la especie bovina (Wait et al., 2002). Estos nos sirvieron como referencia para identificar aquellos "spots" que son procedentes del trasudado sanguíneo y son comunes a los que se encuentran en los fluidos reproductivos del bovino

El análisis de imagen de los geles de electroforesis 2D nos permitió reconocer las proteínas más abundantes del fluido oviductal y uterino. La proteína más abundante en ambos fluidos fue la albúmina sérica (ALB o BSA). La proteína ALB en el fluido oviductal representa el 21% del total de proteína y hasta un 42% en el fluido uterino. La ALB aparece en el fluido oviductal en concentraciones comparables a las del suero. Se sabe que la ALB interviene en la pérdida de colesterol presente en la membrana plasmática de los espermatozoides (Yanagimachi, 1994, Cross 1998, Visconti et al. 2002, Florman et al., 2006).

La proteína ALB media este proceso de la pérdida del colesterol gracias a su actividad de unión a esteroides (Go y Wolf 1985), pero no sólo ALB tiene esta característica. La pérdida del colesterol provocada por la albúmina es regulada en la vagina por la proteína glicodelina-S, que se encuentra presente en grandes cantidades en el plasma seminal; sin embargo, esta se va eliminando durante el paso de los espermatozoides a través de la moco cervical (Chiu et al. 2005). Por lo tanto, la gran cantidad de albumina contenida en el fluido y la pérdida de la glicodelina-S, participan en el inicio de la capacitación espermática del espermatozoide humano (Yeung et al. 2009). En los espermatozoides de toro permanecen factores decapacitantes, como las proteínas de la familia BSP (Chandonnet et al. 1990), estas y otros factores regulan la capacitación de los espermatozoides hasta el momento adecuado para que la fecundación tenga lugar.

### 6.2.1.- Proteoma del fluido oviductal

Al agrupar por funcionalidad las proteínas más abundantes contenidas en el fluido oviductal nos encontramos que 10 de ellas se incluyen dentro de respuesta al estímulo (ACTG1, PDIA6, P4HB, CALR, ENO3, STIP1, EPHX2, PDIA3, GAPDH, ENO1) y 10 como proteínas de unión (ACTG1, ACTG2, ALB, CALR, HSPA5, PEBP1, P4HB, PDIA3, TPPP3 y HSP90B1). De este último grupo ha sido descrita la proteína chaperona HSPA5 en cultivo de células epiteliales del oviducto bovino (Boilard et al., 2004). Esta proteína denominada también GRP78 o proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) fue previamente descrita mediante análisis de expresión de ARNm en el oviducto bovino, donde se observó que su expresión fue incrementada hasta 6 veces durante el estro en comparación con otras fases (Bauersachs et al., 2004).

Otros estudios hacen referencia a esta proteína localizada en las células epiteliales de oviducto de vaca (Boilard et al., 2004), cerda (Sostaric et al., 2006, Yeste et al., 2014), ratón (Lin et al., 2012) y humano (Marin-Briggiler et al., 2010). En una revisión hecha por nuestro grupo se observó que la expresión de este gen es común en el oviducto de

tres especies: cerda, mujer y vaca (Mondejar et al., 2012). En el ratón, se observó por inmunohistoquímica que la presencia de HSPA5 era mayor en la fase del estro (Lin et al., 2012) datos que coinciden con los resultados obtenidos en la especie bovina (Bauersachs et al., 2004) y el útero de rata (Simmons y Kennedy 2000).

Se observó una interacción directa de esta proteína presente en el oviducto y los espermatozoides. Se observó en células epiteliales de bovino que la HSPA5 y la HSPA60 se unen a los espermatozoides (Boilard et al., 2004). Al incubar la proteína recombinante de HSPA5 con espermatozoides de humano, mostró la capacidad de unión a la región acrosomal del espermatozoide y esta unión condujo a una disminución en el número de espermatozoides unidos a la ZP (Marin-Briggiler et al., 2010).

Otro efecto que muestra la proteína contenida en el lumen oviductal, fue que afectó significativamente la fosforilación de tirosina y aumento de los niveles de calcio intracelulares del espermatozoide durante la capacitación (Lachance et al., 2007). Esta interacción entre los espermatozoides y las células epiteliales del oviducto porcino, demostró que el co-cultivo indujo el aumento significativo de expresión de HSPA5 y HSP90AA1 por parte de las células epiteliales (Yeste et al., 2014).

Adicionalmente ha sido descrita en el espermatozoide (Bohring y Krause 2003, Naaby-Hansen y Herr 2010), plasma seminal (Miller et al., 1992, Pilch y Mann 2006), testículo y epidídimo de humano (Lachance et al., 2010). En el tracto masculino se ha descrito su participación en la espermatogénesis (Huo et al., 2004). Un estudio en ratones knockout GRP78 *-/-*, demostró que GPR78 es esencial para la proliferación de células embrionarias y que protege la masa celular interna de la apoptosis durante el desarrollo embrionario temprano, ya que la ausencia de este gen deriva en muerte embrionaria durante el período peri-implantacional (Luo et al., 2006).

En conclusión se ha demostrado la importancia que tiene esta proteína en diferentes procesos reproductivos como el transporte de gametos, la fecundación y el desarrollo temprano de embrión. Nuestra hipótesis es que el oviducto podría participar en cubrir las posibles deficiencias de esta proteína por parte de los espermatozoides y participar activamente en la interacción entre gametos durante las fases previas y durante la fecundación.

Otra proteína chaperona que se encarga del transporte y procesamiento de proteínas secretadas es la endoplasmina (HSP90B1). Como ya se ha mencionado, se observó su sobreexpresión por las células epiteliales del oviducto porcino tras el co-cultivo con espermatozoides (Yeste et al., 2014). También con anterioridad había sido descrita en el oviducto porcino (Seytanoglu et al., 2008). Esta proteína se ha descrito en el modelo murino y se sabe que participa en el plegamiento de proteínas y el ensamblaje de complejos de proteínas multiméricas (Walsh et al., 2008).

Se observó en el útero bovino que esta proteína tiene variaciones en su patrón de expresión en el período cercano a la implantación (Forde et al., 2014). Se detectó su presencia en la cabeza de los espermatozoides de ratón durante la capacitación, lo que sugiere ser de importancia para el reconocimiento de la ZP (Asquith et al., 2004, Maselli et al., 2014).

### 6.2.2.- Proteoma del fluido uterino

Posterior al análisis de imagen de los geles 2D del fluido luminal del útero bovino, se identificaron 18 "spots" que equivalen a 14 proteínas diferentes, las cuales representan el 53% de la proteína total. Una vez realizada la clasificación funcional, encontramos que 8 de ellas han sido descritas con actividad catalítica (AKR1B1, ALDOA, ALDOC, ENO1, ENO3, IDH1, CKB, TPI1) y 5 de ellas también se agruparon como actividad de glicolisis (ALDOA, ALDOC, ENO1, ENO3, TPI1).

A continuación vamos analizar con más detalle estos hallazgos. Una de las proteínas más abundantes en el fluido uterino bovino es la aldosa reductasa AKR1B1. Esta proteína pertenece a la familia aldo-ceto reductasas. Esta familia está involucrada en el proceso de desintoxicación por compuestos de carbonilo citotóxicos (Takahashi et al., 1995). Esta proteína se ha descrito en el endometrio bovino y se ha descrito su participación en la inactivación de la progesterona y la síntesis de PGF<sub>2</sub> (Madore et al., 2003, Bresson et al., 2011).

La concentración de AKR1B1 en el endometrio bovino fue mayor en comparación con el plasma bovino (Faulkner et al., 2012), datos que coinciden con nuestros resultados en la comparativa del fluido uterino *versus* suero. Esta enzima puede también reducir benzaldehído, gliceraldehído, glucosa, y otros compuestos que contienen carbonilo. Se ha descrito esta enzima en el epidídimo de la especie bovina asociada a los epididimosomas pudiendo ser transferida a los espermatozoides (Frenette et al., 2003). En este sentido la presencia de esta proteína en el epidídimo se asocia a la degradación de polioles (Kobayashi et al., 2002). Esta vía se describe como que la aldosa reductasa reduce la glucosa en sorbitol, seguido por su oxidación en fructosa por sorbitol deshidrogenasa. Estos carbohidratos se han descrito como fuentes de energía que puede ser utilizada por los espermatozoides (Murdoch y White 1968, Frenette et al., 2004).

Adicionalmente, esta vía de los polioles también ha sido descrita en el oviducto bovino (Larose et al., 2012). Por lo tanto esta enzima podría afectar la motilidad espermática a nivel epididimario y uterino; además de protegerlos en ambos órganos contra los compuestos de carbonilo.

### 6.2.3.- Comparativa del proteoma del oviducto y endometrio en la especie bovina

El análisis comparativo entre las muestras de fluido oviductal y uterino bovino indica que al menos 11 "spots" que representan 10

proteínas (TPPP3, HSPA5, ANXA8, HSP90B1, LZTFL1, PDIA6, ANXA1, TUBB5, P4HB, PDIA3) están diferencialmente aumentadas en el fluido oviductal en comparación con el fluido uterino.

La proteína tubulina miembro de la familia de proteínas que promueven la polimerización 3 (TPPP3) se encontró en mayor cantidad diferencial, ya que se mostró hasta 421 veces más aumentada en el fluido oviductal *versus* fluido uterino. Sin embargo, esta proteína hasta el momento no se ha descrito que tenga una relación con los procesos reproductivos, se sabe que enlaza tubulina y tiene actividad de la agrupación de microtúbulos y que puede desempeñar un papel en la proliferación celular y la mitosis dada la implicación de los microtúbulos en estos procesos (Zhou et al., 2010, Vincze et al., 2006).

Esta diferencia de entre la mayor cantidad de la familia de las tubulinas en el fluido oviductal *versus* uterino, esto se debería por la gran cantidad de células epiteliales ciliadas que conforman el epitelio oviductal. La presencia en el fluido podría ser consecuencia por la renovación de este tipo de células ciliadas. Otras dos proteínas previamente discutidas pertenecen a la familia de las proteínas de choque térmico HSPA5 y HSAP90B1.

Otras proteínas pertenecientes a este grupo diferencialmente expresado en el oviducto, son dos proteínas pertenecientes a la familia de las anexinas (ANXAs). Estas ANXAs pueden unirse a fosfolípidos y a proteínas de unión de membrana en presencia de  $Ca^{2+}$  (Rescher y Gerke 2004). En el epitelio oviductal bovino se demostró su interacción con las proteínas BSP presentes en la membrana espermática (Ignotz et al. 2007); sugiriendo un importante papel en la formación del reservorio en el istmo de la vaca.

Se informó que la ANXA1 se expresaba durante la maduración *in vitro* de ovocitos bovinos, se observó una sobreexpresión de ANXA1, PLAU, SCT1 y LUM después de la maduración de los ovocitos (Mamo et al., 2011). Otro estudio donde se determinaba la calidad de los complejos ovocito cumulus (COC) de vacas repetidoras, mostró que el



ARNm de ANXA1 y ANXA2 estaban subexpresados en los COC de vacas repetidoras, asociado también a la sobre regulación de la fosfolipasa A2 (Puglisi et al., 2013). Anteriormente se había descrito la interacción de ANXA1 con la fosfolipasa A2, donde ANXA1 se describe como un regulador negativo de la fosfolipasa A2 (Lim y Pervaiz 2007). Nuestros resultados de Western-blot con anticuerpo anti-ANXA1 bovino, demostraron la expresión de una banda de 37 kDa en el fluido oviductal, sin embargo, en el fluido uterino no se detectó ninguna, lo que coincide con los datos del DiGE. Se sugiere que participa en la conformación del reservorio oviductal, dada la capacidad conocida de esta familia de proteínas de mediar la unión a proteínas BSP.

Otras proteínas de nuestros resultados indican que están mayormente expresados en el oviducto, son dos pertenecientes a la familia de las desulfuro isomerasas, estas son la PDIA3 (ERp57) y PDIA6. La PDIA3 se ha demostrado que juega un papel importante en la fusión del espermatozoide y el ovocito, demostrando que está presente en la membrana de los espermatozoides de ratón, y sugiere que participa en un complejo chaperonas similares a las lectinas (Ellerman et al., 2006).

Esta proteína se ha descrito en el testículo y espermatozoides de rata (Zhao et al., 2013), en testículo de cabra y oveja (Lv et al., 2011). Otros estudios en ratón mostraron por inmunofluorescencia que los espermatozoides capacitados mostraban una mayor intensidad en comparación con los no capacitados (Maselli et al., 2014), este patrón se mostró también para las proteínas HSP90AA1 y HSP90B1. Este mismo estudio demostró que PDIA3, HSP90AA1 y HSP90B1, estaba asociada a la recuperación de la fertilidad después de 9 semanas, en ratones tratados con bleomicina, etopósido, y cisplatino (BEP) (Maselli et al., 2014), tratamiento utilizado en el cáncer testicular y que se sabe afecta la capacidad de la fertilidad debido a su efectos quimiotóxicos.

En humano se observó que PDIA3 está asociada con la fertilidad; ya que pacientes con bajas tasas de fertilidad manifestaban una disminución dramática de la expresión de la proteína PDIA3 (Zhang et

al., 2007). Se observó que la PDIA3 juega un papel relevante en la decondensación de los espermatozoides, reduciendo los puentes disulfuro de protamina en ovocitos porcinos (Li et al., 2014b). Se requieren una investigación minuciosa para determinar el papel que desempeña esta proteína en el oviducto de vaca.

Por otro lado y analizando los "spots" que en nuestro estudio son diferencialmente expresados, en el fluido uterino en comparación con el fluido oviductal, encontramos que 17 mostraban una diferencia mayor a dos veces. Estos 17 "spots" equivalen a 13 proteínas diferentes (AKR1B1, IQGAP1, PSAT1, PHGDH, TF, CKB, HSPD1, ACTG1, ACTG2, PEBP1, ALDOA, ALDOC, SELENBP1).

De estas proteínas identificadas por MS/MS, la proteína AKR1B1 (discutida con anterioridad) es la que mostraba una diferencia de hasta 59 veces más en comparación con el oviducto. Una vez hecho el análisis funcional encontramos que tres de ellas (AKR1B1, ALDOA y ALDOC) se encuentran descritas en la vía del metabolismo de la manosa y fructuosa. Anteriormente se había descrito que la AKR1B1 está involucrada en la vía de los polioles y que se encontraba presente en la cabeza de los espermatozoides de la especie bovina. Nuestros resultados de Western-blot demostraron esta expresión diferencial entre el fluido uterino, donde fue detectada una banda de 37 kDa, en contraste con el fluido oviductal donde no fue detectada.

Se ha descrito también que la proteína ALDOA se encuentra en la cabeza y flagelo de los espermatozoides de humano (Petit et al., 2013). Sin embargo, esta detección no es posible sin la previa incubación con 0,005% de saponina. En este mismo estudio se observó que la incubación de espermatozoides con el anticuerpo anti-ALDOA redujo el número de espermatozoides unidos a ZP (Petit et al., 2013). Por lo que se demuestra que la ALDOA interactúa con la ZP directamente. Esta proteína al contenerse en el flagelo y estar incluida en las vías de la glucólisis y glucogénesis se asocia con la producción de energía asociada al mantenimiento de la motilidad del espermatozoide. En el

ratón se observó la expresión de ALDOA en el epidídimo y se asoció con el aumento de ALDOA, ENO1 y TPI1 (importantes para la producción de energía) en los espermatozoides maduros.

#### 6.2.4- Aportación del suero sanguíneo a los fluidos reproductivos del tracto femenino bovino

El mayor aporte por parte del suero sanguíneo a los fluidos del oviducto y uterino son las albúminas,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -globulinas y lipoproteínas de alta densidad. Sin embargo, el aporte de las inmunoglobulinas es mayor en el fluido uterino. Esto puede estar asociado al aumento de la motilidad uterina durante el estro y la consecuente entrada de microorganismos, por la dilatación de los órganos reproductores externos de la hembra y la monta del macho. Nuestro estudio del proteoma de fluido oviductal y uterino fue complementado con otros estudios publicados del proteoma suero y plasma sanguíneo. Gracias a esto pudimos identificar algunas inmunoglobulinas (IGHG1, IGHG2, IGL@). Se observó en el endometrio de rata que el número de inmunoglobulinas G y A es máxima cuando los niveles de estrógenos era máxima (Wira y Sandoe 1977). En la especie bovina se sugiere que los cambios cíclicos influyen en el contenido de IgG en el fluido uterino y que pueden ser parte de los mecanismos de defensa contra patógenos (Alavi-Shoushtari et al., 2014).

## 6.3.- SPAM1 EN LA REPRODUCCIÓN DE LOS MAMÍFEROS

La molécula de la adhesión del espermatozoide 1 (SPAM1) es una proteína de superficie ampliamente conservada en los mamíferos con diferentes funciones reproductivas. Esta proteína inicialmente se describió como exclusiva del tracto genital masculino, habiéndose descrito en el testículo (Zhang y Martin-DeLeon, 2001; Yoon et al., 2014) conductos eferentes, conductos deferentes, próstata, vesículas

seminales (Zhang et al. 2004) y epidídimo (Deng et al. 2000, Zhang y Martin-DeLeon 2003a, Morin et al. 2010). Sin embargo, en el ratón se describió también la expresión de ARNm en el tracto genital femenino (vagina, útero y oviducto) (Zhang y Martin-DeLeon 2003b). La expresión en ambos tractos de esta proteína y las funcionalidades descritas en estos; le confieren una alta relevancia en los procesos reproductivos, en especial el potenciar la capacidad de penetrar el *cumulus oophorus* y la ZP.

Se ha comprobado que la proteína Spam1 de origen epididimario y uterino es adquirida por los espermatozoides tras su tránsito por estos órganos (Zhang y Martin-DeLeon 2003, Zhang y Martin-DeLeon 2003, Zhang et al., 2004). Nuestros datos en la vaca, mujer, cerda y yegua confirmaron que hay expresión de ARNm de SPAM1 en el oviducto de estas especies, demostrando con ello que además del ratón, hay expresión de SPAM1 en el tracto femenino de otras especies de mamíferos, por lo tanto se presume que la participación de SPAM1 en la fecundación es un proceso ampliamente conservado en varias especies de mamíferos.

Estos resultados nos llevaron a investigar si la expresión de ARNm de SPAM1 en el oviducto bovino se traducía a proteína. Por medio de inmunohistoquímica detectamos que esta proteína es expresada por las células epiteliales del oviducto. Anteriormente ya se había descrito por hibridación *in situ* que las células epiteliales del oviducto del ratón, son las que sintetizan Spam1 (Zhang y Martin-DeLeon 2003b).

Los resultados de inmunohistoquímica para TEM, no mostraron un marcaje positivo en las células epiteliales del oviducto bovino. Sin embargo, se observaron dos características importantes. La primera fue que la secreción de SPAM1 en el oviducto no es exclusiva de las células secretoras, que las células ciliadas mostraron también una señal positiva. La segunda fue que observamos que la inmunodetección de las células epiteliales, no está dada mediante la intervención de

gránulos secretores, puesto que observamos que el marcaje es citoplasmático.

Para tener una referencia de una vía clásica de secreción oviductal, realizamos la inmunohistoquímica con anticuerpo anti-OVGP1 y comprobamos que la señal era sólo en células secretoras y se asociaba únicamente a gránulos de secreción.

Se ha comprobado que SPAM1, como otras proteínas ancladas a GPI, utilizan otros medios, como son las vesículas membranosas denominadas exosomas. Este tipo de vesículas se ha descrito recientemente en el tracto genital masculino (epidídimo) y femenino (útero) del ratón. Se observó que transfieren SPAM1 por medio de exosomas a la membrana de los espermatozoides (Griffiths et al., 2008a). Nosotros quisimos comprobar que esta proteína en el fluido oviductal bovino también se asociaba a este tipo de vesículas. Nuestros resultados mostraron mediante MS/MS la presencia de SPAM1 en los exosomas aislados de FOB.

Esto sugiere que en la especie bovina, la transferencia de algunas proteínas ancladas a GPI a los espermatozoides desde el tracto femenino sigue el mismo modelo que en los murinos, mediante la formación de exosomas. Este tipo de transferencia de proteínas había sido comprobado con anterioridad en el útero (Griffiths et al., 2008a) y en el epidídimo del ratón con la proteína Spam1 (Zhang and Martin-DeLeon 2003a) y en el epidídimo de toro con la proteína P25b (Frenette y Sullivan 2001).

La proteína SPAM1 fue descrita en los espermatozoides de la especie bovina (Lalancette et al., 2001, Morin et al., 2010, Morin et al., 2005) detectando por primera vez un banda de 80 kDa, sin embargo, no fue hasta que Morin et al., en el 2010, detectaron otra isoforma de 70 kDa, donde demostraron que dicha variación se encuentra en el extremo C terminal. Esto fue comprobado con la utilización de dos anticuerpos que reconocían los dos extremos terminales de la proteína (C y N). Nuestros datos, a partir de proteína aislada de espermatozoides de

toro, coincidieron con los anteriormente publicados con el anticuerpo que reconoce el extremo N terminal de 80 kDa.

Nuestros resultados obtenidos por Western-blot de la proteína del fluido oviductal mostraron dos patrones de expresión en los diferentes fluidos. Uno de los patrones mostró 3 bandas, una de 80 kDa que coincide con el peso descrito en los espermatozoides y otra banda doble de entre 55 y 60 kDa. El otro patrón es el que sólo muestra la banda doble de 55 y 60 kDa. Estos resultados nos permiten hacer nuestras observaciones en dos sentidos; el primero es que SPAM1 detectada en el FOB muestra diferentes patrones de expresión, la expresión de la banda de 80 kDa no está siempre presente en todas las muestras, lo que sugiere una variabilidad entre individuos.

Se requiere un estudio más detallado para determinar qué efecto reproductivo tiene la presencia o ausencia de esta isoforma de SPAM1 en el fluido oviductal. El segundo punto de análisis de nuestros resultados por Western-blot, fue la presencia en todos los replicados que hicimos de una banda de entre 55 y 60 kDa, que hasta el momento no se había descrito con anterioridad en la especie bovina. Sin embargo, cabe mencionar que esta banda ya había sido detectada en el fluido epididimario del bovino con el mismo anticuerpo que hemos utilizado en la presente tesis doctoral (Morin et al., 2010). Desconocemos por que los autores no consideraron esta banda como SPAM1.

Para determinar que esta banda de 55 kDa no fuese una banda inespecífica, decidimos inmunoprecipitar la proteína SPAM1 del FOB, separarla por electroforesis en gel SDS-PAGE y teñirla con azul de coomassie. Una vez identificada fue recortada e identificada por MS/MS. Esto sugiere que la proteína SPAM1 aislada de FOB es similar a la expresada en el epidídimo bovino demostrándose la existencia de diferentes variantes de la proteína. Son necesarios estudios futuros para explicar a qué se debe el diferente peso molecular y su posible papel biológico.

Una de las funcionalidades reproductivas descritas para la proteína SPAM1, es su capacidad de unión a ZP (Cherr et al., 2001, Hunnicutt et al., 1996). Nuestros resultados demostraron que la proteína SPAM1 aislada de FOB tenía la capacidad de unirse a la zona pelúcida de los ovocitos inmaduros bovino.

Este resultado junto con la capacidad de unión a los espermatozoides de la proteína Spam1 contenida en el útero de ratón (Griffiths et al., 2008a), demuestra que participa activamente en la interacción entre gametos y la unión de estos durante el proceso de fecundación. Futuros estudios permitirán esclarecer la participación de esta proteína en la especie bovina siendo necesario investigar su posible implicación en la hidrólisis del ácido hialurónico presente en la matriz del cúmulo ovífero facilitando la penetración del espermatozoide.

# 7 CONCLUSIONES CONCEPCIONES?





## 7.1.- CONCLUSIONES

1. Un total de 5509 genes son expresados diferencialmente en el oviducto y útero bovino en la fase periovulatoria.
2. La expresión génica en el endometrio y el oviducto no es idéntica. Así, 1078 genes mostraron valores de expresión más altos en el endometrio (up-regulated) y 751 mostraron valores más bajos de expresión en la ampolla (down-regulated). El análisis entre endometrio *versus* unión istmo-ampular indicó que 1041 genes fueron up-regulated y 732 fueron down-regulated.
3. Los genes que determinamos como únicos del oviducto ( $n=61$ ) están principalmente relacionados con una actividad catalítica e hidrolasa. En cuanto a los genes únicos del endometrio ( $n=288$ ) resaltamos su implicación en la adhesión focal y remodelación de la matriz extracelular.
4. 175 genes expresados por los tejidos del endometrio y oviducto fueron clasificados como secretados y/o del espacio extracelular. Estos genes están implicados en la unión de proteínas, tienen actividad catalítica y participan en los mecanismos de defensa.
5. El fluido oviductal presenta una mayor complejidad proteica que el fluido uterino en base al análisis electroforético en dos dimensiones, ya que en el fluido oviductal se identifican casi el doble de spots en comparación con el fluido uterino.
6. El análisis proteómico del fluido oviductal y del fluido uterino indica una composición proteica diferente en concordancia con los datos de expresión génica.
7. Las proteínas identificadas por MS/MS comunes entre FOB y FUB se relacionan con procesos biológicos generales y de respuesta al estímulo. Identificamos como específicas del FOB proteínas relacionadas con el choque térmico y proteínas de unión. En el caso del FUB, las proteínas específicas se relacionan con una actividad catalítica y de glicolisis. Las proteínas procedentes del SSB están fundamentalmente implicadas con procesos inmunológicos.

8. La expresión de SPAM1 en el oviducto está conservada en diferentes mamíferos pudiendo modular la interacción entre gametos.

## 7.2.- CONCLUSIONS

1. A total of 5509 genes are specifically expressed during the periovulatory period at the bovine uterus and oviduct.
2. Gene expression in oviduct and endometrium is not identical. Therefore, 1078 genes showed higher expression values at the endometrium (up-regulated) and 751 showed lower expression values at the ampulla (down-regulated). The comparison endometrium vs. isthmus-ampulla region showed that 1041 genes were up-regulated and 732 were down-regulated.
3. Specific genes of the oviduct ( $n=61$ ) were mainly related with hidrolitic and catalitic activities. However, specific genes of the endometrium ( $n=288$ ) were involved in the focal adhesion and extracellular matrix remodelling.
4. A total of 175 genes expressed at endometrium and oviduct were consideres as secreted and/or belonging to the extracellular region. Proteins encoded by these genes are involved in protein recognition, catalitic activity and defensive response.
5. Two-dimensional electrophoretic analysis revealed a higher protein complexity of the oviductal fluid when compared with the uterine fluid.
6. According to the gene expression data, proteomic analysis indicates a different protein content in the oviduct fluid when compared with the uterine fluid.
7. The proteins identified by MS/MS common between FOB and FUB are related with general biological processes and response to stimulus. Proteins related with heat shock and binding proteins are specific of the FOB; however, proteins with catalytic and glycosis are specific of

the FUB. The proteins from SSB origin are mainly involved in immunological processes.

8. Expression of SPAM1 in the oviduct is preserved throughout different mammalian species. It may modulate interaction between gametes.







*Anexo I Proteínas identificadas en el fluido uterino bovino*

<b>Símbolo oficial</b>	<b>Nombre</b>
A1BG	Alpha-1-B glycoprotein
A2M	Alpha-2-macroglobulin
ACADVL	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain
ACBP	Acyl-coa
ACTB	Actin, beta
ACTC1	Actin, alpha, cardiac muscle 1
ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)
AGR2	Anterior gradient homolog 2 ( <i>Xenopus laevis</i> )
AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein
AK1	Adenylate kinase 1
AKR1B1	Aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)
ALB	Albumin
ALDOA	Aldolase A, fructose-bisphosphate
ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
ANPEP	Alanyl (membrane) aminopeptidase
ANXA1	Annexin A1
ANXA2	Annexin A2 pseudogene 3; annexin A2; annexin A2 pseudogene 1
ANXA3	Annexin A3
ANXA4	Annexin A4
ANXA5	Annexin A5
APOA1	Apolipoprotein A-I
APOA2	Apolipoprotein A-II
ARHGDI1	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha
ARPC2	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kda
ARSA	Arylsulfatase A
AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein
B2M	Beta-2-microglobulin
BCAT1	Branched chain aminotransferase 1, cytosolic
C3	Similar to Complement C3 precursor; complement component 3; hypothetical protein LOC100133511
C4A	Complement component 4A (Rodgers blood group)
CAP1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)
CAPZB	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta
CFB	Complement factor B
CFI	Complement factor I
CFL1	Cofilin 1 (non-muscle)
CHGA	Chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)
CLIC1	Chloride intracellular channel 1
CLU	Clusterin
CMBL	Carboxymethylenebutenolidase homolog ( <i>Pseudomonas</i> )
CNDP2	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)
CP	Ceruloplasmin (ferroxidase)
CST6	Cystatin E/M



CTSD	Cathepsin D
CTSL2	Cathepsin L2
CYC1	Cytochrome c1
DBI	Diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein)
DDAH2	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
DMBT1	Deleted in malignant brain tumors 1
DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2
EEF1D	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)
ENO1	Enolase 1, (alpha)
ENO3	Enolase 3 (beta, muscle)
ENOA	Alpha-enolasa
EZR	Hypothetical protein LOC100129652; ezrin
FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
FGA	Fibrinogen alpha chain
FGB	Fibrinogen beta chain
FGG	Fibrinogen gamma chain
FOLR1	Folate receptor 1 (adult)
FUCA1	Fucosidase, alpha-L- 1, tissue
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like 6; hypothetical protein LOC100133042; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GC	Group-specific component (vitamin D binding protein)
GDI2	GDP dissociation inhibitor 2
GM2A	GM2 ganglioside activator
GNS	Glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase
GPI	Glucose phosphate isomerase
GRP	Gastrin-releasing peptide
GSN	Gelsolin (amyloidosis, Finnish type)
GSTM1	Glutathione S-transferase mu 1
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1
HBA1	Hemoglobin, alpha 2; hemoglobin, alpha 1
HBB	Hemoglobin, beta
HDGF	Hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein 1-like)
HPX	Hemopexin
HSP90AA1	Heat shock protein 90kda alpha (cytosolic), class A member 2; heat shock protein 90kda alpha (cytosolic), class A member 1
HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta
HSPA5	Hypothetical gene supported by AF216292; NM
HSPA8	Heat shock cognate 71 kda protein
HSPB1	Heat shock 27kda protein-like 2 pseudogene; heat shock 27kda protein 1
IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
IGHC	Ige heavy chain constant region
IGL $\lambda$	Immunoglobulin light chain, lambda gene clust
IGLL1	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1
ITIH4	Inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein)

KRT19	Keratin 19
LDHB	Lactate dehydrogenase B
LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain
LGMN	Legumain
LOC522479	LOC522479 similar to serpin peptidase inhibitor, c
LOC617264	LOC617264 similar to PRDX3 protein
LOC780933	LOC780933 Cationic trypsin
LOC784964	LOC784964 similar to Endopin 1b isoform 1
LTF	Lactotransferrin
MDH1	Malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)
MGC137014	MGC137014 Protein HP-20 homolog
MGC137211	Protein HP-25 homolog 2
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
MSTN	Myostatin
NME2	Nucleoside diphosphate kinase B
NUCB1	Nucleobindin 1
ORM1	Orosomuroid 1
P4HB	Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
PAFAH1B3	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma
PARK7	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7
PCPB1	Poly(rc)-binding protein 1
PEBP1	Phosphatidylethanolamine binding protein 1
PEBP4	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4
PFN1	Profilin 1
PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1 (brain)
PKM2	Similar to Pyruvate kinase, isozymes M1/M2 (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Cytosolic thyroid hormone-binding protein) (CTHBP) (THBP1); pyruvate kinase, muscle
PLBD2	Phospholipase B domain containing 2
PNP	Purine nucleoside phosphorylase
PPIA	Similar to trimcyp; peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A); peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 3
PPIB	Peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)
PRDX1	Peroxiredoxin 1
PRDX2	Peroxiredoxin 2
PRDX5	Peroxiredoxin 5
PRDX6	Peroxiredoxin 6
PSMA3	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3
PSMB2	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2
PSMD5	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-atpase, 5
PSME1	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)
RBP4	Retinol binding protein 4, plasma
RPSA	Ribosomal protein SA pseudogene 9
S100A11	S100 calcium binding protein A11
S100A12	S100 calcium binding protein A12
S100G	S100 calcium binding protein G
S10A4	Protein S100-A4

SAO	Primary amine oxidase, liver isozyme
SERA	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1
SERPINA3-1	Serpin A3-1
SERPINA3-7	Endopin 2
SERPINA3-8	Serpin A3-8
SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
SOD3	Superoxide dismutase 3, extracellular
SYNCRIP	Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein
TBA1B	Tubulin alpha-1B chain
TBB4A	Tubulin beta-4A chain
TBB4B	Tubulin beta-4B chain
TBB5	Tubulin beta-5 chain
TF	Transferrin
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
TKT	Transketolase
TPI1	Triosephosphate isomerase
TPM3	Tropomyosin 3
TUBA1C	Tubulin alpha-1C chain
TUBA1D	Tubulin alpha-1D chain
TXN	Thioredoxin
UBA1	Ubiquitin-like modifier activating enzyme 1
VCP	Transitional endoplasmic reticulum atpase
VPS4B	Vacuolar protein sorting 4 homolog B (S. Cerevisiae)
VTN	Vitronectin
WARS	Tryptophanyl-trna synthetase
WFDC2	WAP four-disulfide core domain 2
YWHAE	Similar to 14-3-3 protein epsilon (14-3-3E) (Mitochondrial import stimulation factor L subunit) (MSF L); tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide

Tabla elaborada a partir de datos publicados en: (Faulkner et al., 2012, Gómez et al., 2013, Muñoz et al., 2012a, Beltman et al., 2014)

### Anexo II Listado de genes agrupados (SOTA1)

Símbolo oficial	Acceso	Nombre
AADAC	NM_001075791.1	Arylacetamide deacetylase (esterase)
AARSD1	NM_001105482.1	Alanyl-trna synthetase domain containing 1
AATK	XM_588863.5	Apoptosis-associated tyrosine kinase
ABCA4	NM_174221.2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4
ABCC4	XM_002691921.1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4
ABCG1	NM_001205528.1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
ACBD7	NM_001113297.1	Acyl-coa binding domain containing 7
ACOT13	NM_001101845.1	Acyl-coa thioesterase 13
ACOX2	NM_001102015.1	Acyl-coa oxidase 2, branched chain
ACR	NM_173886.2	Acrosin

ACSL5	NM_001075650.1	Acyl-coa synthetase long-chain family member 5
ACSS3	NM_001102137.1	Acyl-coa synthetase short-chain family member 3
ACTL8	XM_002685796.1	Actin-like 8
ACY1	NM_001077115.1	Aminoacylase 1
ADAM21	XM_002691046.1	ADAM metallopeptidase domain 21
ADCK3	NM_001046419.1	Aarf domain containing kinase 3
ADCY2	XM_587884.5	Adenylate cyclase 2 (brain)
ADORA1	NM_174497.3	Adenosine A1 receptor
ADORA2B	NM_001075925.1	Adenosine A2b receptor
ADRBK2	NM_174500.2	Adrenergic, beta, receptor kinase 2
ADSSL1	NM_001099192.1	Adenylosuccinate synthase like 1
AFTPH	XM_002691387.1	Aftiphilin
AGA	NM_001075511.1	Aspartylglucosaminidase
AGAP3	XM_868297.3	Arfgap with gtpase domain, ankyrin repeat and PH domain 3
AGBL5	NM_001024564.1	ATP/GTP binding protein-like 5
AGMO	NM_001192973.1	Alkylglycerol monooxygenase
AGPAT4	NM_001015537.1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase-related)
AGR2	NM_001040500.1	Anterior gradient homolog 2 (Xenopus laevis)
AGR3	NM_001191502.1	Anterior gradient 3 homolog (Xenopus laevis)
AGRN	XM_002694193.1	Agrin
AGTRAP	NM_001075363.1	Angiotensin II receptor-associated protein
AIF1L	NM_001078079.1	Allograft inflammatory factor 1-like
AKAP9	XM_003582050.1	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9
AKD1	XM_002690132.1	Adenylate kinase domain containing 1
ALDH5A1	NM_001192735.1	Aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1
ALG13	XM_003584307.1	Asparagine-linked glycosylation 13 homolog (S. Cerevisiae)
ALG13	XM_003588141.3	UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit
ALMS1	XM_002691212.1	Alstrom syndrome 1
ALPI	NM_173987.1	Alkaline phosphatase, intestinal
AMN	NM_001077041.1	Amnionless homolog (mouse)
AMY2A	XM_002686164.1	Amylase, alpha 2A (pancreatic)
AMY2B	NM_001035016.1	Amylase, alpha 2B (pancreatic)
ANGEL1	XM_584939.6	Angel homolog 1 (Drosophila)
ANK2	XM_002688100.2	Ankyrin 2, neuronal
ANKH	NM_001109793.1	Ankylosis, progressive homolog (mouse)
ANKRD22	NM_001081579.1	Ankyrin repeat domain 22
ANKRD29	NM_001102104.1	Ankyrin repeat domain 29
ANKRD31	XM_002690414.1	Ankyrin repeat domain 31
ANKRD43	XM_585056.4	Ankyrin repeat domain 43
ANKRD5	XM_002692038.1	Ankyrin repeat domain 5
ANXA1	NM_175784.3	Annexin A1
AP1S1	NM_001077110.1	Adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit
AP4B1	NM_001101950.1	Adaptor-related protein complex 4, beta 1 subunit
APBB1	NM_001075186.1	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1
APC	NM_001075986.2	Adenomatous polyposis coli
APOH	NM_173992.1	Apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)

AQP4	NM_181003.2	Aquaporin 4
AQP6	XM_002687279.1	Aquaporin 6, kidney specific
ARHGAP24	NM_001102234.1	Rho gtpase activating protein 24
ARHGAP25	NM_001046392.1	Rho gtpase activating protein 25
ARHGDIG	NM_001076286.1	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma
ARL6	NM_001075782.1	ADP-ribosylation factor-like 6
ARMC12	XM_613263.5	Armadillo repeat containing 12
ARMC2	NM_001075801.2	Armadillo repeat containing 2
ARMC9	NM_001046418.1	Armadillo repeat containing 9
ARRDC5	NM_001128508.1	Arrestin domain containing 5
AS3MT	NM_001035023.1	Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase
ASB11	NM_001034413.1	Ankyrin repeat and SOCS box containing 11
ASB14	NM_001035070.2	Ankyrin repeat and SOCS box containing 14
ASB15	NM_174687.2	Ankyrin repeat and SOCS box containing 15
ASCL4	XM_612858.2	Achaete-scute complex homolog 4 (Drosophila)
ASGR1	NM_001037590.1	Asialoglycoprotein receptor 1
ASGR2	NM_001075952.1	Asialoglycoprotein receptor 2
ASNS	NM_001075653.1	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)
ASRGL1	NM_001077035.1	Asparaginase like 1
ATF3	NM_001046193.1	Activating transcription factor 3
ATF5	NM_001192422.1	Activating transcription factor 5
ATG13	NM_001076812.1	ATG13 autophagy related 13 homolog (S. Cerevisiae)
ATP8B2	NM_001191221.2	Atpase, class I, type 8B, member 2
AVEN	XM_002700566.2	Apoptosis, caspase activation inhibitor
AXDND1	XM_002694161.1	Axonemal dynein light chain domain containing 1
B3GALT2	NM_001076188.1	UDP-Gal:betaglcnac beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2
B3GAT2	NM_001014392.1	Beta-1,3-glucuronyltransferase 2 (glucuronosyltransferase 5)
B3GNT5	NM_001076979.1	UDP-glcnaac:betagal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5
B9D1	NM_001110064.2	B9 protein domain 1
B9D2	NM_001040593.1	B9 protein domain 2
BANF2	NM_001040559.1	Barrier to autointegration factor 2
BASP1	NM_174780.3	Brain abundant, membrane attached signal protein 1
BBS2	NM_001038160.1	Bardet-Biedl syndrome 2
BBS5	NM_001101132.1	Bardet-Biedl syndrome 5
BBS7	NM_001191346.2	Bardet-Biedl syndrome 7
BCAM	NM_174741.2	Basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)
BCAN	NM_173996.3	Brevican
BCAS1	NM_001077850.2	Breast carcinoma amplified sequence 1
BCAS4	NM_001076474.1	Breast carcinoma amplified sequence 4
BCL2L14	NM_001015544.1	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)
BEX2	NM_001077087.1	Brain expressed X-linked 2
BEX5	NM_001075735.1	Brain expressed, X-linked 5
BIN1	NM_001046541.1	Bridging integrator 1
BMPR1B	NM_001105328.1	Bone morphogenetic protein receptor, type IB
BNC2	XM_001789538.3	Basonuclin 2
BRAF	XM_864068.5	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

BREH1	NM_001012287.1	Retinyl ester hydrolase type 1
BSC12	NM_001015589.1	Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (seipin)
bta-mir-2464	ENSBTAT00000062734	Bta-mir-2464
BTC	NM_173896.2	Betacellulin
BTD	NM_001102206.1	Biotinidase
C10H14orf135	XM_003586585.1	Chromosome 10 open reading frame, human c14orf135
C10H14orf38	NM_001038221.1	Chromosome 10 open reading frame, human c14orf38
C10H15orf23	NM_001038055.1	Chromosome 10 open reading frame, human c15orf23
C10H15orf33	XM_002690974.1	Chromosome 10 open reading frame, human c15orf33
C10H15orf48	NM_001206976.1	Chromosome 10 open reading frame, human c15orf48
C11H2orf65	XM_614936.4	Chromosome 11 open reading frame, human c2orf65
C11H2orf73	NM_001101283.1	Chromosome 11 open reading frame, human c2orf73
C11H9orf167	XM_870775.4	Chromosome 11 open reading frame, human c9orf167
C13H20orf108	NM_001080278.1	Chromosome 13 open reading frame, human c20orf108
C13H20orf195	NM_001079622.1	Chromosome 13 open reading frame, human c20orf195
C13H20orf96	XM_002692430.1	Chromosome 13 open reading frame, human c20orf96
C15H11orf49	NM_001038037.1	Chromosome 15 open reading frame, human c11orf49
C15H11orf70	NM_001046598.1	Chromosome 15 open reading frame, human c11orf70
C15H11orf88	NM_001077028.1	Chromosome 15 open reading frame, human c11orf88
C16H1orf53	XM_001250233.4	Uncharacterized LOC781739
C16orf46	ENSBTAT00000032575	Chromosome 16 open reading frame 46
C17H5orf52	NM_001145133.1	Chromosome 17 open reading frame, human c5orf52
C19H17orf109	NM_001163000.1	Chromosome 19 open reading frame, human c17orf109
C19H17orf28	NM_001076924.1	Chromosome 19 open reading frame, human c17orf28
C19H17orf76	XM_586543.4	Chromosome 19 open reading frame, human c17orf76
C1H21orf2	NM_001075781.1	Chromosome 1 open reading frame, human c21orf2
C1H21orf63	NM_001199027.1	Chromosome 1 open reading frame, human c21orf63
C1H3orf15	XM_003581704.1	Chromosome 1 open reading frame, human c3orf15
C1H3orf52	XM_865244.4	Chromosome 1 open reading frame, human c3orf52
C1orf233	ENSBTAT00000065101	Chromosome 1 open reading frame 233
C21H14orf129	NM_001078056.1	Chromosome 21 open reading frame, human c14orf129
C21H14orf132	XM_870197.3	Chromosome 21 open reading frame, human c14orf132
C21H14orf142	NM_001166559.1	Chromosome 21 open reading frame, human c14orf142
C21H15orf26	NM_001075536.1	Chromosome 21 open reading frame, human c15orf26
C21H15orf39	XM_002696677.2	Chromosome 21 open reading frame, human c15orf39
C22H3orf24	NM_001077121.1	Chromosome 22 open reading frame, human c3orf24
C23H6orf141	NM_001145653.1	Chromosome 23 open reading frame, human c6orf141
C25H16orf54	NM_001105033.1	Chromosome 25 open reading frame, human c16orf54
C25H16orf89	XM_002697889.2	Chromosome 25 open reading frame, human c16orf89
C26H10orf46	XM_002698541.2	Chromosome 26 open reading frame, human c10orf46
C27H4orf47	NM_001038136.1	Chromosome 27 open reading frame, human c4orf47
C27H8orf40	NM_001098040.2	Chromosome 27 open reading frame, human c8orf40
C28H10orf107	NM_001244348.1	Chromosome 28 open reading frame, human c10orf107
C28H10orf27	NM_001038121.2	Chromosome 28 open reading frame, human c10orf27
C28H10orf99	XM_002698933.1	Chromosome 28 open reading frame, human c10orf99
C29H11orf9	XM_586725.6	Chromosome 29 open reading frame, human c11orf9

C2CD4D	XM_001254822.2	C2 calcium-dependent domain containing 4D
C2H1orf201	NM_001102304.1	Chromosome 2 open reading frame, human c1orf201
C2H2orf77	XM_002685306.1	Chromosome 2 open reading frame, human c2orf77
C3H1orf110	NM_001076462.1	Coiled-coil domain-containing protein c1orf110 homolog
C3H1orf111	NM_001046460.1	Chromosome 3 open reading frame, human c1orf111
C3H1orf141	NM_001077091.1	Chromosome 3 open reading frame, human c1orf141
C3H1orf168	XM_002707810.2	Chromosome 3 open reading frame, human c1orf168
C3H1orf88	XM_002686144.1	Chromosome 3 open reading frame, human c1orf88
C3orf49	ENSBTAT00000053491	Uncharacterized protein
C4BPA	NM_174252.2	Complement component 4 binding protein, alpha
C5H12orf63	XM_002687523.2	Chromosome 5 open reading frame, human c12orf63
C6	NM_001045979.1	Complement component 6
C6H4orf19	NM_001104973.1	Chromosome 6 open reading frame, human c4orf19
C6H4orf37	XM_002688130.1	Chromosome 6 open reading frame, human c4orf37
C6orf183	ENSBTAT00000064270	Chromosome 6 open reading frame 183
C7H19orf57	XM_866273.4	Chromosome 7 open reading frame, human c19orf57
C7H19orf70	XM_613885.4	Chromosome 7 open reading frame, human c19orf70
C7H19orf71	ENSBTAT00000019944	Uncharacterized protein c19orf71 homolog
C7H5orf63	XM_002688977.1	Chromosome 7 open reading frame, human c5orf63
C9H6orf118	NM_001046213.1	Chromosome 9 open reading frame, human c6orf118
C9H6orf225	NM_001195067.1	Chromosome 9 open reading frame, human c6orf225
C9H6orf72	NM_001038509.1	Chromosome 9 open reading frame, human c6orf72
CA2	NM_178572.2	Carbonic anhydrase II
CA8	NM_001083690.1	Carbonic anhydrase VIII
CA9	XM_002689698.1	Carbonic anhydrase IX
CABYR	NM_001038067.1	Calcium binding tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated
CACNA2D4	XM_002707821.1	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 4
CACNB2	NM_175789.2	Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
CACNB3	NM_174509.3	Calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit
CACNG4	XM_871022.5	Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4
CADPS	NM_001076020.1	Ca <sup>+++</sup> -dependent secretion activator
CADPS2	NM_001102055.1	Ca <sup>+++</sup> -dependent secretion activator 2
CAGE1	XM_606238.5	Cancer antigen 1
CALM1	NM_001242572.1	Calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
CALML4	NM_001034671.1	Calmodulin-like 4
CALML6	XM_003583246.1	Calmodulin-like 6
CAMK1D	XM_605252.4	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID
CAMK2N2	NM_001114514.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2
CAMKK1	NM_001192251.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha
CAPN14	NM_001192425.1	Calpain 14
CAPS2	XM_003582174.1	Calcyphosine 2
CARNS1	ENSBTAT00000023529	Carnosine synthase 1
CASC1	NM_001046282.1	Cancer susceptibility candidate 1
CBLC	NM_001101248.1	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence c
CBLN4	NM_001081537.1	Cerebellin 4 precursor
CC2D2A	XM_595408.5	Coiled-coil and C2 domain containing 2A

CCBE1	XM_614377.5	Collagen and calcium binding EGF domains 1
CCDC103	XM_002696045.1	Coiled-coil domain containing 103
CCDC104	NM_001034453.1	Coiled-coil domain containing 104
CCDC108	ENSBTAT00000013615	Coiled-coil domain containing 108
CCDC14	NM_001105469.1	Coiled-coil domain containing 14
CCDC146	NM_001205487.1	Coiled-coil domain containing 146
CCDC147	XM_617064.6	Coiled-coil domain containing 147
CCDC148	XM_865557.4	Coiled-coil domain containing 148
CCDC150	XM_002685477.1	Coiled-coil domain containing 150
CCDC158	XM_002688358.1	Coiled-coil domain containing 158
CCDC162P	XR_084196.2	Coiled-coil domain containing 162, pseudogene
CCDC30	XM_002704019.2	Coiled-coil domain containing 30
CCDC39	NM_001206056.1	Coiled-coil domain containing 39
CCDC40	XM_608246.5	Coiled-coil domain containing 40
CCDC41	NM_001206525.1	Coiled-coil domain containing 41
CCDC46	XM_003584749.1	Coiled-coil domain containing 46-like
CCDC50	NM_001038147.1	Coiled-coil domain containing 50
CCDC57	XM_002696133.2	Coiled-coil domain containing 57
CCDC67	NM_001206892.1	Coiled-coil domain containing 67
CCDC69	NM_001206624.1	Coiled-coil domain containing 69
CCDC73	NM_001192547.1	Coiled-coil domain containing 73
CCDC88C	NM_001102017.1	Coiled-coil domain containing 88C
CCDC91	NM_001193032.1	Coiled-coil domain containing 91
CCDC96	NM_001103314.1	Coiled-coil domain containing 96
CCL26	NM_001205635.1	Chemokine (C-C motif) ligand 26
CCNA1	XM_600212.5	Cyclin A1
CCND2	NM_001076372.1	Cyclin D2
CCNO	XM_003585112.1	Cyclin O
CD177	NM_001099155.1	CD177 molecule
CD247	NM_174012.2	CD247 molecule
CD46	NM_001242564.1	CD46 molecule, complement regulatory protein
CD55	NM_001030303.1	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer)
CDC14A	XM_003585862.1	CDC14 cell division cycle 14 homolog A (S. Cerevisiae)
CDC14B	NM_001193238.1	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. Cerevisiae)
CDC25A	NM_001101100.1	Cell division cycle 25 homolog A (S. Pombe)
CDC25C	NM_001097996.1	Cell division cycle 25 homolog C (S. Pombe)
CDC42BPA	NM_001192937.1	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
CDH24	XM_002700557.2	Cadherin 24, type 2
CDH26	XM_869285.3	Cadherin 26
CDHR4	NM_001191232.1	Cadherin-related family member 4
CDK18	NM_001083473.1	Cyclin-dependent kinase 18
CDK5RAP2	NM_001192169.1	CDK5 regulatory subunit associated protein 2
CDKN1A	NM_001098958.1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
CDKN2C	NM_001101054.1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
CEBPE	NM_001192808.1	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon
CELA1	NM_174048.1	Chymotrypsin-like elastase family, member 1



CELA2A	NM_174714.2	Chymotrypsin-like elastase family, member 2A
CELF5	XM_610805.5	CUGBP, Elav-like family member 5
CELF6	NM_001205644.1	CUGBP, Elav-like family member 6
CENPT	NM_001101969.1	Centromere protein T
CEP104	XM_001252419.3	Centrosomal protein 104kda
CEP290	NM_174722.2	Centrosomal protein 290kda
CEP350	XM_002694164.2	Centrosomal protein 350kda
CEP72	XM_002696469.1	Centrosomal protein 72kda
CEP89	XM_003583398.1	Centrosomal protein 89kda
CEPT1	NM_001193130.1	Choline/ethanolamine phosphotransferase 1
CERKL	XM_002685268.1	Ceramide kinase-like
CES1	NM_001046018.1	Carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)
CGN	NM_001192786.1	Cingulin
CHADL	ENSBTAT00000055322	Chondroadherin-like
CHCHD6	NM_001076402.1	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6
CHDH	NM_001205564.1	Choline dehydrogenase
CHI3L2	XM_003585850.1	Chitinase-3-like protein 2-like
CHIA	NM_174699.2	Chitinase, acidic
CHMP4C	NM_001045976.1	Charged multivesicular body protein 4C
CHN2	NM_001045963.1	Chimerin (chimaerin) 2
CHST4	NM_001076145.1	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 4
CHST8	NM_001145992.1	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 8
CIDEB	NM_001034567.1	Cell death-inducing DFFA-like effector b
CIST1	NM_001075271.1	Intestine-specific transcript 1 protein
CITED1	NM_174518.1	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-
CKM	NM_174773.3	Creatine kinase, muscle
CKMT1B	NM_174275.2	Creatine kinase, mitochondrial 1B
CLDN11	NM_001035055.1	Claudin 11
CLDN3	NM_205801.2	Claudin 3
CLDN9	XM_002697935.1	Claudin 9
CLGN	NM_001034205.1	Calmegin
CLIC1	NM_001015608.1	Chloride intracellular channel 1
CLINT1	NM_001105417.1	Clathrin interactor 1
CLMN	XM_002696763.1	Calmin (calponin-like, transmembrane)
CLU	NM_173902.2	Clusterin
CNR1	NM_001242341.1	Cannabinoid receptor 1 (brain)
CNTD2	XR_083919.1	G2/mitotic-specific cyclin-B2-like
COLEC11	NM_001076303.1	Collectin sub-family member 11
COMMD9	NM_001038520.1	COMM domain containing 9
CPEB3	NM_001193228.1	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3
CPNE5	NM_001205639.1	Copine V
CPNE7	XM_002694766.2	Copine VII
CRB1	NM_001192482.1	Crumbs homolog 1 (Drosophila)
CREB3L4	XM_002685996.1	Camp responsive element binding protein 3-like 4
CRTAC1	NM_001191289.2	Cartilage acidic protein 1
CRYBB1	NM_174526.2	Crystallin, beta B1

CSN1S1	NM_181029.2	Casein alpha s1
CSPP1	NM_001193015.2	Centrosome and spindle pole associated protein 1
CSRP1	NM_001083771.1	Cysteine and glycine-rich protein 1
CTAGE5	NM_001075599.1	CTAGE family, member 5
CTNNA2	XM_010810060.1	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 2
CTNND2	XM_002696428.2	Catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-1)
CTPS	NM_001077858.1	CTP synthase
CTSC	NM_001033617.1	Cathepsin C
CTSL1	NM_001083686.1	Cathepsin L1
CTXN1	NM_001105494.1	Cortexin 1
CUEDC2	NM_001075737.1	CUE domain containing 2
CX3CL1	XM_595523.5	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
CXHXorf22	XM_002700184.1	Chromosome X open reading frame, human cxorf22
CXHXorf58	NM_001102023.1	Chromosome X open reading frame, human cxorf58
CYB561D2	NM_001014937.2	Cytochrome b-561 domain containing 2
CYB5D1	NM_001192138.1	Cytochrome b5 domain containing 1
CYP2S1	NM_001100366.1	Cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1
CYP3A4	NM_001099367.1	Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 4
CYP3A5	NM_174531.2	Cytochrome P450, subfamily IIIA (niphedipine oxidase), polypeptide 5
CYP4A11	NM_001077908.1	Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11
DAB1	XM_003582007.1	Disabled homolog 1 (Drosophila)
DAPK2	XM_010809297.1	Death-associated protein kinase 2
DBNDD2	NM_001130748.1	Dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 2
DCAF15	NM_001034685.1	DDB1 and CUL4 associated factor 15
DCDC1	NM_001076434.1	Doublecortin domain containing 1
DCHS2	ENSBTAT00000017605	Dachsous cadherin-related 2
DCLK3	XM_003583775.1	Serine/threonine-protein kinase DCLK3-like
DCXR	NM_001075891.1	Dicarbonyl/L-xylulose reductase
DDN	NM_001102301.1	Dendrin
DDO	NM_173908.2	D-aspartate oxidase
DDX25	NM_001038517.1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 25
DEDD2	NM_001076017.1	Death effector domain containing 2
DEFB	NM_001078133.1	Defensin, beta
DHCR7	NM_001014927.1	7-dehydrocholesterol reductase
DHRS7	NM_001046162.1	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7
DHRSX	XM_591168.5	Dehydrogenase/reductase (SDR family) X-linked
DHX32	NM_001101144.1	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 32
DIDO1	XM_003582945.1	Death inducer-obliterator 1
DIXDC1	XM_002693011.2	DIX domain containing 1
DLG2	XM_003584226.1	Discs, large homolog 2 (Drosophila)
DLX4	NM_001098041.1	Distal-less homeobox 4
DMGDH	NM_001205545.1	Dimethylglycine dehydrogenase
DMRT1	NM_001078060.1	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1
DMXL1	XM_002688999.2	Dmx-like 1
DMXL2	XM_002690967.2	Dmx-like 2
DNAJB1	NM_001033763.1	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1

DNAJB2	NM_001034592.1	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2
DNAJC10	NM_001099121.1	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10
DNAJC12	NM_174096.2	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12
DNAL4	NM_001080918.1	Dynein, axonemal, light chain 4
DNM3	NM_001243284.1	Dynamamin 3
DOC2G	NM_001076499.1	Double C2, gamma
DPY19L2	NM_001206782.1	Dpy-19-like 2 (C. Elegans)
DSC2	NM_001166526.1	Desmocollin 2
DSC3	NM_001178103.1	Desmocollin 3
DSG2	NM_001192172.2	Desmoglein 2
DTNB	NM_001192800.1	Dystrobrevin, beta
DTX3	NM_001105393.1	Deltex homolog 3 (Drosophila)
DYNC2H1	XM_010812295.1	Dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1
DYNC2LI1	NM_001038051.1	Dynein, cytoplasmic 2, light intermediate chain 1
DYRK3	NM_001100298.1	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3
DYX1C1	NM_001206188.1	Dyslexia susceptibility 1 candidate 1
EAF2	NM_001046507.1	ELL associated factor 2
EBPL	NM_001205739.1	Emopamil binding protein-like
ECHDC2	NM_001038536.1	Enoyl coa hydratase domain containing 2
EEF2K	NM_001192542.1	Eukaryotic elongation factor-2 kinase
EFCAB11	XM_869611.4	EF-hand calcium binding domain 11
EFCAB2	NM_001101247.1	EF-hand calcium binding domain 2
EGFL6	XM_002707423.1	EGF-like-domain, multiple 6
EGLN3	NM_001101164.1	Egl nine homolog 3 (C. Elegans)
EIF4E3	NM_001102306.1	Eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3
ELL3	NM_001046126.1	Elongation factor RNA polymerase II-like 3
ELMO3	NM_001102091.1	Engulfment and cell motility 3
ELMOD1	NM_001078108.1	ELMO/CED-12 domain containing 1
EMC9	XM_002690497.1	ER membrane protein complex subunit 9
EML3	NM_001101846.1	Echinoderm microtubule associated protein like 3
ENDOD1	NM_001102519.1	Endonuclease domain containing 1
ENTPD3	NM_001017935.1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3
EPB41L3	NM_001206169.1	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3
EPB41L4A	ENSBTAT00000019627	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4A
EPCAM	NM_001035290.1	Epithelial cell adhesion molecule
EPHB6	ENSBTAT00000033428	Ephrin type-B receptor 6 precursor
EPHX1	NM_001034629.1	Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)
EPHX2	NM_001075534.1	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic
EPN3	NM_001046434.1	Epsin 3
ERAP1	NM_001102003.1	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
ERBB4	XM_003581865.1	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
ERGIC1	NM_001076417.1	Endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1
ESD	NM_001076065.1	Esterase D
ESM1	NM_001098101.1	Endothelial cell-specific molecule 1
ESRP1	NM_001193002.1	Epithelial splicing regulatory protein 1
ESRP2	NM_001205685.1	Epithelial splicing regulatory protein 2

ESRRB	XM_003586599.1	Estrogen-related receptor beta
ETNK2	XM_612564.5	Ethanolamine kinase 2
EXPI	NM_001205278.1	Extracellular proteinase inhibitor
EXTL3	NM_001082473.1	Exostoses (multiple)-like 3
EYA1	XM_003586894.1	Eyes absent homolog 1 (Drosophila)
EZR	NM_174217.2	Ezrin
FAAH	NM_001099102.1	Fatty acid amide hydrolase
FAH	NM_001098912.1	Fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)
FAM102B	XM_592474.5	Family with sequence similarity 102, member B
FAM103A1	NM_001034757.1	Family with sequence similarity 103, member A1
FAM110B	NM_001077018.1	Family with sequence similarity 110, member B
FAM118A	NM_001038035.2	Family with sequence similarity 118, member A
FAM132A	XM_002694132.1	Family with sequence similarity 132, member A
FAM132B	ENSBTAT00000042641	Family with sequence similarity 132, member B
FAM160A1	XM_607376.6	Family with sequence similarity 160, member A1
FAM164C	XM_611651.2	Family with sequence similarity 164, member C
FAM181A	XM_002696759.1	Family with sequence similarity 181, member A
FAM184A	XM_614661.5	Family with sequence similarity 184, member A
FAM186B	XM_002687302.2	Family with sequence similarity 186, member B
FAM216A	NM_001035480.1	Chromosome 17 open reading frame, human c12orf24
FAM26F	NM_001206235.1	Family with sequence similarity 26, member F
FAM3D	XM_865037.3	Family with sequence similarity 3, member D
FAM46A	XM_592539.6	Family with sequence similarity 46, member A
FAM47E	XM_585328.4	Family with sequence similarity 47, member E
FAM60A	NM_001076116.1	Family with sequence similarity 60, member A
FAM81A	XM_002690852.1	Family with sequence similarity 81, member A
FAM82A1	NM_001040508.1	Family with sequence similarity 82, member A1
FAM83H	XM_002692552.2	Family with sequence similarity 83, member H
FAM84A	NM_001034659.1	Family with sequence similarity 84, member A
FBP1	NM_001034447.1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
FBP2	NM_001046164.1	Fructose-1,6-bisphosphatase 2
FBRSL1	XM_003583300.1	Fibrosin-1-like protein-like
FBXL13	XM_005205376.2	F-box and leucine-rich repeat protein 13
FBXL22	NM_001046156.1	F-box and leucine-rich repeat protein 22
FBXO36	NM_001082617.1	F-box protein 36
FBXO42	NM_001046287.1	F-box protein 42
FBXW10	XM_001789314.3	F-box and WD repeat domain containing 10
FCAMR	ENSBTAT00000026382	Fc receptor, iga, igm, high affinity
FCGR2	NM_174539.2	Fc fragment of igg, low affinity iib, receptor (CD32)
FCGRT	NM_176657.1	Fc fragment of igg, receptor, transporter, alpha
FGFR2	NM_001205310.1	Fibroblast growth factor receptor 2
FGFR4	NM_001192584.1	Fibroblast growth factor receptor 4
FIGF	NM_001101043.1	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)
FJX1	XM_003584883.1	Four jointed box 1 (Drosophila)
FKBP5	NM_001192862.1	FK506 binding protein 5
FLNC	NM_001206990.1	Filamin C, gamma

FLRT3	NM_001192674.1	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3
FMN1	XM_001253931.4	Formin 1
FMO2	NM_001163274.1	Flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)
FMO3	NM_174057.2	Flavin containing monooxygenase 3
FOXP4	NM_001205524.1	Forkhead box P4
FRK	XM_586141.5	Fyn-related kinase
FUT5	NM_176851.1	Fucosyltransferase 5 (alpha (1,3) fucosyltransferase)
FXYD3	NM_001079646.1	FXYD domain containing ion transport regulator 3
FYB	NM_001105414.1	FYN binding protein
FZD8	XM_869051.5	Frizzled family receptor 8
G6PD	NM_001244135.1	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GABRA5	NM_001075844.1	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5
GALNT3	NM_001192858.1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-
GALNT4	NM_001103321.1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-
GALNT5	NM_001143859.1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-
GALNT7	XM_602855.3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-
GAS8	NM_001097569.1	Growth arrest-specific 8
GATA6	XM_002697727.1	GATA binding protein 6
GCAT	NM_001075134.1	Glycine C-acetyltransferase
GCHFR	NM_001114526.1	GTP cyclohydrolase I feedback regulator
GFPT1	NM_001109961.1	Glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1
GFRA3	NM_001083747.1	GNDF family receptor alpha 3
GGT6	NM_001105434.1	Gamma-glutamyltransferase 6
GHRL	NM_174067.2	Ghrelin/obestatin prepropeptide
GJB1	ENSBTAT00000027331	Gap junction protein, beta 1, 32kda
GJB7	XM_003586474.1	Gap junction protein, beta 7, 25kda
GLB1	NM_001035043.1	Galactosidase, beta 1
GLCE	NM_174070.2	Glucuronic acid epimerase
GLRA3	XM_002689452.1	Glycine receptor, alpha 3
GNA14	NM_174323.2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 14
GNG13	NM_001206332.1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13
GNG2	NM_174072.3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2
GNPTAB	NM_001192228.1	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta
GOLPH3L	NM_001099052.1	Golgi phosphoprotein 3-like
GPAA1	NM_001024529.1	Glycosylphosphatidylinositol anchor attachment protein 1 homolog
GPD1	NM_001035354.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)
GPR110	NM_001192327.1	G protein-coupled receptor 110
GPR144	XM_002700871.1	G protein-coupled receptor 144
GPR171	NM_001077002.1	G protein-coupled receptor 171
GPR19	NM_001101214.1	G protein-coupled receptor 19
GPR56	ENSBTAT00000066025	G protein-coupled receptor 56
GPR98	XM_617188.6	G protein-coupled receptor 98
GPRIN3	XM_002688165.2	GPRIN family member 3
GPT	NM_001083740.1	Glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase)
GPX2	NM_001163139.1	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
GRAMD1A	XM_002701855.2	GRAM domain containing 1A

GRIA1	XM_002704887.2	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1
GRID1	XM_003584210.1	Glutamate receptor, ionotropic, delta 1
GRIN2B	NM_001192921.1	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B
GRIP1	ENSBTAT00000063440	Glutamate receptor interacting protein 1
GRM3	NM_001098123.1	Glutamate receptor, metabotropic 3
GSDMB	NM_001244217.1	Gasdermin B
GSDMC	NM_001046004.1	Gasdermin C
GSTA2	NM_177515.2	Glutathione S-transferase alpha 2
GSTA3	NM_001078149.1	Glutathione S-transferase alpha 3
GSTA5	NM_001099016.1	Glutathione S-transferase alpha 5
GSTO1	XM_003587877.1	Glutathione S-transferase omega 1
GUCY1A2	NM_001191341.1	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2
GULO	NM_001034043.1	L-gulono-gamma-lactone oxidase
H2AFY2	NM_001076086.1	H2A histone family, member Y2
HAPLN2	NM_001075684.1	Hyaluronan and proteoglycan link protein 2
HBA1	XM_001788676.3	Hemoglobin, alpha 1
HCAR3	XM_002701703.1	Hydroxycarboxylic acid receptor 3
HDAC10	NM_001075460.1	Histone deacetylase 10
HEPACAM	NM_001031759.2	Hepatic and glial cell adhesion molecule
HEPACAM2	NM_001101974.1	HEPACAM family member 2
HERC6	NM_001192644.1	Hect domain and RLD 6
HESX1	NM_001191140.1	HESX homeobox 1
HGSNAT	XM_002698729.1	Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase
HHATL	ENSBTAT00000047533	Hedgehog acyltransferase-like
HIF1A	NM_174339.3	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix
HM13	NM_001046124.2	Histocompatibility (minor) 13
HOGA1	NM_001075237.1	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1
HOMER2	NM_001075467.1	Homer homolog 2 (Drosophila)
HOOK1	NM_001206870.1	Hook homolog 1 (Drosophila)
HOXB2	NM_001191335.1	Homeobox B2
HOXC5	NM_001191351.1	Homeobox C5
HPCA	NM_001025328.2	Hippocalcin
HPSE	NM_174082.2	Heparanase
HRASLS	NM_001076225.2	HRAS-like suppressor
HS3ST1	ENSBTAT00000009799	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1
HS3ST5	NM_001076215.1	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 5
HS6ST2	NM_001206635.1	Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2
HSD11B1L	NM_206969.1	Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1-like
HSP90AA1	NM_001012670.2	Heat shock protein 90kda alpha (cytosolic), class A member 1
HSPA1A	NM_203322.2	Heat shock 70kda protein 1A
HSPA4L	XM_002707745.2	Heat shock 70kda protein 4-like
HSPA6	XM_589747.3	Heat shock 70kda protein 6 (HSP70B')
HSPH1	NM_001075302.1	Heat shock 105kda/110kda protein 1
HUS1	NM_001079592.1	HUS1 checkpoint homolog (S. Pombe)
ICAM5	NM_001113762.1	Intercellular adhesion molecule 5, telencephalin
IDNK	XM_003585184.1	Idnk, gluconokinase homolog (E. Coli)

IDS	NM_001192851.1	Iduronate 2-sulfatase
IFFO2	XM_001255600.2	Intermediate filament family orphan 2
IFI30	NM_001101251.1	Interferon, gamma-inducible protein 30
IFI44L	XM_001789353.3	Interferon-induced protein 44-like
IFLTD1	XM_002687733.2	Intermediate filament tail domain containing 1
IFT122	NM_001206592.1	Intraflagellar transport 122 homolog (Chlamydomonas)
IFT27	ENSBTAT00000008157	Intraflagellar transport 27
IFT43	NM_001040521.1	Intraflagellar transport 43 homolog (Chlamydomonas)
IFT52	NM_001038101.1	Intraflagellar transport 52 homolog (Chlamydomonas)
IFT74	NM_001205775.1	Intraflagellar transport 74 homolog (Chlamydomonas)
IFT80	NM_001098959.1	Intraflagellar transport 80 homolog (Chlamydomonas)
IFT81	NM_001081525.1	Intraflagellar transport 81 homolog (Chlamydomonas)
IGFBP5	NM_001105327.1	Insulin-like growth factor binding protein 5
IGSF5	NM_001206780.1	Immunoglobulin superfamily, member 5
IKBKE	NM_001046345.1	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase
IL17B	NM_001192045.1	Interleukin 17B
IL1R1	NM_001206735.1	Interleukin 1 receptor, type I
IL9R	ENSBTAT00000009944	Interleukin 9 receptor
INSL5	NM_001206131.1	Insulin-like 5
INTS3	NM_001193087.1	Integrator complex subunit 3
IQCH	XM_003582656.1	IQ motif containing H
IQCK	NM_001192088.1	IQ motif containing K
IRF2BPL	XM_002691124.1	Interferon regulatory factor 2 binding protein-like
ITGA7	NM_001191305.1	Integrin, alpha 7
ITM2B	NM_001035093.1	Integral membrane protein 2B
ITPKA	NM_001083519.1	Inositol-trisphosphate 3-kinase A
ITPRIPL2	XM_002698040.1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 2
JAM2	NM_001083736.1	Junctional adhesion molecule 2
KAZALD1	XM_869707.3	Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1
KBTBD10	NM_001083377.1	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10
KBTBD5	NM_001015598.1	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 5
KBTBD6	ENSBTAT00000011412	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 6
KCNA5	NM_001015552.1	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily,
KCNE3	XM_606161.1	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3
KCNH2	NM_001099101.1	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related),
KCNK1	NM_001075207.1	Potassium channel, subfamily K, member 1
KCNMB2	NM_001080300.1	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily
KCNN3	XM_003585828.1	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated
KCNQ4	XM_002686538.2	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 4
KCNRG	NM_205808.1	Potassium channel regulator
KCTD7	NM_001102545.1	Potassium channel tetramerisation domain containing 7
KIAA0195	XM_002696179.2	KIAA0195 ortholog
KIAA0319	XM_003587725.1	KIAA0319 ortholog
KIAA0319L	XM_002686480.1	KIAA0319-like ortholog
KIAA0564	XM_602479.6	KIAA0564 ortholog
KIAA1257	XM_002707781.2	KIAA1257 ortholog

KIAA1370	XM_601152.4	KIAA1370 ortholog
KIAA1377	ENSBTAT00000026683	Uncharacterized protein
KIAA1383	NM_001098148.1	KIAA1383 ortholog
KIAA1407	XM_002684755.1	KIAA1407 ortholog
KIAA1456	NM_001076832.1	Putative methyltransferase KIAA1456 homolog
KIAA1462	NM_001082474.1	KIAA1462 ortholog
KIAA1751	XM_001788491.3	KIAA1751 ortholog
KIF12	XM_003586439.1	Kinesin family member 12
KIF13A	XM_002697576.2	Kinesin family member 13A
KIF17	NM_001105212.1	Kinesin family member 17
KIF19	XM_003583654.1	Kinesin family member 19
KIF23	NM_001098038.1	Kinesin family member 23
KIF27	NM_001206123.1	Kinesin family member 27
KLF13	NM_001083533.1	Kruppel-like factor 13
KLHDC7A	XM_608636.3	Kelch domain containing 7A
KLHL33	NM_001166652.1	Kelch-like 33 (Drosophila)
KREMEN1	XM_602679.6	Kringle containing transmembrane protein 1
KRT15	NM_001130747.1	Keratin 15
KRT17	NM_001105322.1	Keratin 17
KRT19	NM_001015600.3	Keratin 19
KRT7	NM_001046411.1	Keratin 7
KRT76	XM_003584897.1	Keratin 76
KSR1	XM_001788749.2	Kinase suppressor of ras 1
LAMA1	XM_002697797.1	Laminin, alpha 1
LAMA3	XM_001787272.1	Laminin, alpha 3
LCAT	NM_001046069.1	Lecithin-cholesterol acyltransferase
LCORL	NM_001192357.1	Ligand dependent nuclear receptor corepressor-like
LDLRAD3	NM_001192619.1	Low density lipoprotein receptor class A domain containing 3
LEKR1	XM_001253692.4	Leucine, glutamate and lysine rich 1
LENEP	ENSBTAT00000064328	Lens epithelial protein
LGR5	NM_001192520.1	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LHB	NM_173930.1	Luteinizing hormone beta polypeptide
LIMCH1	NM_001191521.1	LIM and calponin homology domains 1
LINGO1	XM_002696672.2	Leucine rich repeat and Ig domain containing 1
LMAN1L	XM_002696679.2	Lectin, mannose-binding, 1 like
LMO1	NM_001075895.1	LIM domain only 1 (rhombotin 1)
LNP1	NM_001205535.1	Leukemia NUP98 fusion partner 1
LNX1	NM_001076234.2	Ligand of numb-protein X 1
LOC100125925	NM_001105495.1	UPF0638 protein B
LOC100137759	XM_003588069.1	N-acetyl-beta-glucosaminyl-glycoprotein 4-beta-N-
LOC100137867	XM_002687968.2	Uncharacterized LOC100137867
LOC100138149	XM_001788182.1	Uncharacterized LOC100138149
LOC100138302	NR_045130.1	Magnesium transporter 1-like protein
LOC100138424	XM_001787878.1	Protein shisa-3 homolog
LOC100138522	XM_001787835.2	Uncharacterized LOC100138522
LOC100138523	XM_002686584.1	Rcg55642-like



LOC100138641	ENSBTAT00000035828	Glutathione S-transferase A1-like
LOC100138645	XM_002702221.1	Primary amine oxidase, liver isozyme-like
LOC100138733	XM_001787397.2	Envelope polyprotein-like
LOC100138921	XM_002691697.1	Uncharacterized LOC100138921
LOC100139041	XM_002695657.1	Hcg2045411-like
LOC100139238	XM_001789089.1	Matrilin 1, cartilage matrix protein-like
LOC100140018	XM_001788131.2	Cytochrome P450 2J2-like
LOC100140403	XM_003586350.1	Uncharacterized LOC100140403
LOC100295089	XM_002691394.1	Uncharacterized LOC100295089
LOC100295232	XM_002703858.2	Uncharacterized LOC100295232
LOC100295298	XM_002685287.2	Uncharacterized LOC100295298
LOC100295531	XM_002702159.1	Uncharacterized LOC100295531
LOC100295688	XM_002687291.1	Uncharacterized LOC100295688
LOC100295741	XM_002697929.2	Uncharacterized LOC100295741
LOC100295883	XM_002688556.1	Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2-like
LOC100296018	XM_002697801.1	Uncharacterized LOC100296018
LOC100296081	XM_002703015.1	Uncharacterized LOC100296081
LOC100296173	XM_002698619.1	Beta defensin
LOC100296257	XM_002704677.2	Uncharacterized LOC100296257
LOC100296273	XM_003584616.1	Butyrophilin, subfamily 1, member A1-like
LOC100296370	XM_002704226.1	Uncharacterized LOC100296370
LOC100296596	XM_002705027.1	Uncharacterized LOC100296596
LOC100296618	XM_002702097.1	Extracellular peptidase inhibitor-like
LOC100296742	XM_002701118.1	Beta-defensin 142
LOC100296964	XM_002701171.2	Uncharacterized LOC100296964
LOC100296992	XM_002696429.2	Uncharacterized LOC100296992
LOC100297185	XM_002690893.2	Uncharacterized LOC100297185
LOC100297903	XM_002687717.1	Uncharacterized LOC100297903
LOC100298352	XM_002698129.1	Uncharacterized LOC100298352
LOC100298364	XM_002698640.1	Defensin, beta 1-like
LOC100298507	XM_002698083.1	Uncharacterized LOC100298507
LOC100298871	XR_139124.1	Thyroid receptor-interacting protein 6-like
LOC100298890	XM_002688414.2	High-mobility group 20A-like
LOC100299023	XM_003583421.1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 14-like
LOC100299715	XR_807450.1	Fatty acid-binding protein, heart
LOC100299970	XM_002692782.1	Uncharacterized LOC100299970
LOC100300738	XM_002692136.1	Uncharacterized LOC100300738
LOC100301295	XM_003587466.1	UPF0450 protein c17orf58-like
LOC100301420	XM_002683613.2	Uncharacterized LOC100301420
LOC100302586	NM_001163727.1	Uncharacterized LOC100302586
LOC100335163	XM_002701954.1	Uncharacterized LOC100335163
LOC100335181	XM_002704532.1	Uncharacterized LOC100335181
LOC100335236	XM_002703848.1	Uncharacterized LOC100335236
LOC100335341	XM_002703250.1	Chromosome 10 open reading frame 92-like
LOC100335353	XM_002702948.2	Uncharacterized LOC100335353
LOC100335389	XM_002705968.1	Beta-defensin 33-like

LOC100335418	XM_002702261.1	Inactive N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase-like protein 2-
LOC100335511	XM_002683762.1	Complement factor H-like
LOC100335700	XM_002707418.2	Uncharacterized LOC100335700
LOC100335727	XM_003586752.1	Ankyrin repeat domain-containing protein 26-like
LOC100335729	XM_003586918.1	Uncharacterized LOC100335729
LOC100335754	XM_003582845.1	Uncharacterized LOC100335754
LOC100335953	XM_002696525.1	Uncharacterized LOC100335953
LOC100336001	XM_003587146.1	Uncharacterized LOC100336001
LOC100336104	XM_003587117.1	Uncharacterized LOC100336104
LOC100336106	XR_138986.1	Uncharacterized protein c17orf72-like
LOC100336139	XM_002700903.1	Uncharacterized LOC100336139
LOC100336185	XM_002703274.1	Beta-defensin 1-like
LOC100336205	XM_002706626.2	Uncharacterized LOC100336205
LOC100336209	XM_002704156.1	Uncharacterized LOC100336209
LOC100336215	XM_002703864.2	Uncharacterized LOC100336215
LOC100336225	XM_002707101.1	Uncharacterized LOC100336225
LOC100336232	XM_003585566.1	Multidrug resistance-associated protein 4-like
LOC100336289	XM_002707433.1	Uncharacterized LOC100336289
LOC100336302	XM_002707434.1	Uncharacterized LOC100336302
LOC100336328	XM_002698627.1	Uncharacterized LOC100336328
LOC100336336	XM_002707070.1	Uncharacterized LOC100336336
LOC100336353	XM_002707071.1	Uncharacterized LOC100336353
LOC100336368	XM_003586008.1	Uncharacterized LOC100336368
LOC100336673	XR_139335.1	Uncharacterized LOC100336673
LOC100336728	XM_002698907.2	Paladin-like
LOC100336791	XM_002699229.1	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like
LOC100336854	XM_003582607.1	Uncharacterized LOC100336854
LOC100336870	XM_002690208.2	5'-nucleotidase, ecto (CD73)-like
LOC100336907	XM_003584898.1	Keratin 76-like
LOC100336928	XM_002691712.1	Neural proliferation, differentiation and control, 1-like
LOC100336929	XM_002696601.2	Zinc finger, AN1-type domain 6-like
LOC100336951	XM_003586724.1	Multidrug resistance-associated protein 4-like
LOC100336978	XM_003584664.1	Atp-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4-like
LOC100336989	XM_002688073.1	Uncharacterized LOC100336989
LOC100336996	XM_002690215.1	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K-like
LOC100337062	XM_002688404.1	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13-like
LOC100337070	XM_002688033.1	Uncharacterized LOC100337070
LOC100337090	XR_810473.1	Ankyrin repeat domain-containing protein 26
LOC100337109	XM_002692965.1	Rab-related GTP-binding protein-like
LOC100337113	XM_003583438.1	Uncharacterized LOC100337113
LOC100337192	XM_002688906.1	G protein-coupled receptor 108-like
LOC100337198	XM_003584356.1	Uncharacterized LOC100337198
LOC100337199	XM_002695707.1	Carboxypeptidase D-like
LOC100337214	XM_003585163.1	Lipid phosphate phosphatase-related protein type 3-like
LOC100337239	XM_002696015.1	Keratin-associated protein 4-7-like
LOC100337292	XM_002691951.1	Atp-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4-like

LOC100337312	XM_003587048.1	Complement factor H-like
LOC100337316	XM_002691953.1	ABCC4 protein-like
LOC100337478	XM_002687387.2	Glutamate receptor interacting protein 1-like
LOC100337497	XM_002694597.1	Phospholipase A2-like
LOC100847106	XR_138915.1	Uncharacterized LOC100847106
LOC100847128	XM_003581701.1	Uncharacterized LOC100847128
LOC100847142	XM_003585810.1	Uncharacterized LOC100847142
LOC100847162	XR_139655.1	Uncharacterized LOC100847162
LOC100847168	XM_003583184.1	Envelope glycoprotein gp70-like
LOC100847175	XM_003586214.1	C-X-C motif chemokine 15-like
LOC100847187	XM_003587534.1	Uncharacterized LOC100847187
LOC100847229	XR_138714.1	Uncharacterized LOC100847229
LOC100847237	XM_003585986.1	Uncharacterized LOC100847237
LOC100847289	XR_138772.1	Uncharacterized LOC100847289
LOC100847355	XR_139654.1	Dynein heavy chain 12, axonemal-like
LOC100847387	XM_003581812.1	Uncharacterized LOC100847387
LOC100847427	XR_138617.1	Uncharacterized LOC100847427
LOC100847448	XM_003587505.1	Uncharacterized LOC100847448
LOC100847465	XM_003585706.1	Uncharacterized LOC100847465
LOC100847467	XM_003588081.1	DDB1- and CUL4-associated factor 12-like protein 2-like
LOC100847472	XR_139475.1	Uncharacterized LOC100847472
LOC100847503	XM_003585895.1	Uncharacterized LOC100847503
LOC100847504	XR_138770.1	Uncharacterized LOC100847504
LOC100847519	XM_003588087.1	Uncharacterized LOC100847519
LOC100847551	XR_138674.1	Uncharacterized LOC100847551
LOC100847560	XM_003582698.1	Uncharacterized LOC100847560
LOC100847576	XM_003583996.1	BAI1-associated protein 3-like
LOC100847606	XR_138816.1	Uncharacterized LOC100847606
LOC100847622	XM_003581855.1	Uncharacterized LOC100847622
LOC100847724	XM_003583536.1	Extracellular peptidase inhibitor-like
LOC100847755	XM_003584100.1	Bbsome-interacting protein 1-like
LOC100847839	XR_139535.1	Uncharacterized LOC100847839
LOC100847860	XM_003582956.1	Beta-defensin 128-like
LOC100847870	XR_139316.1	Uncharacterized LOC100847870
LOC100847885	XM_003582236.1	Uncharacterized LOC100847885
LOC100847940	XR_139712.1	Uncharacterized LOC100847940
LOC100847976	XM_003587461.1	Uncharacterized LOC100847976
LOC100847982	XM_003582960.1	Uncharacterized LOC100847982
LOC100847983	XM_003587167.1	Uncharacterized LOC100847983
LOC100847994	XR_139501.1	Uncharacterized LOC100847994
LOC100848012	XR_139666.1	Uncharacterized LOC100848012
LOC100848030	XR_139241.1	Uncharacterized LOC100848030
LOC100848039	XM_003586834.1	Uncharacterized LOC100848039
LOC100848051	XR_139115.1	Uncharacterized LOC100848051
LOC100848065	XM_003587939.1	Beta-defensin 33-like
LOC100848071	XM_003582805.1	Uncharacterized LOC100848071

LOC100848075	XR_139515.1	Uncharacterized LOC100848075
LOC100848080	XM_003586107.1	Uncharacterized LOC100848080
LOC100848100	XM_003587383.1	Extracellular peptidase inhibitor-like
LOC100848114	XM_003587941.1	Uncharacterized LOC100848114
LOC100848142	XM_003587509.1	Uncharacterized LOC100848142
LOC100848213	XM_003583308.1	Uncharacterized LOC100848213
LOC100848217	XM_003584972.1	Beta-defensin 33-like
LOC100848224	XM_003584010.1	Uncharacterized LOC100848224
LOC100848227	XR_139681.1	Uncharacterized LOC100848227
LOC100848228	XM_003583194.1	Ciliary neurotrophic factor-like
LOC100848238	XM_003583741.1	Pro-neuregulin-4, membrane-bound isoform-like
LOC100848254	XM_003587975.1	Uncharacterized LOC100848254
LOC100848324	XR_139547.1	Uncharacterized LOC100848324
LOC100848325	XM_003585556.1	Uncharacterized LOC100848325
LOC100848357	XM_003583551.1	Uncharacterized LOC100848357
LOC100848361	XM_003585911.1	Uncharacterized LOC100848361
LOC100848369	XM_003587733.1	Uncharacterized LOC100848369
LOC100848414	XR_139346.1	Uncharacterized LOC100848414
LOC100848423	XM_003582577.1	Regulator of G-protein signaling 3-like
LOC100848454	XM_003583587.1	Keratin-associated protein 3-1-like
LOC100848469	XR_139201.1	Uncharacterized LOC100848469
LOC100848505	XR_139400.1	Uncharacterized LOC100848505
LOC100848527	XM_003585714.1	Uncharacterized LOC100848527
LOC100848528	XR_138645.1	Uncharacterized LOC100848528
LOC100848628	XM_003583852.1	Uncharacterized LOC100848628
LOC100848639	XM_003587554.1	Uncharacterized LOC100848639
LOC100848679	XM_003582080.1	Uncharacterized LOC100848679
LOC100848747	XM_003581693.1	Uncharacterized LOC100848747
LOC100848792	XM_003583291.1	Uncharacterized LOC100848792
LOC100848801	XM_003586909.1	Protein TRIQK-like
LOC100848837	XM_003581978.1	Uncharacterized LOC100848837
LOC100848865	XM_003584137.1	TPR repeat-containing protein c10orf93-like
LOC100848912	XM_003586355.1	Uncharacterized LOC100848912
LOC100848925	XR_138666.1	Protein phosphatase 1J-like
LOC100848936	XM_003586325.1	Sperm-associated acrosin inhibitor-like
LOC100848947	XM_003586609.1	Zinc finger protein 184-like
LOC100848953	XM_003587439.1	Uncharacterized LOC100848953
LOC100848992	XM_003585840.1	Uncharacterized LOC100848992
LOC100849064	XM_003587905.1	Uncharacterized LOC100849064
LOC100849137	XR_138652.1	Uncharacterized LOC100849137
LOC100849204	XM_003581977.1	Guanylate-binding protein 4-like
LOC100849299	XM_003582291.1	Uncharacterized LOC100849299
LOC100849469	XM_003585336.1	Envelope glycoprotein gp70-like
LOC100849633	XR_138662.1	Uncharacterized LOC100849633
LOC100849728	XM_003583613.1	Uncharacterized LOC100849728
LOC100849762	XM_003583962.1	Uncharacterized LOC100849762

LOC100849957	XM_003584705.1	Neuronal PAS domain-containing protein 3-like
LOC100850046	XM_003585147.1	Syncoilin-like
LOC100850103	XM_003585368.1	Uncharacterized LOC100850103
LOC100850482	XM_003584848.1	MOSC domain-containing protein 1, mitochondrial-like
LOC100850497	XM_003582295.1	Tetratricopeptide repeat protein 38-like
LOC100850865	XM_003582349.1	Uncharacterized LOC100850865
LOC100850928	XM_003581850.1	Ankyrin repeat and protein kinase domain-containing protein 1-like
LOC100851026	XM_003584902.1	X-linked retinitis pigmentosa gtpase regulator-like
LOC100851083	XM_003581936.1	Protein S100-A1-like
LOC100851174	XM_003584354.1	Uncharacterized LOC100851174
LOC100851275	XM_003584905.1	Serpin B5-like
LOC100851284	XM_003582051.1	Uncharacterized LOC100851284
LOC100851309	XM_003583132.1	Olfactory receptor 52N4-like
LOC100851555	XM_003582967.1	Uncharacterized LOC100851555
LOC100851574	XR_139080.1	Uncharacterized LOC100851574
LOC100851724	XM_003582231.1	Uncharacterized LOC100851724
LOC100851804	XM_003585076.1	Long-chain-fatty-acid--coa ligase 5-like
LOC100851833	XM_003584991.1	Spindle and kinetochore-associated protein 1-like
LOC100851852	XM_003584910.1	Amiloride-sensitive sodium channel subunit gamma-like
LOC100851894	XM_003585174.1	Leucine-rich repeat-containing protein 56-like
LOC100851896	XM_003585498.1	Uncharacterized LOC100851896
LOC100852105	XM_003585223.1	Uncharacterized LOC100852105
LOC100852274	XM_003584145.1	Beta-defensin 33-like
LOC100852322	XM_003583629.1	L-xylulose reductase-like
LOC100852323	XM_003583786.1	Villin-like protein-like
LOC100852349	XR_138650.1	Uncharacterized LOC100852349
LOC100852378	XR_139167.1	Uncharacterized LOC100852378
LOC101902961	XR_817185.1	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-like
LOC101905369	XM_005212262.2	Centrosomal protein of 128 kda-like
LOC101905591	XM_010816297.1	Keratin, type I cytoskeletal 42
LOC101907124	XM_010803940.1	Putative ciliary rootlet coiled-coil protein-like 3 protein
LOC282685	NM_174712.2	Rhesus-like protein
LOC505709	XM_003587426.1	Receptor tyrosine-protein kinase erbb-2-like
LOC506707	XM_002693872.2	Zona pellucida sperm-binding protein 3 receptor-like
LOC506831	XM_611183.6	Iq motif and ankyrin repeat domain-containing protein LOC642574-like
LOC507961	ENSBTAT00000042617	Uncharacterized protein
LOC508347	XM_003581993.1	Interferon-induced protein 44-like
LOC508486	XM_003584034.1	Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE2-like
LOC509029	XM_002696782.1	Uncharacterized LOC509029
LOC509114	XM_002692585.2	WD repeat-containing protein KIAA1875-like
LOC509457	XM_001255634.3	Wd repeat domain 73-like
LOC511103	XM_588373.4	Olfactory receptor 2J3-like
LOC511229	XM_588526.5	Caspase recruitment domain family, member 8-like
LOC511937	XR_083847.2	Annexin A1-like
LOC512612	XM_002699033.3	Histone H2B type 2-E
LOC512973	XM_001787454.1	Olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 1-like

LOC514457	NG_030611.1	Calmodulin 1 phosphorylase kinase, delta pseudogene
LOC515517	XM_003587132.1	La-related protein 1B-like
LOC515545	XM_593580.5	Olfactory receptor, family 8, subfamily A, member 1-like
LOC516074	XM_594211.4	Nucleoporin 62kda-like
LOC516736	XM_003586710.1	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase TPTE2-like
LOC517108	XM_595271.3	Interferon, alpha 14-like
LOC519807	XM_003585770.1	Coiled-coil domain-containing protein 108-like
LOC521269	XM_003586628.1	Uncharacterized LOC521269
LOC522004	XM_003588011.1	Ankyrin repeat domain-containing protein 42-like
LOC522845	XM_002692111.1	Ankyrin repeat domain 26-like
LOC522998	XM_003584189.1	Coiled-coil domain-containing protein 6-like
LOC524576	XM_002687704.1	Apolipoprotein L, 3-like
LOC524650	NM_001040545.1	EF hand calcium binding domain 1-like
LOC525407	XM_003585657.1	GPI mannosyltransferase 4-like
LOC525947	NM_001046279.1	Serotransferrin-like
LOC526041	NM_001075880.1	Ankyrin repeat domain protein
LOC526847	XM_003587196.1	Probable palmitoyltransferase ZDHHC8-like
LOC527119	XM_003583303.1	RIMS-binding protein 2-like
LOC530039	XM_608502.5	Dynein heavy chain at 16F-like
LOC531135	XR_138889.1	Olfactory receptor, family 52, subfamily P, member 1 pseudogene-
LOC532189	XM_003587397.1	Carboxypeptidase D-like
LOC532207	XM_003585231.1	Epididymis-specific alpha-mannosidase-like
LOC533033	XM_003586440.1	Whirlin-like
LOC535353	XM_003586143.1	Pleckstrin homology domain-containing family G member 6-like
LOC536117	XM_003586574.1	Centrosomal protein of 152 kda-like
LOC538435	XM_002688850.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1-like
LOC538699	XR_083276.1	TAF5-like RNA polymerase II p300/CBP-associated factor-associated
LOC538702	NM_001046437.1	Glycerol kinase 2-like
LOC538935	XR_138727.1	Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly-related protein-
LOC539947	XM_003586186.1	CXXC-type zinc finger protein 4-like
LOC540222	XR_082719.2	Uncharacterized LOC540222
LOC574091	NM_001025347.1	Nucleoside-diphosphate kinase NBR-A
LOC613743	XM_003582931.1	Uncharacterized LOC613743
LOC613836	XM_864999.5	Glutathione-S-transferase omega 1-like
LOC614047	NM_001040574.1	Uncharacterized LOC614047
LOC614396	NM_001199075.1	Uncharacterized LOC614396
LOC614741	XM_003587979.1	Formin-2-like
LOC614768	XM_003588147.1	Protein POF1B-like
LOC614914	XM_002693514.2	Uncharacterized LOC614914
LOC615992	XM_881036.4	Uncharacterized LOC615992
LOC616289	XM_002699944.1	Dachshund 2-like
LOC616656	XR_083530.1	DDB1- and CUL4-associated factor 12-like protein 2-like
LOC616691	XM_003587062.1	Uncharacterized LOC616691
LOC617011	XM_869183.3	Olfactory receptor, family 8, subfamily A, member 1-like
LOC617028	XM_882441.4	Uncharacterized LOC617028
LOC617657	XM_001789595.2	Rab-related protein 3-like

LOC617833	XM_002691127.1	Mal, T-cell differentiation protein-like
LOC618824	XM_871147.2	Histone cluster 1, h2ai-like
LOC781114	XM_001249501.3	Uncharacterized LOC781114
LOC781232	XM_001249593.2	Uncharacterized LOC781232
LOC781251	XR_082870.1	Heat shock protein HSP 90-alpha-like
LOC781267	XM_001249643.3	Uncharacterized LOC781267
LOC781339	XR_083814.3	Heat shock protein HSP 90-alpha pseudogene
LOC781439	ENSBTAT00000003434	Methyltransferase-like protein 7A
LOC781505	XM_003583211.1	Potassium channel subfamily T member 2-like
LOC782076	XM_002687912.1	Uncharacterized LOC782076
LOC782174	XM_001249668.3	Beta-defensin 2-like
LOC782236	XM_001250024.2	Beta-defensin 2-like
LOC782264	XR_083810.2	MARCKS-related protein-like
LOC782487	XM_002698634.1	Defensin, beta 1-like
LOC782734	XM_001787805.2	Olfactory receptor 630-like
LOC782761	XM_002688470.1	Epididymis-specific alpha-mannosidase-like
LOC782960	XR_084174.2	Olfactory receptor 51L1-like
LOC783045	XM_003586204.1	Uncharacterized LOC783045
LOC783205	XM_002699211.1	Olfactory receptor, family 8, subfamily A, member 1-like
LOC783226	XM_001251870.4	Regulator of microtubule dynamics protein 2-like
LOC783544	XM_001249983.2	Uncharacterized LOC783544
LOC783604	XM_002686250.2	Guanylate-binding protein 4-like
LOC783616	XM_002693234.2	Olfactory receptor, family 51, subfamily L, member 1-like
LOC783716	XR_803746.1	Protein S100-A14 pseudogene
LOC783721	XM_002685972.1	Uncharacterized LOC783721
LOC784087	XR_082912.1	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate- ...
LOC784148	XM_003582385.1	Zinc finger protein 709-like
LOC784577	XM_001250815.3	Beta-defensin 2-like
LOC784718	XM_001252946.1	Uncharacterized LOC784718
LOC784927	XM_001787874.3	Prostaglandin F synthase 1-like
LOC785010	XM_002690444.1	Myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha-like
LOC785341	XM_001788568.3	Zinc finger protein 345-like
LOC785508	XM_001253506.3	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic-like
LOC785805	XM_003585711.1	Collagen alpha-5(VI) chain-like
LOC786151	ENSBTAT00000047554	Olfactory receptor, family 52, subfamily J, member 3-like
LOC786198	XM_003582081.1	Cadherin-related family member 3-like
LOC786234	XM_001787812.1	Testis expressed 9-like
LOC786248	XM_001253994.4	Complement component 4 binding protein, alpha chain-like
LOC786371	XM_001254066.1	Protein S100-A15A-like
LOC786556	XM_001250914.3	Beta-defensin 2-like
LOC786583	XR_083905.2	Uncharacterized LOC786583
LOC786836	NM_001206775.1	Melanoma antigen family B, 2-like
LOC786961	XM_010803250.1	Acidic mammalian chitinase-like
LOC787138	XR_138892.1	Uncharacterized LOC787138
LOC787246	XM_001254702.1	RING finger protein 11 pseudogene
LOC787564	XM_003584764.1	Uncharacterized LOC787564

LOC787901	XM_001787313.3	Olfactory receptor 52N4-like
LOC787988	XM_002707694.2	Olfactory receptor, family 52, subfamily N, member 4-like
LOC788334	XM_002687703.1	Apolipoprotein L, 3-like
LOC788520	XM_003582918.1	Phosphoribosyltransferase domain-containing protein 1-like
LOC788554	XM_001255584.1	Olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 3-like
LOC788928	XM_001787832.3	Zinc finger protein 254-like
LOC789126	XM_002694073.1	Preferentially expressed antigen in melanoma-like
LOC789182	XM_001788927.2	PRAME family member 12-like
LOC789600	XM_003585791.1	Protein Wnt-4-like
LOC789893	XM_002694696.1	Uncharacterized LOC789893
LOC790074	XR_138960.1	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 3-like
LOC790321	XM_001256831.2	Keratin, type I cytoskeletal 23-like
LONRF3	NM_001191134.1	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3
LOXL4	NM_174384.2	Lysyl oxidase-like 4
LPAR3	NW_005394975.1	Lysophosphatidic acid receptor 3
LPCAT2	NM_001205797.1	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2
LPHN3	NM_181033.1	Latrophilin 3
LPL	NM_001075120.1	Lipoprotein lipase
LRBA	XM_002701638.2	LPS-responsive vesicle trafficking, beach and anchor containing
LRMP	XM_001790052.3	Lymphoid-restricted membrane protein
LRRRC20	NM_001100387.1	Leucine rich repeat containing 20
LRRRC34	XM_590280.5	Leucine rich repeat containing 34
LRRRC41	NM_001045873.1	Leucine rich repeat containing 41
LRRRC45	NM_001191278.2	Leucine rich repeat containing 45
LRRIQ1	NM_001191135.1	Leucine-rich repeats and IQ motif containing 1
LRRIQ3	NM_001105391.1	Leucine-rich repeats and IQ motif containing 3
LUZP2	XM_003584229.1	Leucine zipper protein 2
LY6E	NM_001046070.1	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E
LYPD1	NM_001046359.1	LY6/PLAUR domain containing 1
LYZ3	NM_174104.2	Lysozyme 3
MAD1L1	NM_001102044.1	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
MAGEB4	NM_001077050.1	Melanoma antigen family B, 4
MAGEF1	NM_001102049.1	Melanoma antigen family F, 1
MAGEH1	NM_001080728.1	Melanoma antigen family H, 1
MAGT1	NM_001244318.1	Magnesium transporter 1
MAL2	NM_001081719.1	Mal, T-cell differentiation protein 2 (gene/pseudogene)
MAOA	NM_181014.2	Monoamine oxidase A
MAP1LC3C	NM_001101058.1	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma
MAP2	NM_001205807.1	Microtubule-associated protein 2
MAP3K8	NM_001099071.1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
MAPKBP1	XM_002690805.1	Mitogen-activated protein kinase binding protein 1
MAPT	NM_174106.2	Microtubule-associated protein tau
MARCH10	NM_001192387.2	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 10
MARCKSL1	NM_001076172.1	MARCKS-like 1
MASP1	NM_001076968.1	Mannan-binding lectin serine peptidase 1 (C4/C2 activating component of the lectin pathway)
MAST1	NM_001191528.1	Microtubule associated serine/threonine kinase 1



MATN4	NM_001191311.1	Matrilin 4
MBOAT7	NM_001075152.1	Membrane bound O-acyltransferase domain containing 7
MCC	NM_001083523.1	Mutated in colorectal cancers
MCI	XM_002696330.1	Idas protein
MCU	NM_001206102.1	Mitochondrial calcium uniporter
MEGF9	XM_003582585.1	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 9-like
MEIG1	NM_001114524.2	Meiosis/spermiogenesis associated 1
METAP1D	NM_001046342.1	Methionyl aminopeptidase type 1D (mitochondrial)
Metazoa_SRP	ENSBTAT00000064192	Metazoan signal recognition particle RNA
METTL9	NM_001080367.1	Methyltransferase like 9
MEX3B	XM_005221889.2	Mex-3 RNA binding family member B
MFSD6L	NM_001102523.1	Major facilitator superfamily domain containing 6-like
MGAT4C	NM_001205696.1	MGAT4 family, member C
MGC126945	NM_001076983.1	Uncharacterized protein MGC126945
MGC133804	NM_001077122.1	Uncharacterized protein MGC133804
MGC134473	NM_001077039.1	Uncharacterized protein MGC134473
MGC137030	NM_001077081.1	Uncharacterized protein MGC137030
MGC137036	NM_001077083.1	Uncharacterized protein MGC137036
MGC148318	NR_038117.1	Uncharacterized LOC782788
MGC151671	NM_001083712.1	Uncharacterized LOC531076
MGC152281	NM_001101891.1	Uncharacterized LOC507942
MGMT	XM_001249417.3	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MGST1	NM_001007815.1	Microsomal glutathione S-transferase 1
MGST2	NM_001076382.1	Microsomal glutathione S-transferase 2
MGST3	NM_001035046.1	Microsomal glutathione S-transferase 3
MID1IP1	NM_001076383.1	MID1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12 homolog)
MILR1	XM_002696100.1	Mast cell immunoglobulin-like receptor 1
MIR1251	NR_031016.1	Microrna mir-1251
MIR147	NR_031034.1	Microrna mir-147
MIR1839	NR_031086.1	Microrna mir-1839
MIR2304	NR_031113.1	Microrna mir-2304
MIR2348	NR_031289.1	Microrna mir-2348
MIR2357	ENSBTAT00000061717	Microrna mir-2357
MIR2428	NR_030996.1	Microrna mir-2428
MIR2431	ENSBTAT00000062651	Microrna mir-2431
MIR30F	ENSBTAT00000042215	Microrna mir-30f
MKKS	NM_001206171.2	Mckusick-Kaufman syndrome
MLC1	NM_001076952.1	Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1
MMAB	NM_001079632.1	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblb type
MME	NM_001192884.1	Membrane metallo-endopeptidase
MNS1	NM_001046338.2	Meiosis-specific nuclear structural 1
MOK	XM_002696774.1	MOK protein kinase
MORC4	ENSBTAT0000006967	Uncharacterized protein
MPZL1	NM_001076158.1	Myelin protein zero-like 1
MRAP	XM_582078.5	Melanocortin 2 receptor accessory protein
MRCL	NM_001102034.1	Mannose receptor-like precursor

MRGPRD	XM_867774.2	MAS-related GPR, member D
M-SAA3.2	NM_001242573.1	Mammary serum amyloid A3.2
MSI2	ENSBTAT00000005780	Musashi homolog 2 (Drosophila)
MST1	NM_001075677.1	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)
MT1A	NM_001040492.2	Metallothionein-1A
MT1E	NM_001114857.1	Metallothionein 1E
MT2A	NM_001075140.1	Metallothionein 2A
MT3	NM_001113304.1	Metallothionein 3
MT4	NM_001114859.1	Metallothionein 4
MTM1	NM_001206425.1	Myotubularin 1
MUC12	XM_001255139.3	Mucin 12, cell surface associated
MUC15	NM_176631.1	Mucin 15, cell surface associated
MUC16	XM_002688785.2	Mucin 16, cell surface associated
MUC19	XM_003586064.1	Mucin 19
MUC20	XM_002684818.4	Mucin 20, cell surface associated
MUC21	XM_002697352.4	Mucin 21, cell surface associated
MYCBPAP	XM_002695937.1	MYCBP associated protein
MYH7	NM_174727.1	Myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta
MYO15B	XR_082718.2	Myosin XVB pseudogene
MYO18A	XM_597858.6	Myosin XVIII A
MYO1D	NM_001075838.1	Myosin ID
MYO5B	XM_002697821.2	Myosin VB
MYO7A	XM_002693507.2	Myosin VIIA
MZB1	NM_001098930.1	Marginal zone B and B1 cell-specific protein
NAAA	NM_001100369.1	N-acyl ethanolamine acid amidase
NAALADL2	XM_002684912.1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 2
NANS	NM_001046482.1	N-acetylneuraminic acid synthase
NAPRT1	NM_001098857.1	Nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1
NARS2	NM_001098867.1	Asparaginyl-trna synthetase 2, mitochondrial (putative)
NAT14	NM_001037245.1	N-acetyltransferase 14 (GCN5-related, putative)
NAV3	NM_001192669.2	Neuron navigator 3
NCAPD2	XM_865639.3	Uncharacterized LOC509171
NCSTN	NM_001034475.1	Nicastrin
NDE1	NM_001100321.1	Nude nuclear distribution gene E homolog 1 (A. Nidulans)
NDRG2	NM_001035304.1	NDRG family member 2
NEK11	XM_002685106.2	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 11
NEK5	XM_001788409.1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 5
NELL2	NM_001102084.1	NEL-like 2 (chicken)
NETO1	NM_001192694.1	Neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1
NFIX	ENSBTAT000000024262	Nuclear factor I/X
NFKBIZ	NM_174726.1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NHEDC1	NM_001077892.2	Solute carrier family 9, subfamily B (cation proton antiporter 2),
NHSL1	NM_001191538.1	NHS-like 1
NMNAT2	NM_001075486.1	Nicotinamide nucleotide adenyltransferase 2
NMU	NM_001191153.1	Neuromedin U
NNAT	NM_178323.3	Neuronatin

NOD2	NM_001002889.1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
NOS2	NM_001076799.1	Nitric oxide synthase 2, inducible
NOXA1	NM_001102075.1	NADPH oxidase activator 1
NPAS3	XM_605440.5	Neuronal PAS domain protein 3
NPC2	NM_173918.2	Niemann-Pick disease, type C2
NPDC1	NM_001105489.1	Neural proliferation, differentiation and control, 1
NPVF	NM_174168.1	Neuropeptide VF precursor
NR1I2	NM_001103226.1	Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2
NR3C1	NM_001206634.1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid
NRBP2	NM_001077848.2	Nuclear receptor binding protein 2
NSUN7	XM_002688230.1	NOP2/Sun domain family, member 7
NT5C3	NM_001037597.1	5'-nucleotidase, cytosolic III
NT5C3A	XM_005205471.2	5'-nucleotidase, cytosolic IIIA
NT5E	ENSBTAT00000015059	5'-nucleotidase, ecto (CD73)
NTN4	NM_001102203.1	Netrin 4
NTRK3	NM_001206483.1	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
NTSR2	XM_586493.4	Neurotensin receptor 2
NUDC	NM_001075607.1	Nuclear distribution gene C homolog (A. Nidulans)
NUDT12	NM_001046608.1	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 12
NUDT14	NM_001105652.1	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14
NUDT16	NM_001075560.1	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16
NUDT4	NM_001081618.1	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4
O3FAR1	XM_002698388.1	Omega-3 fatty acid receptor 1
OBFC2A	NM_001098124.1	Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 2A
ODF3	NM_001080252.1	Outer dense fiber of sperm tails 3
OGT	NM_001098070.1	O-linked N-acetylglucosamine (glcnac) transferase
OLFML2A	XM_002691603.1	Olfactomedin-like 2A
OOEP	NM_001077869.1	Oocyte expressed protein homolog (dog)
OPCML	NM_174407.2	Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
OPRK1	NM_001046480.1	Opioid receptor, kappa 1
OPTC	NM_205770.1	Opticin
OR51E1	XM_604996.2	Olfactory receptor, family 51, subfamily E, member 1
OR6Y1	XM_002685938.1	Olfactory receptor, family 6, subfamily Y, member 1
OSTBETA	NM_001077867.1	Organic solute transporter beta
OSTN	NM_001098935.1	Osteocrin
OTOS	NM_001114525.1	Otospiralin
OVOS2	NM_001164024.1	Ovostatin 2
OXR1	NM_001076148.1	Oxidation resistance 1
P2RX5	XM_594012.5	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5
P2RX6	XM_002694647.2	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 6
P4HA1	NM_001075770.1	Prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I
P4HTM	NM_001076115.1	Prolyl 4-hydroxylase, transmembrane (endoplasmic reticulum)
PACRGL	NM_001191517.1	PARK2 co-regulated-like
PAFAH2	NM_174570.2	Platelet-activating factor acetylhydrolase 2, 40kda
PAG16	NM_176625.1	Pregnancy-associated glycoprotein 16
PAK3	NM_001205536.1	P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3

PAN3	XM_003582865.1	PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit homolog (S. Cerevisiae)
PARD3B	XM_005202765.2	Par-3 family cell polarity regulator beta
PARD6A	NM_001046274.1	Par-6 partitioning defective 6 homolog alpha (C. Elegans)
PARD6B	NM_001098104.1	Par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. Elegans)
PARD6G	NM_001098100.1	Par-6 partitioning defective 6 homolog gamma (C. Elegans)
PASK	XM_002686621.1	PAS domain containing serine/threonine kinase
PAX6	NM_001040645.1	Paired box 6
PC	NM_177946.3	Pyruvate carboxylase
PCBD2	XM_002704869.2	Pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of Protocadherin 11 Y-linked
PCDH11Y	XM_002699764.1	Protocadherin 11 Y-linked
PCDH20	NM_001206231.1	Protocadherin 20
PCM1	XM_864234.5	Pericentriolar material 1
PDE3B	XM_002693045.2	Phosphodiesterase 3B, cgmp-inhibited
PDIA6	NM_001206345.1	Protein disulfide isomerase family A, member 6
PDLIM4	NM_001034491.1	PDZ and LIM domain 4
PEMT	NM_182989.2	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
PFKFB3	NM_001077837.1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
PGA5	NM_001001600.2	Pepsinogen 5, group I (pepsinogen A)
PGBD5	XM_002698769.1	Piggybac transposable element derived 5
PHF7	XM_002697023.2	PHD finger protein 7
PHKG1	NM_001046486.1	Phosphorylase kinase, gamma 1 (muscle)
PHLPP1	XM_002707786.1	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1
PHYHD1	NM_001076243.1	Phytanoyl-coa dioxygenase domain containing 1
PIGM	NM_001015563.1	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class M
PIGP	XM_010801719.1	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class P
PIK3AP1	XM_001790272.3	Phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1
PITPNC1	XM_003583614.1	Cytoplasmic phosphatidylinositol transfer protein 1-like
PKDREJ	ENSBTAT00000062977	Polycystic kidney disease (polycystin) and REJ homolog (sperm)
PKHD1L1	XM_003583049.1	Polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)-like 1
PLA2G1B	NM_174646.3	Phospholipase A2, group IB (pancreas)
PLA2G4D	NM_001192704.1	Phospholipase A2, group IVD (cytosolic)
PLA2G4F	NM_001192569.1	Phospholipase A2, group IVF
PLAC8	NM_001025325.1	Placenta-specific 8
PLCB4	NM_174424.1	Phospholipase C, beta 4
PLCH1	XM_002684989.2	Phospholipase C, eta 1
PLEKHD1	NM_001205482.1	Pleckstrin homology domain containing, family D (with coiled-coil)
PLEKHF2	NM_001098150.1	Pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE)
PLEKHG1	NM_001205921.1	Pleckstrin homology domain containing, family G (with rhogef)
PLEKHG7	XM_597636.4	Pleckstrin homology domain containing, family G (with rhogef)
PLEKHM1	XM_003584779.1	Pleckstrin homology domain containing, family M (with RUN)
PLTP	NM_001035027.2	Phospholipid transfer protein
PM20D2	NM_001192533.1	Peptidase M20 domain containing 2
PNPLA4	NM_001080363.1	Patatin-like phospholipase domain containing 4
POLM	NM_001035286.2	Polymerase (DNA directed), mu
POLR3H	NM_001076962.1	Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H (22.9kd)
PON1	NM_001046269.1	Paraoxonase 1

PON3	NM_001075479.1	Paraoxonase 3
POU3F2	NM_001080348.1	POU class 3 homeobox 2
PPM1K	NM_001046474.1	Protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1K
PPP1R14C	NM_001078068.1	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14C
PPP1R1A	NM_001130760.1	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A
PPP1R36	XM_002691066.1	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 36
PPP1R39	NM_001083753.1	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 39
PPP1R9A	NM_001076153.2	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 9A
PPP2R1B	XM_001788593.3	Protein phosphatase 2, regulatory subunit A, beta
PRDX4	NM_174433.2	Peroxiredoxin 4
PRDX6	NM_174643.1	Peroxiredoxin 6
PRELP	NM_174434.2	Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein
PREPL	XM_001787857.3	Prolyl endopeptidase-like
PRKCI	NM_001205955.1	Protein kinase C, iota
PRKCZ	NM_001077833.1	Protein kinase C, zeta
PRKD1	XM_612625.6	Protein kinase D1
PRLR	NM_174155.2	Prolactin receptor
PROCA1	NM_001166568.1	Protein interacting with cyclin A1
PROM1	NM_001245952.1	Prominin 1
PROX2	NM_001192679.1	Prospero homeobox 2
PRPF40B	XM_002687284.2	PRP40 pre-mrna processing factor 40 homolog B (S. Cerevisiae)
PRPH	NM_001102378.1	Peripherin
PRR19	NM_001075635.1	Proline rich 19
PRR5	ENSBTAT00000011665	Proline rich 5 (renal)
PRR5L	XM_003584911.1	Proline rich 5 like
PRRT3	XM_003583793.1	Proline-rich transmembrane protein 3
PRSS12	NM_001193222.1	Protease, serine, 12 (neurotrypsin, motopsin)
PRSS42	NM_001114626.1	Protease, serine, 42
PRTN3	XM_003585066.1	Proteinase 3
PSMD4	NM_001013598.2	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-atpase, 4
PTER	NM_001101282.1	Phosphotriesterase related
PTGFR	NM_181025.2	Prostaglandin F receptor (FP)
PTK2B	NM_001102252.1	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta
PTPN13	NM_174590.3	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 (APO-1/CD95)
PTPN18	ENSBTAT00000015484	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 18
PTPN6	NM_001098017.1	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
PTPRK	NM_001191537.1	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
PTPRZ1	NM_001192272.2	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1
PVALB	NM_001076114.1	Parvalbumin
PVRL4	NM_001024494.1	Poliovirus receptor-related 4
PYGL	NM_001075203.1	Phosphorylase, glycogen, liver
RAB11FIP2	NM_001192771.1	RAB11 family interacting protein 2 (class I)
RAB19	NM_001035040.1	RAB19, member RAS oncogene family
RAB20	NM_001193089.1	RAB20, member RAS oncogene family
RAB26	NM_001046209.1	RAB26, member RAS oncogene family
RAB6B	NM_001101129.1	RAB6B, member RAS oncogene family

RABGGTA	NM_001015614.1	Rab geranylgeranyltransferase, alpha subunit
RABL5	NM_001015612.1	RAB, member RAS oncogene family-like 5
RAD54L	NM_001130766.1	RAD54-like ( <i>S. Cerevisiae</i> )
RAI2	XM_586997.3	Retinoic acid induced 2
RALYL	NM_001077932.1	RALY RNA binding protein-like
RAP1GAP	NM_001076888.1	RAP1 gtpase activating protein
RAPGEF4	NM_001192902.1	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4
RASA4	XM_003587839.1	RAS p21 protein activator 4
RASD1	NM_001206261.1	RAS, dexamethasone-induced 1
RASGEF1B	NM_001083649.1	Rasgef domain family, member 1B
RASSF4	NM_001075454.1	Ras association (ralgds/AF-6) domain family member 4
RASSF9	NM_001193083.2	Ras association (ralgds/AF-6) domain family (N-terminal) member 9
RAX2	NM_182653.1	Retina and anterior neural fold homeobox 2
RBBP7	NM_001034638.1	Retinoblastoma binding protein 7
RBL2	NM_001098073.1	Retinoblastoma-like 2 (p130)
RBM38	NM_001206023.1	RNA binding motif protein 38
RCVRN	NM_174165.2	Recoverin
REEP2	NM_001046325.1	Receptor accessory protein 2
REEP6	NM_001038135.1	Receptor accessory protein 6
REL	NM_001192970.1	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)
REPS2	XM_002700366.1	RALBP1 associated Eps domain containing 2
RFX3	XM_002689615.1	Regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)
RGS11	NM_001075814.2	Regulator of G-protein signaling 11
RGS4	NM_001046600.1	Regulator of G-protein signaling 4
RHBDD2	NM_001046478.2	Rhomboid domain containing 2
RHBDL2	NM_001102014.1	Rhomboid, veinlet-like 2 ( <i>Drosophila</i> )
RHOC	NM_001046138.1	Ras homolog gene family, member C
RIC8B	XM_002687663.1	Resistance to inhibitors of cholinesterase 8 homolog B ( <i>C. Elegans</i> )
RIMS2	NM_001102190.1	Regulating synaptic membrane exocytosis 2
RIPK4	NM_001100327.1	Receptor-interacting serine-threonine kinase 4
RND1	NM_001046016.1	Rho family gtpase 1
RNF128	NM_001076071.1	Ring finger protein 128, E3 ubiquitin protein ligase
RNF208	XM_003584967.1	Ring finger protein 208
RNF217	XM_002690065.1	Ring finger protein 217
RNF6	NM_001098062.1	Ring finger protein (C3H2C3 type) 6
ROGDI	NM_001075452.1	Rogdi homolog ( <i>Drosophila</i> )
ROM1	NM_174174.3	Retinal outer segment membrane protein 1
RP1	NM_173958.1	Retinitis pigmentosa 1 (autosomal dominant)
RPN1	NM_001082605.1	Ribophorin I
RPP21	XM_003587701.1	Ribonuclease P/MRP 21kda subunit
RPS6KA1	NM_001083722.1	Ribosomal protein S6 kinase, 90kda, polypeptide 1
RRAGD	NM_001192828.1	Ras-related GTP binding D
RYR3	XM_590220.5	Ryanodine receptor 3
S100A12	NM_174651.2	S100 calcium binding protein A12
S100A13	NM_205800.1	S100 calcium binding protein A13
S100A14	NM_001079634.1	S100 calcium binding protein A14

S100A16	NM_001075218.1	S100 calcium binding protein A16
S100A8	NM_001113725.1	S100 calcium binding protein A8
SAA1	XM_867996.5	Serum amyloid A1
SAA2	NM_001075260.2	Serum amyloid A2
SAA3	NM_181016.3	Serum amyloid A 3
SAA4	NM_001040505.1	Serum amyloid A4, constitutive
SALL2	NM_001102112.1	Sal-like 2 (Drosophila)
SAMD12	NM_001191180.1	Sterile alpha motif domain containing 12
SAP25	XM_002698207.1	Sin3A-associated protein, 25kda
SCARNA15	ENSBTAT00000062642	Small Cajal body specific RNA 15
SCARNA17	ENSBTAT00000062515	Small Cajal body-specific RNA 17
SCARNA18	ENSBTAT00000061833	Small Cajal body-specific RNA 18
SCARNA2	ENSBTAT00000065535	Small Cajal body-specific RNA 2
SCCPDH	NM_001034288.1	Saccharopine dehydrogenase (putative)
SCEL	NM_001102332.1	Sciellin
SCN9A	NM_001110787.1	Sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit
SCNN1G	NM_001193174.1	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma
SCRN1	NM_001110803.1	Secernin 1
SDR16C5	NM_001205933.1	Short chain dehydrogenase/reductase family 16C, member 5
SDR42E1	NM_001080292.1	Short chain dehydrogenase/reductase family 42E, member 1
SEC62	NM_001205604.1	SEC62 homolog (S. Cerevisiae)
SELENBP1	NM_001046048.1	Selenium binding protein 1
SERPINA1	NM_173882.1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase,
SERPINC1	NM_001034698.1	Serpin peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1
SERPIND1	NM_001105046.1	Serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1
SFTPC	NM_174462.3	Surfactant protein C
SFXN1	NM_001015574.1	Sideroflexin 1
SFXN5	NM_001075914.1	Sideroflexin 5
SGCA	NM_001013402.1	Sarcoglycan, alpha (50kda dystrophin-associated glycoprotein)
SGK2	NM_001075760.1	Serum/glucocorticoid regulated kinase 2
SH3YL1	NM_001034607.1	SH3 domain containing, Ysc84-like 1 (S. Cerevisiae)
SHF	XM_002690907.1	Src homology 2 domain containing F
SHISA3	NM_001205411.1	Shisa homolog 3 (Xenopus laevis)
SHISA8	XM_002687951.2	Shisa homolog 8 (Xenopus laevis)
SHROOM1	NM_001102294.1	Shroom family member 1
SHROOM3	NM_001191524.1	Shroom family member 3
SIDT2	NM_001024530.2	SID1 transmembrane family, member 2
SIRT3	NM_001206669.1	Sirtuin 3
SKA1	NM_001075327.2	Spindle and kinetochore associated complex subunit 1
SKAP2	NM_001038214.1	Src kinase associated phosphoprotein 2
SLAMF9	XM_864973.3	SLAM family member 9
SLC10A5	XM_001253131.2	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family),
SLC10A7	NM_001076292.1	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family),
SLC12A1	XM_002690936.2	Solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters),
SLC13A4	NM_001076884.1	Solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4
SLC14A1	NM_001008666.1	Solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood

SLC16A10	NM_001192847.1	Solute carrier family 16, member 10 (aromatic amino acid transporter)
SLC17A1	XM_584165.6	Solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 1
SLC1A4	NM_001081577.1	Solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4
SLC1A5	NM_174601.2	Solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5
SLC20A2	NM_001080280.1	Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2
SLC22A5	NM_001046502.1	Solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5
SLC28A1	NM_001037458.1	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1
SLC29A3	NM_001080223.1	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 3
SLC34A3	XM_002691698.1	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 3
SLC35A1	NM_001034637.1	Solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member A1
SLC35C2	ENSBTAT00000039194	Solute carrier family 35, member C2
SLC36A2	NM_001206180.1	Solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2
SLC39A11	XM_003583655.1	Solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 11
SLC39A12	NM_001076878.1	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 12
SLC39A14	NM_001098036.1	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14
SLC45A2	XM_002696386.1	Solute carrier family 45, member 2
SLC46A1	NM_001079585.1	Solute carrier family 46 (folate transporter), member 1
SLC46A2	NM_001024519.1	Solute carrier family 46, member 2
SLC5A1	NM_174606.2	Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1
SLC6A14	NM_001098461.1	Solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14
SLC6A9	NM_001102032.1	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
SLC9A10	XM_615728.5	Solute carrier family 9, member 10
SLC9A11	XM_001255171.2	Solute carrier family 9, member 11
SLC9A3	NM_001192154.1	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3
SLITRK5	XM_002691917.1	SLIT and NTRK-like family, member 5
SMPD3	NM_001192363.1	Sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase 3)
SNAP25	NM_001076246.1	Synaptosomal-associated protein, 25kda
SNHG4	NR_038087.1	Small nucleolar RNA host gene 4 (non-protein coding)
SNORA12	ENSBTAT00000060214	Small nucleolar RNA SNORA12
SNORA27	ENSBTAT00000061980	Small nucleolar RNA SNORA27
SNORA48	ENSBTAT00000059651	Small nucleolar RNA SNORA48
SNORA57	ENSBTAT00000060871	Small nucleolar RNA SNORA57
SNORA67	ENSBTAT00000059302	Small nucleolar RNA SNORA67
SNORA74	ENSBTAT00000059607	Small nucleolar RNA SNORA74
SNORD116	ENSBTAT00000061800	Small nucleolar RNA SNORD116
SNORD18	ENSBTAT00000059225	Small nucleolar RNA SNORD18
SNORD89	ENSBTAT00000060150	Small nucleolar RNA SNORD89
snoU109	ENSBTAT00000061824	Small nucleolar RNA U109
snoU2_19	ENSBTAT00000059862	Small nucleolar RNA U2-19
SNX25	NM_001192758.1	Sorting nexin 25
SORCS1	NM_001191207.2	Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1
SORD	NM_001037320.1	Sorbitol dehydrogenase
SORL1	NM_001192757.1	Sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats containing
SORT1	XM_002686189.2	Sortilin 1
SOX1	XM_002691994.2	SRY (sex determining region Y)-box 1
SOX2	NM_001105463.1	SRY (sex determining region Y)-box 2



SOX9	ENSBTAT00000063815	SRY (sex determining region Y)-box 9
SP9	NM_001205839.1	Sp9 transcription factor homolog (mouse)
SPA17	NM_001076440.1	Sperm autoantigenic protein 17
SPAG1	XM_002701247.2	Sperm associated antigen 1
SPAG16	XM_002685561.3	Sperm associated antigen 16
SPAG8	ENSBTAT00000015206	Sperm associated antigen 8
SPATA1	XM_002686313.1	Spermatogenesis associated 1
SPATA13	XM_003582868.1	Spermatogenesis associated 13
SPATA16	XM_003581729.1	Spermatogenesis associated 16
SPATA24	ENSBTAT00000023876	Spermatogenesis associated 24
SPATA6	NM_001046371.2	Spermatogenesis associated 6
SPATS2	NM_001193175.1	Spermatogenesis associated, serine-rich 2
SPCS2	XM_001254329.3	Signal peptidase complex subunit 2 homolog (S. Cerevisiae)
SPDEF	NM_001081578.1	SAM pointed domain containing ets transcription factor
SPINK4	NM_001114522.1	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 4
SPRY4	NM_001081512.1	Sprouty homolog 4 (Drosophila)
SSBP4	NM_001035273.1	Single stranded DNA binding protein 4
ST6GALNAC4	NM_205791.1	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-
ST6GALNAC6	NM_001001151.2	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-
ST8SIA1	NM_001032299.1	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
STEAP3	XM_002685438.1	STEAP family member 3, metalloredutase
STEAP4	XM_583351.4	STEAP family member 4
STK31	XM_002686857.2	Serine/threonine kinase 31
STK33	NM_001075908.1	Serine/threonine kinase 33
STOX1	NM_001192127.1	Storkhead box 1
STRA8	XM_001253649.1	Stimulated by retinoic acid gene 8 homolog (mouse)
STRC	XM_606859.4	Stereocilin
STS	NM_001075394.1	Steroid sulfatase (microsomal), isozyme S
STX16	XM_597848.3	Syntaxin 16
SUN3	NM_001076084.2	Sad1 and UNC84 domain containing 3
SVIP	XM_002699074.1	Small VCP/p97-interacting protein
SYCE3	NM_001206333.1	Synaptonemal complex central element protein 3
SYCP2	XM_001790634.2	Synaptonemal complex protein 2
SYNE1	XM_003586487.1	Spectrin repeat containing, nuclear envelope 1
SYNGR2	NM_001100358.1	Synaptogyrin 2
SYNPR	NM_001046506.1	Synaptoporin
SYT17	NM_001193210.1	Synaptotagmin XVII
SYT4	NM_001098108.1	Synaptotagmin IV
TACC2	XM_003587903.1	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
TACSTD2	XM_002686363.1	Tumor-associated calcium signal transducer 2
TAPT1	XM_002688468.2	Transmembrane anterior posterior transformation 1
TASP1	NM_001034577.2	Taspase, threonine aspartase, 1
TBC1D16	NM_001206271.1	TBC1 domain family, member 16
TBC1D9	XM_003585458.1	TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)
TBX2	NM_001191443.1	T-box 2
TCEA3	NM_001046360.1	Transcription elongation factor A (SII), 3

TCEANC	NM_001024472.2	Transcription elongation factor A (SII) N-terminal and central domain containing 1
TCF7L1	XM_002691408.3	Transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)
TCHH	XM_002703861.2	Trichohyalin
TCP11	XM_600614.5	T-complex 11 homolog (mouse)
TCP11L2	NM_001105431.1	T-complex 11 (mouse)-like 2
TCTEX1D2	NM_001166555.1	Tctex1 domain containing 2
TDP2	NM_001105341.1	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2
TDRD10	XM_870113.3	Tudor domain containing 10
TEAD2	NM_001103347.1	TEA domain family member 2
TEX2	NM_001101970.1	Testis expressed 2
TEX22	XM_002696796.1	Testis expressed 22
TFAP2B	NM_001076247.1	Transcription factor AP-2 beta (activating enhancer binding protein 2)
TGM7	XM_002696747.2	Transglutaminase 7
THG1L	NM_001080233.1	Trna-histidine guanylyltransferase 1-like (S. Cerevisiae)
THRA	NM_001046329.1	Thyroid hormone receptor, alpha
TIGD4	XM_002694314.1	Tigger transposable element derived 4
TM4SF5	NM_001046102.1	Transmembrane 4 L six family member 5
TM9SF1	NM_001083743.1	Transmembrane 9 superfamily member 1
TM9SF2	NM_001205323.1	Transmembrane 9 superfamily member 2
TMBIM6	NM_001076414.1	Transmembrane BAX inhibitor motif containing 6
TMC4	NM_001110440.1	Transmembrane channel-like 4
TMC5	XM_002697978.1	Transmembrane channel-like 5
TMC6	NM_001075208.1	Transmembrane channel-like 6
TMEM120B	NM_001101908.1	Transmembrane protein 120B
TMEM132A	NM_001102237.1	Transmembrane protein 132A
TMEM150C	NM_001078001.1	Transmembrane protein 150C
TMEM151A	NM_001083782.1	Transmembrane protein 151A
TMEM182	NM_001083784.1	Transmembrane protein 182
TMEM190	NM_001205559.1	Transmembrane protein 190
TMEM200A	ENSBTAT00000053029	Transmembrane protein 200A
TMEM205	NM_001037599.1	Transmembrane protein 205
TMEM209	XM_002686941.2	Transmembrane protein 209
TMEM216	NM_001166563.1	Transmembrane protein 216
TMEM218	NM_001099159.1	Transmembrane protein 218
TMEM246	NM_001102342.1	Transmembrane protein 246
TMEM30B	XM_002691040.2	Transmembrane protein 30B
TMEM52	XM_002694183.1	Transmembrane protein 52
TMEM66	NM_001076856.1	Transmembrane protein 66
TMEM67	ENSBTAT00000061587	Transmembrane protein 67
TMEM74	XM_590746.2	Transmembrane protein 74
TMEM89	NM_001111068.1	Transmembrane protein 89
TNFSF9	XM_002688880.1	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
TNS4	NM_001038155.1	Tensin 4
TOB2	NM_001083387.1	Transducer of ERBB2, 2
TOP1MT	XM_003583025.1	Topoisomerase (DNA) I, mitochondrial
TOX2	NM_001206689.1	TOX high mobility group box family member 2

TP53I3	NM_001075378.1	Tumor protein p53 inducible protein 3
TPD52L1	NM_001076033.1	Tumor protein D52-like 1
TPK1	NM_001080370.1	Thiamin pyrophosphokinase 1
TPM1	NM_001013590.2	Tropomyosin 1 (alpha)
TPST2	NM_001035429.1	Tyrosylprotein sulfotransferase 2
TRAPPC9	NM_001037474.1	Trafficking protein particle complex 9
TRIM14	XM_600917.4	Tripartite motif containing 14
TRIM29	NM_001099379.1	Tripartite motif containing 29
TRIM36	NM_001206726.1	Tripartite motif containing 36
TRIM38	NM_001034574.1	Tripartite motif containing 38
TRIM47	NM_001193197.1	Tripartite motif containing 47
TRIM55	NM_001046579.1	Tripartite motif containing 55
TRIM8	NM_001191476.1	Tripartite motif containing 8
TSC22D4	NM_001075860.1	TSC22 domain family, member 4
TSPAN1	NM_001034270.1	Tetraspanin 1
TSPYL1	NM_001076111.1	TSPY-like 1
TSPYL4	NM_001101064.1	TSPY-like 4
TSSK3	NM_001206825.1	Testis-specific serine kinase 3
TTC29	NM_001099073.1	Tetratricopeptide repeat domain 29
TTC30B	NM_001099091.1	Tetratricopeptide repeat domain 30B
TTC34	XM_002694179.1	Tetratricopeptide repeat domain 34
TTC8	XM_002691089.2	Tetratricopeptide repeat domain 8
TUBA1D	NM_001046410.1	Tubulin, alpha 3d
TUBA4A	NM_001078158.1	Tubulin, alpha 4a
TUBA8	NM_001077095.1	Tubulin, alpha 8
TUBE1	NM_001101962.1	Tubulin, epsilon 1
TULP2	NM_001098873.1	Tubby like protein 2
U12	ENSBTAT00000060835	U12 minor spliceosomal RNA
U5	ENSBTAT00000061810	U5 spliceosomal RNA
U6	ENSBTAT00000062385	U6 spliceosomal RNA
U6atac	ENSBTAT00000062878	U6atac minor spliceosomal RNA
UBE2A	NM_001105325.1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2A
UBE2Q1	NM_001206320.1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 1
UBXN2B	NM_001206828.1	UBX domain protein 2B
UGT8	NM_001083635.1	UDP glycosyltransferase 8
UNC5A	XM_582427.6	Unc-5 homolog A (C. Elegans)
UPF1	XM_001789911.3	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)
UPK3BL	NM_001168011.1	Uroplakin 3B-like
UROS	NM_001110086.1	Uroporphyrinogen III synthase
USH1C	NM_001035382.1	Usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe)
USO1	NM_174845.2	USO1 vesicle docking protein homolog (yeast)
USP27X	NM_001145075.1	Ubiquitin specific peptidase 27, X-linked
USP43	XM_583534.6	Ubiquitin specific peptidase 43
UTF1	ENSBTAT00000034863	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
Vault	ENSBTAT00000040740	Vault RNA
VILL	NM_001191121.2	Villin-like

VMA21	NM_001081616.1	VMA21 vacuolar H <sup>+</sup> -atpase homolog (S. Cerevisiae)
VN1R1	XM_001256784.1	Vomeronasal 1 receptor 1
VNN1	NM_001024556.2	Vanin 1
VWA3B	ENSBTAT00000048703	Von Willebrand factor A domain containing 3B
VWA5A	XM_600048.4	Von Willebrand factor A domain containing 5A
WDR17	XM_001789371.3	WD repeat domain 17
WDR34	NM_001206205.1	WD repeat domain 34
WDR38	NM_001163946.1	WD repeat domain 38
WDR52	ENSBTAT00000018490	WD repeat domain 52
WDR60	XM_001788938.2	WD repeat domain 60
WDR78	XM_002703952.2	WD repeat domain 78
WDR93	NM_001075722.1	WD repeat domain 93
WDR96	NM_001205849.1	WD repeat domain 96
WFDC2	NM_001076490.1	WAP four-disulfide core domain 2
WFIKKN2	NM_001076885.1	WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain
WWC1	XM_002689366.2	WW and C2 domain containing 1
ZBBX	XM_010801441.1	Zinc finger, B-box domain containing
ZBED1	XM_002700428.2	Zinc finger, BED-type containing 1
ZCCHC12	NM_001076197.1	Zinc finger, CCHC domain containing 12
ZDHH1	NM_001075747.1	Zinc finger, DHHC-type containing 1
ZDHH11	XM_869440.3	Zinc finger, DHHC-type containing 11-like
ZDHH21	NM_001081534.1	Zinc finger, DHHC-type containing 21
ZFAND6	NM_001034460.1	Zinc finger, AN1-type domain 6
ZKSCAN1	NM_001205510.1	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 1
ZKSCAN4	XM_588389.5	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 4
ZMAT1	XM_580720.4	Zinc finger, matrin-type 1
ZMIZ1	XM_868846.5	Zinc finger, MIZ-type containing 1
ZNF215	NM_001076882.2	Zinc finger protein 215
ZNF219	XM_867319.3	Zinc finger protein 219
ZNF266	NM_001104968.1	Zinc finger protein 266
ZNF331	NM_001103251.1	Zinc finger protein 331
ZNF415	XM_609543.5	Zinc finger protein 415
ZNF518B	XM_002688457.1	Zinc finger protein 518B
ZNF536	XM_002694850.2	Zinc finger protein 536
ZNF577	XM_003583466.1	Zinc finger protein 577
ZNF696	XM_002701165.2	Zinc finger protein 696
ZNF804B	NM_001191503.1	Zinc finger protein 804B
ZNF813	XM_002695323.2	Zinc finger protein 813
ZPBP	NM_001038611.1	Zona pellucida binding protein
ZSWIM2	NM_001192467.1	Zinc finger, SWIM-type containing 2
ZSWIM3	XM_002692345.1	Zinc finger, SWIM-type containing 3

### Anexo III Listado de genes agrupados (SOTA2)

Símbolo oficial	Acceso	Nombre
5S_rRNA	ENSBTAT00000049451	5S ribosomal RNA

7SK	ENSBTAT00000061795	7sk rna
A2M	NM_001109795.1	Alpha-2-macroglobulin
A4GALT	ENSBTAT00000037673	Alpha 1,4-galactosyltransferase
ABCA10	XM_001789465.3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 10
ABCA6	XM_002696225.1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6
ABCB4	XM_001251122.1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
ABCC5	ENSBTAT00000023496	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5
ABHD4	NM_001034368.1	Abhydrolase domain containing 4
ABHD5	NM_001076063.1	Abhydrolase domain containing 5
ABI3BP	XM_010801064.1	ABI family, member 3 (NESH) binding protein
ABLIM1	XM_002698530.2	Actin binding LIM protein 1
ABLIM3	NM_001099127.1	Actin binding LIM protein family, member 3
ACAP3	NM_001083687.1	Arfgap with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 3
ACE2	NM_001024502.2	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2
ACRBP	XM_002687869.1	Acrosin binding protein
ACTA2	NM_001034502.1	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
ACTBL2	XM_010816767.1	Actin, beta-like 2
ACTN2	NM_001034635.1	Actinin, alpha 2
ADAM10	NM_174496.2	ADAM metallopeptidase domain 10
ADAM9	NM_001192818.2	ADAM metallopeptidase domain 9
ADAMTSL2	NM_001205934.1	ADAMTS-like 2
Adamts15	ENSBTAT00000008750	Adamts15
ADD3	NM_001075194.1	Adducin 3 (gamma)
AEBP1	NM_174839.3	AE binding protein 1
AFF3	XM_002691147.2	AF4/FMR2 family, member 3
AGRP	NM_173983.1	Agouti related protein homolog (mouse)
AHNAK2	XM_002696792.3	AHNAK nucleoprotein 2
AIDA	NM_001205634.1	Axin interactor, dorsalization associated
AIF1	NM_173985.2	Allograft inflammatory factor 1
AKAP2	NM_001193034.2	A kinase (PRKA) anchor protein 2
AKAP4	NM_174235.1	A kinase (PRKA) anchor protein 4
AKAP5	NM_174236.1	A kinase (PRKA) anchor protein 5
ALOX12	NM_001192336.1	Arachidonate 12-lipoxygenase
ALOX12B	NM_001192038.1	Arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type
ALOX5	NM_001192792.1	Arachidonate 5-lipoxygenase
AMOTL2	XM_002685085.2	Angiomotin like 2
AMPH	NM_001098130.1	Amphiphysin
ANG	ENSBTAT00000026126	Angiogenin, ribonuclease, rnase A family, 5
ANGPT1	NM_001076797.1	Angiopoietin 1
ANGPTL2	NM_001109814.1	Angiopoietin-like 2
ANGPTL6	NM_001128070.1	Angiopoietin-like 6
ANK1	NM_001104962.1	Ankyrin 1, erythrocytic
ANKRD50	NM_001205949.1	Ankyrin repeat domain 50
ANKRD9	NM_001102144.1	Ankyrin repeat domain 9
ANXA5	NM_001040477.3	Annexin A5
ANXA6	NM_001103224.1	Annexin A6

AOX1	NM_176668.2	Aldehyde oxidase 1
APOA1	NM_174242.3	Apolipoprotein A-I
APOBEC3B	NM_001077845.1	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B
ARAP3	XM_003586307.1	Arfgap with rhogap domain, ankyrin repeat and PH domain 3
ARHGAP42	XM_003584766.1	Rho gtpase activating protein 42
ARHGEF11	XM_588515.5	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11
ARL10	NM_001076320.1	ADP-ribosylation factor-like 10
ARL11	NM_001192342.1	ADP-ribosylation factor-like 11
ARL4C	NM_001102348.1	ADP-ribosylation factor-like 4C
ARMCX1	NM_001075167.1	Armadillo repeat containing, X-linked 1
ARSE	NM_001097988.1	Arylsulfatase E (chondrodysplasia punctata 1)
ARSJ	XM_611819.3	Arylsulfatase family, member J
ASAP1	NM_175821.2	Arfgap with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1
ASB16	NM_001101188.1	Ankyrin repeat and SOCS box containing 16
ASB2	NM_001034669.1	Ankyrin repeat and SOCS box containing 2
ASB9	NM_001191166.1	Ankyrin repeat and SOCS box containing 9
ASCL2	NM_001040607.1	Achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila)
ATP6V0D1	NM_174505.2	Atpase, H+ transporting, lysosomal 38kda, V0 subunit d1
ATP6V0E2	NM_001097574.1	Atpase, H+ transporting V0 subunit e2
ATP8B1	NM_001192839.1	Atpase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 1
ATRX	XM_592333.6	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
AVPI1	NM_001034760.1	Arginine vasopressin-induced 1
B3GALT	XM_002691759.2	Beta 1,3-galactosyltransferase-like
B4GALNT1	NM_001017943.1	Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1 Xylosylprotein beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 7 (galactosyltransferase I)
B4GALT7	NM_001075321.1	Beta-1,4-galactosyltransferase 7
BACE1	NM_001046531.1	Beta-site APP-cleaving enzyme 1
BACE2	NM_001206062.1	Beta-site APP-cleaving enzyme 2
BACH1	XM_002684612.2	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1
BANK1	ENSBTAT00000020342	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1
BATF	NM_001206278.1	Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like
BCAR1	NM_001206698.1	Breast cancer anti-estrogen resistance 1
BNBD-9-LIKE	XM_003587938.1	Neutrophil beta-defensin-9 like peptide
BOK	NM_001098868.1	BCL2-related ovarian killer
BPI	NM_173895.2	Bactericidal/permeability-increasing protein
bta-mir-199c	ENSBTAT00000061883	Bta-mir-199c
bta-mir-2284y-4	ENSBTAT00000062111	Bta-mir-2284y-4
bta-mir-2416	ENSBTAT00000063146	Bta-mir-2416
bta-mir-339a	ENSBTAT00000062263	Bta-mir-339a
BTBD16	NM_001038131.1	BTB (POZ) domain containing 16
C10H14orf1	NM_001035423.1	Chromosome 10 open reading frame, human c14orf1
C10H14orf37	NM_001038060.1	Chromosome 10 open reading frame, human c14orf37
C14orf159	ENSBTAT00000061238	Chromosome 14 open reading frame 159
C16H1orf115	NM_001205383.2	Chromosome 16 open reading frame, human c1orf115
C18H19orf33	NM_001207046.1	Chromosome 18 open reading frame, human c19orf33
C19H17orf79	NM_001098894.1	Chromosome 19 open reading frame, human c17orf79
C1orf186	ENSBTAT00000011220	Chromosome 1 open reading frame 186

C1QL1	NM_001205862.1	Complement component 1, q subcomponent-like 1
C1QTNF1	NM_001083409.1	C1q and tumor necrosis factor related protein 1
C1QTNF3	NM_001101138.1	C1q and tumor necrosis factor related protein 3
C21H15orf38	NM_001076304.1	UPF0552 protein c15orf38 homolog
C22H3orf18	NM_001101260.1	Chromosome 22 open reading frame, human c3orf18
C22H3orf32	XR_084026.2	Chromosome 22 open reading frame, human c3orf32
C23H6orf52	NR_026726.1	Chromosome 23 open reading frame, human c6orf52
C25H16orf5	NM_001014892.1	Chromosome 25 open reading frame, human c16orf5
C26H10orf131	XM_002698480.2	Chromosome 26 open reading frame, human c10orf131
C2CD4B	NM_001046307.1	C2 calcium-dependent domain containing 4B
C3H1orf162	XM_003585873.1	Chromosome 3 open reading frame, human c1orf162
C3orf32	ENSBTAT00000007151	Chromosome 3 open reading frame 32
C5H12orf5	NM_001076370.1	Chromosome 5 open reading frame, human c12orf5
C5H22orf28	NM_001015631.2	Chromosome 5 open reading frame, human c22orf28
C8A	NM_001046285.1	Complement component 8, alpha polypeptide
C8H9orf91	NM_001024561.2	Chromosome 8 open reading frame, human c9orf91
CA1	NM_001075466.1	Carbonic anhydrase I
CABLES1	XM_002697726.2	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1
CADM3	NM_001075946.1	Cell adhesion molecule 3
CALD1	NM_174258.2	Caldesmon 1
CAP1	XM_005204659.2	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)
CAPG	NM_178574.2	Capping protein (actin filament), gelsolin-like
CAPRIN2	XM_871851.3	Caprin family member 2
CARD11	NM_001109796.1	Caspase recruitment domain family, member 11
CARD9	NM_001077111.1	Caspase recruitment domain family, member 9
CASP1	XM_592026.4	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
CBFA2T3	XM_001251963.3	Core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3
CBR1	NM_001034513.1	Carbonyl reductase 1
CBR3	NM_001075734.1	Carbonyl reductase 3
CCDC23	NM_001040575.1	Coiled-coil domain containing 23
CCDC48	NM_001146692.1	Coiled-coil domain containing 48
CCDC58	NM_001083389.1	Coiled-coil domain containing 58
CCDC68	XM_002697773.1	Coiled-coil domain containing 68
CCDC90A	NM_001102309.1	Coiled-coil domain containing 90A
CCL2	NM_174006.2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL3	NM_174511.2	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL8	XM_001255312.4	C-C motif chemokine 8-like
CCR4L	NM_001082454.1	CCR4 carbon catabolite repression 4-like ( <i>S. Cerevisiae</i> )
CD14	NM_174008.1	CD14 molecule
CD163L1	ENSBTAT00000052415	Antigen WC1.1 precursor
CD180	NM_001076168.1	CD180 molecule
CD1D	NM_001205381.1	CD1D antigen, d polypeptide
CD1E	NM_001034394.1	CD1e molecule
CD200R1L	XM_002684750.4	CD200 receptor 1-like
CD276	XM_864408.5	CD276 molecule
CD300LG	XM_867184.5	CD300 molecule-like family member g

CD36	NM_174010.2	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
CD44	NM_174013.3	CD44 molecule (Indian blood group)
CD59	NM_001037446.1	CD59 molecule, complement regulatory protein
CD74	NM_001034735.1	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
CD86	NM_001038017.1	CD86 molecule
CDC42EP3	ENSBTAT00000032505	Cdc42 effector protein 3
CDC7	NM_001037468.1	Cell division cycle 7 homolog (S. Cerevisiae)
CDH13	NM_001035277.1	Cadherin 13, H-cadherin (heart)
CDK14	NM_001206776.2	Cyclin-dependent kinase 14
CDK7	NM_001075715.1	Cyclin-dependent kinase 7
CDKN2B	NM_001075894.1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
CEBPA	ENSBTAT00000006571	Cebpa
CELA3B	NM_001166518.1	Chymotrypsin-like elastase family, member 3B
CENPH	NM_001034236.1	Centromere protein H
CEP170	NM_001035377.2	Centrosomal protein 170kda
CEP19	NM_001099129.1	Centrosomal protein 19kda
CEP78	XM_002689659.2	Centrosomal protein 78kda
CFTR	NM_174018.2	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)
CHGA	NM_181005.2	Chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)
CHODL	NM_001101228.1	Chondrolectin
CHRNA3	NM_174719.2	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3 (neuronal)
CHST11	NM_001192668.1	Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11
CHST12	NM_001077913.1	Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 12
CIDEA	NM_001083449.1	Cell death-inducing DFFA-like effector a
CLEC12A	NM_001105345.1	C-type lectin domain family 12, member A
CLEC2B	XM_002704424.2	C-type lectin domain family 2, member B
CLEC4E	XM_002687823.1	C-type lectin domain family 4, member E
CLN8	ENSBTAT00000011319	Protein CLN8
CMIP	XM_001251051.3	C-Maf inducing protein
CMYA5	XM_003585416.1	Cardiomyopathy associated 5
CNOT8	NM_001192774.1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 8
CNP	NM_180993.1	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
CNTNAP2	XM_002687137.1	Contactin associated protein-like 2
COBLL1	XM_010802043.1	Cordon-bleu WH2 repeat protein-like 1
COL12A1	NM_001206497.1	Collagen, type XII, alpha 1
COL21A1	XM_003587662.1	Collagen, type XXI, alpha 1
COL8A2	NM_001205665.1	Collagen, type VIII, alpha 2
COLEC10	NM_001205713.1	Collectin sub-family member 10 (C-type lectin)
COMP	NM_001166517.1	Cartilage oligomeric matrix protein
COPZ2	NM_001206922.1	Coatmer protein complex, subunit zeta 2
CORO1A	NM_174521.2	Coronin, actin binding protein, 1A
CORO6	NM_001102282.1	Coronin 6
COTL1	NM_001046593.1	Coactosin-like 1 (Dictyostelium)
CPA6	ENSBTAT00000061366	Carboxypeptidase A6
CPT1C	XM_591445.3	Carnitine palmitoyltransferase 1C



CREB5	XM_865288.4	Camp responsive element binding protein 5
CREM	NM_001034710.2	Camp responsive element modulator
CRLF1	XM_002688536.2	Cytokine receptor-like factor 1
CRTC1	NM_001206319.1	CREB regulated transcription coactivator 1
CRTC3	XM_591546.5	CREB regulated transcription coactivator 3
CRX	NM_173904.2	Cone-rod homeobox
CSF1R	NM_001075403.2	Colony stimulating factor 1 receptor
CSPG4	NM_001192782.1	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
CSPG5	NM_001075229.1	Chondroitin sulfate proteoglycan 5 (neuroglycan C)
CTSA	NM_001035326.1	Cathepsin A
CTSK	NM_001034435.1	Cathepsin K
CTSL2	NM_174032.2	Cathepsin L2
CTSS	NM_001033615.1	Cathepsin S
CX3CR1	NM_001102558.1	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
CXCL10	NM_001046551.1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCL11	NM_001113173.1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
CXXC5	NM_001038176.2	CXXC finger protein 5
CYB5R2	XM_002693123.2	Cytochrome b5 reductase 2
CYHR1	NM_001015532.1	Cysteine/histidine-rich 1
CYP27C1	XM_002685217.2	Cytochrome P450, family 27, subfamily C, polypeptide 1
CYR61	NM_001034340.1	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
DBC1	NM_001015669.1	Deleted in bladder cancer 1
DBN1	NM_001045917.1	Drebrin 1
DDAH2	NM_001034704.1	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
DDC	NM_173907.2	Dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)
DDR2	NM_001083720.1	Discoidin domain receptor tyrosine kinase 2
DEFB1	NM_175703.3	Defensin, beta 1
DEFB4A	NM_174775.1	Defensin, beta 4A
DEFB5	NM_001130761.1	Defensin, beta 5
DEFB7	ENSBTAT00000062925	Beta-defensin 7
DENND4B	XM_584938.5	DENN/MADD domain containing 4B
DENND5A	ENSBTAT0000008297	DENN/MADD domain containing 5A
DIP2B	NM_001192309.1	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B (Drosophila)
DIRAS3	NM_001034215.1	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3
DLK2	NM_001083494.1	Delta-like 2 homolog (Drosophila)
DMKN	NM_001082463.1	Dermokine
DOCK8	NM_001191532.1	Dedicator of cytokinesis 8
DOK5	NM_001075939.1	Docking protein 5
DPEP1	NM_001034472.1	Dipeptidase 1 (renal)
DPYSL3	NM_001101068.1	Dihydropyrimidinase-like 3
DRAP1	NM_001076214.1	DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)
DTX4	XM_002693821.2	Deltex homolog 4 (Drosophila)
DUSP23	NM_001082609.1	Dual specificity phosphatase 23
DUSP4	NM_001206953.1	Dual specificity phosphatase 4
DVL3	XM_002684877.2	Dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)
EDC3	NM_001031758.1	Enhancer of mrna decapping 3 homolog (S. Cerevisiae)

EEF1A2	NM_001037464.1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2
EFNA4	NM_001101249.1	Ephrin-A4
EHBP1	XM_002691381.2	EH domain binding protein 1
EID2	NM_001078049.1	EP300 interacting inhibitor of differentiation 2
ELF3	NM_001098909.2	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific )
ELL2	NM_001191146.1	Elongation factor, RNA polymerase II, 2
ELOVL2	NM_001083517.1	ELOVL fatty acid elongase 2
ELTD1	NM_001076908.1	EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1
EMR1	XM_003582392.1	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1-like
EMR3	XR_083707.2	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 3-like
ENHO	NM_001163653.1	Energy homeostasis associated
ENO2	NM_001101125.1	Enolase 2 (gamma, neuronal)
EPB41L1	NM_001206223.1	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1
EPHA2	NM_001205731.1	EPH receptor A2
EPHA3	NM_001206113.1	EPH receptor A3
EPHA7	NM_001192726.1	EPH receptor A7
EPHB4	NM_001206268.1	EPH receptor B4
EPS8L3	NM_001205289.2	EPS8-like 3
ESF1	NM_001192772.1	ESF1, nucleolar pre-rRNA processing protein, homolog (S. Cerevisiae)
ETS2	NM_001080214.1	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)
EVI2B	NM_001099166.1	Ecotropic viral integration site 2B
EXOC3L1	NM_001075882.1	Exocyst complex component 3-like 1
EXTL2	NM_001076224.1	Exostoses (multiple)-like 2
F2RL2	NM_001038533.2	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2
FADS2	NM_001083444.1	Fatty acid desaturase 2
FADS3	NM_001083691.1	Fatty acid desaturase 3
FAIM	NM_001079626.1	Fas apoptotic inhibitory molecule
FAIM2	NM_001075418.1	Fas apoptotic inhibitory molecule 2
FAM167A	NM_001076494.2	Family with sequence similarity 167, member A
FAM167B	NM_001101268.1	Family with sequence similarity 167, member B
FAM178A	NM_001102259.1	Family with sequence similarity 178, member A
FAM19A5	NM_001077000.1	Family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A5
FAM20C	XM_002698175.2	Family with sequence similarity 20, member C
FAM213A	NM_001034599.1	Chromosome 28 open reading frame, human c10orf58
FAM46B	NM_001045950.1	Family with sequence similarity 46, member B
FAM65A	ENSBTAT00000011667	Family with sequence similarity 65, member A
FAM65C	XM_002692501.2	Family with sequence similarity 65, member C
FAM78A	ENSBTAT00000005969	Protein FAM78A
FAM78B	NM_001206587.1	Family with sequence similarity 78, member B
FANCC	NM_174316.2	Fanconi anemia, complementation group C
FAR2	NM_001076022.1	Fatty acyl coa reductase 2
FBLN2	XM_002697131.1	Fibulin 2
FBXL7	XM_002696446.2	F-box and leucine-rich repeat protein 7
FBXO10	NM_001144076.1	F-box protein 10
FCHO1	XM_002688540.1	FCH domain only 1
FERMT3	ENSBTAT00000022017	Fermitin family member 3

FEZ2	XM_001251831.1	Fasciculation and elongation protein zeta 2 (zygin II)
FGF12	ENSBTAT00000016471	Fibroblast growth factor 12
FGF13	NM_001098892.1	Fibroblast growth factor 13
FILIP1	NM_001192362.1	Filamin A interacting protein 1
FKBP10	NM_001046403.1	FK506 binding protein 10, 65 kda
FKBP1A	NM_001035456.1	FK506 binding protein 1A, 12kda
FKBP3	NM_001038112.3	FK506 binding protein 3, 25kda
FKBP7	NM_001100330.1	FK506 binding protein 7
FLNA	NM_001206514.1	Filamin A, alpha
FLT3LG	NM_181030.2	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
Flvcr2	ENSBTAT00000015901	Flvcr2
FMNL3	NM_001191506.1	Formin-like 3
FMO4	NM_001192230.1	Flavin containing monooxygenase 4
FMOD	NM_174058.2	Fibromodulin
FOXN2	XM_002691316.1	Forkhead box N2
FOXN3	NM_001206687.1	Forkhead box N3
FRMD3	NM_001046348.1	FERM domain containing 3
FRZB	NM_174059.2	Frizzled-related protein
FSD1	NM_001081518.1	Fibronectin type III and SPRY domain containing 1
FSTL1	XM_001254148.3	Follistatin-like 1
FZD2	XM_003583623.1	Frizzled-2-like
FZD9	XM_599625.3	Frizzled family receptor 9
GAL3ST3	NM_001075840.1	Galactose-3-O-sulfotransferase 3
GALNTL4	NM_001076316.1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4
GAPT	NM_001099397.1	GRB2-binding adaptor protein, transmembrane
GAS7	NM_001102280.1	Growth arrest-specific 7
GATA1	NM_001206240.1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)
GATA3	NM_001076804.1	GATA binding protein 3
GBP2	XM_002686265.1	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible
GCNT1	NM_177510.2	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2
GDA	NM_001192620.1	Guanine deaminase
GDF1	XM_002688525.1	Growth differentiation factor 1
GDF11	XM_002687421.2	Growth differentiation factor 11
GDF7	NM_001206101.1	Growth differentiation factor 7
GFRA2	NM_001015595.2	GDNF family receptor alpha 2
GFRA4	XM_870813.4	GDNF family receptor alpha 4
GGCT	NM_001037610.1	Gamma-glutamylcyclotransferase
GGCX	NM_174066.2	Gamma-glutamyl carboxylase
GIMAP1	NM_001083677.1	Gtpase, IMAP family member 1
GIMAP7	NM_001046308.1	Gtpase, IMAP family member 7
GLIS2	NM_001205948.1	GLIS family zinc finger 2
GLRX	NM_001037604.2	Glutaredoxin (thioltransferase)
GLS	NM_001077964.1	Glutaminase
GLT8D2	NM_001046266.1	Glycosyltransferase 8 domain containing 2
GLTSCR1	XM_003587299.1	Glioma tumor suppressor candidate region gene 1
GNA15	NM_001192714.1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)

GNAI1	NM_174324.2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1
GNB4	NM_001099033.1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4
GNB5	NM_001099070.1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5
GPBAR1	NM_175049.2	G protein-coupled bile acid receptor 1
GPC1	NM_001046236.1	Glypican 1
GPD2	NM_001100296.1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)
GPIHBP1	XM_002692563.1	Glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1
GPR124	ENSBTAT00000011608	G protein-coupled receptor 124
GPR161	ENSBTAT00000000809	G protein-coupled receptor 161
GPR176	NM_001192616.1	G protein-coupled receptor 176
GPR27	XM_003587626.1	G protein-coupled receptor 27
GPR34	ENSBTAT00000026831	G protein-coupled receptor 34
GPR37	NM_001075969.1	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)
GPR37L1	NM_001075899.1	G protein-coupled receptor 37 like 1
GPRASP1	XM_002699792.4	G protein-coupled receptor associated sorting protein 1
GPRC5A	NM_001034515.1	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A
GPSM1	XM_001787979.2	G-protein signaling modulator 1
GPSM3	XM_002697372.2	G-protein signaling modulator 3
GPX4	ENSBTAT00000063044	Glutathione peroxidase 4
GRB10	NM_001192586.1	Growth factor receptor-bound protein 10
GREM1	NM_001082450.1	Gremlin 1
GRIA4	ENSBTAT00000063398	Glutamate receptor 4 precursor
GRIK5	NM_001046424.1	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 5
GRIN2D	XM_002695195.1	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2D
GRM8	NM_001206117.1	Glutamate receptor, metabotropic 8
GRN	NM_001077014.1	Granulin
GSC	NM_001192386.1	Goosecoid homeobox
GSTA4	NM_001015651.1	Glutathione S-transferase alpha 4
GUCY2C	NM_174547.2	Guanylate cyclase 2C (heat stable enterotoxin receptor)
GULP1	NM_001079509.1	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
GUSB	NM_001083436.1	Glucuronidase, beta
GXYLT2	XM_583887.4	Glucoside xylosyltransferase 2
HECTD2	NM_001206772.1	HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
HEG1	XM_002684814.1	HEG homolog 1 (zebrafish)
HES5	NM_001105467.1	Hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)
HHEX	NM_001105424.1	Hematopoietically expressed homeobox
HHIP	NM_001099114.1	Hedgehog interacting protein
HIBCH	NM_001046413.1	3-hydroxyisobutyryl-coa hydrolase
HMGXB4	NM_001101856.1	HMG box domain containing 4
HMHA1	ENSBTAT00000027682	Histocompatibility (minor) HA-1
HOXA2	NM_001075854.1	Homeobox A2
HOXC6	XM_864696.5	Homeobox C6
HOXC9	XM_002687231.2	Homeobox C9
HOXD11	NM_001206324.1	Homeobox D11
HRC	NM_001102313.1	Histidine rich calcium binding protein

HRH1	ENSBTAT00000001896	Histamine H1 receptor
HRH4	XM_001251983.2	Histamine receptor H4
HS1BP3	XM_002691514.1	HCLS1 binding protein 3
HS3ST3A1	NM_001192548.1	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1
HS3ST3B1	NM_001193139.1	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1
HSD3B7	NM_001034696.1	Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7
HTRA1	NM_001244233.1	Htra serine peptidase 1
HTRA4	XM_002698718.1	Htra serine peptidase 4
HVCN1	NM_001206253.1	Hydrogen voltage-gated channel 1
HYAL1	ENSBTAT00000064853	Hyaluronoglucosaminidase 1
ICAM1	NM_174348.2	Intercellular adhesion molecule 1
IDO2	XR_084098.2	Indoleamine 2,3-dioxygenase 2-like
IER3	NM_001075202.2	Immediate early response 3
IER5L	NM_001206835.1	Immediate early response 5-like
IFIT3	NM_001075414.1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
IFITM1	NM_001078142.1	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)
IFITM10	XM_002699452.2	Interferon induced transmembrane protein 10
IFITM2	NM_001078054.1	Interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)
IFNAR2	NM_174553.2	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
IGFBP2	NM_174555.1	Insulin-like growth factor binding protein 2, 36kda
IGFBP6	NM_001040495.1	Insulin-like growth factor binding protein 6
IGSF1	NM_001105048.1	Immunoglobulin superfamily, member 1
IGSF11	NM_001076921.1	Immunoglobulin superfamily, member 11
IL11RA	NM_001034339.1	Interleukin 11 receptor, alpha
IL1RAPL1	XM_615546.4	Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1
IL1RN	NM_174357.2	Interleukin 1 receptor antagonist
INHBA	NM_174363.2	Inhibin, beta A
INPP5F	XM_003587902.1	Inositol polyphosphate-5-phosphatase F
IRF8	NM_001083769.1	Interferon regulatory factor 8
IRS1	XM_002685642.1	Insulin receptor substrate 1
ISG12(B)	NM_001076457.2	TLH29 protein precursor-like
ISM1	NM_001163935.1	Isthmin 1 homolog (zebrafish)
ISOC1	NM_001101213.1	Isochorismatase domain containing 1
ITGA6	NM_001109981.1	Integrin, alpha 6
ITGA8	XM_002701040.2	Integrin, alpha 8
ITGAX	XM_002698101.2	Integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
JAZF1	ENSBTAT00000025319	Juxtaposed with another zinc finger protein 1
JMY	XM_606924.5	Junction mediating and regulatory protein, p53 cofactor
JPH1	NM_001192887.1	Junctophilin 1
KANK3	NM_001113763.2	KN motif and ankyrin repeat domains 3
KCNA3	XM_002686146.1	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3
KCNB2	ENSBTAT00000053147	Potassium voltage-gated channel subfamily B member 2
KCNE1L	NM_001077875.1	KCNE1-like
KCNE4	NM_001081543.1	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4
KCNJ12	NM_001024690.2	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12

KCTD15	NM_001075568.1	Potassium channel tetramerisation domain containing 15
KCTD8	NM_001205725.1	Potassium channel tetramerisation domain containing 8
KDELC1	NM_001075685.1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 1
KIAA0754	NM_001206988.1	KIAA0754 ortholog
KIAA0930	XM_002687978.1	KIAA0930 ortholog
KIAA1310	NM_001099172.1	KIAA1310 ortholog
KIAA1324L	NM_001046238.2	KIAA1324-like ortholog
KIAA1715	NM_001075989.1	Kiaa1715
KIF26A	ENSBTAT00000029205	Kinesin family member 26A
KIF5A	NM_001205694.1	Kinesin family member 5A
KLF10	NM_001168462.1	Kruppel-like factor 10
KLF2	XM_002688582.2	Kruppel-like factor 2 (lung)
KLRB1	NM_001206636.1	Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1
KRTCAP3	NM_001035062.1	Keratinocyte associated protein 3
LAMA4	NM_001205965.1	Laminin, alpha 4
LAPTM4B	XM_010812166.1	Lysosomal protein transmembrane 4 beta
LAPTM5	NM_001046118.1	Lysosomal protein transmembrane 5
LARP6	ENSBTAT00000005109	La-related protein 6
LAT2	NM_001075183.2	Linker for activation of T cells family, member 2
LATS2	XM_584953.3	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)
LCN10	ENSBTAT00000021488	Lipocalin 10
Ldoc1	ENSBTAT00000024088	Ldoc1
LEPRE1	NM_001103291.1	Leucine proline-enriched proteoglycan (leprecan) 1
LEPREL1	NM_001100345.1	Lepreca-like 1
LGALS4	NM_001034768.1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 4
LGI1	NM_001046591.2	Leucine-rich, glioma inactivated 1
LGMIN	XM_003585053.1	Legumain
LILRA4	NM_001102357.1	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 4
LILRB3	XM_002695423.2	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3
LIMS1	NM_001083495.1	LIM and senescent cell antigen-like domains 1
LMO3	NM_001046337.1	LIM domain only 3 (rhombotin-like 2)
LOC100137883	ENSBTAT00000007127	Loc100137883
LOC100140410	XM_002698229.1	Uncharacterized LOC100140410
LOC100295130	XR_083970.1	Lysosomal-associated transmembrane protein 4B-like
LOC100296151	XM_002693938.1	Uncharacterized LOC100296151
LOC100296849	XR_083642.1	Protein BEX3-like
LOC100297645	XM_002704844.1	Uncharacterized LOC100297645
LOC100297676	XM_002687838.2	C-type lectin domain family 2 member G-like
LOC100297905	XM_003584636.1	Ninein-like protein-like
LOC100298353	XR_084113.2	Uncharacterized LOC100298353
LOC100299445	XM_002688994.2	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B-like
LOC100300061	XM_002699002.2	Ankyrin repeat domain 26-like
LOC100301222	XM_003585040.1	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 6-like
LOC100301250	XR_814318.1	Ras-related protein Rap-2c
LOC100335165	XM_002705650.2	Beta-defensin C7-like

LOC100335345	XM_002702348.1	Carbonyl reductase [NADPH] 1-like
LOC100335364	XM_002700610.1	FERM domain-containing protein 6-like
LOC100335434	XM_002699489.1	Uncharacterized LOC100335434
LOC100335479	XM_002707704.2	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 6-like
LOC100335628	XM_002706682.2	Beta-defensin 3-like
LOC100335809	XM_002685236.2	Protease-like
LOC100335951	XM_002706761.1	Beta-defensin 4-like
LOC100335980	XM_002684485.1	Thymosin beta-4-like
LOC100336124	XM_002702211.1	Hcg1639864-like
LOC100336391	XM_002700628.1	Protease-like
LOC100336434	XM_003587600.1	Uncharacterized LOC100336434
LOC100336547	XM_003584785.1	Wiskott-Aldrich syndrome protein-like
LOC100336560	XM_002700095.1	Wiskott-Aldrich syndrome protein-like
LOC100336568	XM_002690128.1	Laminin alpha 5-like
LOC100336656	XM_002699379.1	Fermitin family homolog 3-like
LOC100337052	XM_002690105.1	Laminin alpha 4-like
LOC100337100	XM_002698477.1	Leucine-rich glioma-inactivated protein 1-like
LOC100337102	XM_002686632.2	DDC protein-like
LOC100337179	XM_002688905.1	Thyroid hormone receptor interactor 10-like
LOC100337296	XM_003587341.3	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 5
LOC100337371	XM_003586889.1	Carboxypeptidase A6-like
LOC100337438	XM_002686187.1	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8-like protein 3-like
LOC100847108	XR_138612.1	Uncharacterized LOC100847108
LOC100847109	XM_003584037.1	Uncharacterized LOC100847109
LOC100847123	XM_003584132.1	Uncharacterized LOC100847123
LOC100847155	XM_003583976.1	Uncharacterized LOC100847155
LOC100847277	XR_138999.1	Uncharacterized LOC100847277
LOC100847295	XM_003587647.1	Uncharacterized LOC100847295
LOC100847326	XM_003583827.1	Uncharacterized LOC100847326
LOC100847376	XM_003585786.1	Uncharacterized LOC100847376
LOC100847414	XR_139271.1	Uncharacterized LOC100847414
LOC100847452	XR_138694.1	Uncharacterized LOC100847452
LOC100847523	XR_139694.1	Uncharacterized LOC100847523
LOC100847526	XM_003582163.1	Gtpase IMAP family member 8-like
LOC100847531	XM_003585620.1	Glutamate receptor, ionotropic kainate 1-like
LOC100847537	XM_003586564.1	Uncharacterized LOC100847537
LOC100847652	XR_139448.1	Uncharacterized LOC100847652
LOC100847670	XM_003586061.1	Uncharacterized LOC100847670
LOC100847674	XR_139491.1	Uncharacterized LOC100847674
LOC100847678	XM_003588180.1	Uncharacterized LOC100847678
LOC100847697	XR_139260.1	Uncharacterized LOC100847697
LOC100847757	XM_003585957.1	Platelet glycoprotein 4-like
LOC100847914	XR_139541.1	Uncharacterized LOC100847914
LOC100847932	XM_003587838.1	Uncharacterized LOC100847932
LOC100847951	XM_003587726.1	Uncharacterized LOC100847951

LOC100848143	XM_003585601.1	Dedicator of cytokinesis protein 11-like
LOC100848246	XR_139015.1	Uncharacterized LOC100848246
LOC100848317	XM_003583915.1	Uncharacterized LOC100848317
LOC100848366	XR_139523.1	Uncharacterized LOC100848366
LOC100848375	XR_139401.1	Uncharacterized LOC100848375
LOC100848404	XM_003584130.1	Uncharacterized LOC100848404
LOC100848448	XR_139043.1	Uncharacterized LOC100848448
LOC100848452	XM_003584767.1	Uncharacterized LOC100848452
LOC100848461	XM_003585167.1	Laminin subunit alpha-2-like
LOC100848466	XR_139490.1	Progesterone receptor-like
LOC100848531	XM_003587050.1	Uncharacterized LOC100848531
LOC100848548	XR_138933.1	Uncharacterized LOC100848548
LOC100848684	XR_139212.1	Uncharacterized LOC100848684
LOC100848719	XM_003587519.1	Uncharacterized LOC100848719
LOC100848735	XM_003584149.1	Uncharacterized LOC100848735
LOC100848864	XM_003581709.1	Uncharacterized LOC100848864
LOC100848875	XM_003583934.1	N-acetyllactosaminide beta-1,6-N-acetylglucosaminyl-transferase, isoform A-like
LOC100848952	XM_003585990.1	Uncharacterized LOC100848952
LOC100848985	XR_139270.1	Uncharacterized LOC100848985
LOC100849041	XM_003586465.1	WNT1-inducible-signaling pathway protein 3-like
LOC100849046	XM_003585825.1	SLAM family member 9-like
LOC100849222	XM_003585461.1	Proto-oncogene vav-like
LOC100849324	XM_003581835.1	Rho gtpase-activating protein 15-like
LOC100849341	XM_003585549.1	BTB/POZ domain-containing protein KCTD17-like
LOC100849568	XR_139156.1	Uncharacterized LOC100849568
LOC100849709	XM_003584725.1	Ovalbumin-like
LOC100849790	XM_003581823.1	Secretory phospholipase A2 receptor-like
LOC100849837	XM_003582451.1	PRELI domain-containing protein 2-like
LOC100849866	XM_003581722.1	Uncharacterized LOC100849866
LOC100850031	XM_003582023.1	Uncharacterized LOC100850031
LOC100850196	XR_139027.1	Uncharacterized LOC100850196
LOC100850381	XM_003585209.1	Neurotrophin-4-like
LOC100851010	XM_003584111.1	Phosphatidylinositide phosphatase SAC2-like
LOC100851082	XM_003581763.1	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B'' subunit alpha-like
LOC100851088	XM_003582271.1	Antigen WC1.1-like
LOC100851475	XM_003585524.1	Sushi repeat-containing protein SRPX2-like
LOC100851496	XM_003585292.1	Uncharacterized LOC100851496
LOC100851524	XM_003584864.1	Netrin receptor UNC5B-like
LOC100851529	XM_003585525.1	Receptor-transporting protein 4-like
LOC100851579	XM_003585038.1	Leucine-rich glioma-inactivated protein 1-like
LOC100851624	XM_003582474.1	Uncharacterized LOC100851624
LOC100851799	XM_003581794.1	Solute carrier family 40 member 1-like
LOC100852077	XM_003585042.1	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 5-like
LOC101903126	XM_010812595.1	Interferon-induced very large gtpase 1-like
LOC104968444	XR_808414.1	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B-like



LOC404107	XM_003587940.1	Beta-defensin C7-like
LOC407171	NM_001001138.1	Fc gamma 2 receptor
LOC504548	XM_002697377.1	Ubiquitin D-like
LOC504927	XM_581122.4	Coiled-coil domain containing 3-like
LOC504986	XM_003587798.1	Polycystin-1-like
LOC506672	XM_003585790.1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 2-like Feline leukemia virus subgroup C cellular receptor family, member 2-like
LOC509034	XM_585913.5	
LOC509283	XM_002696144.3	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213
LOC509972	XM_002687834.1	C-type lectin domain family 2 member D11-like
LOC510083	XM_003587495.1	Dedicator of cytokinesis protein 2-like
LOC510700	XM_001788561.3	Solute carrier family 25 member 40-like
LOC510723	XR_083091.1	Probable phospholipid-transporting atpase VA-like
LOC511498	NM_001075520.1	Cytochrome P450, family 2, subfamily c
LOC512286	XM_003581921.1	Antigen-presenting glycoprotein CD1d-like
LOC512825	XM_590407.4	MHC class I-related protein-like
LOC512863	XM_003583464.1	Sialic acid-binding Ig-like lectin 14-like
LOC514296	XM_003587635.1	5'-nucleotidase domain-containing protein 2-like
LOC519309	XM_003587249.1	Zinc finger protein 790-like
LOC522479	XM_002683806.1	Ovalbumin-like
LOC522910	ENSBTAT00000028129	Loc522910 Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1-like
LOC523153	XM_003581853.1	
LOC524129	XM_002690060.1	Lysosomal protein transmembrane 4 beta-like
LOC527068	NM_001035367.1	Aldo-keto reductase family 1 member C3 -like
LOC528150	XM_001788671.2	Man9-mannosidase-like
LOC529196	NM_001075921.1	C-C chemokine receptor type 1-like
LOC529934	XM_002683850.1	Piezo-type mechanosensitive ion channel component 2-like
LOC534200	XM_001789815.3	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3-like
LOC534360	XM_614108.6	Poliovirus receptor-related 3-like
LOC535166	XM_003586897.1	Extracellular sulfatase Sulf-1-like
LOC535643	XM_003582019.1	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2-like
LOC537655	XM_010822099.1	Dystrophin
LOC540011	XM_590893.5	Spindle and kinetochore-associated protein 2 pseudogene
LOC613677	XM_002685367.1	Mcg124345-like
LOC614138	ENSBTAT00000057343	Loc614138
LOC614141	XM_002696192.1	Cd300c molecule-like
LOC615291	XR_083543.1	Ferritin light chain-like
LOC615936	XM_010819612.1	Autism susceptibility gene 2 protein
LOC616690	XM_002707860.2	Acp1 protein-like
LOC618071	NM_001206718.1	Uncharacterized LOC618071
LOC618311	XM_003583565.1	Zinc finger protein 594-like
LOC618391	XM_002695216.2	Osjnba0006b20.10-like
LOC618541	XM_883359.4	Uncharacterized LOC618541
LOC618591	NM_001101276.1	Killer cell lectin-like receptor-like
LOC751574	NM_001076528.1	Secreted and transmembrane protein 1B
LOC751804	XR_084195.2	WC1 isolate DV100

LOC781254	XR_139520.1	26S protease regulatory subunit 10B-like
LOC781667	XM_003581923.1	Kin of IRRE like
LOC781807	XR_082924.1	Axin interactor, dorsalization-associated protein-like
LOC782134	XM_003582629.1	Myc target protein 1-like
LOC782367	ENSBTAT00000033956	Cd1d molecule-like
LOC782369	XM_002688279.1	Uncharacterized LOC782369
LOC782418	XR_082816.1	Motile sperm domain-containing protein 2-like Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3
LOC782449	XM_001250120.3	
LOC782470	XR_083734.2	Tropomyosin alpha-4 chain-like
LOC782642	XM_001251278.2	Mal, T-cell differentiation protein-like
LOC782921	XR_819728.1	Ferritin light chain Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3-like
LOC783134	XM_002695426.2	
LOC783195	XM_002690653.1	Ribonuclease 4-like
LOC783920	XR_082927.2	Interferon-induced very large gtpase 1-like
LOC784007	XM_001252441.4	Uncharacterized LOC784007
LOC784129	XR_083452.2	Coiled-coil domain-containing protein 3-like
LOC784519	XM_001789758.2	Deoxyribonuclease gamma-like
LOC784535	ENSBTAT00000019687	Loc784535
LOC784541	XM_003586410.1	Uncharacterized LOC784541
LOC784623	XM_002707864.1	Uncharacterized LOC784623
LOC784703	XM_001251479.3	Ras-related protein Rab-33A
LOC785088	XM_001250370.3	Hormone-sensitive lipase-like
LOC785323	XM_001253389.2	Ninein-like protein-like
LOC785745	XM_002696647.1	Putative thymosin beta-4-like protein 2-like
LOC786215	XM_001253968.1	Uncharacterized LOC786215
LOC786332	XM_003588118.1	Tomoregulin-1-like
LOC786948	XM_003587795.1	Tryptase-2-like
LOC787549	XR_083239.2	Coiled-coil domain-containing protein 3-like
LOC787668	XM_010802704.1	Olfactory receptor 1052-like
LOC787750	XM_003585569.1	Ferritin light chain-like
LOC787905	ENSBTAT00000037519	Loc787905
LOC788643	XR_083450.2	Platelet-derived growth factor subunit B-like
LOC789148	XM_003582399.1	Rap1b, member of RAS oncogene family-like
LOC789368	XM_001256143.1	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 5-like
LOC789687	ENSBTAT00000063180	Uncharacterized LOC789687
LOC789929	XM_010818652.1	Olfactory receptor 5D18-like
LOC790101	XR_138959.1	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 6-like
LOC790255	XM_003585464.1	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 6-like
LOC790270	XM_001256788.1	UDP-N-acetylglucosamine transporter-like
LOC790388	XM_001256871.3	Probable G-protein coupled receptor 37-like
LOX	NM_173932.3	Lysyl oxidase
LPAR1	NM_174047.2	Lysophosphatidic acid receptor 1
LRAT	ENSBTAT00000022813	Lecithin retinol acyltransferase Leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 2
LRCH2	XM_618181.3	
LRP6	XM_002687783.2	Low density lipoprotein receptor-related protein 6

LRRC25	NM_174688.3	Leucine rich repeat containing 25
LRRC8B	XM_595756.5	Leucine rich repeat containing 8 family, member B
LSM11	ENSBTAT00000013683	LSM11, U7 small nuclear RNA associated
LSP1	NM_001075374.1	Lymphocyte-specific protein 1
LY9	NM_001075918.1	Lymphocyte antigen 9
LYZ2	NM_180999.1	Lysozyme C-2
MACC1	ENSBTAT00000004882	Metastasis associated in colon cancer 1
MAL	NM_001075428.1	Mal, T-cell differentiation protein
MAMLD1	XM_002699644.1	Mastermind-like domain containing 1
MAN1A1	NM_001205972.1	Mannosidase, alpha, class 1A, member 1
MAP2K1	NM_001130752.1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAP2K6	NM_001034045.1	Mitogen-activated protein kinase kinase 6
MAP3K6	NM_001193236.1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
MAP4K3	NM_001191162.1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3
MAP7D3	ENSBTAT000000048938	MAP7 domain containing 3
MAPRE2	NM_001034374.2	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2
MARCKS	NM_001076276.1	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
MARK3	XM_002696784.2	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
MCF2L	XM_003586739.1	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like
MDGA2	XM_617674.6	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 2
ME1	ENSBTAT00000007465	NADP-dependent malic enzyme
MECOM	XM_003581743.1	MDS1 and EVI1 complex locus
MEF2BNB	NM_001145790.1	MEF2B neighbor
MEMO1	NM_001076395.1	Mediator of cell motility 1
MEP1B	NM_001144098.1	Meprin A, beta
MET	NM_001012999.2	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
MEX3B	XM_002696619.2	Mex-3 homolog B (C. Elegans)
MFSD11	NM_001075777.1	Major facilitator superfamily domain containing 11
MFSD12	XM_605041.6	Major facilitator superfamily domain containing 12
MGAT5B	NM_001102337.1	Mannosyl (alpha-1,6)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme B
MGC134093	ENSBTAT000000051932	Uncharacterized protein LOC768011
MGC139164	NM_001101916.1	Uncharacterized LOC509649
MGC148762	NM_001102069.1	Uncharacterized LOC522763
MIC1	NM_001127317.1	Major histocompatibility class I related protein
MIC2	XM_001255620.3	CD99 molecule
MIR199C	NR_031110.1	Microrna mir-199c
MIR21	ENSBTAT000000042276	Microrna mir-21
MIR2299	NR_031036.1	Microrna mir-2299
MIR339	NR_031204.1	Microrna mir-339
MIR370	ENSBTAT000000042161	Microrna mir-370
MIR490	ENSBTAT000000042344	Microrna mir-490
MLLT11	NM_001076169.1	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 11
MPZ	NM_001079507.1	Myelin protein zero
MRC1	XM_003582925.1	Mannose receptor, C type 1
MRPL32	NM_001038679.1	Mitochondrial ribosomal protein L32

MS4A1	NM_001077854.1	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
MSN	NM_001046477.1	Moesin
MSR1	NM_001113240.1	Macrophage scavenger receptor 1
MSRB3	XM_002687542.1	Methionine sulfoxide reductase B3
MSTN	NM_001001525.2	Myostatin
MSX2	NM_001079614.1	Msh homeobox 2
MTA3	NM_001101964.1	Metastasis associated 1 family, member 3
MTHFR	NM_001011685.1	Methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)
MTMR9	NM_001046256.1	Myotubularin related protein 9-like
MTRR	NM_001030299.1	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase
MUC13	XM_002702427.2	Mucin 13, cell surface associated V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
MYCN	XM_869019.4	
MYL12A	NM_001015640.2	Myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric
MYL6B	NM_001075713.1	Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle
MYO19	NM_001024501.2	Myosin XIX
MYO1G	XM_594668.5	Myosin IG
MYO9A	XM_593333.5	Myosin IXA
MYOF	NM_001193212.1	Myoferlin
NACAD	ENSBTAT00000010646	NAC alpha domain containing
NANP	NM_001105377.1	N-acetylneuraminic acid phosphatase
NAPSA	XM_001790617.2	Napsin A aspartic peptidase
NBEA	XM_002691752.2	Neurobeachin
NCK2	NM_001099036.1	NCK adaptor protein 2
NCKAP1L	NM_001143876.1	NCK-associated protein 1-like
NDN	NM_001014982.1	Necdin homolog (mouse)
NEDD4	XM_003582720.1	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4
NES	NM_001206591.1	Nestin
NEU1	NM_001083642.1	Sialidase 1 (lysosomal sialidase)
NFAT5	XM_002694839.2	Nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive
NFE2	NM_001014923.1	Nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kda
NFIL3	NM_001075240.1	Nuclear factor, interleukin 3 regulated
NGEF	NM_001076926.1	Neuronal guanine nucleotide exchange factor
NGFR	NM_001102478.1	Nerve growth factor receptor
NID1	ENSBTAT00000009531	Nidogen 1
NIM1	NM_001205975.1	Serine/threonine-protein kinase NIM1
NIPSNAP3A	XM_003584685.1	Nipsnap homolog 3A (C. Elegans)
NKD1	NM_001105453.1	Naked cuticle homolog 1 (Drosophila)
NKG7	NM_001035279.1	Natural killer cell group 7 sequence
NLGN4Y	XM_003584738.1	Neuroigin 4, Y-linked-like
NLRC3	XM_002697946.2	NLR family, CARD domain containing 3
NLRC4	NM_001192323.2	NLR family, CARD domain containing 4
NMT2	NM_174456.2	N-myristoyltransferase 2
NO66	NM_001099702.1	Chromosome 10 open reading frame, human c14orf169
NOG	XM_582573.6	Noggin
NOP58	NM_001192957.1	NOP58 ribonucleoprotein homolog (yeast)

NOVA1	NM_001101150.1	Neuro-oncological ventral antigen 1
NPL	NM_001045978.1	N-acetylneuraminatate pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase)
NPNT	XM_003586182.1	Nephronectin
NPR2	ENSBTAT00000065432	Natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atrionatriuretic peptide receptor B)
NR4A1	NM_001075911.1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
NRIP3	NM_001102218.1	Nuclear receptor interacting protein 3
NRM	NM_001037596.1	Nurim (nuclear envelope membrane protein)
NRXN1	ENSBTAT00000047691	Neurexin-1-beta
NTF4	XM_002695202.2	Neurotrophin 4
NTRK1	XM_002685965.2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
NUMBL	NM_001076834.1	Numb homolog (Drosophila)-like
ODZ1	XM_003584669.1	Odz, odd Oz/ten-m homolog 1 (Drosophila)
OLFML2A	ENSBTAT0000006372	Olfactomedin-like 2A
OR5D18	XM_593553.2	Olfactory receptor, family 5, subfamily D, member 18
ORAI2	NM_001191348.1	ORAI calcium release-activated calcium modulator 2
OSBPL8	XM_002687171.2	Oxysterol binding protein-like 8
OSMR	NM_001080272.2	Oncostatin M receptor
OSTALPHA	NM_001025333.1	Organic solute transporter alpha
OXSM	NM_001075624.1	3-oxoacyl-ACP synthase, mitochondrial
P2RY1	NM_174410.2	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1
PABPC5	NM_001192289.1	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 5
PALM3	XM_002688741.2	Paralemmin 3
PALMD	NM_001035079.1	Palmdelphin
PANX2	NM_001102225.1	Pannexin 2
PARVG	NM_001083805.1	Parvin, gamma
PCDHB7	ENSBTAT00000065512	Protocadherin beta 7
PCGF2	NM_001144106.1	Polycomb group ring finger 2
PCK2	NM_001205594.1	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
PCNXL2	XM_002698790.2	Pecanex-like 2 (Drosophila)
PCOLCE	NM_001045888.1	Procollagen C-endopeptidase enhancer
PDE10A	XM_005211116.2	Phosphodiesterase 10A
PDE11A	NM_001205422.1	Phosphodiesterase 11A
PDE4D	XM_003587511.1	Phosphodiesterase 4D, camp-specific
PDGFB	NM_001017953.2	Platelet-derived growth factor beta polypeptide
PDGFRL	NM_001035301.1	Platelet-derived growth factor receptor-like
PDLIM3	NM_001034646.1	PDZ and LIM domain 3
PDLIM7	NM_001113251.1	PDZ and LIM domain 7 (enigma)
PDX1	NM_001192136.1	Pancreatic and duodenal homeobox 1
PEA15	NM_001075456.1	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15
PEBP4	NM_001034440.1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 4
PECAM1	NM_174571.3	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PECR	XM_002685568.2	Peroxisomal trans-2-enoyl-coa reductase
PGBD2	ENSBTAT00000026396	Piggybac transposable element derived 2
PGR	ENSBTAT00000010545	Progesterone receptor
PHKA1	XM_604349.3	Phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)
PHKG2	NM_001046128.1	Phosphorylase kinase, gamma 2 (testis)

PHTF2	NM_001191316.1	Putative homeodomain transcription factor 2
PIK3C2A	ENSBTAT00000046627	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha
PIK3CD	NM_001205548.1	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide
PIK3R3	NM_174796.1	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)
PILRA	XM_870106.5	Uncharacterized LOC617785
PKDCC	NM_001206721.1	Protein kinase domain containing, cytoplasmic homolog (mouse)
PLA2G15	NM_174560.2	Phospholipase A2, group XV
PLA2G2F	NM_001102522.1	Phospholipase A2, group IIF
PLAUR	NM_174423.3	Plasminogen activator, urokinase receptor
PLCL1	NM_001191279.1	Phospholipase C-like 1
PLCXD1	ENSBTAT00000066297	Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1
PLD3	NM_001078041.1	Phospholipase D family, member 3
PLEKHG2	XM_866405.4	Pleckstrin homology domain containing, family G (with rhogef domain) member 2
PLIN1	NM_001083699.1	Perilipin 1
PLK3	NM_001075153.1	Polo-like kinase 3
PLN	NM_001103319.1	Phospholamban
PLSCR4	NM_001081732.1	Phospholipid scramblase 4
PLXNA2	NM_001206657.1	Plexin A2
PLXNA3	ENSBTAT00000030185	Plexin A3
PMAIP1	XM_002697779.2	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
POLR2M	ENSBTAT00000002839	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide M
PPAP2A	NM_001080329.1	Phosphatidic acid phosphatase type 2A
PPARA	NM_001034036.1	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPARG	NM_181024.2	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPFIA2	XM_001788107.2	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 2
PPIC	NM_001076910.1	Peptidylprolyl isomerase C (cyclophilin C)
PPIF	NM_001001597.1	Peptidylprolyl isomerase F
PPP1R12A	NM_001102217.1	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 12A
PPP2R3A	NM_001102346.1	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B'', alpha
PPP4R4	XM_001790303.3	Protein phosphatase 4, regulatory subunit 4
PQLC1	NM_001076893.1	PQ loop repeat containing 1
PRDM5	NM_001192907.1	PR domain containing 5
PRELID2	ENSBTAT00000060989	PRELI domain containing 2
PRKAR2B	NM_174649.2	Protein kinase, camp-dependent, regulatory, type II, beta
PROM2	XM_002691159.1	Prominin 2
PROS1	NM_174438.1	Protein S (alpha)
PROZ	XM_002692014.2	Protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein
PRR16	ENSBTAT00000066344	Proline rich 16
PRRX2	ENSBTAT00000003817	Paired related homeobox 2
PRSS23	NM_001080306.1	Protease, serine, 23
PSMB8	NM_001040480.1	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)
PTAFR	ENSBTAT00000038757	Platelet-activating factor receptor
PTCH1	XM_005210407.2	Patched 1
PTCHD3	XM_002698176.1	Patched domain containing 3

PTGS1	NM_001105323.1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
PTHLH	NM_174753.1	Parathyroid hormone-like hormone
PTK7	NM_001192965.1	PTK7 protein tyrosine kinase 7
PTN	NM_173955.1	Pleiotrophin
PTPN11	NM_001192779.1	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
PTPN21	XM_002691087.2	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21
PXDN	XM_002683948.2	Peroxidasin homolog (Drosophila)
QKI	NM_001007817.1	QKI, KH domain containing, RNA binding
QPCTL	NM_001075940.2	Glutaminyl-peptide cyclotransferase-like
QPRT	NM_001035446.1	Quinolate phosphoribosyltransferase
RAB15	NM_001046538.1	RAB15, member RAS oncogene family
RAB33A	NM_001192993.1	RAB33A, member RAS oncogene family
RAB3B	NM_174447.3	RAB3B, member RAS oncogene family
RAI14	XM_002696398.2	Retinoic acid induced 14
RARG	NM_001130756.1	Retinoic acid receptor, gamma
RASGRP2	NM_001099946.1	RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)
RASGRP4	NM_001035379.2	RAS guanyl releasing protein 4
RASL11B	NM_001015635.2	RAS-like, family 11, member B
RBMS3	XM_002696871.2	RNA binding motif, single stranded interacting protein 3
RCAN1	NM_001034679.1	Regulator of calcineurin 1
RCN1	NM_001103221.1	Reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain
RCN3	NM_001046260.1	Reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain
RECK	NM_001192465.1	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
REM1	NM_001046001.1	RAS (RAD and GEM)-like GTP-binding 1
REV3L	NM_001206172.1	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast)
RGNEF	NM_001102307.1	190 kda guanine nucleotide exchange factor
RGS10	NM_001046540.1	Regulator of G-protein signaling 10
RGS16	NM_174450.3	Regulator of G-protein signaling 16
RHBDF2	XM_596084.4	Rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila)
RHOH	NM_001078124.1	Ras homolog gene family, member H
RHOQ	NM_001205498.1	Ras homolog gene family, member Q
RIN2	NM_001102204.1	Ras and Rab interactor 2
RIPK3	NM_001101884.1	Receptor-interacting serine-threonine kinase 3
RMI2	NM_001099720.1	RMI2, recq mediated genome instability 2, homolog (S. Cerevisiae)
RNASE10	XM_002690744.1	Ribonuclease, rnase A family, 10 (non-active)
RNASE4	NM_001040590.1	Ribonuclease, rnase A family, 4
RNF125	NM_001205859.1	Ring finger protein 125
RNF144A	XM_002691488.2	Ring finger protein 144A
RNF207	NM_001078057.1	Ring finger protein 207
ROR2	NM_001105464.2	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
RSPO1	NM_001105621.1	R-spondin 1
RSPO3	NM_001076034.1	R-spondin 3
RTN4RL1	XM_586643.4	Reticulon 4 receptor-like 1
SAMD1	XM_001250641.3	Sterile alpha motif domain containing 1
SAMD14	NM_001105018.1	Sterile alpha motif domain containing 14
SAMD5	NM_001168606.1	Sterile alpha motif domain containing 5

SAMSN1	NM_001035404.1	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1
SASH3	NM_001077998.1	SAM and SH3 domain containing 3
SCARB1	NM_174597.2	Scavenger receptor class B, member 1
SCIN	NM_174177.2	Scinderin
SCN4B	NM_001076912.1	Sodium channel, voltage-gated, type IV, beta
SDC1	NM_001075924.1	Syndecan 1
SDC2	NM_001034788.2	Syndecan 2
SDPR	XM_610845.5	Serum deprivation response
SECTM1A	NM_001076529.1	Secreted and transmembrane protein 1A
SELL	NM_174182.1	Selectin L
SELM	NM_001163171.1	Selenoprotein M
SELRC1	XM_598765.4	Sel1 repeat containing 1
SEMA3A	XM_002686736.2	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
SEMA4G	NM_001101117.1	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4G
SEMA5B	XM_001788280.1	Sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5B
SEPW1	NM_001163225.1	Selenoprotein W, 1
SERINC5	XM_580814.4	Serine incorporator 5
SERTM1	XM_002700918.1	Serine-rich and transmembrane domain containing 1
SETD9	XM_002696320.1	SET domain containing 9
SH2D2A	NM_001105401.1	SH2 domain containing 2A
SH2D3C	NM_001098039.1	SH2 domain containing 3C
SH2D4A	XM_002698743.2	SH2 domain containing 4A
SH3PXD2A	ENSBTAT00000061357	SH3 and PX domains 2A
SH3TC2	XM_002689285.1	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2
SHC2	XM_002689160.2	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 2
SHE	NM_001098140.1	Src homology 2 domain containing E
SIGLEC5	XM_002695237.2	Sialic acid binding Ig-like lectin 5
SIPA1L2	NM_001206220.1	Signal-induced proliferation-associated 1 like 2
SIRPB1	NM_001080911.1	Signal-regulatory protein beta 1
SKA2	NM_001038579.2	Spindle and kinetochore associated complex subunit 2
SLAMF8	NM_001205794.1	SLAM family member 8
SLC12A2	NM_174782.2	Solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2
SLC13A3	NM_001080288.1	Solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3
SLC16A1	NM_001037319.1	Solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)
SLC16A2	NM_001206939.1	Solute carrier family 16, member 2 (monocarboxylic acid transporter 8)
SLC22A17	NM_001130755.1	Solute carrier family 22, member 17
SLC25A15	NM_001046326.1	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15
SLC26A10	XM_001789606.1	Solute carrier family 26, member 10
SLC26A2	NM_001040525.1	Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2
SLC27A4	NM_001075667.1	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4
SLC29A4	NM_001193196.1	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4
SLC30A4	XM_002690940.2	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4



SLC35A2	NM_176640.2	Solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter), member A2
SLC35A3	NM_001105386.1	Solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-glcnac) transporter), member A3
SLC35E4	NM_001205905.2	Solute carrier family 35, member E4
SLC38A11	NM_001031760.1	Solute carrier family 38, member 11
SLC40A1	NM_001077970.1	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1
SLC41A2	NM_001205910.1	Solute carrier family 41, member 2
SLC6A1	NM_001077836.1	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 1
SLCO4C1	NM_001192846.1	Solute carrier organic anion transporter family, member 4C1
SLITRK3	ENSBTAT00000022827	SLIT and NTRK-like family, member 3
SMAD9	NM_001076928.1	SMAD family member 9
SMCP	NM_001008417.2	Sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein
SMN1	NM_175701.1	Survival of motor neuron 1, telomeric
SMPD5	XM_001789297.3	Sphingomyelin phosphodiesterase 5
SMPX	NM_001037626.1	Small muscle protein, X-linked
SMTNL1	XM_002707731.1	Smoothelin-like 1
SNAI1	NM_001112708.1	Snail homolog 1 (Drosophila)
SNAP91	ENSBTAT00000012314	Synaptosomal-associated protein, 91kda homolog (mouse)
SNCA	NM_001034041.1	Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
SNN	NM_001113722.1	Stannin
SNORA5	ENSBTAT00000060390	Small nucleolar RNA SNORA5
SNORA66	ENSBTAT00000059118	Small nucleolar RNA SNORA66
SNORD112	ENSBTAT00000061759	Small nucleolar RNA SNORD112
SNORD113	ENSBTAT00000059430	Small nucleolar RNA SNORD113/SNORD114 family
SNORD123	ENSBTAT00000061933	Small nucleolar RNA SNORD123
SNTA1	NM_001075898.1	Syntrophin, alpha 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kda, acidic component)
SNTB1	XM_002692812.2	Syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kda, basic component 1)
SOAT1	NM_001034206.1	Sterol O-acyltransferase 1
SOCS2	NM_177523.2	Suppressor of cytokine signaling 2
SOGA1	XM_002692311.2	Suppressor of glucose, autophagy associated 1
SORBS2	ENSBTAT00000054109	Sorbin and SH3 domain containing 2
SOX11	XM_001250191.1	SRY-box 11-like
SOX12	XM_010811633.1	SRY (sex determining region Y)-box 12
SOX4	ENSBTAT00000064038	SRY (sex determining region Y)-box 4
SOX8	XM_002697973.2	SRY (sex determining region Y)-box 8
SP100	XM_001789440.2	SP100 nuclear antigen
SP140	NM_001075447.1	SP140 nuclear body protein
SPIN4	XM_002700137.1	Spindlin family, member 4
SPRED1	NM_001192516.1	Sprouty-related, EVH1 domain containing 1
SPSB4	NM_001192337.1	Spla/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 4
SST	NM_173960.1	Somatostatin
ST14	ENSBTAT00000026272	Suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)
STARD13	NM_001192070.1	Star-related lipid transfer (START) domain containing 13
STARD9	XM_010809237.1	Star-related lipid transfer (START) domain containing 9
STEAP2	NM_001077847.1	STEAP family member 2, metalloredutase

STRADB	NM_001192081.2	STE20-related kinase adaptor beta
STX1A	NM_001083798.1	Syntaxin 1A (brain)
STXBP6	NM_001076038.1	Syntaxin binding protein 6 (amisyn)
STYX	XM_002690461.1	Serine/threonine/tyrosine interacting protein
SULF1	ENSBTAT00000037267	Sulfatase 1
SVOPL	NM_001192500.1	SVOP-like
SWAP70	NM_001080297.2	SWAP switching B-cell complex 70kda subunit
SYNGR3	NM_001082464.1	Synaptogyrin 3
SYNPO2	NM_001083751.1	Synaptopodin 2
SYT11	NM_001099171.1	Synaptotagmin XI
SYT9	XM_003583113.1	Synaptotagmin IX
TAC3	NM_181017.1	Tachykinin 3
TAGAP	NM_001076823.1	T-cell activation rhogtpase activating protein
TBKBP1	XM_001253300.4	TBK1 binding protein 1
TBXA2R	NM_001167919.1	Thromboxane A2 receptor
TCF15	NM_001081721.1	Transcription factor 15 (basic helix-loop-helix)
TCF23	NM_001038216.1	Transcription factor 23
TCF3	NM_001192698.1	Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
TCFL5	XM_003586831.1	Transcription factor-like 5 (basic helix-loop-helix)
TCN2	NM_174195.3	Transcobalamin II
TEAD4	XM_002687882.1	TEA domain family member 4
Telomerase-vert	ENSBTAT00000059784	Vertebrate telomerase RNA
TERC	ENSBTAT00000060149	Telomerase RNA component
TEX11	XM_593293.4	Testis expressed 11
TFAP2C	NM_001075509.1	Transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)
TFEC	NM_001083739.1	Transcription factor EC
TGFB1	NM_001166068.1	Transforming growth factor, beta 1
TGFB3	NM_001101183.1	Transforming growth factor, beta 3
TGFBI	NM_001205402.1	Transforming growth factor, beta-induced, 68kda
THBS2	NM_176872.1	Thrombospondin 2
THBS4	NM_001034728.1	Thrombospondin 4
TIMD4	NM_001075320.1	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4
TIMELESS	XM_003582219.1	Timeless homolog (Drosophila)
TIMP3	NM_174473.3	TIMP metallopeptidase inhibitor 3
TLN2	XM_002690844.1	Talin 2
TLR3	NM_001008664.1	Toll-like receptor 3
TM4SF1	NM_001075980.1	Transmembrane 4 L six family member 1
TMC7	XM_002698015.2	Transmembrane channel-like 7
TMEFF1	XM_010808202.1	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1
TMEM123	XM_002692936.2	Transmembrane protein 123
TMEM2	NM_001192415.1	Transmembrane protein 2
TMEM38A	NM_001083463.1	Transmembrane protein 38A
TMEM65	NM_001076318.1	Transmembrane protein 65
TMEM88	NM_001098378.1	Transmembrane protein 88
TMEM92	NM_001083651.1	Transmembrane protein 92

TMOD1	NM_001079640.1	Tropomodulin 1
TMOD3	ENSBTAT00000066137	Tropomodulin-3
TMSB4	NM_001113231.1	Thymosin beta 4, X-linked
TMSB4X	NM_001002885.1	Thymosin beta 4, X-linked
TNFAIP8L3	ENSBTAT00000056282	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 3 Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain
TNFRSF10D	NM_001102327.1	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
TNFRSF1B	NM_001040490.1	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TNFSF10	XM_002684917.1	Troponin C type 1 (slow)
TNNC1	NM_001034351.1	Tensin 1
TNS1	NM_174766.2	Tumor protein p53
TP53	NM_174201.2	Two pore channel 3
TPC3	NM_001161651.1	Tropomyosin 4
TPM4	NM_001101162.1	Tryptase beta 1
TPSB1	NM_174202.2	TNF receptor-associated factor 5
TRAF5	NM_001105340.1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TREM2	NM_001079580.1	Tripartite motif containing 45
TRIM45	NM_001014952.1	Cdc42-interacting protein 4
TRIP10	ENSBTAT00000018391	Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
TRPA1	XM_581588.6	Transient receptor potential channel 2
TRPC2	NM_174477.3	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2
TRPV2	NM_001024493.1	Teashirt zinc finger homeobox 3
TSHZ3	XM_592300.6	Tetraspanin 11
TSPAN11	NM_001080325.1	Tetraspanin 12
TSPAN12	NM_001046512.1	Thrombospondin-type laminin G domain and EAR repeats
TSPEAR	NM_001206810.1	Tetratricopeptide repeat domain 21B
TTC21B	NM_001102108.1	Tweety homolog 2 (Drosophila)
TTYH2	NM_001105626.1	Tubulin, beta 2A class iia
TUBB2A	XM_002697606.1	Tubulin, beta 2B class iib
TUBB2B	NM_001003900.1	Tubulin, beta 6 class V
TUBB6	NM_001046373.1	Twinfilin, actin-binding protein, homolog 2 (Drosophila)
TWF2	NM_001105324.1	TXK tyrosine kinase
TXK	NM_001206148.1	Thioredoxin domain containing 17
TXNDC17	NM_001205821.1	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
TYROBP	NM_174627.1	U1 spliceosomal RNA
U1	ENSBTAT00000040418	U2 spliceosomal RNA
U2	ENSBTAT00000040476	U5 spliceosomal RNA
U5	ENSBTAT00000061965	U6 spliceosomal RNA
U6	ENSBTAT00000059352	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2
UGGT2	XM_002691971.1	Unc-13 homolog B (C. Elegans)
UNC13B	NM_001193239.1	Unc-5 homolog B (C. Elegans)
UNC5B	NM_001099029.1	Urocanase domain containing 1
UROC1	XM_606660.4	UTP18, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)
UTP18	NM_001098879.1	Vasohibin 2
VASH2	NM_001079611.1	Vasorin
VASN	NM_001083796.1	

VAV1	NM_001078074.1	Vav 1 guanine nucleotide exchange factor
VCAN	NM_181035.2	Versican
VCL	NM_001078093.1	Vinculin
VIPR2	NM_001206781.1	Vasoactive intestinal peptide receptor 2
VMP1	NM_001075368.1	Vacuole membrane protein 1
WC1.2	XM_001250405.1	WC1.2 molecule
WC1-12	XM_003586131.3	WC1 isolate DV10
WC1-2	XM_010805600.1	WC1-2 protein
WDFY4	NM_001205945.1	WDFY family member 4
WDR67	NM_001046073.1	WD repeat domain 67
WDR86	NM_001191339.1	WD repeat domain 86
WIF1	NM_001075996.1	WNT inhibitory factor 1
WIPI1	NM_001099040.1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
WISP1	ENSBTAT00000000946	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
WLS	NM_001192651.1	Wntless homolog (Drosophila)
WNK3	XM_003584707.1	WNK lysine deficient protein kinase 3
WNT10B	ENSBTAT00000020402	Wingless-type MMTV integration site family, member 10B
WNT5B	NM_001205628.1	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
WNT7B	ENSBTAT00000012540	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B
WTIP	NM_001205562.1	Wilms tumor 1 interacting protein
XDH	NM_173972.2	Xanthine dehydrogenase
ZBTB8B	XM_002685612.1	Zinc finger and BTB domain containing 8B
ZCCHC11	NM_001206930.1	Zinc finger, CCHC domain containing 11
ZDHHC17	NM_001206069.1	Zinc finger, DHHC-type containing 17
ZDHHC9	NM_001034561.2	Zinc finger, DHHC-type containing 9
ZEB1	NM_001206590.1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	ENSBTAT00000061551	Zinc finger E-box binding homeobox 2
ZFP90	XM_002694906.2	Zinc finger protein 90 homolog (mouse)
ZHX1	NM_001110095.1	Zinc fingers and homeoboxes 1
ZNF300	XM_002689309.1	Zinc finger protein 300
ZNF385B	NM_001083502.1	Zinc finger protein 385B
ZNF469	ENSBTAT00000063301	Zinc finger protein 469
ZNF569	XM_864866.3	Zinc finger protein 569
ZNF618	XM_003586437.1	Zinc finger protein 618
ZNF711	NM_001205925.1	Zinc finger protein 711
ZNF713	NM_001110444.1	Zinc finger protein 713
ZNF81	XM_002700089.1	Zinc finger protein 81
ZNF84	XM_002694428.2	Zinc finger protein 84
ZYX	NM_001078101.1	Zyxin
ZZEF1	NM_001206129.1	Zinc finger, ZZ-type with EF-hand domain 1

#### *Anexo IV Listado de genes agrupados (SOTA3)*

<b>Símbolo oficial</b>	<b>Acceso</b>	<b>Nombre</b>
ABAT	NM_001081581.1	4-aminobutyrate aminotransferase
ABCA1	NM_001024693.1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1

ABTB2	XM_003587004.1	Ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2
ACP5	XM_002688849.2	Acid phosphatase 5, tartrate resistant
ACSL3	NM_001205468.1	Acyl-coa synthetase long-chain family member 3
ACTC1	NM_001034585.1	Actin, alpha, cardiac muscle 1
ADCY3	NM_001206084.1	Adenylate cyclase 3
ADORA3	NM_001104611.1	Adenosine A3 receptor
AGPAT9	NM_001192514.1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9
AK5	NM_001083757.1	Adenylate kinase 5
AKAP12	ENSBTAT00000019669	A kinase (PKA) anchor protein 12
AKR1C3	XM_001250575.4	Aldo-keto reductase family 1, member C1
ALS2	XM_615861.5	Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile)
APH1B	NM_001191403.1	Anterior pharynx defective 1 homolog B (C. Elegans)
APOBR	XM_002698084.2	Apolipoprotein B receptor
APP	NM_001076796.1	Amyloid beta (A4) precursor protein
ARHGEF4	NM_001192073.1	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4
ARSJ	XM_002688099.1	Arylsulfatase family, member J
ATP13A3	NM_001192585.1	Atpase type 13A3
ATP1B1	NM_001035334.1	Atpase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide
ATP1B3	NM_001035393.1	Atpase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 3 polypeptide
B3GNT2	NM_001102497.1	UDP-glcnac:betagal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2
B3GNT6	NM_001103307.1	UDP-glcnac:betagal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6 (core 3 synthase)
C11H9orf114	XM_002691638.2	Chromosome 11 open reading frame, human c9orf114
C13H20orf7	NM_001206395.1	Chromosome 13 open reading frame, human c20orf7
C16H1orf105	NM_001205494.1	Chromosome 16 open reading frame, human c1orf105
C1QB	NM_001046599.1	Complement component 1, q subcomponent, B chain
C1QBP	NM_001034527.1	Complement component 1, q subcomponent binding protein
C1QC	ENSBTAT00000014865	Complement C1q subcomponent subunit C precursor
C1QTNF6	NM_001101872.1	C1q and tumor necrosis factor related protein 6
C22H3orf32	XR_083114.2	Chromosome 22 open reading frame, human c3orf32
C28H10orf10	NM_001046515.1	Chromosome 28 open reading frame, human c10orf10
C28H10orf116	NM_001114513.1	Chromosome 28 open reading frame, human c10orf116
C3AR1	NM_001083752.1	Complement component 3a receptor 1
C3orf32	ENSBTAT00000065011	Chromosome 3 open reading frame 32
C5	NM_001166616.1	Complement component 5
C6H4orf32	NM_001076961.1	Chromosome 6 open reading frame, human c4orf32
C7	NM_001045966.1	Complement component 7
CA10	NM_001079609.1	Carbonic anhydrase X
CAPN1	NM_174259.2	Calpain 1, (mu/l) large subunit
CC2D2B	XM_002698404.1	Coiled-coil and C2 domain containing 2B
CCDC109B	NM_001075171.1	Coiled-coil domain containing 109B
CCL24	NM_001046596.1	Chemokine (C-C motif) ligand 24
CCR7	NM_001024930.2	Chemokine (C-C motif) receptor 7
CD22	XM_002695015.2	CD22 molecule
CD38	NM_175798.3	CD38 molecule
CD3D	NM_001034033.1	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)
CD52	NM_001198996.1	CD52 molecule

CD8A	NM_174015.1	CD8a molecule
CEACAM1	NM_205788.1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
CHRD1	ENSBTAT00000005810	Chordin-like 1
CHST1	ENSBTAT00000004844	Carbohydrate sulfotransferase 1 precursor
CIB2	ENSBTAT00000014575	Calcium and integrin binding family member 2
CL43	NM_001002237.1	Collectin-43
CL46	NM_001001856.1	Collectin -46
CLCN2	NM_001102487.1	Chloride channel 2
CLDN22	XM_867997.1	Claudin 22
CLDN4	NM_001014391.2	Claudin 4
CLEC10A	XM_002695798.2	C-type lectin domain family 10, member A
CLIC5	NM_174276.2	Chloride intracellular channel 5
CLN3	NM_001075174.2	Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3
CLN8	NM_001075941.2	Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (epilepsy, progressive with mental retardation)
CMBL	NM_001192983.1	Carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)
CMTM7	NM_001075960.1	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7
CNIH3	NM_001206204.1	Cornichon homolog 3 (Drosophila)
COL4A6	XM_002699886.1	Collagen, type IV, alpha 6
COMTD1	NM_001105368.1	Catechol-O-methyltransferase domain containing 1
CRYL1	NM_174293.2	Crystallin, lambda 1
CSGALNACT2	NM_001205653.1	Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2
CSNK1B	NM_001098159.1	Casein kinase I beta
CSTB	NM_001100362.1	Cystatin B (stefin B)
CTNNBIP1	NM_001037142.1	Catenin, beta interacting protein 1
CXCL14	NM_001034410.1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14
CXCR3	ENSBTAT00000019690	C-X-C chemokine receptor type 3
CXCR6	NM_001014859.1	Chemokine (C-X-C motif) receptor 6
CXHXorf69	NM_001163442.1	Uncharacterized LOC100302527
CYB5B	NM_001163782.1	Cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)
CYP4V2	NM_001034373.1	Cytochrome P450, family 4, subfamily V, polypeptide 2
DBI	NM_001113321.1	Diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-coa binding protein)
DDAH1	NM_001102201.1	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
DLGAP4	ENSBTAT00000002286	Discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 4
DMPK	XM_002695096.2	Dystrophia myotonica-protein kinase
DNAJC11	NM_001045993.1	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 11
DPEP2	XM_586714.4	Dipeptidase 2
DPYSL5	NM_001109964.1	Dihydropyrimidinase-like 5
DSB	NM_001083785.1	MHC class II antigen DS beta
ECI2	NM_001034242.2	Enoyl-coa delta isomerase 2
EFNA1	NM_001034292.1	Ephrin-A1
EIF5A2	NM_001192089.1	Eukaryotic translation initiation factor 5A2
ELMO1	NM_001113227.1	Engulfment and cell motility 1
ELOVL6	NM_001102155.1	ELOVL fatty acid elongase 6
ELOVL7	NM_001078042.1	ELOVL fatty acid elongase 7
EMR1	XM_003586264.1	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1-like

ENPP1	NM_001206212.1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
ENPP5	ENSBTAT00000057413	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5 precursor
ERP27	NM_001038041.1	Endoplasmic reticulum protein 27
ERRFI1	NM_001077930.1	ERBB receptor feedback inhibitor 1
F2RL1	NM_001046283.1	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1
FAM154A	NM_001076170.1	Family with sequence similarity 154, member A
FAM55C	NM_001081529.1	Family with sequence similarity 55, member C
FBXL7	XM_597007.6	F-box and leucine-rich repeat protein 7
FBXO31	XM_591717.6	F-box protein 31
FCGR3A	NM_001077402.1	Fc fragment of igg, low affinity iiaa, receptor (CD16a)
FGF1	ENSBTAT00000043056	Fibroblast growth factor 1 Endothelial cell growth factor beta Endothelial cell growth factor alpha
FKBP9	NM_001046372.1	FK506 binding protein 9, 63 kda
FOLH1	NM_001101858.1	Folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1
FOLR1	NM_001206530.1	Folate receptor 1 (adult)
FUCA1	NM_001046035.1	Fucosidase, alpha-L- 1, tissue
GADD45B	NM_001040604.1	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
GALNT14	NM_001192732.1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (galnac-T14)
GBGT1	NM_001076509.1	Globoside alpha-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1
GCA	XM_583697.6	Grancalcin, EF-hand calcium binding protein
GCH1	XM_001251704.4	GTP cyclohydrolase 1
GCLC	NM_001083674.1	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
GCNT2	XM_002697593.1	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme (I blood group)
GDPD1	NM_001076400.1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1
GFRA1	NM_001105411.1	GDNF family receptor alpha 1
GIMAP1	XM_867611.4	Gtpase, IMAP family member 1
GIMAP4	NM_001046060.1	Gtpase, IMAP family member 4
GJB2	NM_001083637.1	Gap junction protein, beta 2, 26kda
GJB5	ENSBTAT00000007517	Gap junction beta-5 protein
GLI4	XM_002692562.2	GLI family zinc finger 4
GLRB	NM_174071.2	Glycine receptor, beta
GNS	NM_001075562.1	Glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase
GPR141	XM_001252806.2	G protein-coupled receptor 141
GPR153	XM_597109.6	G protein-coupled receptor 153
GPR160	ENSBTAT00000066339	G protein-coupled receptor 160
GPRIN2	NM_001205783.1	G protein regulated inducer of neurite outgrowth 2
GPX6	ENSBTAT00000015939	Glutathione peroxidase 6 precursor
GRAMD1B	NM_001191419.1	GRAM domain containing 1B
GRHL1	NM_001076450.1	Grainyhead-like 1 (Drosophila)
GRIK1	ENSBTAT00000026817	Glutamate receptor, ionotropic kainate 1
GSTM2	XM_881439.4	Glutathione S-transferase M2
GSX1	NM_001105448.1	GS homeobox 1
HRSP12	NM_001034208.1	Heat-responsive protein 12
HYAL1	XM_003587640.1	Hyaluronoglucosaminidase 1
IDH2	NM_175790.2	Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial

ILVBL	XM_005208495.2	Ilvb (bacterial acetolactate synthase)-like
IQSEC1	NM_001206814.2	IQ motif and Sec7 domain 1
IRAK3	NM_001190299.1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3
ISLR	NM_001080729.1	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat
ITGA10	NM_001205590.1	Integrin, alpha 10
ITPR1PL1	ENSBTAT00000049472	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 1
JARID2	NM_001192656.1	Jumonji, AT rich interactive domain 2
KCNS3	ENSBTAT00000025570	Potassium voltage-gated channel subfamily S member 3
KCP	XM_002686948.2	Kielin/chordin-like protein
KERA	NM_173910.1	Keratocan
KIAA0355	NM_001206284.1	KIAA0355 ortholog
KIAA0922	NM_001076803.1	KIAA0922 ortholog
KIAA2013	NM_001045942.1	Kiaa2013
KLF4	NM_001105385.1	Kruppel-like factor 4 (gut)
KLHL26	XM_002688529.2	Kelch-like 26 (Drosophila)
KLHL29	NM_001164494.1	Kelch-like 29 (Drosophila)
KSR2	NM_001206862.1	Kinase suppressor of ras 2
LAMA2	ENSBTAT00000061257	Laminin, alpha 2
LAPTM4B	ENSBTAT00000016244	Lysosomal protein transmembrane 4 beta
LAT	NM_001104978.1	Linker for activation of T cells
LCP2	NM_001076844.1	Lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kda)
LGALS9	NM_001015570.3	Lectin, galactoside-binding, soluble, 9
LIN7A	NM_001079602.1	Lin-7 homolog A (C. Elegans)
LOC100124406	NG_007056.1	Beta-globin psi-2A pseudogene
LOC100139201	XM_001787237.1	Probable G-protein coupled receptor 160-like
LOC100139881	XM_001790075.1	Mast cell protease 2-like
LOC100141258	XM_001790356.2	Uncharacterized LOC100141258
LOC100294726	XM_003582466.1	Uncharacterized LOC100294726
LOC100294818	XM_002701615.1	Uncharacterized LOC100294818
LOC100295004	XM_002704384.2	Uncharacterized LOC100295004
LOC100295702	XM_002703048.2	Uncharacterized LOC100295702
LOC100295764	XM_002695637.1	WD repeat and SOCS box-containing 1-like
LOC100295797	XM_002688997.1	Uncharacterized LOC100295797
LOC100296900	XM_002686768.2	Uncharacterized LOC100296900
LOC100297236	XM_002691525.1	Uncharacterized LOC100297236
LOC100300510	XM_002687093.2	Uncharacterized LOC100300510
LOC100335321	XM_002701023.1	Uncharacterized LOC100335321
LOC100335340	XM_002706739.1	Uncharacterized LOC100335340
LOC100335960	XM_002706103.2	Uncharacterized LOC100335960
LOC100336391	XM_002690899.1	Protease-like
LOC100337056	XM_003584729.1	Aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)-like
LOC100337066	XM_002687981.1	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B-like
LOC100337082	XM_002690056.1	Synaptosomal-associated protein, 91kda homolog-like
LOC100337145	XM_002697031.1	Hyaluronidase-1-like
LOC100337259	XM_002696664.1	Calcium and integrin binding family member 2-like



LOC100847397	XM_003588108.1	Interferon-activable protein 204-like
LOC100847398	XM_003584332.1	Zinc finger protein 81-like
LOC100847670	XM_003582201.1	Uncharacterized LOC100847670
LOC100847780	XR_139671.1	Uncharacterized LOC100847780
LOC100847844	XR_138876.1	Uncharacterized LOC100847844
LOC100848000	XM_003588149.1	Uncharacterized LOC100848000
LOC100848025	XM_003586680.1	Uncharacterized LOC100848025
LOC100848095	XM_003582283.1	Neuronal pentraxin receptor-like
LOC100848342	XM_003586497.1	Uncharacterized LOC100848342
LOC100848658	XM_003582386.1	Interferon-activable protein 204-like
LOC100848750	XM_003585929.1	UDP-glucuronosyltransferase 1-3-like
LOC100848855	XM_003582238.1	Uncharacterized LOC100848855
LOC100848919	XM_003583061.1	Uncharacterized LOC100848919
LOC100849016	XM_003588006.1	Ankyrin repeat domain-containing protein 26-like
LOC100849417	XM_003583091.1	Beta,beta-carotene 9',10'-oxygenase-like
LOC100849501	XM_003582627.1	Uronyl 2-sulfotransferase-like
LOC100849557	XM_003585419.1	Bifunctional protease/dutpase-like
LOC100850735	XM_003583644.1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1-like
LOC100851150	XM_003585030.1	Transmembrane protein 131-like
LOC100851864	XM_003583773.1	Creatine kinase B-type-like
LOC100852066	XR_139182.1	Uncharacterized LOC100852066
LOC100852121	XM_003584952.1	Olfactory receptor 5B12-like
LOC100852185	XM_003582841.1	Globoside alpha-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1-like
LOC100852235	XM_003585513.1	Uncharacterized LOC100852235
LOC104975830	XM_010819210.1	Zymogen granule protein 16 homolog B-like
LOC504861	XM_002695344.2	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3-like
LOC507055	XM_001788604.3	Guanylate binding protein 4-like
LOC511617	NM_001080260.1	Gtpase, IMAP family member 5-like
LOC512251	XM_003585805.1	Heat shock protein beta-7-like
LOC512869	XM_002707766.1	Ring finger protein 213-like
LOC515128	XM_003587042.1	Major facilitator superfamily domain-containing protein 4-like
LOC515150	XM_593120.5	Complement component 4 binding protein, alpha-like
LOC523292	XM_003586284.1	Uncharacterized LOC523292
LOC523454	XR_084729.2	Protein WWC3-like
LOC527711	XM_003582733.1	Spectrin beta chain, erythrocyte-like
LOC527882	ENSBTAT00000028173	Uncharacterized protein
LOC530077	ENSBTAT00000053242	Uncharacterized protein
LOC540321	XM_593156.5	Mast cell protease 2-like
LOC613282	XM_003587037.1	Beta-galactosidase-1-like protein 2-like
LOC613880	XR_813622.1	Ribonuclease UK114 pseudogene
LOC613965	XM_865225.1	HRAS-like suppressor 2-like
LOC614950	NM_001078047.1	T-cell receptor beta chain C region
LOC615162	XM_003583796.1	Protein FAM198A-like
LOC616690	XM_868782.5	Acp1 protein-like
LOC617281	NM_001105005.1	T-cell receptor beta chain variable region
LOC781685	XR_813447.1	Heat-responsive protein 12 pseudogene

LOC781710	ENSBTAT00000056121	Uncharacterized protein
LOC781772	ENSBTAT00000023860	Uncharacterized protein
LOC782367	XM_001251012.4	Cd1d molecule-like
LOC782395	XM_003584164.1	Malignant fibrous histiocytoma-amplified sequence 1-like
LOC782977	XM_002704529.1	Uncharacterized LOC782977
LOC783065	XM_003585088.1	Methylcrotonoyl-coa carboxylase beta chain, mitochondrial-like
LOC783608	XR_082740.2	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial-like
LOC784182	NM_001105015.1	T-cell receptor beta
LOC784623	XM_001252881.1	Uncharacterized LOC784623
LOC786372	XM_002686240.1	Uncharacterized LOC786372
LOC786460	XM_001254125.1	Interferon-induced guanylate-binding protein 1-like
LOC786550	XR_083548.1	Germ cell-less protein-like 1-like
LOC786987	XM_010818402.1	Protein c19orf12 homolog
LOC787045	XR_807416.1	Purine nucleoside phosphorylase pseudogene
LOC787063	XM_001254574.1	Myosin-X-like
LOC787788	ENSBTAT00000011960	Uncharacterized protein
LOC788476	XM_001255525.3	Olfactory receptor, family 5, subfamily D, member 13-like
LOC788602	XR_083124.1	Nuclear pore complex protein Nup88-like
LOC790312	XM_002690745.2	Purine nucleoside phosphorylase-like
LRP8	NM_001097565.1	Low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor
LRR3	NM_001098884.1	Leucine rich repeat containing 3
LRRN2	NM_001076971.1	Leucine rich repeat neuronal 2
LSAMP	NM_001205368.1	Neuronal growth regulator 1-like
LY6D	XM_001253695.2	Lymphocyte antigen 6D-like
LYZ	NM_001078159.1	Lysozyme
MACF1	NM_001143860.1	Microtubule-actin crosslinking factor 1
MCF2L	XM_002691997.2	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like
MCOLN2	NM_001192734.1	Mucolipin 2
MESP2	XM_002696577.1	Mesoderm posterior 2 homolog (mouse)
METAP1	NM_001102037.1	Methionyl aminopeptidase 1
MGC142702	NM_001076813.2	Uncharacterized LOC507581
MGLL	NM_001206681.1	Monoglyceride lipase
MIC2	XM_002697324.2	CD99 molecule
MOGAT1	NM_001001153.2	Monoacylglycerol O-acyltransferase 1
MYO1A	NM_174395.2	Myosin IA
MYO1B	NM_001102199.1	Myosin IB
NAALAD2	NM_001192880.1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2
NBL1	ENSBTAT00000006779	Neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1
NCAM1	NM_174399.1	Neural cell adhesion molecule 1
NDRG1	NM_001035009.1	N-myc downstream regulated 1
NEFH	XM_002694606.1	Neurofilament, heavy polypeptide
NFKBIA	NM_001045868.1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NID1	NM_001101155.1	Nidogen 1
NLRC3	XM_584462.5	NLR family, CARD domain containing 3
NROB1	NM_001205857.1	Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1

NSG1	NM_001077957.1	Neuron specific gene family member 1
NUDT5	NM_001076314.1	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 5
NUP88	NM_001034222.1	Nucleoporin 88kda
NUPR1	NM_001114515.1	Nuclear protein, transcriptional regulator, 1
NXNL2	NM_001192693.1	Nucleoredoxin-like 2
NXT2	NM_001100353.1	Nuclear transport factor 2-like export factor 2
OAF	XM_592427.3	OAF homolog (Drosophila)
OGDH	NM_001076030.1	Oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)
OR6S1	XM_002690658.1	Olfactory receptor, family 6, subfamily S, member 1
OSBPL8	XM_002704211.2	Oxysterol binding protein-like 8
OXCT1	NM_001076070.1	3-oxoacid coa transferase 1
PACSN3	NM_001191420.1	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3
PALLD	XM_002689443.2	Palladin, cytoskeletal associated protein
PDE6H	NM_174422.2	Phosphodiesterase 6H, cgmp-specific, cone, gamma
PECR	XM_869212.5	Peroxisomal trans-2-enoyl-coa reductase
PEPD	NM_001080318.2	Peptidase D
PIM3	XM_002688010.2	Pim-3 oncogene
PITX2	NM_001097991.1	Paired-like homeodomain 2
PLA2G16	NM_001075280.1	Phospholipase A2, group XVI
PLAGL1	NM_001103289.1	Pleiomorphic adenoma gene-like 1
PLAT	NM_174146.3	Plasminogen activator, tissue
PLCD4	NM_001046489.1	Phospholipase C, delta 4
PLD1	NM_001102001.1	Phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
PLIN2	NM_173980.2	Perilipin 2
PM20D1	NM_001038100.1	Peptidase M20 domain containing 1
PNMT	NM_177505.3	Phenylethanolamine N-methyltransferase
PNP	NM_001007818.1	Purine nucleoside phosphorylase
POLE2	NM_001105383.1	Polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)
PPM1H	NM_001193049.1	Protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent, 1H
PPP1R14A	NM_001193070.1	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A
PPP1R1B	NM_174647.2	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B
PROZ	NM_001078083.1	Protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein
PRPSAP1	NM_001076857.1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1
PTGDS	NM_174791.3	Prostaglandin D2 synthase 21kda (brain)
PTGIS	NM_174444.1	Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase
PTPRJ	XM_003587017.1	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, J
RDH16	NM_001075796.1	Retinol dehydrogenase 16 (all-trans)
REBK1	NM_001245951.1	RNA export protein-like protein of BERV-K1
REEP1	NM_001082461.1	Receptor accessory protein 1
RET	NM_001191483.1	Ret proto-oncogene
RFFL	XM_002695631.1	Ring finger and FYVE-like domain containing 1
RGS14	NM_001192731.1	Regulator of G-protein signaling 14
RHBDF2	XM_002696165.1	Rhomboid 5 homolog 2 (Drosophila)
RHOBTB3	XM_609411.5	Rho-related BTB domain containing 3
RNASE12	XM_002690743.1	Ribonuclease, rnase A family, 12 (non-active)
RNASE6	NM_174594.2	Ribonuclease, rnase A family, k6

RNF122	NM_001101920.1	Ring finger protein 122
RNF175	NM_001193184.1	Ring finger protein 175
RNF185	NM_001083703.1	Ring finger protein 185
RNF34	NM_001014858.1	Ring finger protein 34
RPAIN	NM_001076500.1	RPA interacting protein
RPRM	NM_001080739.1	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate
RSPRY1	NM_001083734.1	Ring finger and SPRY domain containing 1
RTP4	NM_001075961.1	Receptor (chemosensory) transporter protein 4
RUNX2	XM_002697262.1	Runt-related transcription factor 2
RWDD4	NM_001076824.1	RWD domain containing 4
SBSPON	NM_001075869.1	Somatomedin B and thrombospondin, type 1 domain containing
SCNN1B	NM_001098075.1	Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta
SCUBE2	XM_002693059.2	Signal peptide, CUB domain, EGF-like 2
SDS	NM_001075662.1	Serine dehydratase
SECTM1	NM_001102326.1	Secreted and transmembrane 1
Sectm1a	ENSBTAT00000056556	Uncharacterized protein
SEMA6C	XM_002684071.2	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C
SEMA6D	NM_001191133.1	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
SEPP1	NM_174459.3	Selenoprotein P, plasma, 1
SEPT4	NM_001034651.1	Septin 4
SERPINA5	NM_176646.2	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5
SFRP5	NM_174461.2	Secreted frizzled-related protein 5
SFTA2	NM_001114523.1	Surfactant associated 2
SH2D1A	NM_001034733.1	SH2 domain containing 1A
SH3D19	XM_002694318.2	SH3 domain containing 19
SIK1	ENSBTAT00000015200	Salt-inducible kinase 1
SIX1	ENSBTAT00000016104	SIX1 protein; Uncharacterized protein
SLAMF1	NM_174184.3	Signaling lymphocytic activation molecule family member 1
SLAMF7	NM_001191358.1	SLAM family member 7
SLC16A11	XM_001790274.3	Solute carrier family 16, member 11 (monocarboxylic acid transporter 11)
SLC16A13	NM_001076132.1	Solute carrier family 16, member 13 (monocarboxylic acid transporter 13)
SLC16A6	NM_001192672.1	Solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)
SLC18A2	NM_174653.2	Solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2
SLC1A1	NM_174599.2	Solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1
SLC29A2	NM_001103269.1	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2
SLC38A1	XM_002687321.1	Solute carrier family 38, member 1
SLC38A7	NM_001100355.1	Solute carrier family 38, member 7
SLC44A2	NM_001098139.1	Solute carrier family 44, member 2
SLC9A9	NM_001076068.1	Solute carrier family 9, subfamily A (NHE9, cation proton antiporter 9), member 9
SMARCE1	NM_001099116.1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1
SMOX	NM_001205439.1	Spermine oxidase
SNAP91	NM_001105378.1	Synaptosomal-associated protein, 91kda homolog (mouse)

SNORA35	ENSBTAT00000060880	Small nucleolar RNA SNORA35
SNX20	NM_001038033.1	Sorting nexin 20
SNX8	NM_001046533.1	Sorting nexin 8
SPDYC	XM_002699389.1	Speedy homolog C ( <i>Xenopus laevis</i> )
SPPL3	XM_615162.4	Signal peptide peptidase-like 3
SPRY1	NM_001099366.1	Sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling ( <i>Drosophila</i> )
SRPK3	NM_001083390.1	SRSF protein kinase 3
SRPX	NM_001040489.1	Sushi-repeat containing protein, X-linked
STAG3	NM_001192411.2	Stromal antigen 3
STK32C	XM_002698604.1	Serine/threonine kinase 32C
STON1	NM_001204851.1	Stonin 1
SULT1A1	NM_177521.2	Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1
SUN2	NM_001102319.1	Sad1 and UNC84 domain containing 2
TCF20	NM_001192574.1	Transcription factor 20 (AR1)
TCRA	NM_001075519.1	T cell receptor, alpha
TDRKH	NM_001105375.1	Tudor and KH domain containing
TFDP2	NM_001075241.1	Transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)
TKTL1	NM_001045972.1	Transketolase-like 1
TLE4	NM_001081583.1	Transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, <i>Drosophila</i> )
TLR2	NM_174197.2	Toll-like receptor 2
TM7SF2	NM_174622.3	Transmembrane 7 superfamily member 2
TMEM141	NM_001034462.1	Transmembrane protein 141
TMEM156	NM_001083469.1	Transmembrane protein 156
TMEM210	ENSBTAT00000065269	Transmembrane protein 210
TMEM229B	NM_001031768.2	Transmembrane protein 229B
TMEM35	NM_001014940.1	Transmembrane protein 35
TMEM51	NM_001098975.1	Transmembrane protein 51
TMEM64	XM_616966.5	Transmembrane protein 64
TMEM79	NM_001014920.1	Transmembrane protein 79
TMTC1	NM_001192761.1	Transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1
TNFRSF6B	NM_001101306.1	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy
TNNT1	NM_174474.1	Troponin T type 1 (skeletal, slow)
TOX	NM_001102096.1	Thymocyte selection-associated high mobility group box
TRAC	ENSBTAT00000000555	T cell receptor alpha constant
TRPM3	NM_001076236.1	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 3
TTPA	NM_001206676.1	Tocopherol (alpha) transfer protein
TUBB3	NM_001077127.1	Tubulin, beta 3 class III
U6	ENSBTAT00000059773	U6 spliceosomal RNA
UBAP2	NM_001191276.2	Ubiquitin associated protein 2
UBD	NM_001206473.1	Ubiquitin D
UPK1B	NM_174482.2	Uroplakin 1B
USP31	XM_002698023.1	Ubiquitin specific peptidase 48
UST	NM_001206827.1	Uronyl-2-sulfotransferase
VIL1	NM_001013591.1	Villin 1
VLDLR	NM_174489.2	Very low density lipoprotein receptor
VSIG4	NM_001046529.1	V-set and immunoglobulin domain containing 4

WNK2	XM_002689849.2	WNK lysine deficient protein kinase 2
YEATS2	NM_001105367.1	YEATS domain containing 2
ZAP70	NM_001193017.1	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kda
ZCWPW1	NM_001076853.1	Zinc finger, CW type with PWWP domain 1
ZNF483	NM_001105423.1	Zinc finger protein 483

### Anexo V Listado de genes agrupados (SOTA4)

Símbolo oficial	Acceso	Nombre
ABP1	NM_001034361.1	Amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing))
ACTG2	NM_001013592.1	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
ADCY7	NM_174230.2	Adenylate cyclase 7
AFF2	NM_001191543.1	AF4/FMR2 family, member 2
AKR1C3	XM_002692184.1	Aldo-keto reductase family 1, member C1
AMIGO2	NM_001205786.1	Adhesion molecule with Ig-like domain 2
APOL3	NM_001100297.1	Apolipoprotein L, 3
ARG2	NM_001017942.1	Arginase, type II
BGN	NM_178318.3	Biglycan
BLNK	NM_001046054.1	B-cell linker
BMP4	NM_001045877.1	Bone morphogenetic protein 4
C16H1orf95	NM_001083770.1	Chromosome 16 open reading frame, human c1orf95
C18H16orf74	XM_002694752.1	Chromosome 18 open reading frame, human c16orf74
C1QA	NM_001014945.1	Complement component 1, q subcomponent, A chain
C4H7orf41	NM_001101246.1	Chromosome 4 open reading frame, human c7orf41
CAV1	NM_174004.3	Caveolin 1, caveolae protein, 22kda
CDCA7	NM_001037488.1	Cell division cycle associated 7
CDH17	NM_001098902.1	Cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)
CH25H	NM_001075243.1	Cholesterol 25-hydroxylase
CLDN8	NM_001098096.1	Claudin 8
CLEC14A	NM_001077890.1	C-type lectin domain family 14, member A
CNRIP1	NM_001076183.1	Cannabinoid receptor interacting protein 1
COL4A4	XM_003585388.1	Collagen, type IV, alpha 4
CTGF	NM_174030.2	Connective tissue growth factor
DIO2	NM_001010992.3	Deiodinase, iodothyronine, type II
DPEP2	XM_002694905.1	Dipeptidase 2
EDNRA	NM_174308.2	Endothelin receptor type A
EMCN	NM_001076420.1	Endomucin
ENPP5	NM_001206724.1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative)
FAM105A	NM_001102171.1	Family with sequence similarity 105, member A
FGF18	NM_001076007.1	Fibroblast growth factor 18
FHOD1	NM_001206339.1	Formin homology 2 domain containing 1
FOLR1	NM_001206532.1	Folate receptor 1 (adult)
FOS	NM_182786.2	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FZD5	XM_002685540.2	Frizzled family receptor 5
GIMAP5	NM_001079769.1	Gtpase, IMAP family member 5
GPAT2	NM_001192634.1	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2, mitochondrial

HERC5	NM_001101995.1	Hect domain and RLD 5
HOXA7	XM_867772.3	Homeobox A7
IFFO1	NM_001083380.1	Intermediate filament family orphan 1
IGFBP3	NM_174556.1	Insulin-like growth factor binding protein 3
IL17RB	ENSBTAT00000014846	Interleukin-17 receptor B
ILVBL	NM_001015535.1	Ilvb (bacterial acetolactate synthase)-like
ITGB3	NM_001206490.1	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein iiiia, antigen CD61)
ITPR1L1	XM_002691135.1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 1
LOC100139161	XM_003586489.1	T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 2-like
LOC100300483	XM_002691364.1	Antimicrobial peptide NK-lysin-like
LOC100337056	XM_003585083.1	Aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)-like
LOC100847844	XR_139493.1	Uncharacterized LOC100847844
LOC100848596	XM_003587151.1	Uncharacterized LOC100848596
LOC100850470	XM_003582783.1	Antimicrobial peptide NK-lysin-like
LOC515150	XM_002693873.2	Complement component 4 binding protein, alpha-like
LOC532205	XM_010811349.1	Dihydrodiol dehydrogenase 3-like
LOC538060	NM_001206787.1	Aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)-like
LOC618369	XM_003582287.1	Lactosylceramide 4-alpha-galactosyltransferase-like
LOC768255	NM_001078121.1	Gtpase, IMAP family member 4-like
LOC782061	NM_001166223.1	Aldo-keto reductase family 1, member C1-like
LOC785996	XM_003585603.1	Putative aldo-keto reductase family 1 member C1-like
LOC788927	XM_003582986.1	EMILIN-3-like
LY6G6C	NM_001077856.1	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C
MAFF	NM_001103300.1	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)
MATK	NM_001035011.1	Megakaryocyte-associated tyrosine kinase
MCTP2	XM_003583719.1	Multiple C2 domains, transmembrane 2
MMP11	XM_002694692.1	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
MOCOS	NM_174081.2	Molybdenum cofactor sulfurase
NFATC4	NM_001102536.1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4
NOSTRIN	NM_001046257.1	Nitric oxide synthase trafficker
PCDH18	NM_001102229.1	Protocadherin 18
PDE2A	NM_001256273.1	Phosphodiesterase 2A, cgmp-stimulated
PLAC8	NM_001076987.1	Placenta-specific 8
PRR16	XM_002688993.2	Proline rich 16
PTGS2	NM_174445.2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
PTX3	NM_001076259.1	Pentraxin 3, long
RUNDC3B	NM_001076874.1	RUN domain containing 3B
SAT1	NM_001034333.1	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1
SCD5	NM_001076945.1	Stearoyl-coa desaturase 5
SEL1L3	NM_001206556.2	Sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. Elegans)
SIGLEC10	NM_001206277.1	Sialic acid binding Ig-like lectin 10
SLC13A5	NM_001191446.1	Solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5

SLC22A3	XM_002690372.2	Solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 3
SLC2A5	NM_001101042.1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5
SMPDL3B	NM_001100379.1	Sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B
SNORD113	ENSBTAT00000059500	Small nucleolar RNA SNORD113/SNORD114 family
SPARC	NM_174464.2	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
SPTBN2	ENSBTAT00000007787	Spectrin, beta, non-erythrocytic 2
STMN2	NM_001034622.1	Stathmin-like 2
STYK1	NM_001143868.1	Serine/threonine/tyrosine kinase 1
TLE1	NM_001098020.1	Transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)
TMEM106A	NM_001014870.2	Transmembrane protein 106A
TMEM178	NM_001192028.1	Transmembrane protein 178
TRIB1	NM_001101105.1	Tribbles homolog 1 (Drosophila)
TXNRD1	NM_174625.3	Thioredoxin reductase 1
ULBP3	NM_001103233.1	UL16 binding protein 3
USHBP1	NM_001077137.1	Usher syndrome 1C binding protein 1
VCAM1	NM_174484.1	Vascular cell adhesion molecule 1
VGLL1	XM_002699589.1	Vestigial like 1 (Drosophila)
ZBTB16	NM_001037476.1	Zinc finger and BTB domain containing 16

### Anexo VI Listado de genes agrupados (SOTA5)

Símbolo oficial	Acceso	Nombre
COL2A1	NM_001001135.2	Collagen, type II, alpha 1
CPE	NM_173903.3	Carboxypeptidase E
FABP3	NM_174313.2	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)
FST	NM_175801.2	Follistatin
GDF10	NM_001076167.1	Growth differentiation factor 10
GRP	NM_001101239.1	Gastrin-releasing peptide
HPGD	NM_001034419.1	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)
IFI27	ENSBTAT00000004093	Interferon alpha-inducible protein 27
LOC100847618	XR_139598.1	Uncharacterized LOC100847618
LOC100851446	XM_003583032.1	Proenkephalin-A-like
LOC526200	XM_003582606.1	Absent in melanoma 1 protein-like
LOC783399	XM_002689933.1	Major allergen Equ c 1-like
LOC787414	XM_001254250.3	Chloride channel protein clc-Ka-like
LRP2	XM_002685308.2	Low density lipoprotein receptor-related protein 2
MGP	NM_174707.2	Matrix Gla protein
PDZK1	NM_001034611.1	PDZ domain containing 1
PENK	NM_174141.2	Proenkephalin
SCARA5	NM_001102499.1	Scavenger receptor class A, member 5 (putative)
SCUBE2	XM_003583105.1	Signal peptide, CUB domain, EGF-like 2
THY1	NM_001034765.1	Thy-1 cell surface antigen
UNC93A	NM_001082457.1	Unc-93 homolog A (C. Elegans)



## Anexo VII Listado de genes agrupados (SOTA6)

Símbolo oficial	Acceso	Nombre
ACSL4	XM_865924.4	Acyl-coa synthetase long-chain family member 4
AKAP6	NM_001192923.1	A kinase (PRKA) anchor protein 6
AKR1C4	NM_181027.2	Aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type I; dihydrodiol dehydrogenase 4)
CCNB1	NM_001045872.1	Cyclin B1
CHRD1	XM_592894.6	Chordin-like 1
CHST2	NM_001113769.1	Carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2
CLCNKA	XM_618340.5	Chloride channel Ka
COL4A3	NM_001166529.1	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
CPN1	NM_001076080.1	Carboxypeptidase N, polypeptide 1
CYP2C18	NM_001076051.1	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18
DGAT2	NM_205793.2	Diacylglycerol O-acyltransferase 2
DGKA	NM_001077860.1	Diacylglycerol kinase, alpha 80kda
DRAM1	NM_001031767.2	DNA-damage regulated autophagy modulator 1
F2RL3	NM_001076138.1	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3
GJB5	NM_001205907.1	Gap junction protein, beta 5, 31.1kda
GPR183	NM_001046472.1	G protein-coupled receptor 183
ITPR1L1	XM_002691136.1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like 1
LOC100336592	XR_139225.1	Collagen alpha-4(VI) chain-like
LOC100847753	XR_139607.1	Uncharacterized LOC100847753
LOC512293	XR_083278.1	G2/mitotic-specific cyclin-B1-like
LOC515676	XM_593741.6	Uncharacterized LOC515676
LOC521764	XM_003582972.1	Myosin-7B-like
LOC783399	XM_003582575.1	Major allergen Equ c 1-like
LRRC26	XM_002691686.1	Leucine rich repeat containing 26
MRPS36	NM_001035438.1	Mitochondrial ribosomal protein S36
NDRG4	NM_001075695.1	NDRG family member 4
NPPC	NM_174125.2	Natriuretic peptide C
OSR1	NM_001076916.2	Odd-skipped related 1 (Drosophila)
PKP1	NM_174145.2	Plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)
RTN4RL2	XM_002693714.2	Reticulon 4 receptor-like 2
SFRP4	NM_001075764.1	Secreted frizzled-related protein 4
SLC31A2	NM_001034556.1	Solute carrier family 31 (copper transporters), member 2
SLC39A8	NM_001205630.1	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8
SLC43A3	NM_001038126.1	Solute carrier family 43, member 3
SPC24	NM_001075391.1	SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. Cerevisiae)
TMIE	NM_001206734.1	Transmembrane inner ear
TTC22	NM_001098055.1	Tetratricopeptide repeat domain 22
UNC93A	ENSBTAT00000057059	Unc-93 homolog A
WBSCR17	NM_001192067.1	Williams-Beuren syndrome chromosome region 17
WNT11	NM_001082456.1	Wingless-type MMTV integration site family, member 11

## Anexo VIII Genes expresados únicamente por el oviducto en la especie

## bovina

Número de acceso	Símbolo	FC* (log2)		P-valor		Media de señal
		U_cr/O_a	U_cr/O_i	U_cr/O_a	U_cr/O_i	
XM_003585814.2	OVGP1	-13.08	-13.10	0.0000	0.0000	13.23
NM_001083418.1	LAMP5	-10.01	-10.42	0.0000	0.0000	11.09
NM_001205833.1	AQP9	-9.26	-10.16	0.0000	0.0000	11.03
NM_001076202.1	CYP4B1	-7.64	-7.92	0.0000	0.0000	11.01
NM_001033936.1	CFH	-7.80	-7.90	0.0000	0.0000	11.71
NM_001205300.1	PITX1	-7.48	-7.78	0.0000	0.0000	9.85
NM_001192643.1	P2RX2	-7.75	-7.50	0.0000	0.0000	11.27
NM_001191160.1	AQP5	-6.42	-6.93	0.0000	0.0000	10.52
NM_001205882.1	SEC14L3	-5.55	-6.77	0.0000	0.0000	10.20
XM_002688235.1	GABA	-7.10	-6.74	0.0000	0.0000	8.44
NM_001100374.1	MSLN	-6.94	-6.72	0.0000	0.0000	9.05
XM_866224.2	UTS2D	-5.31	-6.51	0.0000	0.0000	7.80
XM_002690022.1	CD109	-6.19	-6.36	0.0000	0.0000	12.66
XM_002702097.1	WFDC18	-5.08	-6.30	0.0003	0.0000	9.44
NM_001079621.1	BNIP1	-5.80	-6.27	0.0000	0.0000	10.37
NM_174682.2	ACSM1	-6.17	-6.27	0.0000	0.0000	9.89
NM_001205278.1	EXPI	-5.00	-6.23	0.0003	0.0000	9.26
NM_001101935.1	KRT23	-5.85	-6.22	0.0000	0.0000	8.32
NM_001080219.1	CHI3L1	-5.96	-6.15	0.0000	0.0000	9.88
NM_001192898.1	DGKB	-5.70	-6.12	0.0000	0.0000	8.12
NM_001206783.1	PHGR1	-6.13	-6.00	0.0000	0.0000	12.04
NM_001080909.1	STOML3	-5.56	-5.94	0.0000	0.0000	9.25
NM_001035464.1	EYA2	-5.17	-5.81	0.0000	0.0000	11.69
XM_002688785.2	MUC16	-5.58	-5.71	0.0001	0.0001	10.55
XM_587457.5	ATP2C2	-5.65	-5.70	0.0000	0.0000	13.04
XM_867937.4	FAM151A	-5.98	-5.66	0.0000	0.0000	9.34
NM_001008663.1	KRT5	-5.68	-5.66	0.0000	0.0000	8.01
XM_003587381.1	LOC100847724	-4.72	-5.55	0.0000	0.0000	8.95
NM_001076121.1	BCL11A	-5.35	-5.53	0.0000	0.0000	9.02
NM_173877.1	F2	-5.57	-5.48	0.0000	0.0000	10.62
XM_001253283.2	PDYN	-5.69	-5.46	0.0000	0.0000	8.67
XM_002684535.2	MSLNL	-5.72	-5.45	0.0000	0.0000	8.38
NM_001077034.1	BEX2	-5.18	-5.35	0.0000	0.0000	7.83
XM_002685502.2	LOC518393	-4.90	-5.30	0.0000	0.0000	8.04
XM_614095.6	FCGBP	-4.92	-5.29	0.0000	0.0000	12.43
XM_001255698.3	KRT9	-5.23	-5.29	0.0000	0.0000	10.66
NM_001102054.1	SERPINI2	-5.91	-5.19	0.0000	0.0000	8.33
NM_001101980.1	COL17A1	-4.73	-5.17	0.0000	0.0000	7.42
NM_001102210.1	NWD1	-4.49	-5.01	0.0000	0.0000	8.04
XM_002699995.1	LOC519208	-5.48	-4.98	0.0000	0.0000	7.76
XM_002688413.2	PPP2R2C	-4.68	-4.92	0.0000	0.0000	10.13
XM_002696055.1	RPRML	-4.62	-4.89	0.0000	0.0000	8.32
XM_003585238.1	PI3	-5.13	-4.85	0.0000	0.0000	11.15
XM_003582989.1	BTRAPPIN-5	-5.02	-4.84	0.0000	0.0000	11.00
NM_173883.2	TG	-4.35	-4.80	0.0000	0.0000	8.41
XM_003585390.1	BTRAPPIN-4	-5.08	-4.75	0.0000	0.0000	11.00
XM_865147.1	ATP6V1G3	-4.63	-4.55	0.0000	0.0000	11.10
XR_138891.1	LOC100848261	-4.64	-4.52	0.0000	0.0000	9.50
NM_001102110.1	CTNNA2	-4.92	-4.47	0.0000	0.0000	7.19
NM_001075923.1	ENPP3	-4.42	-4.40	0.0000	0.0000	11.14
NM_174129.3	NT5E	-4.49	-4.30	0.0000	0.0000	9.32
XM_003583102.1	LOC514824	-4.32	-4.29	0.0000	0.0000	8.04
NM_001206968.1	OTUD7A	-4.51	-4.28	0.0000	0.0000	6.67
NM_001078022.1	GJA5	-4.60	-4.27	0.0000	0.0000	10.62
NM_001101050.1	UPB1	-4.32	-4.25	0.0000	0.0000	7.35

XM_605496.4	CORIN	-4.28	-4.24	0.0000	0.0000	6.66
NM_001206903.1	SLC6A11	-4.11	-4.21	0.0000	0.0000	6.39
XM_003582232.1	LOC100847954	-4.08	-4.09	0.0000	0.0000	7.95
XM_615728.5	SLC9A10	-4.85	-4.06	0.0000	0.0000	7.53
XM_002690855.2	ALDH1A2	-4.49	-4.02	0.0000	0.0000	11.41
NM_001205610.1	ABCC8	-4.90	-4.00	0.0000	0.0000	10.43

\*fold change

### Anexo IX Genes expresados únicamente por el endometrio en la especie bovina

Número de acceso	Símbolo	FC*(log2) U_cr/O_a	FC*(log2) U_cr/O_i	P-valor U_cr/O_a	P-valor U_cr/O_i	Media de señal
NM_001076831.1	COL3A1	10.81	10.23	0.0000	0.0000	7.99
NM_174257.2	S100G	10.62	10.04	0.0000	0.0000	7.96
XM_002686854.2	HOXA11	9.46	9.19	0.0000	0.0000	6.14
NM_001101239.1	GRP	9.34	5.29	0.0000	0.0000	11.10
NM_174520.2	COL1A2	9.22	9.05	0.0000	0.0000	7.11
NM_001143865.1	COL6A1	9.10	8.46	0.0000	0.0000	9.82
NM_205786.1	PTI	8.71	7.94	0.0000	0.0000	6.35
NM_001105017.1	HOXA10	8.49	8.26	0.0000	0.0000	5.94
NM_001192114.1	GATA2	8.42	8.36	0.0000	0.0000	6.74
NM_001001598.1	P4HA3	8.41	8.35	0.0000	0.0000	6.03
NM_001105636.1	UGT1A1	8.29	6.98	0.0000	0.0000	6.81
NR_037684.1	MEG3	8.24	8.03	0.0000	0.0000	6.24
XM_597117.5	LAMC3	7.88	7.95	0.0000	0.0000	6.38
NM_001080358.1	TDGF1	7.87	7.50	0.0000	0.0000	7.77
NM_001083664.1	TMEM119	7.85	7.57	0.0000	0.0000	5.60
NM_173934.1	LUM	7.81	7.79	0.0000	0.0000	6.05
XM_003584958.1	HTRA3	7.76	7.36	0.0000	0.0000	7.01
NM_001046379.1	CNN1	7.74	6.46	0.0000	0.0000	7.03
NM_001099053.1	LOXL2	7.69	7.26	0.0000	0.0000	6.26
NM_001083644.1	BCAT1	7.66	7.33	0.0000	0.0000	6.72
NM_001098001.1	FAP	7.64	7.57	0.0000	0.0000	6.01
NM_001166511.1	COL4A1	7.64	7.04	0.0000	0.0000	8.16
XM_003584268.1	LOC520070	7.64	7.59	0.0000	0.0000	6.69
NM_001098134.1	SMOC2	7.63	6.91	0.0000	0.0000	9.38
XM_002690397.1	DACT2	7.58	6.95	0.0000	0.0000	5.58
XM_001788106.3	MGC127538	7.55	7.02	0.0000	0.0000	6.31
XM_002685670.1	CD24	7.44	7.11	0.0000	0.0000	6.26
NM_173969.3	VIM	7.42	7.03	0.0000	0.0000	8.02
ENSBTAT0000008743	PIP	7.36	6.32	0.0000	0.0000	7.20
NM_001105617.2	HOXA9	7.35	6.78	0.0000	0.0000	5.54
NM_001034328.1	OSR2	7.31	7.03	0.0000	0.0000	6.74
NM_001205527.1	SHOX2	7.25	7.21	0.0000	0.0000	5.62
NM_001192658.1	RORB	7.18	6.91	0.0000	0.0000	5.31
XM_002685288.1	HOXD9	7.14	7.02	0.0000	0.0000	6.73
NM_001192367.1	MCOLN3	7.13	6.63	0.0000	0.0000	6.29
NM_001100299.1	CRISPLD2	7.13	7.56	0.0000	0.0000	8.20
NM_173950.2	PGF	7.09	6.78	0.0000	0.0000	5.30
NM_001163778.1	FN1	7.06	6.21	0.0000	0.0000	7.83
NM_001034611.1	PDZK1	7.06	5.71	0.0000	0.0003	7.07
NM_174140.3	SERPINF1	7.05	6.51	0.0000	0.0000	7.79
NM_001035470.2	MRGPRF	7.03	6.74	0.0000	0.0000	6.03
XM_002686666.1	DLX6	7.03	6.59	0.0000	0.0000	5.62
XM_003583032.1	LOC100851446	7.00	6.69	0.0000	0.0000	5.41
NM_174702.3	AQP1	6.96	6.35	0.0000	0.0000	7.61
NM_001034227.1	MPTX	6.96	5.99	0.0000	0.0000	6.42
NM_174798.2	MSX1	6.94	5.86	0.0000	0.0000	9.94
NM_001099000.1	GLI1	6.94	6.80	0.0000	0.0000	5.58

NM_001078026.1	TNC	6.91	7.19	0.0000	0.0000	5.93
XM_002688974.1	FBN2	6.91	5.00	0.0000	0.0000	6.04
NM_001143869.1	EMILIN2	6.90	7.14	0.0000	0.0000	7.46
NM_001034538.1	SNAI2	6.81	6.59	0.0000	0.0000	5.75
NM_174460.2	SFRP1	6.78	7.00	0.0000	0.0000	7.33
NM_174141.2	PENK	6.77	6.47	0.0000	0.0000	5.48
NM_174669.2	SERPINE2	6.73	5.86	0.0000	0.0000	7.05
NM_174707.2	MGP	6.70	6.13	0.0001	0.0002	11.72
XM_584835.5	B4GALNT2	6.68	6.41	0.0000	0.0000	5.16
NM_001101979.1	EDN3	6.66	6.37	0.0000	0.0000	5.61
XM_003587968.1	GPR124	6.64	6.58	0.0000	0.0000	8.27
XM_590993.3	LOC513329	6.61	6.38	0.0000	0.0000	7.05
NM_001099948.1	TNMD	6.61	6.40	0.0000	0.0000	5.27
NM_001145035.1	C15H11ORF96	6.59	6.01	0.0000	0.0000	6.16
NM_001083369.1	TMEM130	6.56	6.20	0.0000	0.0000	5.46
NM_001046532.1	RAB3IL1	6.51	6.44	0.0000	0.0000	6.12
NM_001013001.1	WNT2	6.50	6.72	0.0000	0.0000	6.37
NM_001008416.1	KLK1	6.47	6.24	0.0000	0.0000	6.94
NM_174087.3	IGF2	6.46	6.32	0.0000	0.0000	10.19
NM_173903.3	CPE	6.42	4.37	0.0000	0.0000	7.54
XM_002686570.2	COL6A3	6.42	6.01	0.0000	0.0000	9.72
NM_001045913.1	RRAD	6.37	6.34	0.0000	0.0000	5.54
NM_001099105.1	HOXD10	6.37	6.50	0.0000	0.0000	6.12
NM_001099385.1	RUNX1T1	6.35	5.96	0.0000	0.0000	5.93
NM_001015642.2	CPXM1	6.33	6.40	0.0000	0.0000	5.90
NM_001083748.1	TWIST2	6.32	6.08	0.0000	0.0000	5.29
NM_174388.2	MFAP2	6.32	6.18	0.0000	0.0000	8.75
NM_001040482.1	KCNJ8	6.31	6.04	0.0000	0.0000	5.36
NM_001034564.2	GPR133	6.30	6.58	0.0000	0.0000	5.71
NM_001014845.2	NPY	6.28	5.93	0.0000	0.0000	5.41
NM_174183.2	SELP	6.25	5.79	0.0000	0.0000	5.45
XM_002685618.1	COL16A1	6.23	6.37	0.0000	0.0000	8.80
NM_001101156.1	PMP22	6.22	6.28	0.0000	0.0000	6.84
NM_001097568.1	ID1	6.19	6.79	0.0000	0.0000	8.42
NM_174134.2	OXTR	6.18	5.97	0.0000	0.0000	5.40
NM_001076301.1	APOD	6.18	6.43	0.0000	0.0000	6.71
NM_001046121.1	SLC11A2	6.14	5.12	0.0000	0.0000	10.13
XM_001789060.1	LOC790476	6.10	5.04	0.0000	0.0000	7.79
XR_139433.1	LOC100337023	6.09	5.75	0.0000	0.0000	7.93
NM_174233.2	AGTR1	6.04	5.81	0.0000	0.0000	5.16
NM_001101044.2	PLBD1	6.01	6.25	0.0000	0.0000	7.26
NM_001075126.1	COL6A2	6.00	5.91	0.0000	0.0000	6.02
XM_005206031.1	SYT1	6.00	5.72	0.0000	0.0000	4.96
XM_002692011.1	COL4A2	5.94	5.59	0.0000	0.0000	8.66
NM_001015590.2	ITIH4	5.94	6.11	0.0000	0.0000	6.75
NM_001206283.1	EFNB3	5.89	5.97	0.0000	0.0000	5.43
NM_001013592.1	ACTG2	5.88	4.54	0.0000	0.0000	6.55
XM_002684144.1	LOC100297468	5.86	5.62	0.0000	0.0000	7.48
NM_001098381.1	CXCR7	5.86	5.76	0.0000	0.0000	5.04
NM_001099191.1	ROBO4	5.81	5.88	0.0000	0.0000	7.27
NM_174118.2	MYOC	5.80	5.72	0.0000	0.0000	7.11
NM_181667.1	ADAMTS4	5.79	5.41	0.0000	0.0000	5.01
NM_001205320.1	OLFM2	5.77	5.70	0.0000	0.0000	5.05
NM_001102065.1	NID2	5.76	5.64	0.0000	0.0000	6.62
NM_001035045.1	FSCN1	5.74	5.96	0.0000	0.0000	6.97
NM_001076820.1	DNM1	5.74	5.73	0.0000	0.0000	6.73
XM_003586784.2	CD93	5.74	5.77	0.0000	0.0000	5.77
NM_001046611.2	LDB2	5.74	5.61	0.0000	0.0000	5.15
NM_001075771.1	PARM1	5.73	5.38	0.0000	0.0000	6.42
XM_003588045.3	CD248	5.71	5.88	0.0000	0.0000	6.09
XM_002690525.2	ITGA11	5.71	5.70	0.0000	0.0000	5.41

NM_001098982.1	CCDC80	5.70	5.09	0.0000	0.0000	9.41
NM_174703.2	TNXB	5.70	5.61	0.0000	0.0000	7.53
NM_001076891.1	DAPP1	5.69	5.97	0.0000	0.0000	5.93
NM_001012519.1	AKR1B1	5.69	4.67	0.0000	0.0000	6.26
XM_592756.4	FNDC1	5.66	5.06	0.0000	0.0000	8.58
NM_001075983.1	MMP19	5.66	5.80	0.0000	0.0000	7.06
NM_001075832.1	EFHD1	5.65	5.11	0.0000	0.0000	6.55
NM_001101127.1	GALNTL1	5.63	5.25	0.0000	0.0000	6.86
NM_001040589.1	MUSTN1	5.63	6.00	0.0000	0.0000	7.95
NM_001034707.1	RGS5	5.63	5.65	0.0000	0.0000	5.49
XR_138968.1	LOC100847618	5.61	5.68	0.0001	0.0001	6.28
XM_864684.4	MOXD1	5.59	4.09	0.0000	0.0000	6.07
NM_001101165.1	CRISPLD1	5.58	5.29	0.0000	0.0000	4.83
NM_001076201.2	C1QTNF7	5.55	5.58	0.0000	0.0000	5.67
XM_003587297.1	DACT3	5.54	5.43	0.0000	0.0000	5.48
NM_001078136.1	PCP4	5.54	6.54	0.0000	0.0000	8.59
NM_001076330.2	PRSS16	5.51	5.66	0.0000	0.0000	6.56
NM_001046522.1	TMEM100	5.51	5.26	0.0000	0.0000	5.04
XM_001254294.3	LOC786683	5.49	5.17	0.0000	0.0000	4.96
XM_002701345.1	DCHS1	5.48	5.38	0.0000	0.0000	7.10
XM_003582575.1	LOC783399	5.47	5.28	0.0000	0.0001	5.05
NM_001103232.1	PRDM8	5.47	4.46	0.0000	0.0000	6.14
NM_001101186.1	S1PR3	5.47	5.35	0.0000	0.0000	5.11
NM_001098860.1	RAMP2	5.46	5.49	0.0000	0.0000	8.81
NR_003958.2	H19	5.45	5.39	0.0000	0.0000	6.40
NM_001075197.1	OLFML3	5.45	5.58	0.0000	0.0000	9.32
NM_001102493.1	DLC1	5.44	4.24	0.0000	0.0000	7.12
NM_174680.2	KCNMA1	5.44	5.26	0.0000	0.0000	7.58
NM_001046516.1	DYNC111	5.41	5.48	0.0000	0.0000	5.78
NM_001075309.1	GPM6A	5.41	4.93	0.0000	0.0000	5.04
NM_173888.3	ADM	5.41	5.29	0.0000	0.0000	7.85
NM_001110445.1	PCP4L1	5.40	5.30	0.0000	0.0000	5.07
NM_001078162.1	FABP7	5.40	5.44	0.0000	0.0000	5.09
NM_001076550.1	C1S	5.40	6.06	0.0000	0.0000	8.72
NM_001083660.1	MGC155285	5.39	5.21	0.0000	0.0000	4.86
NM_001076460.1	CLDN5	5.38	5.46	0.0000	0.0000	6.65
NM_001075313.1	DLX5	5.38	5.20	0.0000	0.0000	7.31
NM_001081722.1	FADS6	5.37	5.68	0.0000	0.0000	5.87
NM_001081624.1	CDH11	5.33	5.76	0.0000	0.0000	7.41
NM_001192345.1	PDGFRA	5.33	5.16	0.0000	0.0000	5.43
NM_001082457.1	UNC93A	5.33	4.05	0.0000	0.0001	6.23
NM_001076342.1	B3GNT9	5.32	5.67	0.0000	0.0000	6.17
NM_001035385.2	OLFML1	5.30	5.19	0.0000	0.0000	5.43
NM_001075879.1	CHST9	5.29	5.15	0.0000	0.0000	5.29
XM_585971.6	PDZRN3	5.28	4.69	0.0000	0.0000	5.44
NM_001076049.1	EFEMP2	5.27	5.47	0.0000	0.0000	6.17
NM_001083738.1	GJA4	5.27	4.95	0.0000	0.0000	6.73
NM_194465.2	MRVI1	5.23	4.85	0.0000	0.0000	5.20
XM_002696635.1	CYP1A1	5.23	5.01	0.0000	0.0000	4.96
XM_003585119.1	TMEM132C	5.20	5.18	0.0000	0.0000	5.28
XM_002696468.1	NKD2	5.20	5.30	0.0000	0.0000	8.40
NM_001206659.1	TMEM200C	5.20	5.15	0.0000	0.0000	5.50
NM_001083715.1	LMOD1	5.20	4.93	0.0000	0.0000	6.58
NM_001102382.1	NOV	5.20	6.43	0.0000	0.0000	6.90
NM_001078066.1	ESAM	5.18	5.15	0.0000	0.0000	5.47
NM_001075789.1	SOX18	5.17	5.16	0.0000	0.0000	5.80
NM_001077844.1	C14H8ORF47	5.15	4.92	0.0000	0.0000	4.88
NM_001037626.1	SMPX	5.14	4.44	0.0001	0.0003	4.86
NM_174595.2	S100A4	5.14	5.11	0.0000	0.0000	10.14
XM_001787671.3	COL9A3	5.13	5.10	0.0000	0.0000	5.04
XM_002690338.2	AKAP12	5.11	4.47	0.0000	0.0000	6.40

NM_001192922.1	NRXN2	5.11	5.30	0.0000	0.0000	6.90
XM_583112.5	SEMASA	5.10	4.59	0.0000	0.0000	5.59
NM_001035353.1	PLVAP	5.08	5.15	0.0000	0.0000	6.29
XM_003585090.1	LOC100849577	5.08	4.99	0.0000	0.0000	6.59
NM_174762.1	UGT1A6	5.07	4.81	0.0000	0.0000	5.34
NM_174642.1	HSD11B2	5.06	4.88	0.0000	0.0000	8.31
NM_001205858.1	C6H4ORF31	5.06	4.80	0.0000	0.0000	4.88
NM_001101843.1	COLEC12	5.05	5.19	0.0000	0.0000	7.30
NM_001206755.1	FAM171B	5.05	5.05	0.0000	0.0000	4.86
NM_001001156.1	ADAM12	5.04	5.00	0.0000	0.0000	5.86
NM_173946.2	OGN	5.04	5.03	0.0000	0.0000	5.59
NM_001098029.1	FBLN1	5.03	4.67	0.0000	0.0000	9.90
NM_177944.2	MAOB	5.03	4.92	0.0000	0.0000	6.09
NM_001034309.1	ASPN	5.03	5.00	0.0000	0.0000	5.46
NM_001034407.1	C1R	5.02	5.60	0.0000	0.0000	7.99
NM_001243326.1	SH3BGR	5.01	5.04	0.0000	0.0000	5.27
NM_001081594.1	RASD2	5.00	5.07	0.0000	0.0000	5.20
NM_001205624.1	COL5A3	4.92	5.11	0.0000	0.0000	5.80
NM_001102514.1	GRIK1	4.92	4.68	0.0000	0.0000	4.66
NM_174797.2	SERPINA14	4.92	5.17	0.0000	0.0000	5.03
NM_001025343.1	RBP1	4.91	5.06	0.0000	0.0000	8.76
NM_001102299.1	PARVB	4.90	5.06	0.0000	0.0000	5.86
XM_003585388.1	COL4A4	4.90	4.78	0.0000	0.0000	5.20
NM_001034744.1	TMEM37	4.88	4.81	0.0000	0.0000	5.84
NM_001034537.1	GAL3ST4	4.87	4.36	0.0000	0.0000	4.87
NM_174437.1	PROCR	4.87	4.82	0.0000	0.0000	6.96
NM_001102335.1	PGM5	4.87	4.78	0.0000	0.0000	10.37
NM_001037488.1	CDCA7	4.87	4.02	0.0000	0.0000	6.99
XM_003586664.1	LOC100848673	4.86	4.47	0.0000	0.0000	6.37
NM_001014946.1	FBLN5	4.85	4.60	0.0000	0.0000	7.24
XM_003585941.1	LOC100848662	4.85	4.52	0.0000	0.0000	4.76
NM_001038065.1	GPNMB	4.84	4.41	0.0000	0.0000	5.01
NM_001078150.2	LRRC17	4.84	5.30	0.0000	0.0000	6.98
XM_606519.3	SCARF2	4.84	4.14	0.0000	0.0000	5.46
XM_001787662.3	CTHRC1	4.83	4.56	0.0000	0.0000	4.61
XM_005203378.1	CLCNKA	4.83	4.47	0.0001	0.0001	4.68
NM_001102499.1	SCARA5	4.82	4.54	0.0000	0.0001	7.94
NM_001105644.1	LOC788205	4.78	4.94	0.0000	0.0000	6.99
NM_175801.2	FST	4.77	4.99	0.0000	0.0000	7.31
NM_001083479.1	ACVRL1	4.76	4.96	0.0000	0.0000	8.06
NM_001103299.1	PLS1	4.74	4.49	0.0000	0.0000	5.07
XM_864013.4	COL23A1	4.74	4.79	0.0000	0.0000	6.15
NM_174557.3	IGFBP4	4.74	4.12	0.0000	0.0000	7.97
NM_001206114.1	ADAMTS19	4.72	4.68	0.0000	0.0000	5.08
XM_001254148.3	FSTL1	4.72	4.90	0.0000	0.0000	10.08
XM_587893.4	LOC510716	4.72	4.40	0.0000	0.0000	8.46
NM_173897.1	CA4	4.71	4.73	0.0000	0.0000	5.82
NM_181010.2	EDN1	4.70	4.41	0.0000	0.0000	4.75
NM_177503.2	LRAT	4.69	4.57	0.0000	0.0000	6.27
NM_001014899.1	TCF21	4.68	4.46	0.0000	0.0000	6.38
NM_001206519.1	LAMB1	4.68	4.96	0.0000	0.0000	8.90
NM_001102276.1	MGC148992	4.68	4.59	0.0000	0.0000	6.63
NM_001102524.1	APLNR	4.66	4.65	0.0000	0.0000	4.86
NM_001076119.1	TSPAN5	4.66	4.22	0.0000	0.0000	4.75
NM_001101176.1	COL8A1	4.63	4.20	0.0000	0.0000	4.62
XM_001788013.3	PLEKHG4	4.60	4.49	0.0000	0.0000	4.95
NM_001102528.1	MATN2	4.59	4.56	0.0000	0.0000	6.33
NM_001034765.1	THY1	4.59	5.65	0.0012	0.0002	8.47
NM_001099145.1	TMEM176B	4.57	4.64	0.0000	0.0000	6.02
NM_001193243.1	GPR116	4.55	4.47	0.0000	0.0000	6.75
NM_001101180.1	APOLD1	4.54	4.62	0.0000	0.0000	6.94

NM_001191132.2	FLT1	4.52	4.17	0.0000	0.0000	6.01
XM_002686730.1	LOC100296627	4.51	4.15	0.0000	0.0000	7.49
NM_001098473.1	B3GNT3	4.51	4.58	0.0000	0.0000	5.61
NM_001113174.1	CXCL12	4.51	4.25	0.0000	0.0000	5.29
XM_613967.3	PRRX2	4.50	4.69	0.0000	0.0000	7.08
XM_003583217.1	RGS2	4.50	4.34	0.0000	0.0000	8.03
NM_001206811.1	LPCAT1	4.50	4.79	0.0000	0.0000	7.74
NM_001077990.1	LHFP	4.50	4.26	0.0000	0.0000	5.80
NM_001244446.1	ECSCR	4.49	4.37	0.0000	0.0000	6.94
NM_001099203.1	GRRP1	4.48	4.68	0.0000	0.0000	5.81
NM_001083498.1	RHOJ	4.48	4.03	0.0000	0.0000	4.87
NM_001034223.1	FHL3	4.47	4.63	0.0000	0.0000	6.70
XM_003587266.1	LTBP4	4.47	4.48	0.0000	0.0000	8.89
XM_002690926.1	TNFAIP8L3	4.47	4.13	0.0000	0.0000	7.11
NM_001075830.1	MXRA8	4.46	4.34	0.0000	0.0000	5.36
NM_174464.2	SPARC	4.46	4.50	0.0001	0.0001	9.96
NM_176608.1	GHR	4.45	4.64	0.0000	0.0000	6.15
NM_001080307.1	ABI3BP	4.45	4.02	0.0000	0.0000	6.06
NM_001102116.1	CSGALNACT1	4.43	4.29	0.0000	0.0000	5.47
NM_001046585.1	CCL14	4.42	4.40	0.0000	0.0000	5.20
XR_083279.2	LOC785554	4.42	4.33	0.0000	0.0000	6.73
XM_003582250.1	ABCC9	4.41	4.15	0.0000	0.0000	4.52
XM_581642.5	WFDC1	4.40	4.94	0.0000	0.0000	9.29
XM_005205566.1	STEAP1	4.39	4.84	0.0000	0.0000	6.98
NM_001083505.1	RAMP3	4.38	4.37	0.0000	0.0000	8.33
NM_174603.3	SLC2A3	4.38	4.33	0.0000	0.0000	6.20
NM_174443.2	PTGES	4.35	4.13	0.0000	0.0000	5.69
XM_868432.4	LOC616414	4.34	4.18	0.0000	0.0000	8.92
XM_581588.6	TRPA1	4.33	4.12	0.0000	0.0000	4.73
NM_001206785.1	IGSF10	4.31	4.36	0.0000	0.0000	4.82
NM_001167894.1	F13A1	4.28	4.38	0.0000	0.0000	5.69
NM_174414.3	PDE1A	4.28	4.58	0.0000	0.0000	5.19
NM_001098056.1	TNFRSF11B	4.23	4.05	0.0000	0.0000	4.97
NM_001046616.1	HSD17B13	4.23	4.94	0.0000	0.0000	6.51
XR_138907.1	LOC100848883	4.22	4.22	0.0000	0.0000	5.01
NM_173991.2	APOE	4.21	4.86	0.0000	0.0000	7.65
NM_001045898.1	NPY1R	4.21	4.19	0.0000	0.0000	4.89
NM_001075877.1	ME3	4.20	4.15	0.0000	0.0000	5.46
NM_001038050.2	IFI27	4.20	4.55	0.0000	0.0000	9.60
XM_582023.4	RASL11A	4.19	4.72	0.0000	0.0000	6.07
NM_001034220.2	LOC504773	4.18	4.48	0.0000	0.0000	5.54
NM_001193246.1	DAB2	4.17	4.43	0.0000	0.0000	6.19
NM_001035457.3	PRSS35	4.16	4.13	0.0000	0.0000	6.58
NM_174745.2	MMP2	4.15	4.10	0.0000	0.0000	7.22
NM_177507.2	TGM2	4.15	4.01	0.0000	0.0000	10.36
XM_868029.5	LOC616063	4.15	4.25	0.0000	0.0000	7.52
NM_001075473.1	LOC510860	4.14	4.41	0.0000	0.0000	5.15
XM_002688934.1	ANKRD24	4.12	4.47	0.0000	0.0000	5.83
NM_001077828.1	IGF1	4.09	4.09	0.0000	0.0000	4.70
NM_001076933.1	RASL12	4.09	4.18	0.0000	0.0000	5.84
NM_001192935.1	SLC35F3	4.09	4.04	0.0000	0.0000	4.90
XM_002702778.2	COL7A1	4.08	4.52	0.0000	0.0000	10.35
NM_001038050.1	ISG12(A)	4.06	4.47	0.0000	0.0000	9.83
NM_001192742.1	PI15	4.06	4.10	0.0000	0.0000	4.86
NM_001102050.1	ANO4	4.02	4.04	0.0000	0.0000	5.11
NM_001184724.1	TM4SF18	4.01	4.08	0.0000	0.0000	7.00
NM_174743.2	SPON1	4.01	4.11	0.0000	0.0000	9.31
NM_176858.2	ALPL	4.01	4.21	0.0000	0.0000	9.89

\*fold change

# 9 BIBLIOGRAFÍA

## 9 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ





- Abascal I.; Skalaban S. R.; Grimm K. M.; Avilés M.; Martínez-Menarguez J. A.; Castells M. T.; Ballesta J.; Alhadeff J. A., 1998: *Alteration of the isoform composition of plasma-membrane-associated rat sperm alpha-L-fucosidase during late epididymal maturation: comparative characterization of the acidic and neutral isoforms*. *Biochemical Journal*, 333 201-207.
- Acott T. S.; Katz D. F.; Hoskins D. D., 1983: *Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa - effects of forward motility protein and epididymal maturation*. *Biology of Reproduction*, 29 389-399.
- Acuña O. S.; Jimenez-Movilla M.; Vilella I.; Jara L.; Canovas S.; Coy P.; Avilés M., 2014: *Detection of SPAM1 in the bovine oviductal fluid*. World Congress of Reproductive Biology. Edinburgh, UK.
- Acuña O. S.; Stetson I.; Izquierdo-Rico M.; Coy P.; Avilés M., 2011: *Expression of sperm adhesion molecule-1 (SPAM1) in cow and sow oviduct*. *Reproduction in Domestic Animals*, 46 79.
- Acuña O. S.; Vilella I.; Canovas S.; Coy P.; Jimenez-Movilla M.; Avilés M., 2014: *Detection of SPAM1 in exosomes isolated from the bovine oviductal fluid*. *Reproduction in Domestic Animals*, 49 97-98.
- Alavi-Shoushtari S. M.; Abedizadeh R.; Khaki A.; Mokarizadeh A.; Dorostkar K., 2014: *A study on the effects of the estrous cycle on uterine fluid and blood serum immunoglobulin G (IgG) content in the cow*. *Veterinary Research Forum*, 5 115-119.
- Alavi-Shoushtari S. M.; Asri-Rezai S.; Abshenas J., 2006: *A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: A comparison with the serum proteins*. *Animal Reproduction Science*, 96 10-20.
- Allison A. C.; Hartree E. F., 1970: *Lysosomal enzymes in acrosome and their possible role in fertilization*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 21 501.
- Almeida F. F.; Leal M. C.; Franca L. R., 2006: *Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (Sus scrofa scrofa)*. *Biology of Reproduction*, 75 792-799.
- Amjadi F.; Salehi E.; Mehdizadeh M.; Aflatoonian R., 2014: *Role of the innate immunity in female reproductive tract*. *Advanced biomedical research*, 3 1.
- Anakwe O. O.; Gerton G. L., 1990: *Acrosome biogenesis begins during meiosis - evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea-pig spermatogenesis*. *Biology of Reproduction*, 42 317-328.
- Angrimani D. S.; Lucio C. F.; Veiga G. A.; Silva L. C.; Regazzi F. M.; Nichi M.; Vannucchi C. I., 2013: *Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic*

*antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa.* *Andrologia*, 46 814-819.

Araki Y.; Nohara M.; Yoshida-Komiya H.; Kuramochi T.; Ito M.; Hoshi H.; Shinkai Y.; Sendai Y., 2003: *Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization.* *Biochemical Journal*, 374 551-557.

Araki Y.; Yoshida-Komiya H., 1998: *Mammalian oviduct-specific glycoprotein: characterization and potential role in fertilization process.* *Journal of Reproduction and Development* 21 3894-3906

Arangasamy A.; Kasimanickam V. R.; DeJarnette J. M.; Kasimanickam R. K., 2011: *Association of CRISP2, CCT8, PEBP1 mRNA abundance in sperm and sire conception rate in Holstein bulls.* *Theriogenology*, 76 570-577.

Arosh J. A.; Parent J.; Chapdelaine P.; Sirois J.; Fortier M. A., 2002: *Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle.* *Biology of Reproduction*, 67 161-169.

Asquith K. L.; Baleato R. M.; McLaughlin E. A.; Nixon B.; Aitken R. J., 2004: *Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition.* *Journal of Cell Science*, 117 3645-3657.

Austin C. R., 1951: *Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg.* *Australian Journal of Scientific Research Series B-Biological Sciences*, 4 581.

Austin C. R., 1952: *The capacitation of the mammalian sperm.* *Nature*, 170 326-326.

Avilés M.; Abascal I.; MartínezMenarguez J. A.; Castells M. T.; Skalaban S. R.; Ballesta J.; Alhadeff J. A., 1996: *Immunocytochemical localization and biochemical characterization of a novel plasma membrane-associated, neutral pH optimum alpha-L-fucosidase from rat testis and epididymal spermatozoa.* *Biochemical Journal*, 318 821-831.

Avilés M.; Gutiérrez-Adán A.; Coy P., 2010: *Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs?* *Molecular Human Reproduction*, 6 649-660 Pág.

Baba T.; Hoff H. B.; Nemoto H.; Lee H.; Orth J.; Arai Y.; Gerton G. L., 1993: *Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins, and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ-cells.* *Molecular Reproduction and Development*, 34 233-243.

Baba T.; Niida Y.; Michikawa Y.; Kashiwabara S.; Kodaira K.; Takenaka M.; Kohno N.; Gerton G. L.; Arai Y., 1994: *An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding-protein specific for 2 proacrosins and an acrosin intermediate.* *Journal of Biological Chemistry*, 269 10133-10140.

- Baibakov B.; Gauthier L.; Talbot P.; Rankin T. L.; Dean J., 2007: *Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis*. *Development*, 134 933-943.
- Baker M. A.; Nixon B.; Naumovski N.; Aitken R. J., 2012: *Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa*. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58 211-217.
- Ball P. J. H.; Peters A. R., 2004: *Reproduction in Cattle*.
- Banning A.; Florian S.; Deubel S.; Thalmann S.; Muller-Schmehl K.; Jacobasch G.; Brigelius-Flohe R., 2008a: *GPX2 counteracts PGE2 production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells*. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10 1491-1500.
- Banning A.; Kipp A.; Schmitmeier S.; Lowinger M.; Florian S.; Krehl S.; Thalmann S.; Thierbach R.; Steinberg P.; Brigelius-Flohe R., 2008b: *Glutathione peroxidase 2 inhibits cyclooxygenase-2-mediated migration and invasion of HT-29 adenocarcinoma cells but supports their growth as tumors in nude mice*. *Cancer Research*, 68 9746-9753.
- Bauersachs S.; Blum H.; Mallok S.; Wenigerkind H.; Rief S.; Prella K.; Wolf E., 2003: *Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: A transcriptomics approach*. *Biology of Reproduction*, 68 1170-1177.
- Bauersachs S.; Mitko K.; Blum H.; Wolf E., 2007: *Technical note: Bovine oviduct and endometrium array version 1: A tailored tool for studying bovine endometrium biology and pathophysiology*. *Journal of Dairy Science*, 90 4420-4423.
- Bauersachs S.; Rehfeld S.; Ulbrich S. E.; Mallok S.; Prella K.; Wenigerkind H.; Einspanier R.; Blum H.; Wolf E., 2004: *Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 32 449-466.
- Bauersachs S.; Ulbrich S. E.; Gross K.; Schmidt S. E. M.; Meyer H. H. D.; Einspanier R.; Wenigerkind H.; Vermehren M.; Blum H.; Sinowatz F.; Wolf E., 2005: *Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34 889-908.
- Bearer E. L.; Friend D. S., 1990: *Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation*. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 16 281-297.

- Bedford J. M.; Calvin H.; Cooper G. W., 1973: *The maturation of spermatozoa in the human epididymis. Journal of reproduction and fertility. Supplement, 18* 199-213.
- Belleannee C.; Belghazi M.; Labas V.; Teixeira-Gomes A. P.; Gatti J. L.; Dacheux J. L.; Dacheux F., 2011a: *Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. Proteomics, 11* 1952-1964.
- Belleannee C.; Labas V.; Teixeira-Gomes A. P.; Gatti J. L.; Dacheux J. L.; Dacheux F., 2011b: *Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. Journal of Proteomics, 74* 59-78.
- Beltman M. E.; Mullen M. P.; Elia G.; Hilliard M.; Diskin M. G.; Evans A. C.; Crowe M. A., 2014: *Global proteomic characterization of uterine histotroph recovered from beef heifers yielding good quality and degenerate day 7 embryos. Domestic Animal Endocrinology, 46* 49-57.
- Berendt F. J.; Frohlich T.; Schmidt S. E. M.; Reichenbach H. D.; Wolf E.; Arnold G. J., 2005: *Holistic differential analysis of embryo-induced alterations in the proteome of bovine endometrium in the preattachment period. Proteomics, 5* 2551-2560.
- Bleil J. D.; Wassarman P. M., 1983: *Sperm egg interactions in the mouse - sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. Developmental Biology, 95* 317-324.
- Blobel C. P., 2000: *Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. Reviews of Reproduction, 5* 75-83.
- Bohring C.; Krause W., 2003: *Characterization of spermatozoa surface antigens by antisperm antibodies and its influence on acrosomal exocytosis. American Journal of Reproductive Immunology, 50* 411-419.
- Boice M. L.; Geisert R. D.; Blair R. M.; Verhage H. G., 1990: *Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. Biology of Reproduction, 43* 457-465.
- Boilard M.; Reyes-Moreno C.; Lachance C.; Massicotte L.; Bailey J. L.; Sirard M. A.; Leclerc P., 2004: *Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. Biology of Reproduction, 71* 1879-1889.
- Bork K.; Chevrier C.; Paquignon M.; Jouannet P.; Dacheux J. L., 1988: *Flagellar motility and movement of boar spermatozoa during epididymal transit. Reproduction Nutrition Development, 28* 1307-1315.
- Brandt Y.; Lang A.; Rodriguez-Martinez H.; Madej A.; Einarsson S., 2006: *Impact of ACTH during oestrus on the ultrastructure of the spermatozoa and their*

- environment in the tubal reservoir of the postovulatory sow.* Animal Reproduction Science, *93* 231-245.
- Breitbart H.; Cohen G.; Rubinstein S., 2005: *Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction.* Reproduction, *129* 263-268.
- Brenner R.; Slayden O., 1994: Cyclic changes in the primate oviduct and endometrium. Kobil and Neill's *Physiology of Reproduction (Second Edition)*. New York, pp. 541-569.
- Bresson E.; Boucher-Kovalik S.; Chapdelaine P.; Madore E.; Harvey N.; Laberge P. Y.; Leboeuf M.; Fortier M. A., 2011: *The human aldose reductase AKR1B1 qualifies as the primary prostaglandin F synthase in the endometrium.* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, *96* 210-219.
- Buhi W. C., 2002: *Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein.* Reproduction, *123* 355-362.
- Buhi W. C.; Alvarez I. M.; Kouba A. J., 2000: *Secreted proteins of the oviduct.* Cells Tissues Organs, *166* 165-179.
- Buhi W. C.; Alvarez I. M.; Sudhipong V.; Donessmith M. M., 1990: *Identification and characterization of denovo-synthesized porcine oviductal secretory proteins.* Biology of Reproduction, *43* 929-938.
- Busso D.; Goldweic N. M.; Hayashi M.; Kasahara M.; Cuasnicu P. S., 2007: *Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion.* Biology of Reproduction, *76* 701-708.
- Caballero J.; Frenette G.; D'Amours O.; Belleannee C.; Lacroix-Pepin N.; Robert C.; Sullivan R., 2012: *Bovine sperm raft membrane associated Glioma Pathogenesis-Related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida.* Journal of Cellular Physiology, *227* 3876-3886.
- Carmeliet P.; Schoonjans L.; Kieckens L.; Ream B.; Degen J.; Bronson R.; Devos R.; Vandenoord J. J.; Collen D.; Mulligan R. C., 1994: *Physiological consequences of loss of plasminogen-activator gene-function in mice.* Nature, *368* 419-424.
- Carrasco L. C.; Coy P.; Avilés M.; Gadea J.; Romar R., 2008a: *Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle.* Reproduction Fertility and Development, *20* 808-817.
- Carrasco L. C.; Romar R.; Avilés M.; Gadea J.; Coy P., 2008b: *Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle.* Reproduction, *136* 833-842.
- Chabory E.; Damon C.; Lenoir A.; Henry-Berger J.; Vernet P.; Cadet R.; Saez F.; Drevet J. R., 2010: *Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and*

- maintenance of spermatozoa integrity*. Journal of Animal Science, 88 1321-1331.
- Chandonnet L.; Roberts K. D.; Chapdelaine A.; Manjunath P., 1990: *Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma*. Molecular Reproduction and Development, 26 313-318.
- Chang M. C., 1951: *Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes*. Nature, 168 697-698.
- Chen H.; Griffiths G.; Galileo D. S.; Martin-DeLeon P. A., 2006: *Epididymal SPAM1 is a marker for sperm maturation in the mouse*. Biology of Reproduction, 74 923-930.
- Chen S.; Einspanier R.; Schoen J., 2013: *In vitro mimicking of estrous cycle stages in porcine oviduct epithelium cells: estradiol and progesterone regulate differentiation, gene expression, and cellular function*. Biology of Reproduction, 89 12.
- Cherr G. N.; Lambert H.; Meizel S.; Katz D. F., 1986: *Invitro studies of the golden-hamster sperm acrosome reaction - completion on the zona-pellucida and induction by homologous soluble zonae-pellucidae*. Developmental Biology, 114 119-131.
- Cherr G.; Yudin A.; Overstreet J., 2001: *The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling*. Matrix Biology, 20 515-525.
- Chiu P. C. N.; Chung M. K.; Tsang H. Y.; Koistinen R.; Koistinen H.; Seppala M.; Lee K. F.; Yeung W. S. B., 2005: *Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa*. Journal of Biological Chemistry, 280 25580-25589.
- Cho C. H.; Bunch D. O.; Faure J. E.; Goulding E. H.; Eddy E. M.; Primakoff P.; Myles D. G., 1998: *Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta*. Science, 281 1857-1859.
- Chocu S.; Calvel P.; Rolland A. D.; Pineau C., 2012: *Spermatogenesis in mammals: proteomic insights*. Systems Biology in Reproductive Medicine, 58 179-190.
- Clermont Y.; Trott M., 1969: *Duration of cycle of seminiferous epithelium in mouse and hamster determined by means of 3h-thymidine and radioautography*. Fertility and Sterility, 20 805.
- Cohen D. J.; Maldera J. A.; Muñoz M. W.; Ernesto J. I.; Vasen G.; Cuasnicu P. S., 2011: *Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP) and their role in mammalian fertilization*. Biological Research, 44 135-138.

- Comer M. T.; Leese H. J.; Southgate J., 1998: *Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium*. Human Reproduction, 13 3114-3120.
- Cooper T. G., 1998: *Interactions between epididymal secretions and spermatozoa*. Journal of reproduction and fertility. Supplement, 53 119-136.
- Cooper T. G., 2005: *Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing?* Human Reproduction, 20 9-11.
- Cornwall G. A., 2009: *New insights into epididymal biology and function*. Human Reproduction Update, 15 213-227.
- Cowan A. E.; Nakhimovsky L.; Myles D. G.; Koppel D. E., 1997: *Barriers to diffusion of plasma membrane proteins form early during guinea pig spermiogenesis*. Biophysical Journal, 73 507-516.
- Coy P.; Canovas S.; Mondejar I.; Saavedra M. D.; Romar R.; Grullon L.; Matas C.; Avilés M., 2008: *Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105 15809-15814.
- Coy P.; Garcia-Vazquez F. A.; Visconti P. E.; Avilés M., 2012: *Roles of the oviduct in mammalian fertilization*. Reproduction, 144 649-660.
- Cross N. L., 1998: *Role of cholesterol in sperm capacitation*. Biology of Reproduction, 59 7-11.
- Dacheux J. L.; Belleannee C.; Jones R.; Labas V.; Belghazi M.; Guyonnet B.; Druart X.; Gatti J. L.; Dacheux F., 2009: *Mammalian epididymal proteome*. Molecular and Cellular Endocrinology, 306 45-50.
- Dacheux J. L.; Dacheux F., 2014: *New insights into epididymal function in relation to sperm maturation*. Reproduction, 147 R27-R42.
- Dacheux J. L.; O Shea T.; Paquignon M., 1979: *Effects of osmolality, bicarbonate and buffer on the metabolism and motility of testicular, epididymal and ejaculated spermatozoa of boars*. Journal of Reproduction and Fertility, 55 287-296.
- Dacheux J. L.; Voglmayr J. K., 1983: *Sequence of sperm cell-surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis*. Biology of Reproduction, 29 1033-1046.
- D'Ambrosio C.; Arena S.; Talamo F.; Ledda L.; Renzone G.; Ferrara L.; Scaloni A., 2005: *Comparative proteomic analysis of mammalian animal tissues and body fluids: bovine proteome database*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 815 157-168.



- D'Amours O.; Bordeleau L. J.; Frenette G.; Blondin P.; Leclerc P.; Sullivan R., 2012a: *Binder of sperm 1 and epididymal sperm binding protein 1 are associated with different bull sperm subpopulations*. *Reproduction*, 143 759-771.
- D'Amours O.; Frenette G.; Bordeleau L. J.; Allard N.; Leclerc P.; Blondin P.; Sullivan R., 2012b: *Epididymosomes transfer epididymal sperm binding protein 1 (ELSPBP1) to dead spermatozoa during epididymal transit in bovine*. *Biology of Reproduction*, 87 11.
- Davis B. K.; Byrne R.; Hungund B., 1979: *Studies on the mechanism of capacitation .2. evidence for lipid transfer between plasma-membrane of rat sperm and serum-albumin during capacitation invitro*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 558 257-266.
- Day A.; Quilter C.; Sargent C.; Mileham A., 2002: *Characterization of the porcine sperm adhesion molecule gene SPAM1- expression analysis, genomic structure, and chromosomal mapping*. *Animal Genetics*, 33 211-214.
- De Ondiz A., 2011: *Caracterización de las glicosidasas en el espermatozoide y su papel en la fecundación, con especial énfasis en la especie porcina*. Tesis doctoral, Universidad de Murcia.
- De Rooij D. G., 1968: *Stem cell renewal and duration of spermatogonial cycle in the gold hamster*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 89 133-136.
- Demott R. P.; Suarez S. S., 1992: *Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct*. *Biology of Reproduction*, 46 779-785.
- Deng X.; He Y.; Martin-Deleon P., 2000: *Mouse Spam1 (PH-20): evidence for its expression in the epididymis and for a new category of spermatogenic-expressed genes*. *Journal of Andrology*, 21 822-832.
- Desnoyers L.; Manjunath P., 1992: *Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid*. *Journal of Biological Chemistry*, 267 10149-10155.
- DeSouza M.; Murray M., 1995: *An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development*. *Endocrinology*, 136 2485-2496.
- Diez R.; Herbstreith M.; Osorio C.; Alzate O., 2010: Chapter – 4 *2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (DIGE) in Neuroproteomics.*, Boca Raton (FL): CRC Press edn.
- Drevet J. R., 2006: *The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250 70-79.

- Druart X., 2012: *Sperm interaction with the female reproductive tract*. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 348-352.
- Dube C.; Leclerc P.; Baba T.; Reyes-Moreno C.; Bailey J. L., 2005: *The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm*. *Journal of Andrology*, 26 519-528.
- Eddy E. M.; Neill J. D.; Plant T. M.; Pfaff D. W.; Challis J. R. G.; Kretser D. M. d.; Richards J. S.; Wassarman P. M., 2006: Chapter 1 - The Spermatozoon. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*. Academic Press, St Louis, pp. 3-54.
- Ehrenwald E.; Foote R. H.; Parks J. E., 1990: *Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux*. *Molecular Reproduction and Development*, 25 195-204.
- Ellerman D. A.; Myles D. G.; Primakoff P., 2006: *A role for sperm surface protein disulfide isomerase activity in gamete fusion: Evidence for the participation of ERp57*. *Developmental Cell*, 10 831-837.
- Erickson G. F.; Shimasaki S., 2003: *The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1 9.
- Espana F.; Berrettini M.; Griffin J. H., 1989: *Purification and characterization of plasma protein-c inhibitor*. *Thrombosis Research*, 55 369-384.
- Espana F.; Estelles A.; Fernandez P. J.; Gilabert J.; Sanchezcuenca J.; Griffin J. H., 1993: *Evidence for the regulation of urokinase and tissue-type plasminogen activators by the serpin, protein-c inhibitor, in semen and blood-plasma*. *Thrombosis and Haemostasis*, 70 989-994.
- Evans E. A.; Zhang H.; Martin-DeLeon P. A., 2003: *SPAM1 (PH-20) protein and mRNA expression in the epididymides of humans and macaques: utilizing laser microdissection/RT-PCR*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1 54.
- Fabrega A.; Puigmule M.; Dacheux J. L.; Bonet S.; Pinart E., 2012: *Glycocalyx characterisation and glycoprotein expression of Sus domesticus epididymal sperm surface samples*. *Reproduction Fertility and Development*, 24 619-630.
- Fahey J. V.; Schaefer T. M.; Channon J. Y.; Wira C. R., 2005: *Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract*. *Human Reproduction*, 20 1439-1446.
- Fatehi A. N.; van den Hurk R.; Colenbrander B.; Daemen A.; van Tol H. T. A.; Monteiro R. M.; Roelen B. A. J.; Bevers M. M., 2005: *Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development*. *Theriogenology*, 63 872-889.

- Faulkner S.; Elia G.; Mullen M. P.; O'Boyle P.; Dunn M. J.; Morris D., 2012: *A comparison of the bovine uterine and plasma proteome using iTRAQ proteomics*. *Proteomics*, 12 2014-2023.
- Faulkner S.; Elia G.; O'Boyle P.; Dunn M.; Morris D., 2013: *Composition of the bovine uterine proteome is associated with stage of cycle and concentration of systemic progesterone*. *Proteomics*, 13 3333-3353.
- Ferrer M.; Rodriguez H.; Zara L.; Yu Y.; Xu W.; Oko R., 2012: *MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization*. *Cell and Tissue Research*, 349 881-895.
- Ficarro S.; Chertihin O.; Westbrook V. A.; White F.; Jayes F.; Kalab P.; Marto J. A.; Shabanowitz J.; Herr J. C.; Hunt D. F.; Visconti P. E., 2003: *Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm - Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation*. *Journal of Biological Chemistry*, 278 11579-11589.
- Flesch F. M.; Gadella B. M., 2000: *Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes*, 1469 197-235.
- Florian S.; Wingler K.; Schmehl K.; Jacobasch G.; Kreuzer O. J.; Meyerhof W.; Brigelius-Flohe R., 2001: *Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue*. *Free Radical Research*, 35 655-663.
- Florman H. M.; Ducibella T.; Wassarman J. D.; Neill. M.; Plant. W.; Pfaff. R. G.; Challis. M. D.; Kretser. S. Richards. M., 2006: Chapter 2 - Fertilization in Mammals. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction (Third Edition)*. Academic Press, St Louis, pp. 55-112.
- Florman H. M.; Storey B. T., 1982: *Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro*. *Developmental Biology*, 91 121-130.
- Forde N.; Beltman M. E.; Duffy G. B.; Duffy P.; Mehta J. P.; O'Gaora P.; Roche J. F.; Lonergan P.; Crowe M. A., 2011a: *Changes in the Endometrial Transcriptome During the Bovine Estrous Cycle: Effect of Low Circulating Progesterone and Consequences for Conceptus Elongation*. *Biology of Reproduction*, 84 266-278.
- Forde N.; Beltman M. E.; Lonergan P.; Diskin M.; Roche J. F.; Crowe M. A., 2011b: *Oestrous cycles in Bos taurus cattle*. *Animal Reproduction Science*, 124 163-169.

- Forde N.; McGettigan P. A.; Mehta J. P.; O'Hara L.; Mamo S.; Bazer F. W.; Spencer T. E.; Lonergan P., 2014: *Proteomic analysis of uterine fluid during the pre-implantation period of pregnancy in cattle*. *Reproduction*, 147 575-587.
- Forde N.; Mehta J. P.; McGettigan P. A.; Mamo S.; Bazer F. W.; Spencer T. E.; Lonergan P., 2013: *Alterations in expression of endometrial genes coding for proteins secreted into the uterine lumen during conceptus elongation in cattle*. *Bmc Genomics*, 14 13.
- Foster J. A.; Friday B. B.; Maulit M. T.; Blobel C.; Winfrey V. P.; Olson G. E.; Kim K. S.; Gerton G. L., 1997: *AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 272 12714-12722.
- Foster J. A.; Gerton G. L., 1996: *Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family*. *Molecular Reproduction and Development*, 44 221-229.
- Foster J. A.; Klotz K. L.; Flickinger C. J.; Thomas T. S.; Wright R. M.; Castillo J. R.; Herr J. C., 1994: *Human sp-10 - acrosomal distribution, processing, and fate after the acrosome reaction*. *Biology of Reproduction*, 51 1222-1231.
- Franca L. R.; Avelar G. F.; Almeida F. F. L., 2005: *Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs*. *Theriogenology*, 63 300-318.
- Franceschini A.; Szklarczyk D.; Frankild S.; Kuhn M.; Simonovic M.; Roth A.; Lin J. Y.; Minguez P.; Bork P.; von Mering C.; Jensen L. J., 2013: *STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration*. *Nucleic Acids Research*, 41 D808-D815.
- Frenette G.; Girouard J.; D'Amours O.; Allard N.; Tessier L.; Sullivan R., 2010: *Characterization of Two Distinct Populations of Epididymosomes Collected in the Intraluminal Compartment of the Bovine Cauda Epididymis*. *Biology of Reproduction*, 83 473-480.
- Frenette G.; Girouard J.; Sullivan R., 2006: *Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis*. *Biology of Reproduction*, 75 885-890.
- Frenette G.; Lessard C.; Madore E.; Fortier M. A.; Sullivan R., 2003: *Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis*. *Biology of Reproduction*, 69 1586-1592.

- Frenette G.; Lessard C.; Sullivan R., 2002: *Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull*. *Biology of Reproduction*, 67 308-313.
- Frenette G.; Lessard C.; Sullivan R., 2004: *Polyol pathway along the bovine epididymis*. *Molecular Reproduction and Development*, 69 448-456.
- Frenette G.; Sullivan R., 2001: *Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface*. *Molecular Reproduction and Development*, 59 115-121.
- Fujihara Y.; Satouh Y.; Inoue N.; Isotani A.; Ikawa M.; Okabe M., 2012: *SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia*. *Development*, 139 3583-3589.
- Fukami K.; Nakao K.; Inoue T.; Kataoka Y.; Kurokawa M.; Fissore R. A.; Nakamura K.; Katsuki M.; Mikoshiba K.; Yoshida N.; Takenawa T., 2001: *Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction*. *Science*, 292 920-923.
- Gabler C.; Chapman D.; Killian G., 2003: *Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle*. *Reproduction*, 126 721-729.
- Gabler C.; Killian G. J.; Einspanier R., 2001: *Differential expression of extracellular matrix components in the bovine oviduct during the oestrous cycle*. *Reproduction*, 122 121-130.
- Gandolfi F., 1995: *Functions of proteins secreted by oviduct epithelial-cells*. *Microscopy Research and Technique*, 32 1-12.
- Gatti J. L.; Castella S.; Dacheux F.; Ecroyd H.; Metayer S.; Thimon V.; Dacheux J. L., 2004: *Post-testicular sperm environment and fertility*. *Animal Reproduction Science*, 82-3 321-339.
- Gatti J. L.; Druart X.; Guerin Y.; Dacheux F.; Dacheux J. L., 1999: *A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I converting enzyme (ACE); Evidence that sperm are the source of this ACE*. *Biology of Reproduction*, 60 937-945.
- Gatti J. L.; Metayer S.; Belghazi M.; Dacheux F.; Dacheux J. L., 2005: *Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles*. *Biology of Reproduction*, 72 1452-1465.
- Gebhardt S.; Merkl M.; Herbach N.; Wanke R.; Handler J.; Bauersachs S., 2012: *Exploration of global gene expression changes during the estrous cycle in equine endometrium*. *Biology of Reproduction*, 87 13.

- Geiger M.; Huber K.; Wojta J.; Stingl L.; Espana F.; Griffin J. H.; Binder B. R., 1989: *Complex-formation between urokinase and plasma protein-c inhibitor invitro and invivo*. *Blood*, 74 722-728.
- Gerena R. L.; Killian G. J., 1990: *Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous-cycle*. *Journal of Experimental Zoology*, 256 113-120.
- Girouard J.; Frenette G.; Sullivan R., 2009: *Compartmentalization of Proteins in Epididymosomes Coordinates the Association of Epididymal Proteins with the Different Functional Structures of Bovine Spermatozoa*. *Biology of Reproduction*, 80 965-972.
- Girouard J.; Frenette G.; Sullivan R., 2011: *Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis*. *International Journal of Andrology*, 34 E475-E486.
- Gmachl M.; Sagan S.; Kreil G.; Ketter S., 1993: *The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity*. *Febs Letters*, 336 545-548.
- Go K. J.; Wolf D. P., 1985: *Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation*. *Biology of Reproduction*, 32 145-153.
- Gómez E.; Caamano J. N.; Corrales F. J.; Diez C.; Correia-Alvarez E.; Martin D.; Trigal B.; Carrocera S.; Mora M. I.; Pello-Palma J.; Moreno J. F.; Muñoz M., 2013: *Embryonic sex induces differential expression of proteins in bovine uterine fluid*. *Journal of Proteome Research*, 12 1199-1210.
- Gottlieb W.; Meizel S., 1987: *Biochemical-studies of metalloendoprotease activity in the spermatozoa of 3 mammalian-species*. *Journal of Andrology*, 8 14-24.
- Gould S. F.; Bernstein M. H., 1975: *Localization of bovine sperm hyaluronidase*. *Differentiation*, 3 123-132.
- Greube A.; Muller K.; Topfer-Petersen E.; Herrmann A.; Muller P., 2001: *Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes*. *Biochemistry*, 40 8326-8334.
- Griffiths G. S.; Galileo D. S.; Reese K.; Martin-DeLeon P. A., 2008a: *Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model*. *Molecular Reproduction and Development*, 75 1627-1636.
- Griffiths G. S.; Miller K. A.; Galileo D. S.; Martin-DeLeon P. A., 2008b: *Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency*. *Reproduction*, 135 293-301.

- Grigorieva A.; Griffiths G.; Zhang H.; Laverty G.; Shao M.; Taylor L.; Martin-DeLeon P., 2007: *Expression of SPAM1 (PH-20) in the murine kidney is not accompanied by hyaluronidase activity: evidence for potential roles in fluid and water reabsorption*. *Kidney and Blood Pressure Research*, 30 145-155.
- Gualtieri R.; Boni R.; Tosti E.; Zagami M.; Talevi R., 2005: *Intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation during the release of bovine sperm adhering to the fallopian tube epithelium in vitro*. *Reproduction*, 129 51-60.
- Guyonnet B.; Dacheux F.; Dacheux J. L.; Gatti J. L., 2011: *The Epididymal Transcriptome and Proteome Provide Some Insights Into New Epididymal Regulations*. *Journal of Andrology*, 32 651-664.
- Guyonnet B.; Zabet-Moghaddam M.; SanFrancisco S.; Cornwall G. A., 2012: *Isolation and proteomic characterization of the mouse sperm acrosomal matrix*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11 758-774.
- Gwathmey T. M.; Ignatz G. G.; Mueller J. L.; Manjunath P.; Suarez S. S., 2006: *Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct*. *Biology of Reproduction*, 75 501-507.
- Gwathmey T. M.; Ignatz G. G.; Suarez S. S., 2003: *PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir*. *Biology of Reproduction*, 69 809-815.
- Haimov-Kochman R.; Prus D.; Zcharia E.; Goldman-Wohl D. S.; Natanson-Yaron S.; Greenfield C.; Anteby E. Y.; Reich R.; Orly J.; Tsafiriri A.; Hurwitz A.; Vlodavsky I.; Yagel S., 2005: *Spatiotemporal expression of heparanase during human and rodent ovarian folliculogenesis*. *Biology of Reproduction*, 73 20-28.
- Hao J.; Chen M.; Ji S.; Wang X.; Wang Y.; Huang X.; Yang L.; Cui X.; Lv L.; Liu Y.; Gao F., 2014: *Equatorin is not essential for acrosome biogenesis but is required for the acrosome reaction*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444 537-542.
- Hao Z. L.; Wolkowicz M. J.; Shetty J.; Klotz K.; Bolling L.; Sen B.; Westbrook V. A.; Coonrod S.; Flickinger C. J.; Herr J. C., 2002: *SAMP32, a testis-specific, isoantigenic sperm acrosomal membrane-associated protein*. *Biology of Reproduction*, 66 735-744.
- Hardy D. M.; Garbers D. L., 1994: *Species-specific binding of sperm proteins to the extracellular-matrix (zona-pellucida) of the egg*. *Journal of Biological Chemistry*, 269 19000-19004.
- Harrington D. J.; Lessey B. A.; Rai V.; Bergqvist A.; Kennedy S.; Manek S.; Barlow D. H.; Mardon H. J., 1999: *Tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis*. *Journal of Pathology*, 187 242-248.

- Hasuwa H.; Muro Y.; Ikawa M.; Kato N.; Tsujimoto Y.; Okabe M., 2010: *Transgenic mouse sperm that have green acrosome and red mitochondria allow visualization of sperm and their acrosome reaction in vivo*. Experimental Animals, 59 105-107.
- Hawk H. W., 1987: *Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle*. Journal of Dairy Science, 70 1487-1503.
- Hawk H. W.; Conley H. H., 1975: *Involvement of cervix in sperm transport failures in reproductive-tract of ewe*. Biology of Reproduction, 13 322-328.
- He S. P.; Lin Y. L.; Liu Y. X., 1999: *Functionally inactive protein C inhibitor in seminal plasma may be associated with infertility*. Molecular Human Reproduction, 5 513-519.
- Heller C. H.; Clermont Y., 1964: *Kinetics of the germinal epithelium in man*. Recent progress in hormone research, 20 545-575.
- Hermans J. M.; Jones R.; Stone S. R., 1994: *Rapid inhibition of the sperm protease acrosin by protein-c inhibitor*. Biochemistry, 33 5440-5444.
- Hermo L.; Jacks D., 2002: *Nature's ingenuity: Bypassing the classical secretory route via apocrine secretion*. Molecular Reproduction and Development, 63 394-410.
- Herrero J.; Valencia A.; Dopazo J., 2001: *A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns*. Bioinformatics, 17 126-136.
- Hess R. A.; de Franca L. R., 2008: *Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium*. Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, 636 1-15.
- Heydon R. A.; Adams N. R., 1979: *Comparative morphology and mucus histochemistry of the ruminant cervix - differences between crypt and surface epithelium*. Biology of Reproduction, 21 557-562.
- Hinsch K. D.; Hinsch E.; Meinecke B.; Topferpetersen E.; Pfisterer S.; Schill W. B., 1994: *Identification of mouse zp3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic zp3 peptides*. Biology of Reproduction, 51 193-204.
- Hochereau M. T., 1963: *Constance des frequences relatives des etudes du cycle de l'epithelium seminifere chez lez taureau et chez le rat*. Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique, 3 93-102.
- Holt W. V., 1984: *Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon*. International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology, 87 159-194.
- Holt W. V.; Fazeli A., 2010: *The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection*. Molecular Reproduction and Development, 77 934-943.



- Honda A.; Siruntawineti J.; Baba T., 2002: *Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions*. Human Reproduction Update, 8 405-412.
- Howes E.; Pascall J. C.; Engel W.; Jones R., 2001: *Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization*. Journal of Cell Science, 114 4127-4136.
- Hu J.; Chen Y. X.; Wang D.; Qi X. X.; Li T. G.; Hao J.; Mishina Y.; Garbers D. L.; Zhao G. Q., 2004: *Developmental expression and function of Bmp4 in spermatogenesis and in maintaining epididymal integrity*. Developmental Biology, 276 158-171.
- Huang D. H.; Zhang S. W.; Zhao H.; Zhang L., 2011: *The role of C-type natriuretic peptide in rat testes during spermatogenesis*. Asian Journal of Andrology, 13 275-280.
- Huang D. W.; Sherman B. T.; Lempicki R. A., 2009a: *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. Nucleic Acids Research, 37 1-13.
- Huang D. W.; Sherman B. T.; Lempicki R. A., 2009b: *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nature Protocols, 4 44-57.
- Huang H. M.; Acuff C. G.; Steinhilber M. E., 1996: *Isolation, mapping, and regulated expression of the gene encoding mouse C-type natriuretic peptide*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 271 H1565-H1575.
- Huarte J.; Belin D.; Bosco D.; Sappino A. P.; Dominiquevassalli J., 1987: *Plasminogen-activator and mouse spermatozoa - urokinase synthesis in the male genital-tract and binding of the enzyme to the sperm cell-surface*. Journal of Cell Biology, 104 1281-1289.
- Hugentobler S. A.; Humpherson P. G.; Leese H. J.; Sreenan J. M.; Morris D. G., 2008: *Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle*. Molecular Reproduction and Development, 75 496-503.
- Hugentobler S.; Sreenan J.; Humpherson P.; Leese H.; Diskin M.; Morris D., 2010: *Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood*. Reproduction, Fertility and Development, 22 684-694.
- Hung P. H.; Suarez S. S., 2010: *Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct*. Reproduction in Domestic Ruminants, 67 257-266.
- Hunnicut G.; Primakoff P.; Myles D., 1996: *Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is*

- required in secondary sperm-zona binding.* Biology of Reproduction, 55 80-86.
- Hunter R. H. F., 1998: *Have the Fallopian tubes a vital rôle in promoting fertility?* Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, 77 475-486.
- Hunter R. H. F., 1973: *Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa.* Journal of Experimental Zoology, 183 57-63.
- Hunter R. H. F., 1981: *Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation.* Journal of Reproduction and Fertility, 63 109-117.
- Hunter R. H. F., 2005: *The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity?* Reproduction Nutrition Development, 45 281-290.
- Hunter R. H. F., 2012: *Components of oviduct physiology in eutherian mammals.* Biological Reviews, 87 244-255.
- Hunter R. H. F.; Leglise P. C., 1971: *Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to role of isthmus.* Journal of Reproduction and Fertility, 24 233.
- Hunter R. H. F.; Nichol R., 1983: *Transport of spermatozoa in the sheep oviduct - preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus.* Journal of Experimental Zoology, 228 121-128.
- Hunter R. H. F.; Rodriguez-Martinez H., 2004: *Capacitation of mammalian spermatozoa in vivo, with a specific focus on events in the fallopian tubes.* Molecular Reproduction and Development, 67 243-250.
- Hunter R. H. F.; Wilmut I., 1983: *The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows.* Animal Reproduction Science, 5 167-173.
- Hunter R. H. F.; Wilmut I., 1984: *Sperm transport in the cow - peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct.* Reproduction Nutrition Development, 24 597-608.
- Huo R.; Zhu Y. F.; Ma X.; Lin M.; Zhou Z. M.; Sha J. H., 2004: *Differential expression of glucose-regulated protein 78 during spermatogenesis.* Cell and Tissue Research, 316 359-367.
- Ignotz G.; Cho M.; Suarez S., 2007: *Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir.* Biology of Reproduction, 77 906-913.
- Ignotz G.; Lo M.; Perez C.; Gwathmey T.; Suarez S., 2001: *Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible*

- for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, 64 1806-1811.
- Ijiri T. W.; Merdiushev T.; Cao W. L.; Gerton G. L., 2011: *Identification and validation of mouse sperm proteins correlated with epididymal maturation*. *Proteomics*, 11 4047-4062.
- Ikawa M.; Inoue N.; Benham A. M.; Okabe M., 2010: *Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte*. *Journal of Clinical Investigation*, 120 984-994.
- Ikawa M.; Nakanishi T.; Yamada S.; Wada I.; Kominami K.; Tanaka H.; Nozaki M.; Nishimune Y.; Okabe M., 2001: *Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility*. *Developmental Biology*, 240 254-261.
- Ikawa M.; Tokuhiko K.; Yamaguchi R.; Benham A. M.; Tamura T.; Wada I.; Satouh Y.; Inoue N.; Okabe M., 2011: *Calsperin Is a Testis-specific Chaperone Required for Sperm Fertility*. *Journal of Biological Chemistry*, 286 5639-5646.
- Inoue N.; Ikawa M.; Isotani A.; Okabe M., 2005: *The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs*. *Nature*, 434 234-238.
- Inoue N.; Satouh Y.; Ikawa M.; Okabe M.; Yanagimachi R., 2011: *Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 20008-20011.
- Jackson V.; Chalkley R., 1974: *Binding of estradiol-17beta to bovine endometrial nuclear-membrane*. *Journal of Biological Chemistry*, 249 1615-1626.
- Jaiswal M. K.; Mallers T. M.; Larsen B.; Kwak-Kim J.; Chaouat G.; Gilman-Sachs A.; Beaman K. D., 2012: *V-ATPase upregulation during early pregnancy: a possible link to establishment of an inflammatory response during preimplantation period of pregnancy*. *Reproduction*, 143 713-725.
- Jin M.; Fujiwara E.; Kakiuchi Y.; Okabe M.; Satouh Y.; Baba S. A.; Chiba K.; Hirohashi N., 2011: *Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 4892-4896.
- Joshi C. S.; Suryawanshi A. R.; Khan S. A.; Balasinor N. H.; Khole V. V., 2013: *Liprin alpha 3: a putative estrogen regulated acrosomal protein*. *Histochemistry and Cell Biology*, 139 535-548.
- Kaji K.; Oda S.; Shikano T.; Ohnuki T.; Uematsu Y.; Sakagami J.; Tada N.; Miyazaki S.; Kudo A., 2000: *The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice*. *Nature Genetics*, 24 279-282.

- Kapelnikov A.; Zelinger E.; Gottlieb Y.; Rhissorakrai K.; Gunsalus K. C.; Heifetz Y., 2008: *Mating induces an immune response and developmental switch in the Drosophila oviduct*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105 13912-13917.
- Katz D. F.; Slade D. A.; Nakajima S. T., 1997: *Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability*. Advances in Contraception, 13 143-151.
- Kawano N.; Araki N.; Yoshida K.; Hibino T.; Ohnami N.; Makino M.; Kanai S.; Hasuwa H.; Yoshida M.; Miyado K.; Umezawa A., 2014: *Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111 4145-4150.
- Kawano N.; Kang W. J.; Yamashita M.; Koga Y.; Yamazaki T.; Hata T.; Miyado K.; Baba T., 2010: *Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile in vitro*. Biology of Reproduction, 83 359-369.
- Kerr J. B.; Loveland K. L.; O'Bryan M. K.; de Kretser D. M.; Neill J. D.; Plant T. M.; Pfaff D. W.; Challis J. R. G.; Kretser D. M. d.; Richards J. S.; Wassarman P. M., 2006: Chapter 18 - Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction (Third Edition)*. Academic Press, St Louis, pp. 827-947.
- Killian G. J., 2004: *Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development*. Animal Reproduction Science, 82-3 141-153.
- Killian G. J.; Chapman D. A.; Kavanaugh J. F.; Deaver D. R.; Wiggin H. B., 1989: *Changes in phospholipids, cholesterol and protein-content of oviduct fluid of cows during the estrous-cycle*. Journal of Reproduction and Fertility, 86 419-426.
- Kim K. S.; Cha M. C.; Gerton G. L., 2001: *Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix*. Biology of Reproduction, 64 36-43.
- Kim K. S.; Foster J. A.; Kvasnicka K. W.; Gerton G. L., 2011: *Transitional states of acrosomal exocytosis and proteolytic processing of the acrosomal matrix in guinea pig sperm*. Molecular Reproduction and Development, 78 930-941.
- Kirchhoff C., 1996: *CD52 is the 'major maturation-associated' sperm membrane antigen*. Molecular human reproduction, 2 9-17.
- Kobayashi T.; Kaneko T.; Iuchi Y.; Matsuki S.; Takahashi M.; Sasagawa I.; Nakada T.; Fujii J., 2002: *Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats*. Journal of Andrology, 23 674-683.

- Kohno N.; Yamagata K.; Yamada S.; Kashiwabara S.; Sakai Y.; Baba T., 1998: *Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm acrosome*. Biochemical and Biophysical Research Communications, *245* 658-665.
- König H. E.; Liebich H. G., 2004: *Veterinary anatomy of domestic mammals: textbook and colour atlas*.
- Krapf D.; Ruan Y. C.; Wertheimer E. V.; Battistone M. A.; Pawlak J. B.; Sanjay A.; Pilder S. H.; Cuasnicu P.; Breton S.; Visconti P. E., 2012: *cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit*. Developmental Biology, *369* 43-53.
- Kumamoto K.; Yang X. Z.; Hasegawa A.; Komori S.; Koyama K., 2009: *CD52 expression is induced in the mouse uterus at the time of embryo implantation*. Journal of Reproductive Immunology, *82* 32-39.
- Kumar S.; Tomar A. K.; Singh S.; Gill K.; Dey S.; Yadav S., 2014: *Heparin binding carboxypeptidase E protein exhibits antibacterial activity in human semen*. International Journal of Biological Macromolecules, *64* 319-327.
- Kumar V.; Yadav V. K.; Hassan M. I.; Singh A. K.; Dey S.; Singh S.; Singh T. P.; Yadav S., 2012: *Kinetic and Structural Studies on the Interactions of Heparin and Proteins of Human Seminal Plasma using Surface Plasmon Resonance*. Protein and Peptide Letters, *19* 795-803.
- Kwon W. S.; Rahman M. S.; Lee J. S.; Kim J.; Yoon S. J.; Park Y. J.; You Y. A.; Hwang S. S.; Pang M. G., 2014: *A comprehensive proteomic approach to identifying capacitation related proteins in boar spermatozoa*. BMC Genomics, *15* 12.
- Lachance C.; Bailey J. L.; Leclerc P., 2007: *Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions*. Human Reproduction, *22* 2606-2614.
- Lachance C.; Fortier M.; Thimon V.; Sullivan R.; Bailey J. L.; Leclerc P., 2010: *Localization of Hsp60 and Grp78 in the human testis, epididymis and mature spermatozoa*. International Journal of Andrology, *33* 33-44.
- Lalancette C.; Dorval V.; Leblanc V.; Leclerc P., 2001: *Characterization of an 80-kilodalton bull sperm protein identified as PH-20*. Biology of Reproduction, *65* 628-636.
- Lapointe J. R.; Kimmins S.; MacLaren L. A.; Bilodeau J. F., 2005: *Estrogen selectively up-regulates the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the oviducts*. Endocrinology, *146* 2583-2592.
- Lapointe J.; Bilodeau J. F., 2003: *Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle*. Biology of Reproduction, *68* 1157-1164.

- Lapointe S.; Legare C.; Gaudreault C.; Sullivan R.; Sirard M. A., 1998: *cDNA sequence and deduced amino acid sequence of bovine oviductal fluid catalase*. Molecular Reproduction and Development, 51 265-273.
- Larose J.; Laflamme J.; Cote I.; Lapointe J.; Frenette G.; Sullivan R.; Bilodeau J. F., 2012: *The polyol pathway in the bovine oviduct*. Molecular Reproduction and Development, 79 603-612.
- Lathrop W. F.; Carmichael E. P.; Myles D. G.; Primakoff P., 1990: *cDNA cloning reveals the molecular-structure of a sperm surface protein, ph-20, involved in sperm egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals*. Journal of Cell Biology, 111 2939-2949.
- Laurell M.; Christensson A.; Abrahamsson P. A.; Stenflo J.; Lilja H., 1992: *Protein-C inhibitor in human-body fluids - seminal plasma is rich in inhibitor antigen deriving from cells throughout the male reproductive-system*. Journal of Clinical Investigation, 89 1094-1101.
- Lavery K.; Way A.; Killian G., 2003: *Identification and immunohistochemical localization of a haptoglobin-like protein in the tissues and fluids of the bovine (Bos taurus) ovary and oviduct*. Reproduction, 125 837-846.
- Le Naour F.; Rubinstein E.; Jasmin C.; Prenant M.; Boucheix C., 2000: *Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice*. Science, 287 319-321.
- Ledgard A. M.; Lee R. S. F.; Peterson A. J., 2009: *Bovine Endometrial Legumain and TIMP-2 Regulation in Response to Presence of a Conceptus*. Molecular Reproduction and Development, 76 65-74.
- Leese H. J., 1988: *The formation and function of oviduct fluid*. Journal of Reproduction and Fertility, 82 843-856.
- Leese H. J.; Hugentobler S. A.; Gray S. M.; Morris D. G.; Sturmey R. G.; Whitemar S. L.; Sreenan J. M., 2008: *Female reproductive tract fluids: Composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease*. Reproduction Fertility and Development, 20 1-8.
- Leese H.; Tay J.; Reischl J.; Downing S., 2001: *Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium*. Reproduction, 121 339-346.
- Lefebvre R.; Lo M. C.; Suarez S. S., 1997: *Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition*. Biology of Reproduction, 56 1198-1204.
- Li H. Y.; Zhang H., 2013: *Proteome analysis for profiling infertility markers in male mouse sperm after carbon ion radiation*. Toxicology, 306 85-92.

- Li J. J.; Bickel P. J.; Biggin M. D., 2014: *System wide analyses have underestimated protein abundances and the importance of transcription in mammals*. Peerj, 2 26.
- Li J. Y.; Huan Y. J.; Xie B. T.; Wang J. Q.; Zhao Y. H.; Jiao M. X.; Huang T. Q.; Kong Q. R.; Liu Z. H., 2014: *Identification and characterization of an oocyte factor required for sperm decondensation in pig*. Reproduction, 148 367-375.
- Lim L. H. K.; Pervaiz S., 2007: *Annexin 1: the new face of an old molecule*. FASEB Journal, 21 968-975.
- Lin P. F.; Lan X. L.; Chen F. L.; Yang Y. Z.; Jin Y. P.; Wang A. H., 2013: *Reference gene selection for real-time quantitative PCR analysis of the mouse uterus in the peri-implantation period*. Plos One, 8 8.
- Lin P.; Chen F.; Yang Y.; Song Y.; Li X.; Lan X.; Jin Y.; Wang A., 2012: *GRP78 expression and immunohistochemical localization in the female reproductive tract of mice*. Theriogenology, 78 1824-1829.
- Lin Y. N.; Roy A.; Yan W.; Burns K. H.; Matzuk M. A., 2007: *Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis*. Molecular and Cellular Biology, 27 6794-6805.
- Lin Y.; Kimmel L. H.; Myles D. G.; Primakoff P., 1993: *Molecular-cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 10071-10075.
- Lin Y.; Mahan K.; Lathrop W. F.; Myles D. G.; Primakoff P., 1994: *A hyaluronidase activity of the sperm plasma-membrane protein ph-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg*. Journal of Cell Biology, 125 1157-1163.
- Lombard L.; Morgan B. B.; McNutt S. H., 1950: *The morphology of the oviduct of virgin heifers in relation to the estrous cycle*. Journal of Morphology, 86 1-23.
- Lopez C. I.; Pelletan L. E.; Suhaiman L.; De Bias G. A.; Vitale N.; Mayorga L. S.; Belmonte S. A., 2012: *Diacylglycerol stimulates acrosomal exocytosis by feeding into a PKC- and PLD1-dependent positive loop that continuously supplies phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 1821 1186-1199.
- Lovell J. E.; Getty R., 1968: *Fate of semen in uterus of sow - histologic study of endometrium during 27 hours after natural service*. American Journal of Veterinary Research, 29 609.
- Lu P.; Vogel C.; Wang R.; Yao X.; Marcotte E. M., 2007: *Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation*. Nature Biotechnology, 25 117-124.

- Lum L.; Blobel C. P., 1997: *Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin*. *Developmental Biology*, 191 131-145.
- Luo S. Z.; Mao C. H.; Lee B.; Lee A. S., 2006: *GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development*. *Molecular and Cellular Biology*, 26 5688-5697.
- Lv L. X.; Ujisinguleng B.; Orhontana B.; Lian W. B.; Xing W. J., 2011: *Molecular cloning of sheep and cashmere goat Pdia3 and localization in sheep testis*. *Reproduction in Domestic Animals*, 46 980-989.
- Mack S.; Bhattacharyya A. K.; Joyce C.; Vandervan H.; Zaneveld L. J. D., 1983: *Acrosomal enzymes of human-spermatozoa before and after invitro capacitation*. *Biology of Reproduction*, 28 1032-1042.
- Madore E.; Harvey N.; Parent J.; Chapdelaine P.; Arosh J. A.; Fortier M. A., 2003: *An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin F2 alpha in the bovine endometrium*. *Journal of Biological Chemistry*, 278 11205-11212.
- Majumder G. C.; Turkingt.Rw, 1974: *Acrosomal and lysosomal isoenzymes of beta-galactosidase and n-acetyl-beta-glucosaminidase in rat testis*. *Biochemistry*, 13 2857-2864.
- Malcher A.; Rozwadowska N.; Stokowy T.; Kolanowski T.; Jedrzejczak P.; Zietkowiak W.; Kurpisz M., 2013: *Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis*. *Fertility and Sterility*, 100 1686.
- Mamo S.; Carter F.; Lonergan P.; Leal C. L. V.; Al Naib A.; McGettigan P.; Mehta J. P.; Evans A. C. O.; Fair T., 2011: *Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation*. *Bmc Genomics*, 12 14.
- Manaskova-Postlerova P.; Davidova N.; Jonakova V., 2011: *Biochemical and binding characteristics of boar epididymal fluid proteins*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879 100-106.
- Mandal A.; Klotz K. L.; Shetty J.; Jayes F. L.; Wolkowicz M. J.; Bolling L. C.; Coonrod S. A.; Black M. B.; Diekman A. B.; Haystead T. A. J.; Flickinger C. J.; Herr J. C., 2003: *SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa*. *Biology of Reproduction*, 68 1525-1537.
- Manjunath P.; Sairam M., 1987: *Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma*. *Biochem J*, 241 685-692.



- Manjunath P.; Soubeyrand S.; Chandonnet L.; Roberts K. D., 1994: *Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase a(2)*. *Biochemical Journal*, 303 121-128.
- Manjunath P.; Therien I., 2002: *Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation*. *Journal of Reproductive Immunology*, 53 109-119.
- Mann T.; Lutwak-Mann C., 1981: *Biochemistry of Spermatozoa: Chemical and Functional Correlations in Ejaculated Semen, Andrological Aspect. Male Reproductive Function and Semen*. Springer London, pp. 195-268.
- Mao H. T.; Yang W. X., 2013: *Modes of acrosin functioning during fertilization*. *Genetics and Heredity*, 526 75-79.
- Marin-Briggiler C. I.; Gonzalez-Echeverria M. F.; Munuce M. J.; Ghersevich S.; Caille A. M.; Hellman U.; Corrigall V. M.; Vazquez-Levin M. H., 2010: *Glucose-regulated protein 78 (Grp78/BiP) is secreted by human oviduct epithelial cells and the recombinant protein modulates sperm zona pellucida binding*. *Fertility and Sterility*, 93 1574-1584.
- Marquez B.; Suarez S. S., 2007: *Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx*. *Biology of Reproduction*, 76 660-665.
- Martin-DeLeon P. A., 2006: *Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250 114-121.
- Martin-DeLeon P. A., 2011: *Germ-cell hyaluronidases: their roles in sperm function*. *International Journal of Andrology*, 34 306-318.
- Maselli J.; Hales B. F.; Robaire B., 2014: *Paternal exposure to testis cancer chemotherapeutics alters sperm fertilizing capacity and affects gene expression in the eight-cell stage rat embryo*. *Andrology*, 2 259-266.
- Mattner P. E., 1968: *Distribution of spermatozoa and leucocytes in female genital tract in goats and cattle*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17 253.
- McDonald J. K.; Kadkhodayan S., 1988: *Cathepsin I - a latent proteinase in guinea-pig sperm*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151 827-835.
- McEntee K., 1990: Chapter 7 - The Uterus: Anatomy. *Reproductive pathology of domestic mammals*. Academic Press, San Diego, pp. 110-117.
- McGee E.; Spears N.; Minami S.; Hsu S. Y.; Chun S. Y.; Billig H.; Hsueh A. J. W., 1997: *Preantral ovarian follicles in serum-free culture: Suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone*. *Endocrinology*, 138 2417-2424.

- McRae A. C., 1988: *The blood-uterine lumen barrier and exchange between extracellular fluids*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82 857-873.
- Meikle A.; Sahlin L.; Ferraris A.; Masironi B.; Blanc J. E.; Rodriguez-Irazaqui M.; Rodriguez-Pinon M.; Kindahl H.; Forsberg M., 2001: *Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor alpha, progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle*. *Animal Reproduction Science*, 68 45-56.
- Merkl M.; Ulbrich S. E.; Otzdorff C.; Herbach N.; Wanke R.; Wolf E.; Handler J.; Bauersachs S., 2010: *Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy*. *Biology of Reproduction*, 83 874-886.
- Meyers S. A.; Rosenberger A.; Orpneck K., 2000: *Localization and cellular distribution of a unique hyaluronidase in stallion spermatozoa during epididymidal transit*. *Journal of reproduction and fertility*. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement, 79-86.
- Michaut M.; De Blas G.; Tomes C. N.; Yunes R.; Fukuda M.; Mayorga L. S., 2001: *Synaptotagmin VI participates in the acrosome reaction of human spermatozoa*. *Developmental Biology*, 235 521-529.
- Middendorff R.; Davidoff M. S.; Behrends S.; Mewe M.; Miethens A.; Muller D., 2000: *Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function*. *Andrologia*, 32 55-59.
- Middendorff R.; Muller D.; Paust H. J.; Holstein A. F.; Davidoff M. S., 1997: *New aspects of Leydig cell function*. *Fate of the Male Germ Cell*, 424 125-138.
- Miller D. J.; Gong X.; Shur B. D., 1993: *Sperm require beta-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida*. *Development*, 118 1279-1289.
- Miller D. J.; Winer M. A.; Ax R. L., 1990: *Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin*. *Biology of Reproduction*, 42 899-915.
- Miller D.; Brough S.; Alharbi O., 1992: *Characterization and cellular-distribution of human spermatozoal heat-shock proteins*. *Human Reproduction*, 7 637-645.
- Mitchell J. R.; Senger P. L.; Rosenberger J. L., 1985: *Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital-tract*. *Journal of Animal Science*, 61 956-967.
- Mitko K.; Ulbrich S. E.; Wenigerkind H.; Sinowatz F.; Blum H.; Wolf E.; Bauersachs S., 2008: *Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle*. *Reproduction*, 135 225-240.

- Miyado K.; Yamada G.; Yamada S.; Hasuwa H.; Nakamura Y.; Ryu F.; Suzuki K.; Kosai K.; Inoue K.; Ogura A.; Okabe M.; Mekada E., 2000: *Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization*. *Science*, 287 321-324.
- Mondejar I.; Acuña O. S.; Izquierdo-Rico M. J.; Coy P.; Avilés M., 2012: *The oviduct: functional genomic and proteomic approach*. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 22-29.
- Mooney J. K.; Horan A. H.; Lattimer J. K., 1972: *Motility of spermatozoa in human epididymis*. *Journal of Urology*, 108 443.
- Moore A.; Penfold L. M.; Johnson J. L.; Latchman D. S.; Moore H. D. M., 1993: *Human sperm egg binding is inhibited by peptides corresponding to core region of an acrosomal serine protease inhibitor*. *Molecular Reproduction and Development*, 34 280-291.
- Morales C. R.; Badran H.; El-Alfy M.; Men H.; Zhang H.; Martin-DeLeon P. A., 2004: *Cytoplasmic localization during testicular biogenesis of the murine mRNA for Spam1 (PH-20), a protein involved in acrosomal exocytosis*. *Molecular Reproduction and Development*, 69 475-482.
- Morin G.; Lalancette C.; Sullivan R.; Leclerc P., 2005: *Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit*. *Molecular Reproduction and Development*, 71 523-534.
- Morin G.; Sullivan R.; Laflamme I.; Robert C.; Leclerc P., 2010: *SPAM1 isoforms from two tissue origins are differentially localized within ejaculated bull sperm membranes and have different roles during fertilization*. *Biology of Reproduction*, 82 271-281.
- Muglia U.; Abbate F.; Correr S.; Germanà G.; Motta P., 1997: *The architecture of the myosalpinx in the sow as revealed by scanning electron microscopy*. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 74 93-98.
- Muñoz M. W.; Ernesto J. I.; Bluguermann C.; Busso D.; Battistone M. A.; Cohen D. J.; Cuasnicu P. S., 2012b: *Evaluation of testicular sperm crisp2 as a potential target for contraception*. *Journal of Andrology*, 33 1360-1370.
- Muñoz M.; Corrales F. J.; Caamano J. N.; Diez C.; Trigal B.; Mora M. I.; Martin D.; Carrocera S.; Gómez E., 2012a: *Proteome of the early embryo-maternal dialogue in the cattle uterus*. *Journal of Proteome Research*, 11 751-766.
- Murdoch R. N.; White I. G., 1968: *Studies of metabolism of human spermatozoa*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 16 351.
- Murray M. K., 1995: *Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological-changes in secretory status and cell height*. *Biology of Reproduction*, 53 653-663.

- Myles D.; Primakoff P., 1984: *Localized surface antigens of guinea pig sperm migrate to new regions prior to fertilization*. The Journal of Cell Biology, 99 1634-1641.
- Naaby-Hansen S.; Herr J. C., 2010: *Heat shock proteins on the human sperm surface*. Journal of Reproductive Immunology, 84 32-40.
- Nagdas S. K.; Buchanan T.; Raychoudhury S., 2014: *Identification of peroxiredoxin-5 in bovine cauda epididymal sperm*. Molecular and Cellular Biochemistry, 387 113-121.
- Nahar A.; Kadokawa H., 2014: *Suppressed expression of macrophage migration inhibitory factor in the oviducts of lean and obese cows*. Animal Reproduction Science, 139 1-8
- Nakanishi T.; Ikawa M.; Yamada S.; Parvinen M.; Baba T.; Nishimune Y.; Okabe M., 1999: *Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein*. Febs Letters, 449 277-283.
- Nakanishi T.; Ikawa M.; Yamada S.; Toshimori K.; Okabe M., 2001: *Alkalinization of acrosome measured by GFP as a pH indicator and its relation to sperm capacitation*. Developmental Biology, 237 222-231.
- Nauc V.; Manjunath P., 2000: *Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm*. Biology of Reproduction, 63 1058-1066.
- Naz R. K.; Rajesh P. B., 2004: *Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction*. Reproductive biology and endocrinology, 2 75.
- Nikolajczyk B. S.; O'Rand M. G., 1992: *Characterization of rabbit testis beta-galactosidase and arylsulfatase A: purification and localization in spermatozoa during the acrosome reaction*. Biology Reproduction, 46 366-378.
- Nimlamool W.; Bean B. S.; Lowe-Krentz L. J., 2013: *Human sperm CRISP2 is released from the acrosome during the acrosome reaction and re-associates at the equatorial segment*. Molecular Reproduction and Development, 80 488-502.
- Nishimura H.; Kim E.; Nakanishi T.; Baba T., 2004: *Possible function of the ADAM1a/ADAM2 fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface*. Journal of Biological Chemistry, 279 34957-34962.
- Nixon B.; Aitken R. J.; McLaughlin E. A., 2007: *New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction*. Cellular and Molecular Life Sciences, 64 1805-1823.

- Noland T. D.; Friday B. B.; Maulit M. T.; Gerton G. L., 1994: *The sperm acrosomal matrix contains a novel member of the pentaxin family of calcium-dependent binding-proteins*. Journal of Biological Chemistry, 269 32607-32614.
- Novak S.; Treacy B. K.; Almeida F.; Mao J.; Buhi W. C.; Dixon W. T.; Foxcroft G. R., 2002: *Regulation of IGF-I and porcine oviductal secretory protein (pOSP) secretion into the pig oviduct in the peri-ovulatory period, and effects of previous nutrition*. Reproduction Nutrition Development, 42 355-372.
- O'Donnell L.; Robertson K. M.; Jones M. E.; Simpson E. R., 2001: *Estrogen and spermatogenesis*. Endocrine Reviews, 22 289-318.
- O'Flaherty C.; de Lamirande E.; Gagnon C., 2006: *Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events*. Free Radical Biology and Medicine, 41 528-540.
- Oh J.; Woo J. M.; Choi E. Y.; Kim T.; Cho B. N.; Park Z. Y.; Kim Y. C.; Kim D. H.; Cho C. H., 2005: *Molecular, biochemical, and cellular characterization of epididymal ADAMS, ADAM7 and ADAM28*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 331 1374-1383.
- Ohmura K.; Kohno N.; Kobayashi Y.; Yamagata R.; Sato S.; Kashiwabara S.; Baba T., 1999: *A homologue of pancreatic trypsin is localized in the acrosome of mammalian sperm and is released during acrosome reaction*. Journal of Biological Chemistry, 274 29426-29432.
- Okabe M., 2014: *Mechanism of Fertilization: A Modern View*. Experimental Animals, 63 357-365.
- Olson G. E.; Winfrey V. P.; Bi M.; Hardy D. M.; NagDas S. K., 2004: *Zonadhesin assembly into the hamster sperm acrosomal matrix occurs by distinct targeting strategies during spermiogenesis and maturation in the epididymis*. Biology of Reproduction, 71 1128-1134.
- Orimoto A. M.; Dumaresq-Doiron K.; Jiang J. Y.; Tanphaichitr N.; Tsang B. K.; Carmona E., 2008: *Mammalian hyaluronidase induces ovarian granulosa cell apoptosis and is involved in follicular atresia*. Endocrinology, 149 5835-5847.
- Ota K.; Jaiswal M. K.; Ramu S.; Jeyendran R.; Kwak-Kim J.; Gilman-Sachs A.; Beaman K. D., 2013: *Expression of a2 vacuolar ATPase in spermatozoa is associated with semen quality and chemokine-cytokine profiles in infertile men*. Plos One, 8 7.
- Panicker G.; Ye Y.; Wang D.; Unger E. R., 2010: *Characterization of the Human Cervical Mucous Proteome*. Clinical Proteomics, 6 18-28.
- Park K.; Jeon S.; Song Y. J.; Yi L. S. H., 2012: *Proteomic analysis of boar spermatozoa and quantity changes of superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase, and*

- peroxiredoxin 5 during epididymal maturation*. *Animal Reproduction Science*, 135 53-61.
- Park Y. J.; Kim J.; You Y. A.; Pang M. G., 2013: *Proteomic revolution to improve tools for evaluating male fertility in animals*. *Journal of Proteome Research*, 12 4738-4747.
- Parrish J. J., 2014: *Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin*. *Theriogenology*, 81 67-73.
- Parrish J. J.; Susko-Parrish J. L.; Graham J. K., 1999: *In vitro capacitation of bovine spermatozoa: Role of intracellular calcium*. *Theriogenology*, 51 461-472.
- Parrish J. J.; Suskoparrish J. L.; Handrow R. R.; Sims M. M.; First N. L., 1989: *Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid*. *Biology of Reproduction*, 40 1020-1025.
- Parrish J. J.; Suskoparrish J. L.; Uguz C.; First N. L., 1994: *Differences in the role of cyclic adenosine-3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid*. *Biology of Reproduction*, 51 1099-1108.
- Patrat C.; Serres C.; Jouannet P., 2000: *The acrosome reaction in human spermatozoa*. *Biology of the Cell*, 92 255-266.
- Pesch S.; Bergmann M., 2006: *Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation*. *Micron*, 37 597-612.
- Petit F. M.; Serres C.; Bourgeon F.; Pineau C.; Auer J., 2013: *Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding*. *Human Reproduction*, 28 852-865.
- Phelps B. M.; Koppel D. E.; Primakoff P.; Myles D. G., 1990: *Evidence that proteolysis of the surface is an initial step in the mechanism of formation of sperm cell-surface domains*. *Journal of Cell Biology*, 111 1839-1847.
- Phelps B.; Myles D., 1987: *The guinea pig sperm plasma membrane protein, PH-20, reaches the surface via two transport pathways and becomes localized to a domain after an initial uniform distribution*. *Developmental Biology*, 123 63-72.
- Pholpramool C.; Zupp J. L.; Setchell B. P., 1985: *Motility of undiluted bull epididymal spermatozoa collected by micropuncture*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75 413-420.
- Pierson R. A.; Ginther O. J., 1987: *Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous-cycle*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190 995-1001.

- Pilch B.; Mann M., 2006: *Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma*. *Genome Biology*, 7 10.
- Pluta K.; Irwin J. A.; Dolphin C.; Richardson L.; Fitzpatrick E.; Gallagher M. E.; Reid C. J.; Crowe M. A.; Roche J. F.; Lonergan P.; Carrington S. D.; Evans A. C. O., 2011: *Glycoproteins and glycosidases of the cervix during the periestrous period in cattle*. *Journal of Animal Science*, 89 4032-4042.
- Pluta K.; McGettigan P. A.; Reid C. J.; Browne J. A.; Irwin J. A.; Tharmalingam T.; Corfield A.; Baird A.; Loftus B. J.; Evans A. C. O.; Carrington S. D., 2012: *Molecular aspects of mucin biosynthesis and mucus formation in the bovine cervix during the periestrous period*. *Physiological Genomics*, 44 1165-1178.
- Polakoski K. L.; Parrish R. F., 1977: *Boar proacrosin - purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm*. *Journal of Biological Chemistry*, 252 1888-1894.
- Pollard J. W.; Plante C.; King W. A.; Hansen P. J.; Betteridge K. J.; Suarez S. S., 1991: *Fertilizing-capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial-cells*. *Biology of Reproduction*, 44 102-107.
- Primakoff P.; Hyatt H.; Myles D. G., 1985: *A role for the migrating sperm surface-antigen PH-20 in guinea-pig sperm binding to the egg zona pellucida*. *Journal of Cell Biology*, 101 2239-2244.
- Puglisi R.; Cambuli C.; Capoferri R.; Giannino L.; Lukaj A.; Duchi R.; Lazzari G.; Galli C.; Feligini M.; Galli A.; Bongioni G., 2013: *Differential gene expression in cumulus oocyte complexes collected by ovum pick up from repeat breeder and normally fertile Holstein Friesian heifers*. *Animal Reproduction Science*, 141 26-33.
- Puglisi R.; Tramer F.; Carlomagno G.; Gandini L.; Panfili E.; Stefanini M.; Lenzi A.; Mangia F.; Boitani C., 2005: *PHGPx in spermatogenesis: how many functions?* *Contraception*, 72 291-293.
- Pursel V. G.; Schulman L. L.; Johnson L. A., 1978: *Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in reproductive-tract of gilts after artificial-insemination*. *Biology of Reproduction*, 19 69-76.
- Raheem K. A.; Marei W. F.; Mifsud K.; Khalid M.; Wathes D. C.; Fouladi-Nashta A. A., 2013: *Regulation of the hyaluronan system in ovine endometrium by ovarian steroids*. *Reproduction*, 145 491-504.
- Rath D.; Schuberth H. J.; Coy P.; Taylor U., 2008: *Sperm Interactions from Insemination to Fertilization*. *Reproduction in Domestic Animals*, 43 2-11.
- Rattanachaiyanont M.; Weerachayanukul W.; Leveille M. C.; Taylor T.; D'Amours D.; Rivers D.; Leader A.; Tanphaichitr N., 2001: *Anti-SLIP1-reactive proteins exist*

- on human spermatozoa and are involved in zona pellucida binding. Molecular Human Reproduction, 7* 633-640.
- Ravnik S. E.; Albers J. J.; Muller C. H., 1995: *Stimulation of human sperm capacitation by purified lipid transfer protein. Journal of Experimental Zoology, 272* 78-83.
- Redgrove K. A.; Anderson A. L.; McLaughlin E. A.; O'Bryan M. K.; Aitken R. J.; Nixon B., 2013: *Investigation of the mechanisms by which the molecular chaperone HSPA2 regulates the expression of sperm surface receptors involved in human spermoocyte recognition. Molecular Human Reproduction, 19* 120-135.
- Redgrove K. A.; Nixon B.; Baker M. A.; Hetherington L.; Baker G.; Liu D. Y.; Aitken R. J., 2012: *The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition. Plos One, 7* 16.
- Rejraji H.; Sion B.; Prensier G.; Carreras M.; Motta C.; Frenoux J. M.; Vericel E.; Grizard G.; Vernet P.; Drevet J. R., 2006: *Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. Biology of Reproduction, 74* 1104-1113.
- Rempel L. A.; Freking B. A.; Miles J. R.; Nonneman D. J.; Rohrer G. A.; Schneider J. F.; Vallet J. L., 2011: *Association of porcine heparanase and hyaluronidase 1 and 2 with reproductive and production traits in a landrace-duroc-yorkshire population. Frontiers in genetics, 2* 20.
- Rescher U.; Gerke V., 2004: *Annexins - unique membrane binding proteins with diverse functions. Journal of Cell Science, 117* 2631-2639.
- Rios M.; Carreno D. V.; Oses C.; Barrera N.; Kerr B.; Villalon M., 2014: *Low physiological levels of prostaglandins E2 and F2alpha improve human sperm functions. Reproduction, Fertility and Development.*
- Robaire B.; Hinton B. T.; Orgebin-Crist M.-C.; Neill J. D.; Plant T. M.; Pfaff D. W.; Challis J. R. G.; Kretser D. M. d.; Richards J. S.; Wassarman P. M., 2006: Chapter 22 - The Epididymis. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction (Third Edition)*. Academic Press, St Louis, pp. 1071-1148.
- Roberts G. P.; Parker J. M., 1974: *Macromolecular components of luminal fluid from bovine uterus. Journal of Reproduction and Fertility, 40* 291.
- Roberts G. P.; Parker J. M.; Symonds H. W., 1975: *Proteins in luminal fluid from bovine oviduct. Journal of Reproduction and Fertility, 45* 301-313.
- Rodriguez-Martinez H., 2007: *Role of the oviduct in sperm capacitation. Theriogenology, 68 Supplement 1* S138-146.



- Rodriguez-Martinez H.; Nicander L.; Viring S.; Einarsson S.; Larsson K., 1990: *Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs*. *Anatomia Histologia Embryologia-Journal of Veterinary Medicine Series C-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe C*, 19 16-36.
- Rodriguez-Martinez H.; Saravia F.; Wallgren M.; Tienthai P.; Johannisson A.; Vazquez J. M.; Martinez E.; Roca J.; Sanz L.; Calvete J. J., 2005: *Boar spermatozoa in the oviduct*. *Theriogenology*, 63 514-535.
- Romero-AguirreGómezcorta J.; Matas C.; Coy P., 2015: *Alpha-L-fucosidase enhances capacitation-associated events in porcine spermatozoa*. *Veterinary Journal*, 203 109-114.
- Rooney I. A.; Heuser J. E.; Atkinson J. P., 1996: *GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma - An analysis of their physical condition and the mechanisms of their binding to exogenous cells*. *Journal of Clinical Investigation*, 97 1675-1686.
- Roy M.; Gauvreau D.; Bilodeau J. F., 2008: *Expression of superoxide dismutases in the bovine oviduct during the estrous cycle*. *Theriogenology*, 70 836-842.
- Sakaue T.; Takeuchi K.; Maeda T.; Yamamoto Y.; Nishi K.; Ohkubo I., 2010: *Factor H in porcine seminal plasma protects sperm against complement attack in genital tracts*. *Journal of Biological Chemistry*, 285 2184-2192.
- Salamonsen L. A.; Hannan N. J.; Dimitriadis E., 2007: *Cytokines and chemokines during human embryo implantation: Roles in implantation and early placentation*. *Seminars in Reproductive Medicine*, 25 437-444.
- Salicioni A. M.; Platt M. D.; Wertheimer E. V.; Arcelay E.; Allaire A.; Sosnik J.; Visconti P. E., 2007: *Signalling pathways involved in sperm capacitation*. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65 245-259.
- Saxena D. K.; Tanii I.; Yoshinaga K.; Toshimori K., 1999: *Role of intra-acrosomal antigenic molecules acrin 1 (MN7) and acrin 2 (MC41) in penetration of the zona pellucida in fertilization in mice*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117 17-25.
- Schenk M.; Koppisetty C. A.; Santos D. C.; Carmona E.; Bhatia S.; Nyholm P. G.; Tanphaichitr N., 2009: *Interaction of arylsulfatase-A (ASA) with its natural sulfoglycolipid substrates: a computational and site-directed mutagenesis study*. *Glycoconjugate Journal*, 26 1029-1045.
- Schwanhauser B.; Busse D.; Li N.; Dittmar G.; Schuchhardt J.; Wolf J.; Chen W.; Selbach M., 2011: *Global quantification of mammalian gene expression control*. *Nature*, 473 337-342.

- Seytanoglu A.; Georgiou A. S.; Sostaric E.; Watson P. F.; Holt W. V.; Fazeli A., 2008: *Oviductal cell proteome alterations during the reproductive cycle in pigs*. Journal of Proteome Research, 7 2825-2833.
- Shemesh M., 2001: *Actions of gonadotrophins on the uterus*. Reproduction, 121 835-842.
- Shetty J.; Wolkowicz M. J.; Digilio L. C.; Klotz K. L.; Jayes F. L.; Diekman A. B.; Westbrook V. A.; Farris E. M.; Hao Z. L.; Coonrod S. A.; Flickinger C. J.; Herr J. C., 2003: *SAMP14, a novel, acrosomal membrane-associated, glycosylphosphatidylinositol-anchored member of the Ly-6/urokinase-type plasminogen activator receptor superfamily with a role in sperm-egg interaction*. Journal of Biological Chemistry, 278 30506-30515.
- Shimizu T.; Krebs S.; Bauersachs S.; Blum H.; Wolf E.; Miyamoto A., 2010: *Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium*. Physiological Genomics, 42A 290-300.
- Simmons D. G.; Kennedy T. G., 2000: *Induction of glucose-regulated protein 78 in rat uterine glandular epithelium during uterine sensitization for the decidual cell reaction*. Biology of Reproduction, 62 1168-1176.
- Simons K.; Ikonen E., 1997: *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 387 569-572.
- Song X. X.; Park C. K.; Piao Y. J.; Niwa K., 2007: *Effect of monosaccharide L-fucose and polysaccharide fucoidan on sperm alpha-L-fucosidase activity and relation to sperm-oocyte interaction in pig*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 20 351-358.
- Sostaric E.; Georgiou A. S.; Wong C. H.; Watson P. F.; Holt W. V.; Fazeli A., 2006: *Global profiling of surface plasma membrane proteome of oviductal epithelial cells*. Journal of Proteome Research, 5 3029-3037.
- Soubeyrand S.; Manjunath P., 1997: *Novel seminal phospholipase A(2) is inhibited by the major proteins of bovine seminal plasma*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1341 183-188.
- Spencer T. E.; Johnson G. A.; Burghardt R. C.; Bazer F. W., 2004: *Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from domestic animals*. Biology of Reproduction, 71 2-10.
- Srivastava P. N.; Ninjoor V., 1982: *Isolation of rabbit testicular cathepsin-d and its role in the activation of proacrosin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 109 63-69.
- Stanke D. F.; Sikes J. D.; Deyoung D. W.; Tumbleso.Me, 1974: *Proteins and amino-acids in bovine oviducal fluid*. Journal of Reproduction and Fertility, 38 493-496.

- Suarez S. S., 2008: *Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct*. International Journal of Developmental Biology, 52 455-462.
- Suarez S. S.; Ho H. C., 2003: *Hyperactivated motility in sperm*. Reproduction in Domestic Animals, 38 119-124.
- Suarez S. S.; Neill J. D.; Plant T. M.; Pfaff D. W.; Challis J. R. G.; Kretser D. M. d.; Richards J. S.; Wassarman P. M., 2006: Chapter 3 - Gamete and Zygote Transport. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction (Third Edition)*. Academic Press, St Louis, pp. 113-145.
- Suarez S. S.; Oliphant G., 1982: *interaction of rabbit spermatozoa and serum complement components*. Biology of Reproduction, 27 473-483.
- Suarez S. S.; Pacey A. A., 2006: *Sperm transport in the female reproductive tract*. Human Reproduction Update, 12 23-37.
- Suarez S.; Brockman K.; Lefebvre R., 1997: *Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir*. Biology of Reproduction, 56 447-453.
- Sullivan R.; Saez F., 2013: *Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology*. Reproduction, 146 R21-R35.
- Sun T.; Lei Z. M.; Rao C. V., 1997: *A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells*. Molecular and Cellular Endocrinology, 131 97-108.
- Suryawanshi A. R.; Khan S. A.; Joshi C. S.; Khole V. V., 2012: *Epididymosome-mediated acquisition of MMSDH, an androgen-dependent and developmentally regulated epididymal sperm protein*. Journal of Andrology, 33 963-974.
- Sutovsky P.; Moreno R.; Ramalho-Santos J.; Dominko T.; Winston W. E.; Schatten G., 2001: *A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis*. Journal of Cell Science, 114 1665-1675.
- Swierstra E. E., 1968: *Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis*. Anatomical Record, 161 171-185.
- Swierstra E. E.; Foote R. H., 1963: *Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit*. Journal of reproduction and fertility, 5 309-322.
- Takahashi M.; Fujii J.; Miyoshi E.; Hoshi A.; Taniguchi N., 1995: *Elevation of aldose reductase gene-expression in rat primary hepatoma and hepatoma-cell lines - implication in detoxification of cytotoxic aldehydes*. International Journal of Cancer, 62 749-754.

- Talbot P., 1985: *Sperm penetration through oocyte investments in mammals*. American Journal of Anatomy, 174 331-346.
- Talbot P.; Geiske C.; Knoll M., 1999: *Oocyte pickup by the mammalian oviduct*. Molecular Biology of the Cell, 10 5-8.
- Talbot P.; Shur B. D.; Myles D. G., 2003: *Cell adhesion and fertilization: Steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion*. Biology of Reproduction, 68 1-9.
- Tanii I.; Oh-oka T.; Yoshinaga K.; Toshimori K., 2001: *A mouse acrosomal cortical, matrix protein, MC41, has ZP2-binding activity and forms a complex with a 75-kDa serine protease*. Developmental Biology, 238 332-341.
- Tanwar P. S.; McFarlane J. R., 2011: *Dynamic expression of bone morphogenetic protein 4 in reproductive organs of female mice*. Reproduction, 142 573-579.
- Tardif S.; Cormier N., 2011: *Role of zonadhesin during sperm-egg interaction: a species-specific acrosomal molecule with multiple functions*. Molecular Human Reproduction, 17 661-668.
- Tardif S.; Guyonnet B.; Cormier N.; Cornwall G. A., 2012: *Alteration in the processing of the ACRBP/sp32 protein and sperm head/acrosome malformations in proprotein convertase 4 (PCSK4) null mice*. Molecular Human Reproduction, 18 298-307.
- Taylor U.; Rath D.; Zerbe H.; Schuberth H. J., 2008: *Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage*. Reproduction in Domestic Animals, 43 166-175.
- Teijeiro J. M.; Igotz G. G.; Marini P. E., 2009: *Annexin A2 is in pig (sus scrofa) sperm-oviduct interaction*. Molecular Reproduction and Development, 76 334-341.
- Thaler C.; Cardullo R., 1995: *Biochemical characterization of a glycosylphosphatidylinositol-linked hyaluronidase on mouse sperm*. Biochemistry, 34 7788-7795.
- Therien I.; Bleau G.; Manjunath P., 1995: *Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin*. Biology of Reproduction, 52 1372-1379.
- Therien I.; Moreau R.; Manjunath P., 1998: *Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm*. Biology of Reproduction, 59 768-776.
- Therien I.; Soubeyrand S.; Manjunath P., 1997: *Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein*. Biology of Reproduction, 57 1080-1088.

- Tienthai P.; Johannisson A.; Rodriguez-Martinez H., 2004: *Sperm capacitation in the porcine oviduct*. *Animal Reproduction Science*, *80* 131-146.
- Tokuhiro K.; Ikawa M.; Benham A. M.; Okabe M., 2012: *Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male infertility*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109* 3850-3855.
- Tone A. A.; Begley H.; Sharma M.; Murphy J.; Rosen B.; Brown T. J.; Shaw P. A., 2008: *Gene expression profiles of luteal phase fallopian tube epithelium from BRCA mutation carriers resemble high-grade serous carcinoma*. *Clinical Cancer Research*, *14* 4067-4078.
- Travis A. J.; Kopf G. S., 2002: *The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa*. *Journal of Clinical Investigation*, *110* 731-736.
- Tulsiani D. R.; Abou-Haila A.; Loeser C. R.; Pereira B. M., 1998: *The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization*. *Experimental Cell Research*, *240* 151-164.
- Turunen H. T.; Sipila P.; Krutskikh A.; Toivanen J.; Mankonen H.; Hamalainen V.; Bjorkgren I.; Huhtaniemi I.; Poutanen M., 2012: *Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice*. *Biology of Reproduction*, *86* 8.
- Ueda Y.; Yamaguchi R.; Ikawa M.; Okabe M.; Morii E.; Maeda Y.; Kinoshita T., 2007: *PGAP1 knockout mice show otocephaly and male infertility*. *Journal of Biological Chemistry*, *282* 30373-30380.
- Uhrin P.; Dewerchin M.; Hilpert M.; Chrenek P.; Schofer C.; Zechmeister-Machhart M.; Kronke G.; Vales A.; Carmeliet P.; Binder B. R.; Geiger M., 2000: *Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility*. *Journal of Clinical Investigation*, *106* 1531-1539.
- Uhrin P.; Schofer C.; Zaujec J.; Ryban L.; Hilpert M.; Weipoltshammer K.; Jerabek I.; Pirtzkall I.; Furtmuller M.; Dewerchin M.; Binder B. R.; Geiger M., 2007: *Male fertility and protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 (PCI): localization of PCI in mouse testis and failure of single plasminogen activator knockout to restore spermatogenesis in PCI-deficient mice*. *Fertility and Sterility*, *88* 1049-1057.
- Vandreden P.; Gonzales J.; Poirrot C., 1991: *Human seminal fibrinolytic-activity - specific determinations of tissue plasminogen-activator and urokinase*. *Andrologia*, *23* 29-33.
- Verhage H. G.; Fazleabas A. T.; Donnelly K., 1988: *The invitro synthesis and release of proteins by the human oviduct*. *Endocrinology*, *122* 1639-1645.

- Vilagran I.; Castillo J.; Bonet S.; Sancho S.; Yeste M.; Estanyol J. M.; Oliva R., 2013: *Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity*. *Theriogenology*, *80* 443-450.
- Vincze O.; Tokesi N.; Olah J.; Hlavanda E.; Zotter A.; Horvath I.; Lehotzky A.; Tirian L.; Medzihradzsky K. F.; Kovacs J.; Orosz F.; Ovadi J., 2006: *Tubulin polymerization promoting proteins (TPPPs): Members of a new family with distinct structures and functions*. *Biochemistry*, *45* 13818-13826.
- Vines C.; Li M.; Deng X.; Yudin A.; Cherr G.; Overstreet J., 2001: *Identification of a hyaluronic acid (HA) binding domain in the PH-20 protein that may function in cell signaling*. *Molecular Reproduction and Development*, *60* 542-552.
- Visconti P. E.; Bailey J. L.; Moore G. D.; Pan D. Y.; Oldsclarke P.; Kopf G. S., 1995: *Capacitation of mouse spermatozoa .1. correlation between the capacitation state and protein-tyrosine phosphorylation*. *Development*, *121* 1129-1137.
- Visconti P. E.; Galantino-Homer H.; Moore G. D.; Bailey J. L.; Ning X. P.; Fornes M.; Kopf G. S., 1998: *The molecular basis of sperm capacitation*. *Journal of Andrology*, *19* 242-248.
- Visconti P. E.; Hao Z. L.; Purdon M. A.; Stein P.; Balsara B. R.; Testa J. R.; Herr J. C.; Moss S. B.; Kopf G. S., 2001: *Cloning and chromosomal localization of a gene encoding a novel serine/threonine kinase belonging to the subfamily of testis-specific kinases*. *Genomics*, *77* 163-170.
- Visconti P. E.; Westbrook V. A.; Chertihin O.; Demarco I.; Sleight S.; Diekman A. B., 2002: *Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity*. *Journal of Reproductive Immunology*, *53* 133-150.
- Visconti P., 2009: *Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106* 667-668.
- Vogel C.; Abreu R. D.; Ko D. J.; Le S. Y.; Shapiro B. A.; Burns S. C.; Sandhu D.; Boutz D. R.; Marcotte E. M.; Penalva L. O., 2010: *Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line*. *Molecular Systems Biology*, *6* 9.
- Volpi N.; Schiller J.; Stern R.; Soltes L., 2009: *Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan*. *Current Medicinal Chemistry*, *16* 1718-1745.
- Wait R.; Miller I.; Eberini I.; Cairoli F.; Veronesi C.; Battocchio M.; Gemeiner M.; Gianazza E., 2002: *Strategies for proteomics with incompletely characterized genomes: The proteome of Bos taurus serum*. *Electrophoresis*, *23* 3418-3427.

- Walsh A.; Whelan D.; Bielanowicz A.; Skinner B.; Aitken R. J.; O'Bryan M. K.; Nixon B., 2008: *Identification of the molecular chaperone, heat shock protein 1 (chaperonin 10), in the reproductive tract and in capacitating spermatozoa in the male mouse*. *Biology of Reproduction*, *78* 983-993.
- Wang B. T.; Goff A. K., 2003: *Interferon-tau stimulates secretion of macrophage migration inhibitory factor from bovine endometrial epithelial cells*. *Biology of Reproduction*, *69* 1690-1696.
- Webb R.; Nicholas B.; Gong J. G.; Campbell B. K.; Gutierrez C. G.; Garverick H. A.; Armstrong D. G., 2003: *Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle*. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, *61* 71-90.
- Wei Y. H.; Wang X. L.; Fu G. L.; Yu L., 2013: *Testis specific serine/threonine kinase 4 (Tssk4) maintains its kinase activity by phosphorylating itself at Thr-197*. *Molecular Biology Reports*, *40* 439-447.
- Willems P. J.; Seo H. C.; Coucke P.; Tonlorenzi R.; O'Brien J. S., 1999: *Spectrum of mutations in fucosidosis*. *European Journal of Human Genetics*, *7* 60-67.
- Williams A. C.; Ford W. C. L., 2005: *Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function*. *Fertility and Sterility*, *83* 929-936.
- Wilmot I.; Hunter R. H. F., 1984: *Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in estrus*. *Reproduction Nutrition Development*, *24* 461-468.
- Wira C. R.; Sandoe C. P., 1977: *Sex steroid-hormone regulation of iga and igg in rat uterine secretions*. *Nature*, *268* 534-536.
- Wolkowicz M. J.; Shetty J.; Westbrook A.; Klotz K.; Jayes F.; Mandal A.; Flickinger C. J.; Herr J. C., 2003: *Equatorial segment protein defines a discrete acrosomal subcompartment persisting throughout acrosomal biogenesis*. *Biology of Reproduction*, *69* 735-745.
- Wright R. M.; John E.; Klotz K.; Flickinger C. J.; Herr J. C., 1990: *Cloning and sequencing of cdnas coding for the human intraacrosomal antigen sp-10*. *Biology of Reproduction*, *42* 693-701.
- Wrobel K. H.; Kujat R.; Fehle G., 1993: *The bovine tubouterine junction - general organization and surface-morphology*. *Cell and Tissue Research*, *271* 227-239.
- Wu A.; Anupriwan A.; Iamsaard S.; Chakrabandhu K.; Santos D. C.; Rupar T.; Tsang B. K.; Carmona E.; Tanphaichitr N., 2007: *Sperm surface arylsulfatase a can disperse the cumulus matrix of cumulus oocyte complexes*. *Journal of Cellular Physiology*, *213* 201-211.

- Xu H.; Liu F.; Srakaew N.; Koppisetty C.; Nyholm P. G.; Carmona E.; Tanphaichitr N., 2012: *Sperm arylsulfatase A binds to mZP2 and mZP3 glycoproteins in a nonenzymatic manner*. *Reproduction*, 144 209-219.
- Yamada O.; Todoroki J.; Takahashi T.; Hashizume K., 2002: *The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64 207-214.
- Yamaguchi R.; Muro Y.; Isotani A.; Tokuhiko K.; Takumi K.; Adham I.; Ikawa M.; Okabe M., 2009: *Disruption of ADAM3 Impairs the Migration of Sperm into Oviduct in Mouse*. *Biology of Reproduction*, 81 142-146.
- Yanagimachi R., 1970: *The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 23 193-196.
- Yanagimachi R., 1994a: *Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity*. *Zygote (Cambridge, England)*, 2 371-372.
- Yanagimachi R., 1994b: Chapter -2 Mammalian fertilization. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction (Second Edition)*. New York, pp. 189-317.
- Yanagimachi R.; Chang M. C., 1963: *Sperm ascent through oviduct of hamster and rabbit in relation to time of ovulation*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 6 413.
- Yang C. H.; Srivastava P. N., 1975: *Purification and properties of hyaluronidase from bull sperm*. *Journal of Biological Chemistry*, 250 79-83.
- Yaniz J. L.; Lopez-Gatius F.; Hunter R. H. F., 2006: *Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa*. *Anatomia Histologia Embryologia-Journal of Veterinary Medicine Series C*, 35 28-34.
- Yaniz J. L.; Lopez-Gatius F.; Santolaria P.; Mullins K. J., 2000: *Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa*. *Anatomical Record*, 260 268-278.
- Yeste M.; Holt W. V.; Bonet S.; Rodriguez-Gil J. E.; Lloyd R. E., 2014: *Viable and morphologically normal boar spermatozoa alter the expression of heat-shock protein genes in oviductal epithelial cells during co-culture in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 81 805-819.
- Yeung W. S. B.; Lee K. F.; Koistinen R.; Koistinen H.; Seppala M.; Chiu P. C. N., 2009: *Effects of glycodepins on functional competence of spermatozoa*. *Journal of Reproductive Immunology*, 83 26-30.
- Yoon S.; Chang K.-T.; Cho H.; Moon J.; Kim J.-S.; Min S.-H.; Koo D.-B.; Lee S.-R.; Kim S.-H.; Park K.-E.; Park Y. I.; Kim E., 2014: *Characterization of pig sperm hyaluronidase and improvement of the digestibility of cumulus cell mass by recombinant pSPAM1 hyaluronidase in an in vitro fertilization assay*. *Animal Reproduction Science*, 150 107-114



- Yuan H. X.; Zhang L.; Liu A. H.; Zhou H.; Wang Y. G.; Zhang H.; Wang G. Q.; Zeng R.; Zhang Y. L.; Chen Z. J., 2006: *Proteomic profiling of regionalized proteins in rat epididymis indicates consistency between specialized distribution and protein functions*. Journal of Proteome Research, 5 299-307.
- Yudin A.; Li M.; Robertson K.; Cherr G.; Overstreet J., 2001: *Characterization of the active site of monkey sperm hyaluronidase*. Reproduction, 121 735-743.
- Zaneveld L. J.; Polakosk.KI; Schumach.Gf, 1973: *Properties of acrosomal hyaluronidase from bull spermatozoa - evidence for its similarity to testicular hyaluronidase*. Journal of Biological Chemistry, 248 564-570.
- Zhang H.; Martin-DeLeon P. A., 2003a: *Mouse epididymal Spam1 (PH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor*. Journal of Andrology, 24 51-58.
- Zhang H.; Martin-DeLeon P. A., 2003b: *Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: Evidence for its expression in the female reproductive tract*. Biology of Reproduction, 69 446-454.
- Zhang H.; Martin-DeLeon P., 2001: *Mouse epididymal Spam1 (PH-20) is released in vivo and in vitro, and Spam1 is differentially regulated in testis and epididymis*. Biology of Reproduction, 65 1586-1593.
- Zhang H.; Morales C. R.; Badran H.; El-Alfy M.; Martin-DeLeon P. A., 2004: *Spam1 (PH-20) expression in the extratesticular duct and accessory organs of the mouse: A possible role in sperm fluid reabsorption*. Biology of Reproduction, 71 1101-1107.
- Zhang J. J.; Wu J. D.; Huo R.; Mao Y. Z.; Lu Y.; Guo X. J.; Liu J. Y.; Zhou Z. M.; Huang X. Y.; Sha J. H., 2007: *ERp57 is a potential biomarker for human fertilization capability*. Molecular Human Reproduction, 13 633-639.
- Zhao X. J.; Tang R. Z.; Wang M. L.; Guo W. L.; Liu J.; Li L.; Xing W. J., 2013: *Distribution of PDIA3 transcript and protein in rat testis and sperm cells*. Reproduction in Domestic Animals, 48 59-63.
- Zheng X. L.; Geiger M.; Ecke S.; Bielek E.; Donner P.; Eberspacher U.; Schleuning W. D.; Binder B. R., 1994: *Inhibition of acrosin by protein-c inhibitor and localization of protein-c inhibitor to spermatozoa*. American Journal of Physiology, 267 C466-C472.
- Zheng Y.; Martin-DeLeon P. A., 1999: *Characterization of the genomic structure of the murine Spam1 gene and its promoter: Evidence for transcriptional regulation by a cAMP-responsive element*. Molecular Reproduction and Development, 54 8-16.
- Zhou W. B.; Wang X. C.; Li L. X.; Feng X. C.; Yang Z. H.; Zhang W. W.; Hu R. M., 2010: *Depletion of tubulin polymerization promoting protein family member 3*

*suppresses HeLa cell proliferation. Molecular and Cellular Biochemistry, 333* 91-98.

Zitta K.; Wertheimer E. V.; Miranda P. V., 2006: *Sperm N-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida. Molecular Human Reproduction, 12* 557-563.