

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



**CONSECUENCIAS REPRODUCTIVAS DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN
BOVINOS: ANÁLISIS DE LOS FACTORES METABÓLICOS
INVOLUCRADOS Y SUS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

Autora: Lic. Pascua, Ana Malen

Directora: Dra. Furnus, Cecilia C.

Codirector: Dr. Anchordoquy, Juan Mateo

Lugar de trabajo: Instituto de Genética Veterinaria Prof. Fernando N. Dulout (IGEVET, UNLP-CONICET). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118 s/n, (CP 1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Miembros del Jurado:

Dra. Salvetti, Natalia; Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET, CONICET - UNL), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

Dr. Bo, Gabriel; Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (IRAC), Argentina.

Dr. Lirón, Juan Pedro; Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET - CIC - UNICEN), Buenos Aires, Argentina.

La Plata, 2020

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por proporcionar educación superior pública, gratuita y de calidad.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, por mi carrera de doctorado y todo lo que allí aprendí.

Al Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" (IGEVET), por brindarme un ámbito donde realizar mi formación de doctorado y capacitarme en el trabajo de la investigación científica. Por la calidez de las personas que allí conocí.

Al grupo de trabajo que me acompañó durante mi doctorado, el "Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción", que me recibió abierta y alegremente y me integró a su familia laboral. De cada uno de ellos me llevo algo valioso.

A Cecilia Furnus, por aceptarme en su Laboratorio y convertirse en mi directora de tesis. Por compartirnos su experiencia y expertise en el campo de la Biotecnología de la Reproducción. Por todo el recorrido realizado, por la confianza que tuvo en mí y por acompañarme en mis decisiones y proyectos.

A Mateo Anchordoquy, por guiarme en este camino como co-director de tesis, compartiendo su conocimiento y visión constructiva sobre los proyectos que fui llevando a cabo. Por sus valiosos consejos y apoyo en los momentos difíciles.

A Noe, Anita y Mari, por su compañía de todos los días y, sobre todo, en esos días larguísimos de experimentos interminables. Por su alegría, compañerismo y apoyo. Por lo que me enseñaron y aprendimos juntas. A Pato, Mati y Nico, por lo que aprendí de ellos, su ayuda y colaboración, las risas y los mates. A Gise, por su valiosísima colaboración y consejo en el campo de la biología molecular, su gran compañía, paciencia, buena onda y predisposición.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), que me brindaron una beca inicial y una de finalización de doctorado, respectivamente. Gracias a su financiamiento pude realizar mi formación de posgrado, y se han llevado a cabo diversos proyectos asociados a mi tesis y al Laboratorio.

A la Dra. Silvina Quintana y al grupo del laboratorio "Fares Taie", por recibirme y falicitarme la práctica de experimentos en momentos en los que no era posible localmente. Por su colaboración y asistencia.

A la Dra. Corina Mayrhofer, por recibirme en su laboratorio en Austria, permitirme trabajar en un área vanguardista de la biología molecular y ampliar los hallazgos de mi

tesis. Por su colaboración, compromiso y seguimiento. Por todo lo que aprendí y la maravillosa experiencia de trabajar y vivir en el exterior. También a Hans, Vitezslav, Urban y otros científicos y trabajadores del Instituto de Biotecnología en Producción Animal de Tulln, por su compañía y colaboración, y al Profesor Brem, por asistir en el financiamiento del proyecto científico.

A mi querido compañero de vida, Esteban, muy especialmente. Por su apoyo incondicional, su infinita paciencia y por permanecer siempre a mi lado, incluso cuando estábamos a un océano de distancia. Por lo que hemos aprendido juntos y he aprendido de él, tanto en lo laboral como en lo personal. Por ayudarme a salir adelante en mis muchos apuros y decisiones difíciles. El avance y la conclusión de mi doctorado habría sido mucho más duro sin su amorosa compañía.

A mis padres, por darme la vida y también su amor, acompañamiento y confianza, entre tantas otras cosas. Por enseñarme a no rendirme nunca, la importancia del estudio y del trabajo. Por su gran empeño y compromiso en que sus hijos tengamos una buena educación que nos permitiera salir adelante en la vida. Por llevarme a la escuela de inglés desde niña (¡aunque yo me resistiera, al principio!) y que aprendiera un idioma que tanto me ayudó en mi carrera e incluso me permitió trabajar en el exterior. A mi papá por enseñarme a priorizar los pensamientos positivos y a mi mamá por alentarme a seguir mis sueños. A mis queridos hermanos Tatín y Nehuen, por creer en mí, su compañía, sus palabras de aliento y su ayuda siempre que los necesité. A toda mi familia materna y paterna, a mi querida familia política Piccinini-Criado; a los Molina y los Pujó, entre otros, que también son parte de nuestra familia.

A mis amigas en Neuquén y La Plata: Nancy, Samy, Vani, Caro; y Fer, Leti, Rebe, Lau, Clari, Mari, Pía, las que también son mis colegas y fueron grandes compañeras durante la carrera de grado y algunas en posgrado. Su amistad es preciosa para mí y es maravilloso todo lo que hemos compartido.

Este trabajo de tesis no habría sido posible sin el apoyo, cariño y consejo de todas estas personas y de aquellas que habré olvidado mencionar, junto con las instituciones que me abrieron la puerta a este mundo especial del doctorado y la investigación científica. No olvidaré las enriquecedoras experiencias vividas. Siento gratitud tanto por los momentos felices como los difíciles, por lo que aprendí, que fue mucho.

Publicaciones parciales del trabajo de tesis

Publicaciones en revistas especializadas

Pascua, AM; Nikoloff, N; Carranza, AC; Anchordoquy, JP; Quintana, S; Barbisán, G; Díaz, S; Anchordoquy, JM; Furnus, CC. Reproductive hormones influence zinc homeostasis in the bovine cumulus-oocyte complex: Impact on intracellular zinc concentration and transporters gene expression. *Theriogenology*. 2020; 146: 48–57.

Pascua, AM; Anchordoquy, JM; Havlicek, V; Brem, G; Furnus, CC; Itze-Mayrhofer, C. The impact of zinc and estradiol on the bovine oviductal epithelial cell proteome. Manuscrito en preparación. 2020.

Ponencias en congresos

Pascua, AM; Nikoloff, N; Carranza, AC; Anchordoquy, JP; Campagna, A; Anchordoquy, JM; Furnus, CC. Rol de E₂, FSH Y LH en la homeostasis de zinc durante la maduración del complejo ovocito-cúmulus bovino. Argentina. La Plata. 2018. XIX Congreso de Ciencias Morfológicas y XVII Jornadas de Educación Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata.

Pascua, AM; Carranza, AC; Quintana, S; Nikoloff, N; Anchordoquy, JP; Anchordoquy, JM; Furnus, CC. Transportadores de zinc: cuantificación de la expresión génica en el complejo ovocito-cúmulus bovino bajo el efecto de tres hormonas reproductivas. Argentina. Quilmes, Buenos Aires, Argentina. 2018. 3ra Reunión de Jóvenes Investigadores de Ciencia y Tecnología.

Pascua, AM; Carranza, AC; Nikoloff, N; Anchordoquy, JP; Anchordoquy, JM; Furnus, CC. Maduración de ovocitos bovinos y niveles de zinc intracelulares: influencia de tres hormonas reproductivas. Argentina. Córdoba. 2017. XII Simposio Internacional de Reproducción Animal.

Pascua, AM; Quintana, S; Nikoloff, N; Sirini, MA; Anchordoquy, JP; Anchordoquy, JM; Furnus, CC. Expresión génica de transportadores de zinc en el complejo ovocito cúmulus bovino: influencia de tres hormonas reproductivas. Argentina. Buenos Aires. 2016. Congreso de la Sociedad Argentina de Tecnologías embrionarias.

Pascua, AM; Nikoloff, N; Anchordoquy, JP; Anchordoquy, JM; Furnus, CC. Rol del zinc como antioxidante en el sistema reproductor bovino: efecto de tres hormonas reproductivas en las células del cúmulus. Argentina. Chascomús. 2016. III Taller de Biología Celular y Desarrollo.

Índice de contenidos

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	4
Aspectos históricos.....	5
El aparato reproductor de la hembra bovina	7
Fisiología reproductiva de la hembra bovina.....	8
Ovogénesis y desarrollo folicular	8
Oviducto.....	21
Ciclo estral bovino	25
El zinc (Zn^{+2})	33
Introducción	33
Distribución en la célula.....	35
Funciones	36
Regulación en la célula	37
Transportadores de Zn^{+2}	39
Maduración in vitro (MIV) del complejo ovocito cúmulus (COC)	43
Cultivos primarios de células del epitelio oviductal	46
HIPÓTESIS.....	48
OBJETIVO GENERAL	48
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
CAPÍTULO 1	
Efecto de las hormonas E_2, FSH y LH sobre la concentración de Zn^{+2} libre intracelular y la expresión de sus transportadores en el COC bovino	50
Introducción.....	51
Materiales y Métodos	52
Resultados	61
Discusión.....	73

CAPÍTULO 2

Efecto del E₂ y la P₄ sobre la concentración de Zn⁺² libre intracelular y la expresión de sus transportadores en las células epiteliales del oviducto bovino (CEOB)	79
Introducción.....	80
Materiales y Métodos	81
Resultados	85
Discusión.....	90

CAPÍTULO 3

Efecto de la fase del ciclo estral sobre la expresión de los transportadores de Zn⁺² en el COC y las CEOB	96
Introducción.....	97
Materiales y Métodos	97
Resultados	101
Discusión.....	102

CAPÍTULO 4

Efecto del Zn⁺² y el E₂ sobre el proteoma de las células epiteliales del oviducto bovino (CEOB)	107
Introducción.....	108
Materiales y Métodos	109
Resultados	116
Discusión.....	123

CONCLUSIONES FINALES.....	135
----------------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA.....	138
--------------------------	------------

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AF: ácido fórmico

ARN: ácido ribonucleico

BCA: bicinehoninic acid

CDK: quinasa dependiente de ciclina

CEO: células epiteliales de oviducto

CEOB: células epiteliales de oviducto bovino

CGP: células germinales primordiales

CIS: cultivo *in situ*

CL: cuerpo lúteo

COC: complejo ovocito – cúmulus

CS: cultivo en suspensión

DMT1: divalent metal transporter 1

DTT: ditioneitol

E₂: estradiol

EEM: error estándar de la media

ER: expresión relativa

EROS: especies reactivas de oxígeno

FCS: factor citostático

FD: folículo dominante

FDR: False Discovery Rate

FIV: fertilización *in vitro*

FPM: factor promotor de la maduración

GAG: glicosaminoglicanos

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

GO: Gene Ontology

GVBD: germinal vesicle breakdown

HBP: hexosamine biosynthesis pathway

HSP: Heat Shock Protein

IF: intensidad de fluorescencia

IGF-1: insulin-like growth factor 1

LFQ: intensidades de cuantificación sin marcaje

LH: hormona luteinizante

LK: ligando KIT

M-I: meiosis I

M-II: meiosis II

MIV: maduración *in vitro*

MRE: metal response element

MS: materia seca

MT: metalotioneína

MTF-1: metal-response element-binding transcription factor-1

nano *LC- MS/MS*: espectrometría de masas acoplada a nano-cromatografía líquida de alta resolución

P₄: progesterona

PBS: solución salina *buffer* de fosfatos

PGF₂ α : prostaglandina F₂ α

P-I: profase I

PIV: producción *in vitro* de embriones

PNF: pronúcleo femenino

PNM: pronúcleo masculino

RE: retículo endoplasmático

SDF1: factor derivado del estroma

SFB: suero fetal bovino

STAT3: Signal transducers and activators of transcription

TCA-DOC: ácido tricloroacético-deoxicolato de sodio

TEAB: bicarbonato de trietilamina

TPEN: N,N,N',N'-tetrakis (2-piridilmetil) etano-1,2-diamina

T_m: temperatura de *melting*

UPR: *unfolded protein response*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

ZP: *zona pellucida*

CONSECUENCIAS REPRODUCTIVAS DE LA DEFICIENCIA DE ZINC EN BOVINOS: ANÁLISIS DE LOS FACTORES METABÓLICOS INVOLUCRADOS Y SUS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN

Palabras claves: COC bovino, oviducto bovino, zinc, hormonas reproductivas, maduración *in vitro*, cultivo *in vitro*

Resumen

El zinc (Zn^{+2}) cumple funciones en innumerables procesos celulares. Sin embargo, el conocimiento acerca de su homeostasis en la célula (en particular, en el sistema reproductor bovino) es aún limitado. En este contexto, se estudió la influencia de las hormonas folículo estimulante, luteinizante, estradiol y progesterona (según correspondiera) sobre la expresión de los transportadores de Zn^{+2} y la concentración intracelular del mineral en i) el complejo ovocito-cúmulus (COC) bovino y ii) las células epiteliales del oviducto bovino (CEOB). Luego, se evaluó la expresión de dichos transportadores según la fase del ciclo estral en los COC y las CEOB, y, además, el efecto del Zn^{+2} y el estradiol sobre el proteoma de las CEOB. Para ello, se realizaron maduraciones *in vitro* de COC y cultivos *in vitro* de CEOB obtenidos a partir de hembras de frigorífico. La concentración intracelular de Zn^{+2} se determinó por medio del colorante FluoZin-3, la expresión y cuantificación de los transportadores por PCR en Tiempo Real (PCR-RT), y el análisis proteómico por espectrometría de masas (nano LC- MS/MS) y análisis funcionales. Las investigaciones permitieron comprobar la expresión génica de transportadores de Zn^{+2} en los COC y las CEOB, y señalaron que las hormonas estudiadas participarían activamente en la regulación intracelular del Zn^{+2} en dichas células. Además, se detectó interacción entre las hormonas y el Zn^{+2} en la mayoría de los casos al evaluar el nivel intracelular de Zn^{+2} y la expresión génica de sus transportadores. En el COC y las CEOB, los transportadores cuantificados tuvieron diferencias en su expresión de ARNm entre las fases luteal y folicular del ciclo estral.

La exposición de las CEOB al Zn^{+2} en presencia de E_2 provocó cambios en la abundancia de proteínas involucradas en involucradas en la remodelación del epitelio oviductal y la proteostasis, entre otros procesos.

REPRODUCTIVE CONSEQUENCES OF ZINC DEFICIENCY IN THE BOVINE: ANALYSIS OF METABOLIC FACTORS INVOLVED AND POSSIBLE ACTION MECHANISMS

Key words: bovine COC, bovine oviduct, zinc, reproductive hormones, *in vitro* maturation, *in vitro* culture

Abstract

Zinc (Zn^{2+}) is involved in a myriad of cellular functions. However, knowledge about Zn^{2+} homeostasis in the cell (particularly, in the bovine reproductive system) is still scarce. In this context, follicle-stimulating and luteinizing hormones, as well as estradiol and progesterone (where appropriate) were analyzed on how they may influence Zn^{2+} transporters gene expression and intracellular Zn^{2+} levels in i) the oocyte-cumulus complex (OCC) and ii) the bovine oviductal epithelial cells (BOEC). Subsequently, Zn^{2+} transporters gene expression in different estral cycle phases (luteal or follicular) was assessed in both OCC and BOEC. Furthermore, a proteomic study on how estradiol and Zn^{2+} impact the BOEC proteome was performed. For these purposes, *in vitro* maturation of OCC and *in vitro* culture of BOEC were employed. Zn^{2+} intracellular concentration was determined using indicator FluoZin-3, gene expression analyses and quantification by Real Time PCR (RT-PCR) and the proteomic studies by mass spectrometry (nano LC- MS/MS) and functional analyses. Experiments confirmed the transporters gene expression in OCC and BOEC, and showed that these hormones would actively participate in intracellular Zn^{2+} regulation. Moreover, Zn^{2+} -hormone interplay was detected in most FluoZin-3 and RT-PCR results. Transporters whose gene expression was quantified held differences in their mRNA levels when comparing the luteal and follicular phases of the estral cycle. Lastly, BOEC exposure to estradiol and Zn^{2+} during culture led to changes in the abundance of proteins involved in the oviduct epithelia remodeling and proteostasis, among other cell processes.

Introducción general

1.1 Aspectos históricos

Desde principios del siglo XX, el número de investigaciones en pos de mejorar el entendimiento de la biología de la reproducción en mamíferos ha crecido sustancialmente. Para el desarrollo de dichos estudios, fue necesario crear condiciones *in vitro* similares a aquellas encontradas en el microambiente natural, que permitieran mantener a los ovocitos y a los espermatozoides en estado funcional.

Los trabajos pioneros en el desarrollo de modelos *in vitro* se generaron durante la década de 1930 (Pincus y Enzmann, 1935; Pincus y Saunders, 1939) y consistieron en pruebas de fecundación utilizando gametas de conejo y un medio de cultivo que preservara su viabilidad. Se transfirieron ovocitos recién fecundados a oviductos de conejas cuya ovulación había sido inducida, eventualmente obteniéndose éxito con el nacimiento de crías. A pesar de este primer logro en mamíferos, a lo largo de la década de 1940 gran parte de los conocimientos sobre fecundación se basaron en estudios realizados en erizo de mar. El auge en los estudios sobre fisiología de la reproducción en mamíferos llegó al transcurrir los años '50, gracias al éxito conseguido en la fecundación *in vitro* (FIV) de conejos, ratones y hámsteres (Austin, 1951; Chang, 1968; Chang y col., 1977). De todos modos, fue en 1977 que se llevó a cabo la primer FIV de ovocitos bovinos madurados en cultivo (Iritani y Niwa, 1977). Para 1987, ya se habían obtenido terneros desarrollados a partir de un procesamiento *in vitro* completo que incluyó las etapas de maduración, fecundación, y cultivo de embriones, denominado desde entonces “producción *in vitro* de embriones” (PIV) (Lu y col., 1987). Este progreso alcanzado en bovinos tuvo también repercusión en ovinos, porcinos, equinos, caprinos, búfalos y ciervos; e incluso estimuló investigaciones orientadas hacia las especies en vías de extinción. La mayoría de los trabajos realizados con embriones de

rumiantes a dicho momento histórico fueron compilados por Trounson (Trounson, 1992).

De 1990 en adelante, han tenido especial impulso los estudios fisiológicos y metabólicos en ovocitos, espermatozoides y embriones de mamíferos en relación con el microambiente que los rodea. En la década de 1990, se le concedió especial atención a las funciones que cumplen los aminoácidos (Gardner y col., 1994; Hill y col., 1997), las glicoproteínas (Hunter, 1994), los protectores contra el estrés oxidativo (Yoshida, 1993; Yoshida y col., 1993) y los glicosaminoglicanos (GAG) presentes en los fluidos folicular, oviductal y uterino (Sato y col., 1990; Edelstam y col., 1991; Carolan y col., 1995). Ya por los años 2000, las investigaciones se centraron en la regulación ejercida por diversos factores ovocitarios sobre las funciones de las células del cúmulus (Gilchrist y col., 2008), el rol que desempeñan distintos factores de crecimiento durante la maduración *in vitro* (MIV) del ovocito (Chen y col., 2008; Shabankareh y Zandi, 2010) y las vías metabólicas involucradas en dicho proceso (Sutton-McDowall y col., 2010). También fueron objeto de estudio la dinámica de los eventos relacionados con los microfilamentos durante la maduración del ovocito y la fecundación (Sun y Schatten, 2006) y las mitocondrias en ovocitos y embriones preimplantacionales (Wang y col., 2009).

Se conoce que las alteraciones en el desarrollo embrionario están condicionadas al microambiente que rodea, tanto al ovocito como al embrión en sus primeros estadios de desarrollo (De Wit y col., 2000; Ward y col., 2002; Li y Winuthayanon, 2017). En este sentido, el oviducto, el órgano que constituye el soporte estructural, ambiental y nutricional del embrión temprano, además de ser la vía de transporte de las gametas, entre otras funciones, ha ganado también creciente atención, especialmente desde los

años 2000 (Leese y col., 2008; Ulbrich y col., 2010; Besenfelder y col., 2012; Li y Winuthayanon, 2017; Almiñana y Bauersachs, 2019).

Dado este contexto, los estudios sobre el impacto de diversos factores o las consecuencias de cambios drásticos en el ambiente folicular, oviductal o uterino continúan desarrollándose intensamente en la actualidad (Hoelker y col., 2014; Warzych y col., 2014; Nikoloff y col., 2017; Da Broi y col., 2018; Anchordoquy y col., 2019).

1.2 El aparato reproductor de la hembra bovina

El sistema reproductor de la vaca está compuesto por dos ovarios, dos oviductos, dos cuernos uterinos, un cuerpo uterino, el cérvix, la vagina y la vulva (Figura i1). El tracto reproductivo se extiende por debajo del recto, y está separado de él por el saco recto-genital. Esta disposición anatómica permite la palpación manual (manipulación vía recto) y/o examen ultrasónico del tracto reproductivo femenino para, por ejemplo, diagnosticar el estatus ovárico (Figura i2) (Senger, 2003).

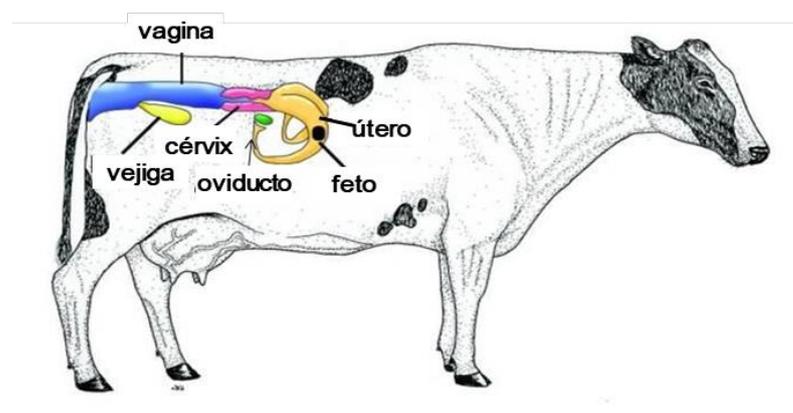


Figura i1. Aparato reproductor de la hembra bovina. Ilustración del sistema reproductor de la vaca (vista lateral). Se observa la disposición de los órganos dentro de las cavidades pélvica y abdominal. Modificada de Gyeongsang National University (GSNU) <http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap2.html>.

Los ovarios constituyen los órganos sexuales primarios de la hembra. Son estructuras ovoides relativamente densas y sus principales funciones son las de producir las gametas femeninas y las hormonas estrógeno y progesterona (P₄). Durante el ciclo estral de la vaca, sufren una dramática serie de cambios (ver sección “Ciclo estral bovino”). Los oviductos, por su parte, proporcionan un ambiente óptimo para la fecundación, mientras que el útero es la ruta de transporte del espermatozoide y la localización de la embriogénesis temprana y la implantación. El útero funciona como punto de conexión entre el cérvix y los dos cuernos uterinos. Éstos últimos consisten en tres capas de músculo y una red de vasos sanguíneos que les permiten contraerse rítmicamente para ayudar en el transporte del espermatozoide hacia el oviducto. El cérvix o cuello uterino, compuesto de tejido conectivo denso y muscular, es un anillo que conecta el útero con la vagina y tiene como principales roles producir una barrera de sellado cervical durante la preñez y secretar moco durante el estro. Finalmente, la vagina es el órgano copulador y también produce lubricación en el estro, a la vez que la vulva sirve como canal de parto y de pasaje de orina (Senger, 2003).

1.3 Fisiología reproductiva de la hembra bovina

1.3.1 Ovogénesis y desarrollo folicular

La ovogénesis es el proceso por el cual se forman las gametas femeninas, encargadas de aportar el complemento haploide de cromosomas que, junto con el del espermatozoide, darán origen a un nuevo individuo. En los mamíferos, la ovogénesis comienza relativamente temprano, durante el desarrollo del feto, y termina meses o años más tarde en la madurez sexual del adulto (Aerts y Bols, 2010a, b). La ovogénesis se inicia con la formación de las células germinales primordiales (CGP), que sufren una

serie de transformaciones celulares hasta llegar al estado de ovogonia, y de ovogonia hasta ovocito, ambas etapas en el feto, para finalmente evolucionar hasta la formación del ovocito maduro (O'Shea y col., 2012; Combelles y Rawe, 2013; Rossi y col., 2019).

Etapas de la ovogénesis

a) Proliferación

En el ovario, las divisiones mitóticas de las CGP resultan en la formación de grupos de ovogonias, que se encuentran conectadas entre sí por medio de puentes citoplasmáticos intercelulares (Pepling y Spradling, 1998; Larose y col., 2019). Cuando la formación de estos grupos se completa, el ovario queda formado por unas pocas células germinales individuales y numerosos sincitios de células germinales primordiales llamados “células germinales en nido” (*Nest Germ Cells*). Antes del nacimiento, estos grupos celulares comienzan a separarse para formar los folículos individuales. Esta separación resulta crítica ya que muchas células mueren y solo algunas llegan a formar folículos primordiales (Tingen y col., 2009). El número total de ovogonias que tiene cada individuo ya está fijado antes de la madurez sexual y en algunos casos antes del nacimiento (Yang y Fortune, 2008). Actualmente se cree que el número de divisiones mitóticas que sufre una ovogonia antes de entrar en la fase de crecimiento es fijo para cada especie (Fair, 2003).

b) Formación del folículo primordial

Las ovogonias se diferencian a ovocitos primarios (ovocitos sin crecimiento), que se caracterizan por permanecer detenidos por un período prolongado en la profase de la primera división meiótica (P-I) (Aerts y Bols, 2010a). Estos ovocitos rodeados por

una única capa de células epiteliales aplanadas denominadas células foliculares forman los folículos primordiales, que están ubicados superficialmente en la corteza del ovario, y constituyen la reserva de folículos que permanecerá durante toda la vida reproductiva del individuo. En la hembra bovina los folículos primordiales completos están presentes alrededor de los 90 días de gestación (Yang y Fortune, 2008).

Existe una clasificación clásica del desarrollo folicular en folículos primordiales, primarios, secundarios o preantrales, y terciarios o antrales (Fair, 2003; Figura i2).

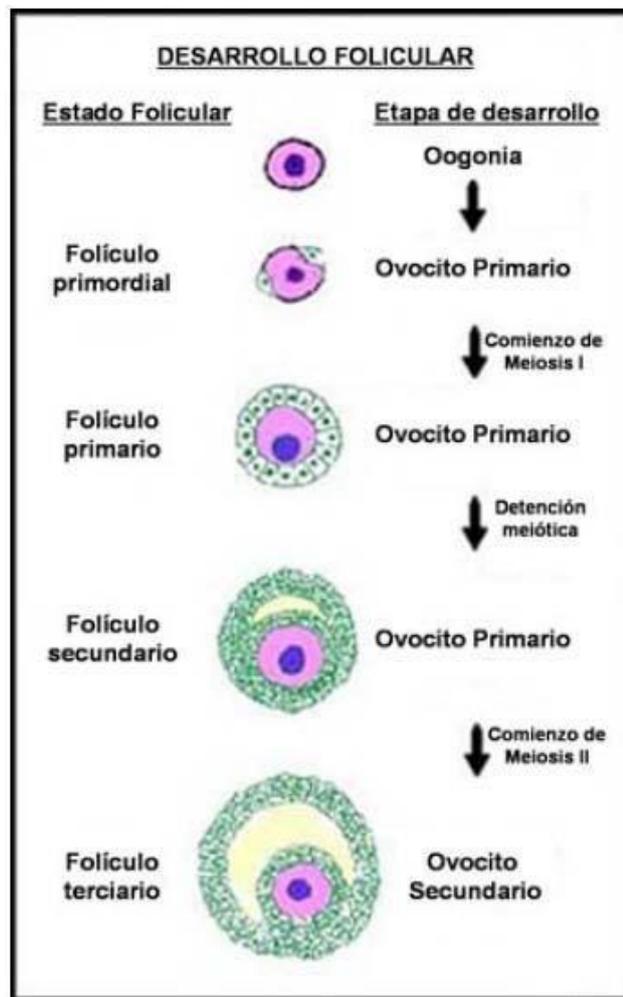


Figura i2. Esquema del desarrollo folicular. Modificada de www.erin.utoronto.ca. Universidad de Toronto.

Una clasificación más específica para bovinos sugiere la subdivisión de los folículos preantrales en dos tipos (Braw-Tal y Yossefi, 1997; Tabla i1).

Tabla i1. Clasificación de los folículos preantrales **

Folículo (Tipo)	Capas de células de la granulosa	N° células de la granulosa	Folículo (diámetro) (rango- μm)	Ovocito (diámetro μm) ($X \pm ES$)	Zona pellucida, presencia	Teca interna claramente definida
Primordial (tipo 1)	1	< 10 (planas)	< 40	$29 \pm 0,3$	-	-
Primario (tipo 2)	1 – 1,5	10-40 (cúbicas)	40-80	$31 \pm 0,4$	-	-
Pre-antral pequeño (tipo 3)	2 – 3	41-100	81-130	$49,5 \pm 2,4$	-	+/-
Pre-antral grande (tipo 4)	4 – 6	101-250	131-250	$68,6 \pm 2,8$	+	+
Antral pequeño (tipo 5)	> 6	> 250	250-500	$92,9 \pm 4,5$	++	++

**El número de capas de de células de la granulosa fue tomado en el folículo más grande, cuando el núcleo del ovocito estaba presente. (Modificado de Braw-Tal y Yossefi, 1997).

Los ovocitos primarios permanecen detenidos en diplonema tardío o difuso (también llamado estadio de diacinesis) hasta que el folículo complete la atresia folicular o complete su crecimiento en respuesta al pico de hormona luteinizante (LH), el cual induce la reanudación de la meiosis convirtiendo al ovocito primario en una gameta haploide (van den Hurk y Zhao, 2005).

Una de las doctrinas básicas de la biología indica que la mayoría de las hembras de mamífero pierden la capacidad de renovación de las células germinales durante la vida fetal, quedando fijada la reserva de células germinales (ovocitos primarios) al nacimiento. Sin embargo, estudios realizados en primates adultos (Bukovsky y col.,

2004) y en ratones (Johnson y col., 2004) mostraron que los ovarios de estas especies poseían células germinales mitóticamente activas capaces de formar ovocitos y folículos. Además, se observó que los componentes de los folículos primordiales (células germinales y células de la granulosa primitiva) pueden diferenciarse a partir de células progenitoras mesenquimáticas presentes en la túnica albugínea de ovarios de mujeres adultas (Bukovsky y col., 2004). De todos, al presente no se han reportado otros trabajos que confirmen estos resultados (Akahori y col., 2019).

c) Crecimiento: folículos preantrales

Los folículos primordiales se convierten en folículos primarios tras la hipertrofia de las células planas que rodean al ovocito, y que se transforman en células cúbicas. A partir de este momento, el folículo comienza a crecer en un proceso continuo que está regulado por el ovario. El ovocito y las células foliculares que lo rodean, crecen coordinadamente progresando a través de una serie de estadios morfológicos definidos, que culminan en la ovulación de un ovocito maduro o en la atresia folicular (Moniruzzaman y Miyano, 2010).

El ingreso de los folículos primordiales a la fase de crecimiento ocurre a ritmos relativamente constantes y por ciclos, es decir que periódicamente un grupo de folículos inicia esta etapa. Existe un balance entre los factores estimuladores e inhibidores de origen sistémico y local, que influyen sobre el número de folículos primordiales que comienzan a crecer en cada ciclo y que son independientes de la acción directa de la hormona FSH (Méduri y col., 2002; Moniruzzaman y Miyano, 2010; Reddy y col., 2010; Kim, 2012; Monget y col., 2012). Durante esta fase de crecimiento, el ovocito permanece detenido en diplonema de la primera profase meiótica e incrementa su

volumen. La cantidad de citoplasma aumenta por acumulación de sustancias de reserva, produciéndose un incremento en la síntesis de ácido ribonucleico (ARN). Además, aumenta el número de mitocondrias que elevan el consumo de oxígeno, se forman los gránulos corticales que contienen mucopolisacáridos y enzimas proteolíticas, y que se ubican por debajo de la membrana plasmática, se forman microvellosidades en la membrana citoplasmática y aparece la zona pelúcida (ZP) (Aerts y Bols, 2010a). Ésta última está constituida por glicoproteínas como las ZP I a IV que, si bien presentan variaciones entre especies, son esenciales para mantener la esfericidad del ovocito, permitir la fijación del espermatozoide y generar la reacción acrosómica (Gupta y Bhandari, 2011; Gupta, 2015)

La capa de células foliculares cúbicas del folículo primario se estratifica por una serie de divisiones mitóticas pasando a constituir las células de la granulosa. De esta manera, queda formado el folículo preantral o folículo secundario (Young y McNeilly, 2010). Tanto los estrógenos como la FSH estimulan la proliferación de las células de la granulosa ejerciendo un efecto mitogénico sobre las mismas (Shimizu y col., 2007) . Estas células, además de comunicarse entre sí, presentan uniones gap con el ovocito (Gilchrist y col., 2004). Estas uniones están formadas por proteínas llamadas conexinas, como la conexina-37 que se expresa en el ovocito a lo largo de todos los estadios de la foliculogénesis (Borowczyk y col., 2006). Este tipo de uniones se encuentran en muchos sistemas biológicos y actúan como mediadores de la comunicación intercelular, permitiendo el pasaje de pequeñas moléculas que influyen sobre las células vecinas, incluyendo nutrientes, precursores metabólicos como aminoácidos y nucleótidos, hormonas y factores de crecimiento (van den Hurk y Zhao, 2005; Johnson y col., 2017). El ovocito estimula y controla el desarrollo de las células de la granulosa a través de las

uniones gap y de una regulación de tipo parácrina (Gilchrist y col., 2004; Sanfins y col., 2018).

A medida que el folículo continúa creciendo, se reclutan los precursores de las células de la teca, y se completa el proceso de ensamblaje del folículo (Edson y col., 2009; Hirshfield, 1991a; Figura i4). Se ha propuesto que las células tecales derivan del estroma intersticial del ovario y están presentes como células individuales en la lámina basal de los folículos primarios (Hirshfield, 1991b); sin embargo, un origen definitivo de este tipo celular aún no ha sido determinado (Peters y Pedersen, 1967; Erickson y col., 1985; Young y McNeilly, 2010). Las primeras células de la teca interna pueden ser identificadas en folículos preantrales pequeños o Tipo 3. Sin embargo, la teca interna no se desarrolla claramente hasta el estadio preantral grande o Tipo 4 (Tabla i1; Figura i3). La capa externa de la teca está densamente vascularizada y provee al folículo los factores endócrinos (Tajima y col., 2006; Rodgers y Irving-Rodgers, 2010).

Aunque los folículos multilaminares son sensibles a las gonadotropinas LH y FSH, que promueven su crecimiento (McGee y col., 1997), son capaces de desarrollarse hacia el próximo estadio (antral) con una mínima circulación de FSH o en presencia de receptores de FSH defectuosos (Schoot y col., 1994; Abel y col., 2000; McGee y Hsueh, 2000). La hormona LH parecería ser más importante para el desarrollo del folículo multilaminar que la FSH (Eppig y col., 1997).

El crecimiento de los folículos en la etapa preantral es independiente de la acción directa de las gonadotropinas y se encuentra regulado por factores autócrinos y parácrinos, dentro de los cuales, los factores de crecimiento GDF9 y BMP15 secretados por el ovocito serían esenciales (Rajkovic y col., 2006; Andrade y col., 2019). A

medida que la foliculogénesis progresa, el folículo se vuelve sensible a las gonadotropinas (Erickson, 2000; Forde y col., 2011).

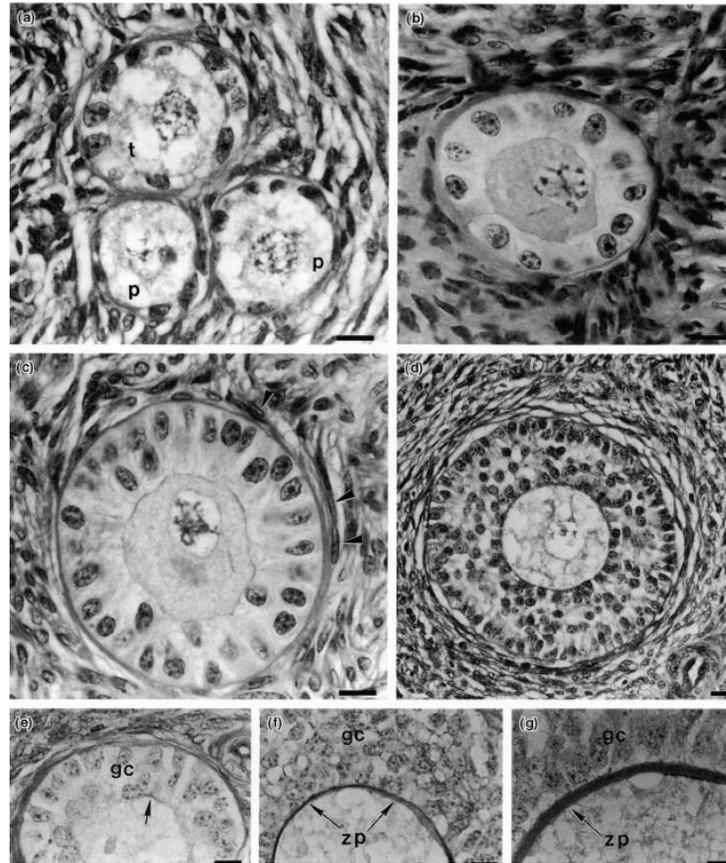
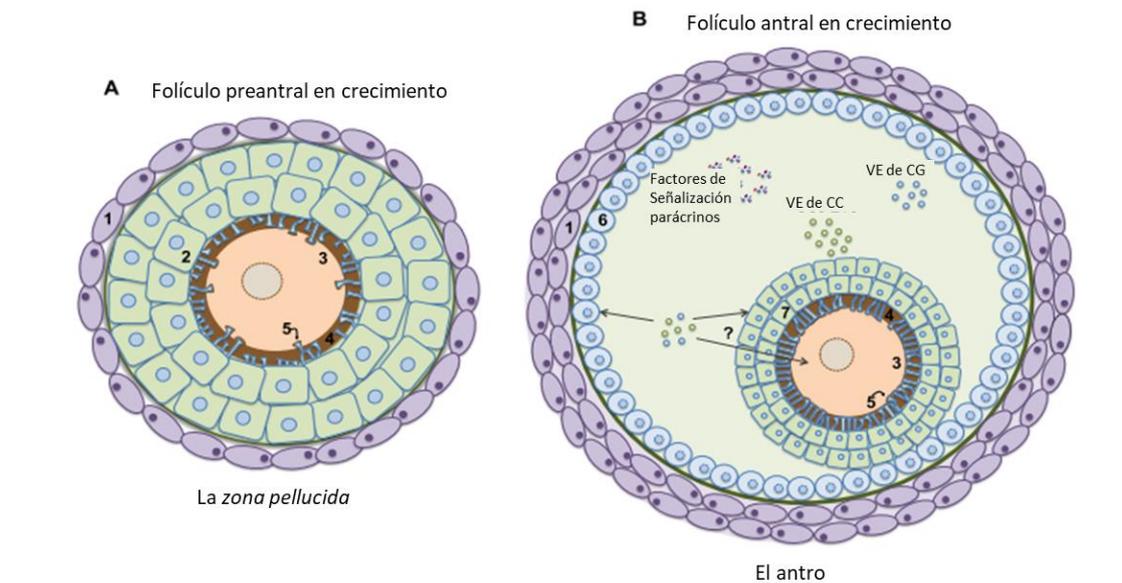


Figura i3. Folículos pequeños en ovarios de bovino. (a) Dos folículos primordiales (Tipo 1, p) con una capa de células planas de la granulosa y un folículo transitorio (Tipo 1+, t), con una mezcla de células aplanadas y cúbicas. (b) Folículo primario (Tipo 2): ovocito rodeado de una capa simple de células cúbicas. (c) Folículo preantral primario (Tipo 3): el ovocito comenzó su crecimiento y está rodeado de dos capas de células de la granulosa. El inicio en la formación de la teca puede ser reconocido por la presencia de células elongadas (flecha), pegadas a la membrana basal. (d) Folículo preantral grande (Tipo 4): el ovocito continúa creciendo y está rodeado por cinco capas de células de la granulosa, mientras que la teca interna está poco definida. (e-g) Formación de la ZP en folículos de bovinos. (gc) Células de la granulosa. (e) Pequeño folículo preantral con una isla de material PAS positivo (detección de polisacáridos, flecha). (f) Folículo preantral grande con ZP que forma un anillo completo alrededor del ovocito (flecha). (g) Folículo antral con una gruesa ZP (flecha). (a-d) Tinción con hematoxilina-eosina. (e-g) Reacción de PAS. La barra de la escala representa 10 μm . Braw-Tal y Yossefi, 1997.



Referencias: 1 células de la teca, 2 células de la granulosa, 3 ovocito, 4 zona pellucida, 5 proyecciones trans-zonales, 6 células de la granulosa murales, 7 células del cúmulo.

Figura i4. Folículo en crecimiento, etapas preantral y antral. Durante el crecimiento preantral, se forma la zona pelúcida, la primera barrera significativa entre el ovocito y las células foliculares. Para el mantenimiento continuo de un puente citoplasmático entre la célula germinal y las somáticas, el ovocito estimula a las células de la granulosa a que generen filamentos citoplasmáticos especializados que conectan ambas células: las proyecciones trans-zonales (A). En los folículos en crecimiento antral, se forma una segunda barrera significativa entre las células foliculares: el antro. La comunicación bilateral se mantiene mediante señalización parácrina y tráfico de vesículas extracelulares. La señalización parácrina de factores secretados por ovocitos y la activación del receptor de EGF por señalización de LH impulsa el desarrollo y la ovulación del folículo. Las vesículas extracelulares se secretan en el líquido folicular y son captadas por diferentes tipos de células mediante un mecanismo de entrega de carga (B). CC: células del cúmulo; VE: vesículas extracelulares; CG: células de la granulosa. (Modificada de Andrade y col., 2019).

d) Maduración

d-1. Folículos antrales

Como se discutió anteriormente, en el desarrollo folicular se distinguen una etapa inicial, independiente de la estimulación por gonadotrofinas, y una segunda etapa dependiente de las mismas. Si bien los folículos antrales tempranos presentan ARN mensajero (ARNm) para receptores de FSH, son relativamente independientes de las gonadotrofinas durante el período de crecimiento inicial. Estos folículos aumentan su

tamaño en presencia de muy bajas concentraciones de FSH y LH e incluso, lo hacen en ausencia de las mismas (van den Hurk y Zhao, 2005). En la hembra bovina, cuando los folículos antrales alcanzan un tamaño de aproximadamente 4 a 5 mm, se vuelven dependientes de gonadotrofinas (Driancourt, 2001).

Los folículos antrales se caracterizan por la formación de una cavidad llena de líquido folicular. Este fluido antral comienza a formarse cuando el folículo posee más de 250 células de la granulosa en pequeñas zonas, que luego se unifican para formar el antro folicular (Smitz y Cortvrindt, 2002). El líquido folicular se forma por el gradiente osmótico que generan proteoglicanos sintetizados por las células de la granulosa, con ingreso de agua por las vías paracelular y transcelular desde los vasos tecales (Rodgers y Irving-Rodgers, 2010; Figura i5). El fluido folicular es una importante fuente de sustancias regulatorias y moduladoras derivadas de la sangre, como gonadotrofinas, esteroides, factores de crecimiento, enzimas, proteoglicanos y lipoproteínas, además de sustratos energéticos y especies reactivas de oxígeno (van den Hurk y Zhao, 2005; Ambekar y col., 2013). La señal que dispara la formación del antro folicular no está definida hasta el momento. Estudios *in vitro* han postulado a la FSH como potencial candidata en murinos (Hartshorne, 1997; Mao y col., 2002), primates (Xu y col., 2011), humanos (Wright y col., 1999) y bovinos (Gutierrez y col., 2000; McLaughlin y col., 2010), aunque también se señala a la LH (Cortvrindt y col., 1998), a la activina (Zhao y col., 2001; McLaughlin y col., 2010) y al LK (Driancourt y col., 2000).

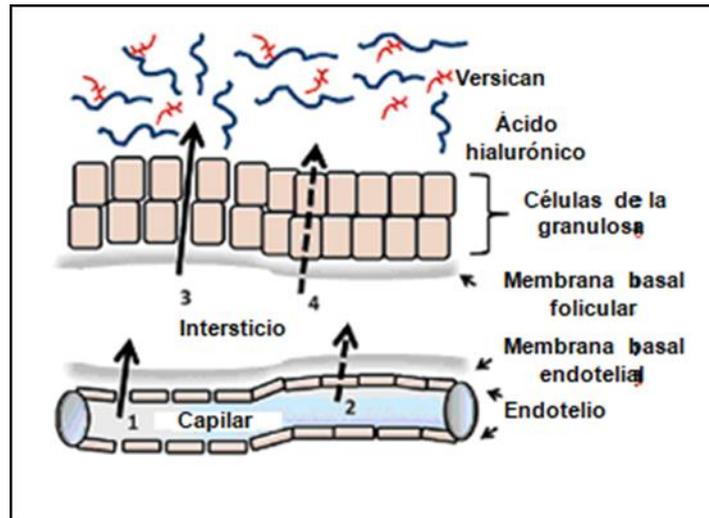


Figura i5. Esquema de formación del líquido antral en el folículo. Las rutas 1 y 3 (líneas sólidas) indican vías transcelulares, y las rutas 2 y 4 (líneas punteadas), las vías transcelulares que incluyen acuaporinas y transcitosis. Modificada de Rodgers e Irving-Rodgers, 2010.

Al volverse dependientes de gonadotropinas, los folículos son reclutados para continuar su crecimiento (Driancourt, 2001). El número de folículos reclutados varía entre las especies, siendo de 5 a 20 en bovinos (Forde y col., 2011). El reclutamiento y la selección de los folículos antrales ocurren en forma de ondas, con 2 a 3 ondas por ciclo estral, la última de las cuales culmina en la ovulación (Figura i6). Una señal hormonal, en la que intervienen FSH, LH y estrógenos, selecciona a un grupo de folículos que continúan su crecimiento. En esta selección, y hasta alcanzar un diámetro de aproximadamente 8 mm, el crecimiento del folículo es estimulado por la FSH secretada por la glándula pituitaria. Los folículos se desarrollan por medio de la rápida proliferación de las células de la granulosa y la teca que contribuyen a un mayor agrandamiento del antro y el folículo en sí.

A partir de los 8 mm de diámetro aproximadamente, comienzan a desarrollarse receptores de LH en las células de la granulosa. A partir de allí, los folículos se

desarrollan principalmente gracias a la estimulación trófica de LH, y reciben el nombre de dominantes (Eppig y col., 1997; Driancourt, 2001). Los mismos, sometidos a la acción de la LH, independientemente de que la concentración de FSH disminuya, crecerán rápidamente en pocos días y se volverán más grandes que el resto. En los folículos dominantes, el ovocito se encuentra rodeado muy estrechamente por células de la granulosa conocidas como células del cúmulus, formando un complejo muy compacto llamado complejo ovocito - cúmulus (COC), cuyo desarrollo *in vitro* es dependiente de FSH. A lo largo de todo este proceso de crecimiento y diferenciación folicular, se produce paralelamente el crecimiento y la adquisición de competencia del ovocito (El-Hayek y Clarke, 2015; Monniaux, 2016).

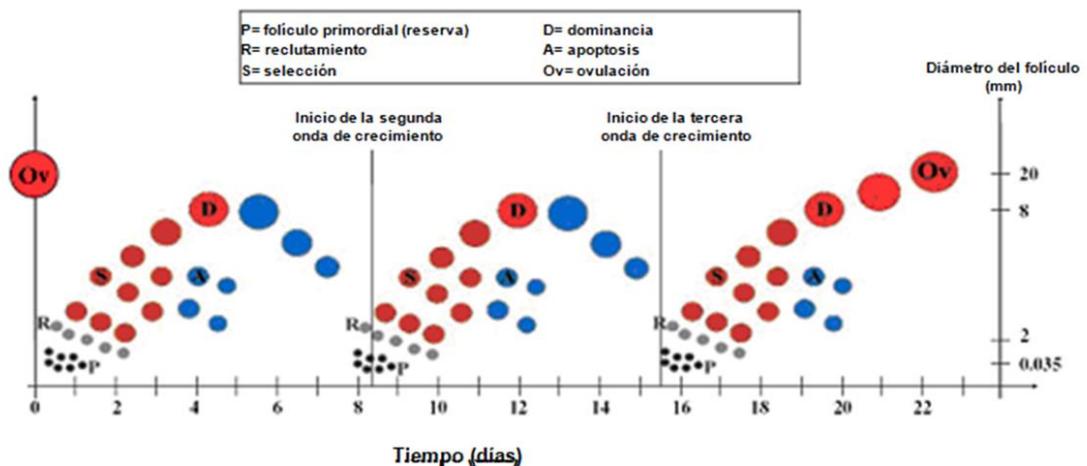


Figura i6. Ondas de crecimiento folicular durante el ciclo estral bovino. Cada onda de crecimiento folicular incluye una etapa de reclutamiento (R) de folículos primordiales de reserva (P), seguido de una etapa de selección de uno de ellos (S), mientras el resto se atrofia (A), y finalmente una etapa de dominancia (D), para terminar en la ovulación. Modificado de Aerts y Bols, 2010-b.

El COC constituye una “península” embebida en líquido folicular y conectada con las células de la granulosa murales que rodean el antro folicular (Eppig y col.; Figura i4). Se ha sugerido que los ovocitos tienen la capacidad de regular el metabolismo de las CG para coordinar el ritmo del desarrollo del folículo (Sugiura y Eppig, 2005).

La dominancia folicular se encuentra reforzada por al menos dos factores locales, el IGF-I (*insulin-like growth factor 1*), que estimula la formación de receptores para LH (Chase y col., 1998), y el VEGF (*vascular endothelial growth factor*), un potente promotor de la angiogénesis derivado de la teca, cuya producción se encuentra estimulada por la LH (Garrido y col., 1993). La LH que llega a las células foliculares estimula la producción de altos niveles de estrógenos que, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo e hipófisis, inhiben la producción de FSH, lo que priva a los folículos menos desarrollados del estímulo hormonal necesario para comenzar o completar el proceso de crecimiento (Zelevnik, 1981). Se cree que esta inhibición disminuye la actividad de la enzima aromatasa, que es dependiente de FSH (Hillier, 1994). Esta falta de estrógenos en los folículos de menor grado de maduración impide completar su desarrollo, por lo que estarían destinados a la atresia (Aerts y Bols, 2010b).

D-2. Maduración nuclear o meiótica

Durante el período comprendido entre el pico de LH y la ovulación, el ovocito sufre una serie de cambios en su núcleo y citoplasma, necesarios su maduración. Este proceso incluye la redistribución de organelas celulares, la migración de mitocondrias a una posición perinuclear y la acumulación de gránulos a lo largo del oolema (van den Hurk y Zhao, 2005).

El progreso del ovocito desde el estadio de profase I (P-I) hasta el de meiosis II (M-II) se denomina maduración meiótica. Este proceso se lleva a cabo en aproximadamente 24 horas en rumiantes y se caracteriza por un fuerte incremento en la síntesis de proteínas durante el período denominado “*germinal vesicle breakdown*” (GVBD), que involucra el desarmado de la membrana nuclear e inicio de la condensación de los cromosomas (van den Hurk y Zhao, 2005). Ya que no se produce la transcripción genética *de novo* en este momento del ciclo, las proteínas deben ser sintetizadas a partir de un *pool* de ARNm latente; es decir, que se traduce ARNm preformado (Wrenzycki y col., 2007).

En concreto, la maduración o competencia meiótica consiste en la siguiente secuencia: disolución de la membrana nuclear, la condensación de la cromatina (que lleva a la formación de cromosomas bivalentes distinguibles), la separación de los cromosomas homólogos, la emisión del primer cuerpo polar, y la detención en M-II con los cromosomas alineados en el huso acromático. Los ovocitos que ovulan completan la meiosis con la separación de las cromátidas y la emisión del segundo cuerpo polar (segunda división reduccional) en el momento de la fecundación. Este proceso es inducido por la penetración del espermatozoide y permite que se complete, así, el ciclo celular y ocurra la subsecuente transición desde un tipo de división meiótica a una mitótica (Fan y Sun, 2004). *In vivo*, la meiosis se inicia por el estímulo hormonal de la oleada de LH, pero en condiciones *in vitro* el proceso meiótico continúa aún en medios carentes de LH (Hashimoto y col., 2002; Hashimoto, 2009).

1.3.2 Oviducto

El oviducto es un órgano de aproximadamente 25 a 28 cm de largo en el bovino (Prange y Duby, 2011) con funcionalidades diferentes según cada zona. Este órgano resulta esencial para la capacitación de los espermatozoides, la fertilización del óvulo y el desarrollo embrionario temprano (Killian, 2004). Anatómicamente, el oviducto se divide en cuatro secciones: la unión útero-tubal (UUT), que conecta el útero con el comienzo del oviducto, el istmo, el ampulla y el infundíbulo (Menezo y Guerin, 1997) (Figura i7).

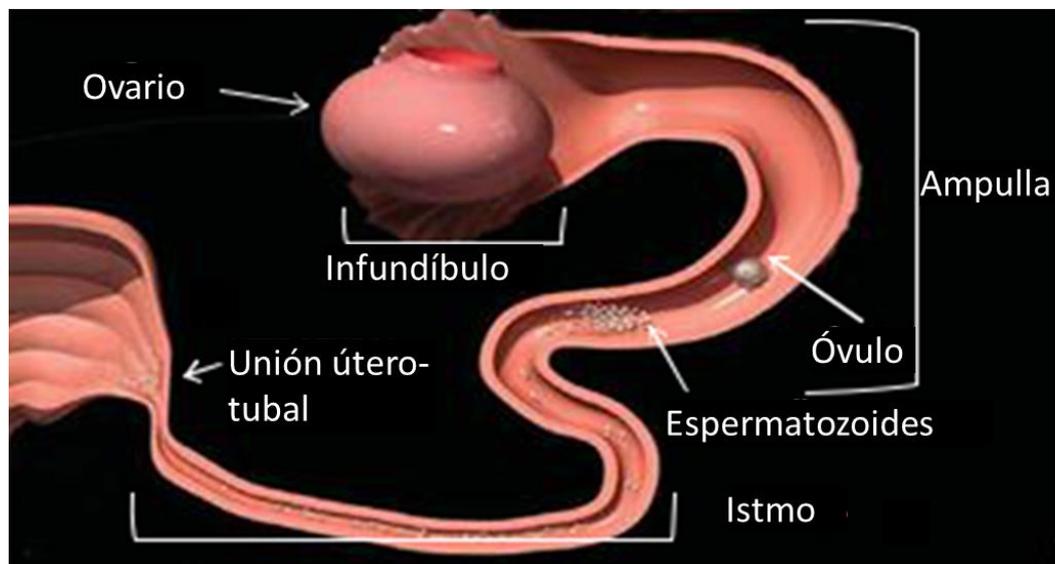


Figura i7. Configuración del oviducto en la hembra bovina. La unión UUT sirve como barrera selectiva permitiendo que solo los espermatozoides sanos ingresen al istmo, donde forman un reservorio. Al liberarse, continúan hasta el ampulla, sitio de la fertilización. Modificado de Dejarnette y Nebel (2013).

La UUT regula el movimiento del embrión hacia el útero por influencia hormonal. Al aumentar las concentraciones de E_2 , la UUT forma un pliegue que bloquea el movimiento embrionario, a la que vez que su descenso endereza el pliegue y permite que el embrión ingrese fácilmente a la luz uterina (Senger, 2003). Esta unión también funciona como un filtro de espermatozoides anormales, ya que su estructura permite que los sanos transiten en el istmo, donde forman un reservorio (Hunter, 1981;

Pollard y col., 1991; Bosch y Wright, 2005). El ámpula es la región superior del oviducto y el sitio de la fecundación. Su región interna consiste en pliegues de la mucosa, con epitelio ciliado (Senger, 2003). En el extremo abierto se encuentra una gran estructura en forma de embudo, llamada infundíbulo. El mismo atrapa al ovocito luego de su liberación desde el ovario, y lo guía hacia el ámpula.

La pared oviductal se compone desde la luz a la periferia de una túnica mucosa interna, una submucosa, una muscular y una serosa (Senger, 2003; Bosch y Wright, 2005). La serosa está compuesta por mesotelio y tejido conectivo submesotelial. La túnica muscular, está formada por dos capas de músculo liso dispuestas en distintas direcciones, cuya función principal es generar contracciones para la progresión y transporte de los espermatozoides y del óvulo hacia el ámpula, en donde se produce la fecundación (Senger, 2003). La submucosa es una capa de tejido conectivo que se ubica entre la muscular y la mucosa. Ésta última, por su parte, consiste de una capa de células epiteliales altas de aspecto columnar que secretan diferentes sustancias necesarias para proveer un ambiente óptimo al óvulo que aún no ha sido fecundado, además de mantener la función espermática hasta la fecundación. Asimismo, ofrece un ambiente favorable para el desarrollo embrionario temprano (Senger, 2003)

Células epiteliales del oviducto bovino (CEOB)

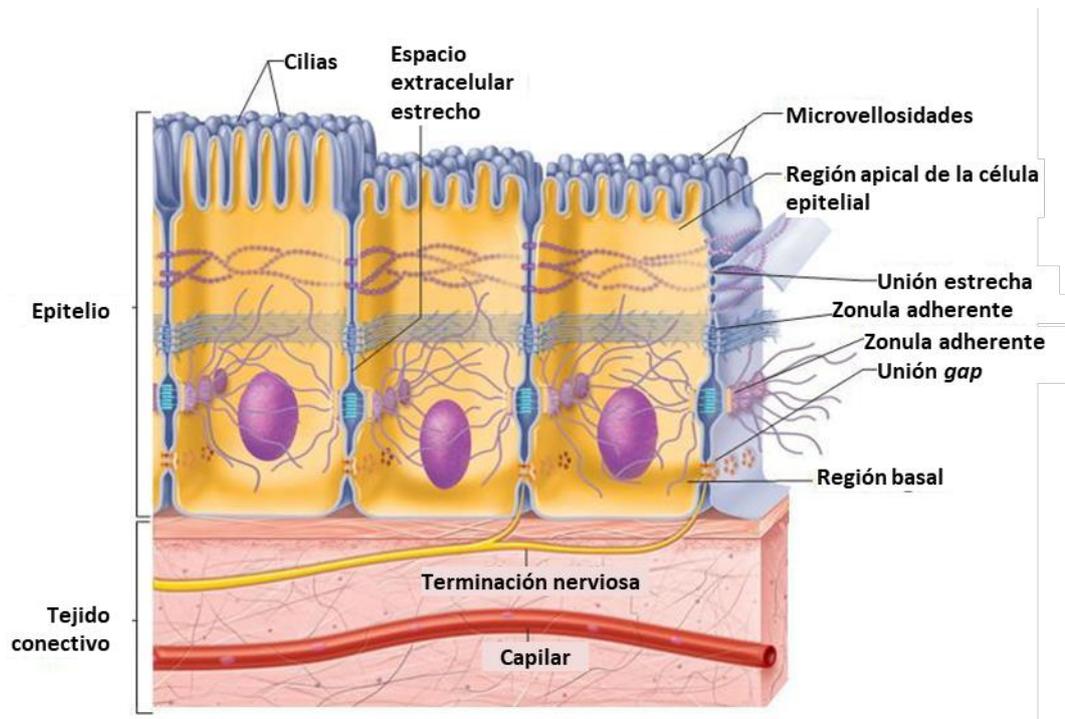


Figura i8. Estructura de célula epitelial con sus uniones intercelulares. La región apical está próxima al lumen mientras que la basal mira al tejido conectivo. Modificado de Deyab (2013).

Como se puede apreciar en la Figura i8, la túnica mucosa oviductal está revestida por las CEOB, compuestas por células ciliadas y secretoras (Yániz y col., 2000) cuya morfología varía de manera dinámica dependiendo del estadio del ciclo estral (Rottmayer y col., 2006). Las células ciliadas son esenciales para el transporte de gametas, mientras que las otras son responsables de sintetizar y liberar productos de secreción (Abe, 1996; Rottmayer y col., 2006).

Las CEOB secretan numerosos factores nutricionales, tales como aminoácidos, piruvato (Kölle y col., 2009), factores de crecimiento como el *IGF* alfa, *FGF*, *VEGF*

(Makarevich y Markkula, 2002; Wolf y col., 2003; Wijayagunawardane y col., 2005), antioxidantes, hipotaurina y taurina (Guérin y col., 2001). Producen, también, factores embriotróficos, entre los cuales la más importante es la glicoproteína específica del oviducto 1 (OVGP1), que participa en la fecundación y en el desarrollo embrionario temprano (Avilés y col., 2010). Por otro lado, las CEOB producen el fluido oviductal, donde ocurren todos los procesos relacionados a las gametas y el embrión temprano.

1.3.3 Ciclo estral bovino

Cuando la hembra alcanza la pubertad manifiesta cambios rítmicos en su conducta sexual (receptividad sexual), denominada celo. Los acontecimientos que comienzan en un estro y finalizan en el siguiente reciben el nombre de ciclo estral. El ciclo estral bovino tiene una duración promedio de 21 días (rango: 17-25) y se produce en forma continua a lo largo del año, por lo que se clasifica a las hembras bovinas como poliéstricas continuas (Hurnik, 1987; Hafez y Palacios Martínez, 1996).

Control del ciclo estral

Eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero

El ciclo estral se encuentra regulado por una interacción hormonal controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario-útero (Figura i9).

a) Hipotálamo

Es un órgano ubicado a la parte baja del cerebro cuyas neuronas, denominadas neuronas endócrinas (Hazum y Conn, 1988), generan la hormona liberadora de

gonadotrofinas o GnRH (Carmel y col., 1976; Anderson y col., 1981; Rodríguez y Wise, 1989).

La GnRH se libera de modo pulsátil a los capilares del sistema porta-hipofisario, y de ahí llega a las células de la adenohipófisis (McDonald, 1978; Hafez y Palacios Martínez, 1996). Esta hormona (un decapeptido) al llegar a la célula gonadotropa se une a un receptor de membrana (Naor, 1990; Conn y col., 1995) y da lugar a cambios moleculares que controlan la producción y secreción de gonadotrofinas (Anderson y col., 1981; Rodríguez y Wise, 1989; Conn y col., 1995).

b) Hipófisis

Es una glándula endócrina constituida por dos porciones bien diferenciadas: la adenohipófisis y la neurohipófisis (Hafez y Palacios Martínez, 1996).

La adenohipófisis sintetiza varios tipos de hormonas, entre las cuales la FSH y la LH tienen un rol destacado en la regulación neuroendócrina del ciclo estral. Estas gonadotrofinas hipofisarias son de tipo glicoproteicas y se encuentran conformadas por dos cadenas polipeptídicas, α y β , que son necesarias para que la hormona tenga funcionalidad biológica. Su mecanismo de acción consiste en la unión de gonadotrofina a receptores de membrana celular y en la estimulación de la adenilatoclasa como segundo mensajero (Combarous, 1988; Bousfield y col., 1994).

Considerando sus funciones más relevantes, la FSH es la responsable de la esteroidogénesis ovárica y el crecimiento y maduración folicular, mientras que la LH también está involucrada en la ovulación, la formación del cuerpo lúteo (CL) y el mantenimiento del mismo (Hafez y Palacios Martínez, 1996).

La neurohipófisis almacena la oxitocina que se produce en el hipotálamo (Hafez y Palacios Martínez, 1996). Entre las diversas funciones de esta hormona se encuentran

la regulación del mecanismo del parto (Bazer y First, 1983), de la bajada de leche (Kucker, 1994) y del proceso de luteólisis (Bazer, 1992).

c) Ovarios

Son órganos cuya función principal es la ovogénesis. Además, poseen función endócrina ya que producen y secretan hormonas. Entre las hormonas sintetizadas por los ovarios podemos mencionar a los estrógenos, la P_4 , la inhibina y la activina.

Los estrógenos, como el $17-\beta E_2$, son hormonas de tipo esteroideas producidas por los folículos ováricos. En cuanto a su síntesis, se ha propuesto que la LH interacciona con su receptor en las células de la teca interna y ellas sintetizan andrógenos. A su vez, éstos pasan a las células de la granulosa, sobre las que actúa la FSH. Esta hormona entonces activa un sistema aromatizante que transforma los andrógenos en estrógenos, los cuales se transportan al líquido folicular y a la circulación general (McDonald, 1978; Holy, 1983; Calandra, 1985; Hafez y Palacios Martínez, 1996). Finalmente, llegan a su órgano blanco y ejercen diversos efectos por medio de los mecanismos de acción propuestos para las hormonas esteroideas (Brann y col., 1995).

Entre los principales órganos blanco de los estrógenos se hallan el sistema nervioso central, la vulva, la vagina, el útero y el oviducto. En el primero, estimulan la conducta del celo, y en el hipotálamo ejercen un *feed back* negativo sobre el generador de pulsos y uno positivo sobre la regulación de la actividad cíclica. En la vulva y la vagina, elevan el flujo sanguíneo (hiperemia) e inducen la congestión, así como la extravasación de líquido (agua y sales) al espacio extracelular. En el útero, los estrógenos trabajan como una hormona de crecimiento al producir la proliferación de las

células y las glándulas endometriales, que aumentan su secreción. Además, se produce una congestión de los vasos sanguíneos con edema del estroma. Por otro lado, las células del miometrio se sensibilizan a la acción de la oxitocina, que favorece la contractibilidad. En el cérvix, los estrógenos producen relajación, aumento de diámetro y la aparición de abundante secreción mucosa; en tanto que, en el oviducto, aumenta la actividad del músculo liso y la secreción serosa, junto con la estimulación de la proliferación celular (Hafez y Palacios Martínez, 1996).

La P_4 es una hormona esteroidea producida por el CL gracias a la acción de la LH. A nivel hipotalámico, la P_4 ejerce un efecto de *feed back* negativo sobre el control de la secreción de GnRH (McDonald, 1978; Holy, 1983; Calandra, 1985; Hafez y Palacios Martínez, 1996; Weems y col., 1998).

En el endometrio, la P_4 produce un aumento en el espesor del epitelio y las glándulas uterinas llegan a su máximo desarrollo. Éstas secretan sostenidamente un líquido que contiene proteínas séricas, glicoproteínas y minerales, esenciales para la nutrición del cigoto. En el miometrio, la P_4 inhibe las contracciones, lo cual es necesario en la gestación, y en el cérvix se establece un tapón mucoso; esto convierte al útero en una cámara de incubación.

La inhibina (Kaneko y col., 1993, 1997; Findlay, 1994; Vale, 1994; Akagi y col., 1997) es una hormona proteica producida por las células de la granulosa del folículo ovárico, que participa en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH. En este sentido, ejerce un *feed back* negativo en la hipófisis que disminuye su secreción. Por otro lado, posee una acción paracrina positiva por sobre la producción de andrógenos ejercida por la LH en las células tecaes (Findlay, 1993).

La activina es generada por las células de la granulosa y tiene un papel autócrino tanto sola como en conjunto con FSH por sobre dichas células, manteniendo el desarrollo de la foliculogénesis (Findlay, 1993).

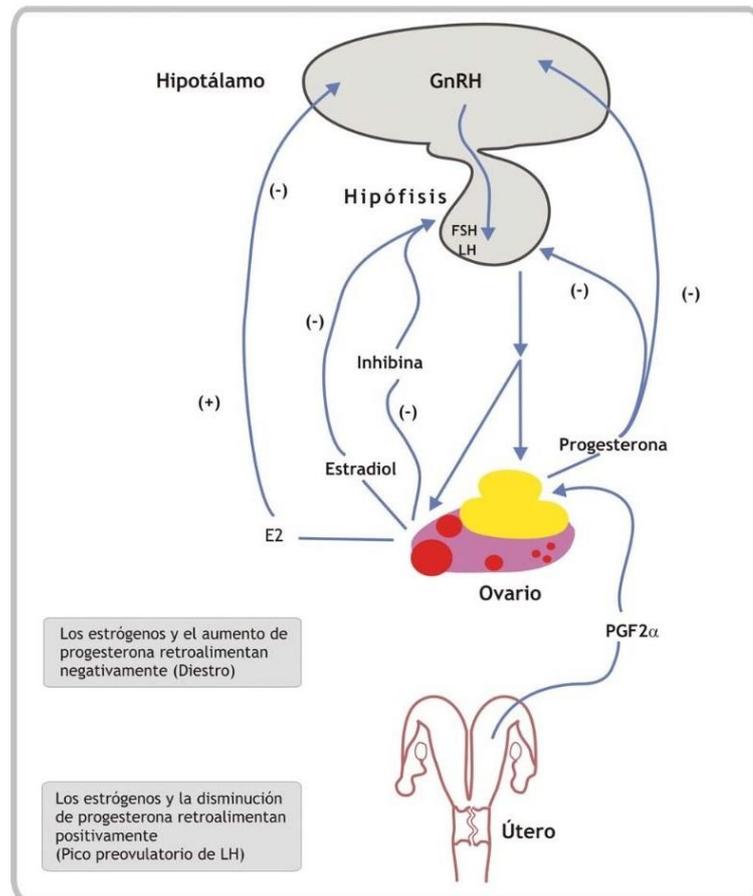


Figura i9. Mecanismos de retroalimentación entre el hipotálamo, la hipófisis, el ovario y el útero. González (2018).

d) Útero

Este órgano produce dos clases de prostaglandinas, la PGF2α (Danet-Desnoyers y col., 1994) y la PGE₂ (Shemesh y col., 1997). La PGF2α se secreta en forma pulsátil (Kindahl y col., 1976) e interviene en la regulación neuroendócrina del ciclo estral por medio de un efecto luteolítico (Knickerbocker y col., 1986), mientras que la PGE₂ participa en el ablandamiento del cérvix durante el proestro y estro (Shemesh y col.,

1997). Por último, PGE₂ también interviene en el proceso del parto (Bazer y First, 1983).

La principal fuente de PFG2 es la célula endometrial (Danet-Desnoyers y col., 1994), aunque se cree que las células del estroma también contribuirían en su producción (Poyser, 1995).

Fases del ciclo estral

El ciclo estral en la vaca se puede dividir en dos fases: la luteal (14 a 18 días de duración) y la folicular (4 a 6 días de duración). La primera, también conocida como metaestro y diestro, es el período que sigue a la ovulación, y en el cual se forma el CL. La fase folicular (o proestro y estro) comprende el tiempo entre la degeneración del CL (luteólisis) y la ovulación (Figura i10). Durante la fase folicular es cuando ocurre la maduración definitiva y la ovulación del folículo ovulatorio, y el ovocito se libera al oviducto para ser fecundado (revisión bibliográfica por Forde y col., 2011).

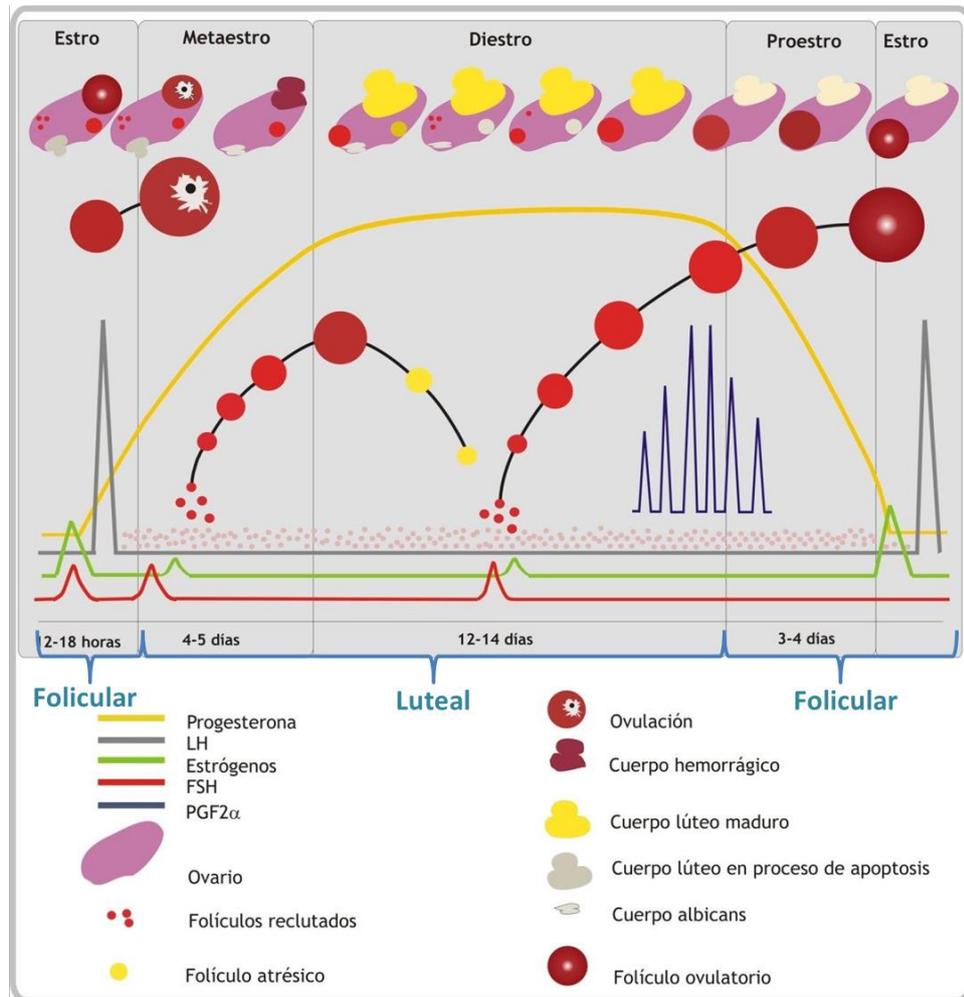


Figura i10. Ciclo estral en la especie bovina. Modificado de González (2018)

Fase folicular

Este es un estadio caracterizado por la existencia de niveles basales de P_4 en circulación debido a la regresión del CL. El rápido crecimiento del folículo dominante preovulatorio eleva la concentración de E_2 , situación que, junto con el descenso de la P_4 , induce un pico de GnRH y dispara el comportamiento del estro. Éste implica que las vacas o vaquillonas se mostrarán sexualmente receptivas y tolerarán ser montadas (Frandsen y col., 2009). El disparo de GnRH provoca a su vez un pico preovulatorio de LH. En cuanto a la FSH, su secreción decrece como consecuencia del *feed back* negativo del E_2 y la inhibina, excepto en el momento en que ocurre en pico

preovulatorio de LH, cuando puede producirse un pico de FSH (Kaneko y col., 1991). En las 4 a 12 horas posteriores al pico de LH, aumenta la concentración basal y la amplitud de los pulsos de FSH (Walters y Schallenberger, 1984), que se relaciona con la primera onda de crecimiento folicular (Turzillo y Fortune, 1990) (Adams y col., 1992). Después de 12 a 24 horas de comenzado el celo, el sistema nervioso de la vaca se vuelve refractario al E_2 y merman todas las manifestaciones psíquicas de dicho período.

Eventualmente, al darse las condiciones de coexistencia de concentraciones basales de P_4 con pulsos de LH cada 40-70 minutos, por 2 o 3 días, es que ocurre la ovulación del folículo dominante (Roche, 1996). A diferencia de otras especies, la ovulación se presenta luego del período de celo, entre las 10 y 20 horas posteriores (Luque y col., 1983). El primer evento que se desencadena es un aumento en el flujo sanguíneo del folículo ovulatorio (Spey y Lipner, 1994). Posteriormente, se produce edema en las tecas interna y externa, se disocia el cúmulus *oophorus*, cesa la inhibición de la meiosis y se elimina el primer corpúsculo polar (Lipner, 1988; Hafez y Palacios Martínez, 1996). Finalmente, se produce la ruptura del folículo, activada por la acción de $PGF2\alpha$. Ésta produce contracciones ováricas que fomentan dicha ruptura, además de favorecer la contracción del folículo. El proceso culmina en la liberación del ovocito (Hafez y Palacios Martínez, 1996).

Fase luteal

El comienzo de la fase luteal se conoce como metaestro y comúnmente dura 3-4 días. Se caracteriza por la formación del CL a partir del folículo remanente que colapsó al ovular, denominado cuerpo hemorrágico (Figura i10). Luego de la ovulación, se

producen una serie de cambios morfológicos, endocrinológicos y bioquímicos que dan lugar a que las células foliculares se transformen en luteales. Se presentan receptores para LH y FSH, principalmente los primeros a medida que se va desarrollando el CL (Niswender y col., 1994; Smith y col., 1994). La estructura del CL está comprendida por dos tipos de células: las luteales pequeñas, derivadas de la teca interna, y las grandes, derivadas de la granulosa

El período diestro se caracteriza por el predominio de CL, cuyo desarrollo y mantenimiento es regulado por la LH (Peters y col., 1994; Vizcarra y col., 1997). Su secreción de tipo pulsátil es necesaria para sostener los niveles de P_4 en los primeros 12 días del ciclo estral. Se cree que luego dicha secreción pulsátil no sería indispensable y sería modulada por bajas concentraciones de LH (Peters y col., 1994) o por mecanismos independientes de dicha hormona (Wiltbank, 1994).

Durante la fase luteal, la LH se secreta en pulsos de baja frecuencia (Walters y Schallenberger, 1984; Peters, 1985) y gran amplitud (Schallenberger y col., 1985). En la regulación de su secreción intervienen la P_4 , el E_2 y los neuropéptidos opioides, en una acción conjunta para anular la frecuencia pulsátil de dicha gonadotropina (Stumpf y col., 1993). Si la fecundación no se produce, el CL permanece funcional hasta el día 16-19 del ciclo estral, para luego entrar en regresión y que se establezca la preparación para un nuevo ciclo (Luque y col., 1983). A partir de aquí, los niveles de P_4 empiezan a descender y la frecuencia pulsátil de LH se incrementa (Roberson y col., 1989).

1.4 El zinc

1.4.1 Introducción

El Zinc (Zn^{+2}) es un microelemento cuya función esencial en los organismos vivos se conoce desde 1869 (McCall y col., 2000). Se trata de un oligoelemento involucrado en una amplia gama de procesos celulares, como la proliferación, la respuesta inmune, la defensa antioxidante, la expresión génica y la actividad de la ARN polimerasa (Powell, 2000; Dreosti, 2001; Prasad y Kucuk, 2002). Además, participa en la estabilidad y regulación génica, forma parte de más de 3000 factores de transcripción, de más de 300 enzimas incluyendo la cobre/zinc superóxido dismutasa (Cu/Zn^{+2} -SOD) y de varias proteínas involucradas en la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), (Prasad, 1998, 2003; Dreosti, 2001; Prasad y Kucuk, 2002; Andreini y Bertini, 2012). El Zn^{+2} se encuentra presente en casi todas las células animales, sin embargo, las concentraciones presentes en el músculo esquelético y en el hueso representan el 90 % del Zn^{+2} total del individuo (Cousins, 1999). Se lo considera el oligoelemento intracelular más abundante, y forma parte de las metaloproteínas Zn^{+2} -dependientes que se encuentran en el interior del citoplasma, el núcleo y las organelas incluyendo el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi, las vesículas secretoras y las mitocondrias (Eide, 2006).

En los mamíferos, la homeostasis del Zn^{+2} es esencial para una óptima función metabólica en general y en los procesos reproductivos en particular. En este sentido, la deficiencia de Zn^{+2} puede resultar en teratogénesis fetal, gestaciones prolongadas, dificultades en el trabajo de parto, y bajo peso y debilidad al nacer (Favier, 1992; Bedwal y Bahuguna, 1994). Por otro lado, la biodisponibilidad de Zn^{+2} es importante para una gran variedad de eventos reproductivos, entre los que se encuentran el crecimiento folicular, la maduración ovocitaria, la fecundación y el desarrollo embrionario (Falchuk, 1998; Hostetler y col., 2003).

1.4.2 Distribución de Zn^{+2} en la célula

En las células, el Zn^{+2} varía en su proporción distribuyéndose por el citoplasma (50%), el núcleo (30-40%) y la membrana celular (10%) (Thiers y Vallee, 1957; Haase, 2014). Se cree que la concentración total de Zn^{+2} se encontraría en el rango de entre decenas o cientos de micromoles (Palmiter y Findley, 1995; Krężel y Maret, 2006; Colvin y col., 2008). De todos modos, dado que este mineral se une a cantidades de proteínas y, por otra parte, es capturado hacia el interior de organelas y compartimientos subcelulares, la concentración de Zn^{+2} citosólico lábil (“libre”) es muy baja, valorada en magnitudes entre picomolares y nanomolares (Sensi y col., 1997; Outten y O’Halloran, 2001; Vinkenborg y col., 2009; Qin y col., 2011). Se ha demostrado que la concentración de Zn^{+2} puede fluctuar en respuesta a varios estímulos, como en el caso de los fenómenos de “onda” y “chispa” de Zn^{+2} . El primero da nombre a la liberación de Zn^{+2} desde la región perinuclear, incluyendo al RE, proceso importante en varias funciones de señalización (Yamasaki y col., 2007; Taylor y col., 2012). El segundo, a la expulsión de Zn^{+2} acumulado en el proceso de activación ovocitaria, que requiere la disminución de los niveles de este mineral en el ovocito una vez iniciadas las variaciones en las concentraciones de Ca^{+2} , correspondientes a dicha etapa (Kim y col., 2011). Por otro lado, se ha encontrado que las fluctuaciones temporales en los niveles de Zn^{+2} juegan un papel crucial en las vías de señalización celular que lo utilizan como mediador (Outten y O’Halloran, 2001; Maret, 2013).

Las mediciones de Zn^{+2} libre en organelas intracelulares han arrojado valores de 0,14 pM en la mitocondria (Park y col., 2012), 0,2 pM en la matriz mitocondrial (McCranor y col., 2012), 0,9 pM en el RE y 0,2 pM en el Golgi (Qin y col., 2011).

1.4.3 Funciones del Zn^{+2}

El Zn^{+2} participa en múltiples y variados procesos biológicos, tanto en su forma iónica como parte estructural y/o funcional de una gran variedad de proteínas. También participa en la respuesta inmune y la defensa antioxidante (Powell, 2000; Prasad y Kucuk, 2002). De acuerdo a la ubicación del Zn^{+2} en las metaloproteínas, este microelemento puede actuar como catalizador (carboxipeptidasa A), cocatalizador (fosfatasa alcalina, fosfolipasa C, nucleasa P1 y leucina aminopeptidasa) (Vallee y Auld, 1990; Vallee y Falchuk, 1993; Andreini y Bertini, 2012) o con funciones estructurales (Cu^{+2}/Zn^{+2} -SOD y “dedos de Zn^{+2} ”) (Krishna y col., 2003; Gamsjaeger y col., 2007; Andreini y col., 2011). Cuando el Zn^{+2} se encuentra en el sitio catalítico, su forma iónica participa directamente en el proceso de conformación o ruptura de uniones moleculares. Por último, el Zn^{+2} , en su función estructural, participa en la estabilización de la estructura terciaria de las enzimas, de manera análoga al puente disulfuro (Schmalen y col., 2014). En todos los casos, la eliminación del Zn^{+2} de su sitio de acción puede llevar a la pérdida de la actividad enzimática (McCall y col., 2000).

El Zn^{+2} forma parte de aproximadamente 300 enzimas (Andreini y Bertini, 2012). Algunas de estas pertenecen al grupo de las metaloproteinasas (*matrix metaloproteinases*) como las colagenasas, gelatinasas y endometasas, entre otras. Estas enzimas intervienen en la proliferación y motilidad celular, en el proceso de cicatrización de heridas, en la angiogénesis y en el control de eventos reproductivos claves como la ovulación, la implantación embrionaria, la embriogénesis, la involución uterina, la involución mamaria y prostática, y la proliferación endometrial (Hulboy y col., 1997; Amălinei y col., 2007). Las enzimas alcohol deshidrogenasa, fosfatasa

alcalina, anhidrasa carbónica y carboxipeptidasas A y B también forman parte de la extensa lista de enzimas Zn^{+2} -dependientes (Underwood y Suttle, 1999).

En cuantos a las funciones estructurales, los “dedos de Zn^{+2} ” fueron definidos por Laity y colaboradores (2001) como cualquier dominio proteico pequeño, funcional y plegado de forma independiente que requiere la coordinación de uno o más iones de Zn^{+2} para estabilizar su estructura. Las proteínas con dedos de Zn^{+2} forman parte de una gran cantidad de receptores de membrana, nucleoproteínas y más de 1000 factores de transcripción (Cousins, 1999; Beyersmann y Haase, 2001; Andreini y Bertini, 2012). Las funciones de estas estructuras son extraordinariamente diversas e incluyen el reconocimiento del ADN, el empaquetamiento del ARN, la activación de la transcripción, la regulación de la apoptosis, el ensamble y plegamiento de las proteínas y la unión de éstas a lípidos (Laity y col., 2001). Es principalmente por la participación del Zn^{+2} en la expresión génica que este mineral posee vital importancia en la glucólisis, la síntesis de ADN, la síntesis de ácido nucleico, en la división celular y el metabolismo de las proteínas (Underwood y Suttle, 1999; Andreini y Bertini, 2012).

Además de lo anteriormente expuesto, ha sido creciente a lo largo de los años la evidencia que señala al Zn^{+2} iónico como posible factor de señalización tanto extra como intracelularmente (Beyersmann y Haase, 2001; Fukada y Kambe, 2014). Según estos autores, el Zn^{+2} podría unirse a un receptor específico y regular una función orgánica al igual que lo hacen las hormonas locales.

1.4.4 Regulación del Zn^{+2} en la célula

La captación y liberación de Zn^{+2} en las células del organismo se realiza por múltiples mecanismos, entre los que se encuentran: el cotransporte unido a aminoácidos

(cisteína o histidina), la unión al receptor de transferrina y la unión a proteínas transportadoras específicas o semiespecíficas de Zn^{+2} (Tapiero y Tew, 2003). El estudio de éstas últimas ha ganado particular atención hasta la actualidad [revisiones por Goff (2018) y Kambe (2015); ver sección a continuación]. Estos sistemas de captación, distribución, almacenamiento y liberación son complejos y fundamentales para la homeostasis de Zn^{+2} a nivel tanto celular como subcelular.

La homeostasis intracitoplasmática de Zn^{+2} también se encuentra regulada por las metalotioneínas (MT) (Coyle y col., 2002). Las MT son un grupo de proteínas de bajo peso molecular (6000-7000 kDa) que contienen 60-68 residuos de aminoácidos, de los cuales 25-30 % son cisteína (Powell, 2000). Cada molécula de MT contiene 7 átomos de Zn^{+2} que pueden ser liberados, a pesar de su elevada estabilidad termodinámica, de acuerdo a la demanda celular (Maret, 2001). Este hecho, sumado a la capacidad de la MT de atravesar diferentes compartimientos celulares le otorga a esta proteína un rol esencial en el metabolismo del Zn^{+2} (Maret, 2003). La MT permite la amortiguación de la concentración intracitoplasmática de Zn^{+2} de una manera controlada, tomando o cediendo átomos de Zn^{+2} de acuerdo a las circunstancias (Tapiero y Tew, 2003). Además, participa en la translocación del Zn^{+2} entre los diferentes compartimientos celulares (Maret, 2003).

En el murino, se ha estudiado que la expresión de las variedades I y II de las MT se incrementa significativamente ante exceso de Zn^{+2} en la célula. El mecanismo que conduce dicho aumento involucra la unión del *metal-response element-binding transcription factor-1* (MTF-1) al *metal response element* (MRE) localizado en el promotor (Stuart y col., 1985). Cuando los niveles de Zn^{+2} se elevan, MTF-1 juega un rol central en la homeostasis de Zn^{+2} al incrementar la transcripción de un set de genes

relacionados a la reducción de su toxicidad en caso de incrementarse sus concentraciones, tales como MTs, ZnT1 y ZnT2 (Stuart y col., 1985; Langmade y col., 2000; Guo y col., 2010), y también al inhibir la expresión de una batería de genes involucrados en la captación de Zn^{+2} , como ZIP10 (Wimmer y col., 2005; Lichten y col., 2011)

1.4.5 Transportadores de Zn^{+2}

Para que el Zn^{+2} lleve a cabo sus funciones biológicas, es necesario un sistema de transporte específico y de fina regulación que permita su paso a través de la membrana celular. Este sistema es imprescindible, además, para el mantenimiento de la homeostasis celular del Zn^{+2} , que involucra su captación, distribución, almacenaje y liberación. Es por esto que las proteínas transportadoras de Zn^{+2} son fundamentales para la fisiología de este metal. En particular, las denominadas ZnT (*Zn transporter*) y ZIP (*Zrt-, Irt-related proteins*) contribuyen en un amplio abanico de funciones fisiológicas y celulares (inmunes, endócrinas, reproductivas, óseas, neuronales) gracias a su estricto control de la homeostasis de Zn^{+2} .

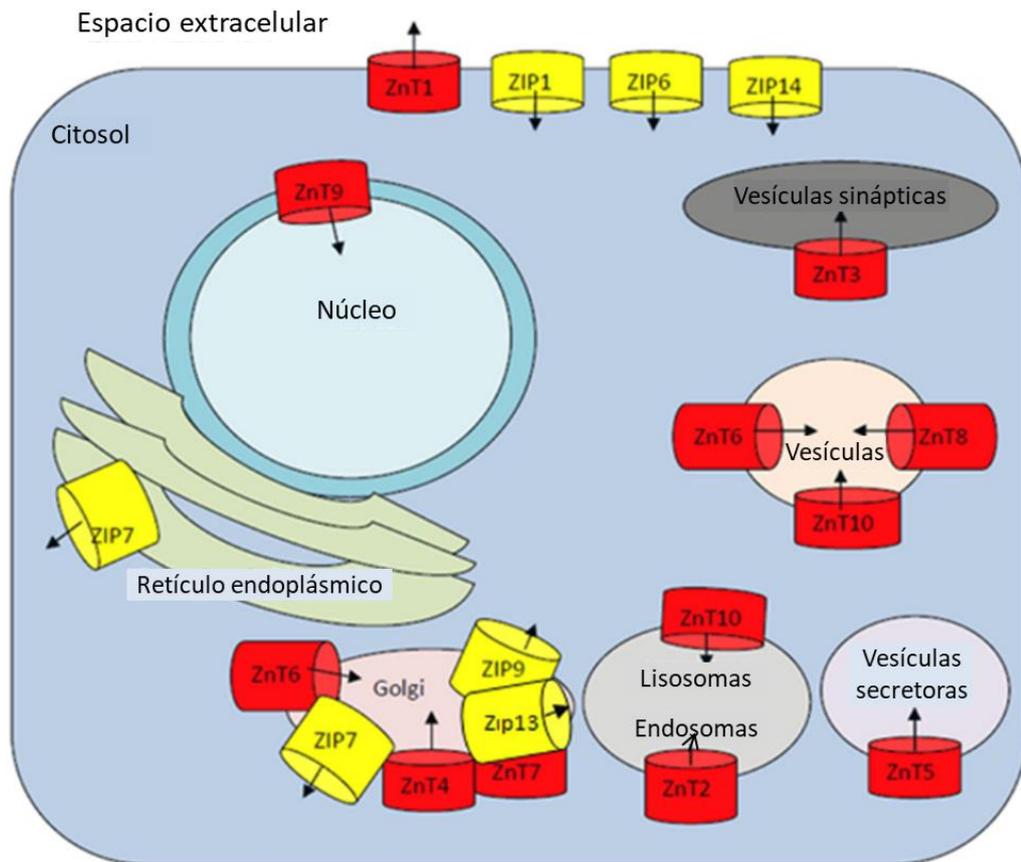


Figura i11. Localización subcelular y dirección de transporte de ZIPs y ZnTs. Se muestra la localización principal de los ZnT y de los ZIP de acuerdo a los datos disponibles en la bibliografía. Aunque se exponen de manera estática, la mayoría de los transportadores se redistribuyen en respuesta a diversos estímulos (Kambe, 2013). El Zn^{+2} citosólico se transporta a o desde el interior de compartimientos subcelulares, incluyendo las vesículas sinápticas o los gránulos de insulinas, específicos de ciertos tipos celulares. Modificado de Baltaci y Yuce (2018).

Los transportadores ZnT pertenecen a la familia de transportadores 30A (SLC30A), de 10 miembros (ZnT1 a ZnT10) (Palmiter y Huang, 2004). Movilizan el Zn^{+2} desde el citosol hasta el espacio extracelular y/o el lumen de compartimientos intracelulares, y en general operan mediante el transporte hacia el lado luminal (Huang y Tepaamorndech, 2013; Kambe, 2012; Lichten y Cousins, 2009) (Figura i11). En cuanto a la estructura conformacional, aunque no hay datos concretos en la actualidad, está ampliamente descrito un homólogo bacteriano, el YiiP (Lu y Fu, 2007; Lu y col.,

2009; Coudray y col., 2013; Gupta y col., 2014), cuyo mecanismo de intercambio Zn^{2+}/H^+ se halla conservado en mamíferos (Ohana y col., 2009; Shusterman y col., 2014). En base a las propiedades estructurales de YiiP, se ha caracterizado bioquímicamente a los ZnT (Figura i12a). De este modo, se predice que cuentan con seis hélices transmembrana y forman homodímeros (Suzuki y col., 2005; Fukunaka y col., 2009; Murgia y col., 2009; Salazar y col., 2009; Itsumura y col., 2013; Lasry y col., 2014), a excepción de ZnT5, que posee nueve hélices y forma heterodímeros con ZnT6 (Kambe y col., 2002; Fukunaka y col., 2009; Lasry y col., 2014).

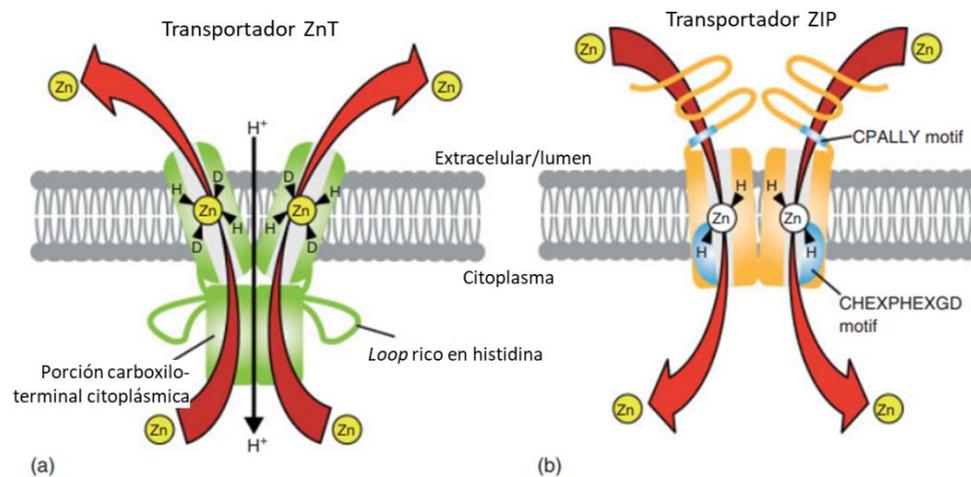


Figura i12. Estructuras de los transportadores ZnT y ZIP. Modificado de Kambe (2013).

Por su parte, los transportadores ZIP constituyen 14 miembros (ZIP1-ZIP14), ordenados en la familia SLC39A (Eide, 2004; Jeong y Eide, 2013). Realizan la captación de Zn^{+2} en el medio extracelular y en el lumen de los compartimientos intracelulares para su posterior liberación en el citosol (Jeong y Eide, 2013; Kambe, 2012; Lichten y Cousins, 2009), (Figura i11). Fue gracias a la secuenciación al completo del genoma humano que se identificaron todos los ZIP conocidos al momento en mamíferos (Kambe y col., 2006; Lichten y Cousins, 2009). La mayoría de los ZIP se

localizan en la membrana plasmática, y su número se incrementa ante condiciones deficientes de Zn^{+2} , a excepción de ZIP5 (Gaither y Eide, 2001; Dufner-Beattie y col., 2003; Liuzzi y col., 2004; Liu y col., 2008; Lichten y col., 2011). Por el contrario, frente al exceso de Zn^{+2} en la célula, se retrotraen y/o degradan rápidamente (Huang y Kirschke, 2007a; Mao y col., 2007; Weaver y col., 2007). En cuanto a estructura, no existen modelos de los ZIP o sus homólogos en la actualidad. Sin embargo, trabajos con gráficos de hidrofobicidad sugieren que estos transportadores poseen ocho hélices transmembrana (Jeong y Eide, 2013; Kambe, 2012; Lichten y Cousins, 2009). Se conoce, por otro lado, que tanto los ZIP como sus homólogos forman homodímeros a la hora de transportar Zn^{+2} (Lin y col., 2010; Bin y col., 2011) (Figura i12b). Con respecto a los mecanismos de transporte, no hay una caracterización definitiva actualmente para los ZIP, aunque se sugiere un sistema simportador de tipo $NaHCO_3/Zn^{2+}$ en varios casos (Gaither y Eide, 2000; He y col., 2006; Girijashanker y col., 2008). Finalmente, los ZIP transportan principalmente Zn^{+2} , pero también pueden movilizar Fe^{+2} (Liuzzi y col., 2006; Gao y col., 2008), Mn^{+2} y cadmio (Cd^{+2}) (Girijashanker y col., 2008; Fujishiro y col., 2012; Jenkitkasemwong y col., 2012).

Regulación transcripcional y estímulo hormonal

Investigaciones previas han revelado que la expresión génica de los transportadores de Zn^{+2} responde a una variedad de estímulos, entre los que se encuentran las citoquinas (Liuzzi y col., 2005), los lipopolisacáridos (Ishihara y col., 2006), los factores de transcripción, como el mencionado MTF-1 (Langmade y col., 2000; Liu y col., 2013; Miyai y col., 2014), el estrés oxidativo (Homma y col., 2013), la hipoxia (Zhao y col., 2015), la concentración misma de Zn^{+2} (Ryu y col., 2008; Guo y

col., 2010) y hormonas como la testosterona y el estrógeno (Manning y col., 1988; Cousins y col., 2006; Thomas y col., 2014).

La sensibilidad de diversos transportadores de Zn^{+2} al estímulo hormonal se ha detectado en variedad de tejidos y órganos reproductivos en mamíferos. En tejidos susceptibles a la acción de hormonas esteroideas, como la placenta, la glándula mamaria y la próstata, la expresión de ZIP6 es elevada (Taylor y Nicholson, 2003). Por otro lado, en tejido mamario tumoral, la expresión de este transportador resulta inducible no sólo por estrógenos, sino también por la 5 α -dihidroxi-testosterona y el factor de crecimiento epidérmico (Manning y col., 1988; El-Tanani y Green, 1995). Siguiendo con dicho tejido, la expresión de ZIP7, ZIP 8 y ZIP14 también se incrementa en respuesta a estrógenos (Taylor y col., 2007). ZnT 9, que actúa además como coactivador de receptores nucleares, aumenta su expresión en respuesta al E₂ (Chen y col., 2005). Otros estudios, llevados a cabo en células mamarias no tumorales, mostraron que la prolactina ejerce una acción regulatoria sobre la transcripción de ZIP3 (Kelleher y Lönnnerdal, 2005) y ZnT2 (Qian y col., 2009).

1.5 Maduración *in vitro* (MIV) de COC

La MIV es la base de muchas tecnologías aplicadas a la reproducción. En bovinos, ha permitido aumentar el potencial reproductivo de las hembras y el desarrollo de otras tecnologías, como la clonación y la producción de animales transgénicos. Por otro lado, como modelo experimental para la investigación de desarrollo embrionario temprano, permite la obtención en el laboratorio de un gran número de embriones a bajo costo, a partir de ovocitos extraídos de ovarios de animales sacrificados para consumo humano.

A pesar de que los ovocitos madurados *in vitro* manifiestan tasas de maduración nuclear, fecundación y clivaje similares a los ovocitos madurados *in vivo*, su capacidad de desarrollo es significativamente menor. Mientras que el 85% de los ovocitos madurados *in vivo* son capaces de ser fecundados y dar origen a un embrión, sólo un tercio de los ovocitos de MIV obtienen esa capacidad. Esta diferencia se debería fundamentalmente al origen de los ovocitos (Blondin y col., 2002). La maduración *in vivo* ocurre en folículos preovulatorios, luego de una etapa de selección y dominancia que dura unos 5 días, durante los cuales crecen desde los 2 mm hasta los 15 mm de diámetro (Driancourt, 1991). En contraposición, el origen de los ovocitos de MIV es muy heterogéneo, ya que se obtienen de folículos subordinados o en crecimiento que pueden estar a entre 4 y 10 días de una posible ovulación. Estos ovocitos no completarían la pre-maduración, o capacitación, que ocurre *in vivo* en los folículos dominantes y mediante la cual alcanzarían la capacidad de desarrollo completa (Hyttel y col., 1997).

El tamaño de los folículos está directamente relacionado con la capacidad de desarrollo ya que un mayor porcentaje de ovocitos obtenidos de folículos mayores de 6 mm son capaces de dar origen a embriones en comparación con los obtenidos de folículos de entre 2 y 6 mm (Lonergan y col., 1994). Por otro lado, esto también significa que existe una proporción de ovocitos que adquiere la capacidad de desarrollo en el estadio folicular de 3 mm sin necesidad de la pre-maduración en el folículo preovulatorio.

En la práctica de la MIV, los ovocitos bovinos se obtienen por aspiración de folículos antrales de 2 a 8 mm de diámetro de ovarios obtenidos en mataderos. Luego, son seleccionados morfológicamente por homogeneidad de citoplasma y presencia de

un cúmulus de células de la granulosa compacto y que rodee completamente al ovocito conformando el COC (Figura 15, izquierda). Estos parámetros son indicadores de capacidad de desarrollo (Leibfried y First, 1979).

In vitro, los COC bovinos reinician la meiosis espontáneamente luego de ser retirados del ambiente folicular. Al cabo de 24 horas alcanzan el estadio de metafase II (MII) donde se arrestan nuevamente hasta el momento de la fecundación. Durante este periodo, también se produce la expansión del cúmulus, el cual es uno de los indicadores morfológicos de maduración citoplasmática (Figura i13, derecha). Esta expansión se ve favorecida por el agregado de FSH y de un 5% de suero fetal bovino durante la maduración.

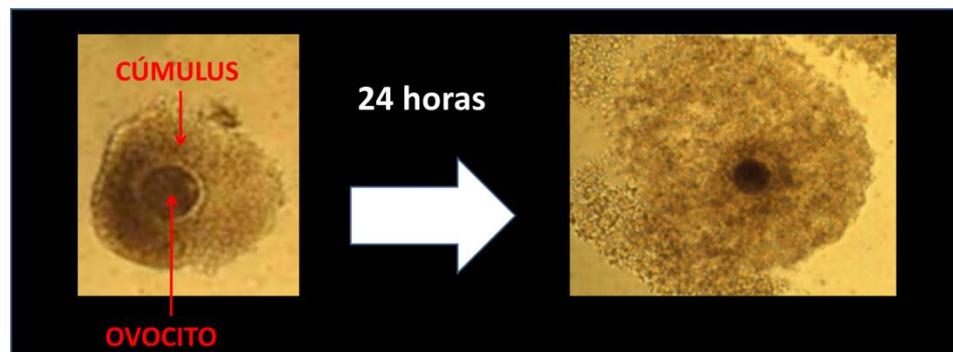


Figura i13. Expansión de células del cúmulus luego de 24 horas de maduración. Izquierda: ovocito rodeado por un cúmulus compacto al inicio de la MIV. Derecha: ovocito rodeado por un cúmulus completamente expandido después de un periodo de 24 horas de MIV.

Estudios *in vitro* revelaron que durante el proceso de maduración del ovocito es fundamental la presencia de aminoácidos y sustratos energéticos (Sutton y col., 2003), ya que se produce un aumento en la actividad glucolítica, en la oxidación de la glucosa y de la glutamina (Zuelke y Brackett, 1993) y en el metabolismo oxidativo del piruvato

luego de la ruptura de la GVBD (Kim y col., 1993; Rieger y Loskutoff, 1994). Se ha demostrado, además, que hormonas presentes en el medio de maduración, como la LH, pueden afectar los procesos celulares pre- y post- desarrollo preimplantacional (Rose y Bavister, 1992; Trounson y col., 2001).

1.6 Cultivos primarios de células del epitelio oviductal (CEOB)

A lo largo del tiempo, se han utilizado diversos métodos para la obtención de CEOB viables. Los mecánicos incluyen lavado oviductal, compresión con pinzas (*squeezing*) y presión sobre las paredes. Los métodos enzimáticos, por su parte, requieren el uso de colagenasa y tripsina (Walter, 1995; Reischl y col., 1999). En comparación, el primer tipo de metodología demanda menos tiempo y costos, son sencillos de realizar y minimizan el daño celular (Reischl y col., 1999). El lavado es un procedimiento relativamente inofensivo para la viabilidad celular, pero el rendimiento en cantidad de células no suele ser suficiente para llevar adelante un cultivo. Las compresiones y presiones, sin embargo, reclutan un gran número de células viables aptas para experimentos. En contraposición, los métodos enzimáticos, aunque también dan lugar a un alto rendimiento en número, llevan a menores tasas de viabilidad celular, probablemente por el daño perpetrado por las enzimas.

Se han llevado adelante cultivos en diversos materiales de soporte celular, tales como el polímero Thermanox, nitrato de celulosa, vidrio, gasa, nylon, policarbonato y nucleopor. El Thermanox, seguido por el vidrio y el nitrato de celulosa, demostró sustentar satisfactoriamente el crecimiento de células epiteliales (Reischl y col., 1999). Sin embargo, estos sistemas de soporte celular tienen un gran efecto sobre el estado de diferenciación de las células epiteliales cultivadas. También se ha demostrado que los

materiales de soporte permeables llevan a las células a mayores estadios de diferenciación que los materiales no permeables (Reischl y col., 1997). También se han empleado sistemas estáticos y de perfusión; los primeros contienen medio de cultivo que se cambia después de un período de tiempo particular, mientras que los de perfusión mantienen un flujo constante de medio sobre las células en crecimiento. Los cultivos de perfusión tienden a mantener los aspectos morfológicos y fisiológicos de las células cultivadas durante un período prolongado en comparación con el sistema estático (Reischl y col., 1999). Por otro lado, en una comparación directa entre las CEOB cultivadas en monocapa o en cultivo en suspensión, solo las células en suspensión mantuvieron su morfología con cilias y su actividad secretora (Walter, 1995).

Hipótesis más relevante

La concentración de Zn^{+2} intracelular en el complejo ovocito-cúmulus y en las células del oviducto depende de los transportadores específicos de este mineral, cuya expresión está condicionada por la acción de las hormonas involucradas en las etapas de maduración y fecundación del ovocito.

Objetivo general

Estudiar la homeostasis del Zn^{+2} en el complejo ovocito-cúmulus y las células epiteliales del oviducto de la hembra bovina en presencia o ausencia de estradiol (E_2), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteneizante (LH) y progesterona (P_4).

Objetivos específicos

Para investigar la influencia de las hormonas reproductivas sobre la homeostasis de Zn^{+2} se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer el efecto de la presencia de E_2 , FSH, LH y P_4 sobre la concentración intracelular de Zn^{+2} en el complejo ovocito-cúmulus y en células del oviducto.
2. Determinar el efecto de la presencia de E_2 , FSH, LH y P_4 sobre la expresión de transportadores de Zn^{+2} : ZIP6, ZIP8, ZIP14, ZnT3, ZnT7 y ZnT9 en el complejo ovocito-cúmulus y células del oviducto.

3. Estudiar la expresión de transportadores de Zn^{+2} : ZIP6, ZIP8, ZIP14, ZnT3, ZnT7 y ZnT9 en el complejo ovocito-cúmulus y células del oviducto obtenidos de hembras bovinas en los diferentes períodos del ciclo estral.
4. Evaluar el efecto del Zn^{+2} y el E_2 sobre el proteoma de las células epiteliales del oviducto bovino.

CAPÍTULO 1

Efecto de las hormonas E₂, FSH y LH sobre la
concentración de Zn⁺² libre intracelular y la expresión de
sus transportadores en el COC bovino

1 INTRODUCCION

El Zn^{+2} es un oligoelemento involucrado en una amplia variedad de procesos celulares, como la proliferación, la respuesta inmune, la defensa antioxidante y la expresión génica, entre otros (Powell, 2000; Dreosti, 2001; Prasad y Kucuk, 2002). En mamíferos, la homeostasis del Zn^{+2} resulta esencial para una óptima función metabólica, incluso en los procesos reproductivos. En este sentido, la biodisponibilidad de Zn^{+2} es importante para una gran variedad de fenómenos entre los que se encuentran el crecimiento folicular, la maduración del ovocito, la fecundación y el desarrollo embrionario (Falchuk, 1998; Hostetler y col., 2003).

Trabajos previos han destacado la participación del Zn^{+2} en el tracto reproductivo de la hembra bovina, tanto en la viabilidad de las células somáticas como en la maduración de los ovocitos (Picco y col., 2010; Anchordoquy y col., 2011). En los últimos años, se ha demostrado que los niveles intracelulares de este mineral se elevan durante la maduración del ovocito, lo cual resulta necesario para la culminación de la primera división meiótica (Kim y col., 2010) y el posterior establecimiento de la MII (Suzuki y col., 2010; Bernhardt y col., 2012). Finalmente, el avance de la MII y la consumación de la meiosis requieren como condición esencial la disminución de su concentración intracelular. Dicha reducción se ve facilitada por una rápida expulsión de Zn^{+2} desde el ovocito al ambiente externo en un proceso conocido como “chispas de zinc” (*zinc sparks*), el cual resulta crítico para la activación y reanudación del ciclo celular (Kim y col., 2011). En un hallazgo reciente, se encontró que los ovocitos bovinos también sufren dicho fenómeno, como consecuencia de su activación química o de su unión al espermatozoide (fecundación). Debido a que el flujo de salida de Zn^{+2} del ovocito bovino es muy similar al descrito en humanos, monos y

murinos, podría suponerse que es un evento altamente conservado entre los mamíferos (Que y col., 2019).

De lo expuesto anteriormente, se desprende la importancia de la preservación de niveles de Zn^{+2} adecuados para el correcto funcionamiento celular y del ovocito en particular. Por lo tanto, resulta valioso conocer cómo se encuentra regulada la expresión de los transportadores de Zn^{+2} , que son los actores claves en el metabolismo y la homeostasis celular de este mineral (Kambe y col., 2015). Investigaciones previas han revelado que la expresión génica de los transportadores de Zn^{+2} puede ser modificada por una variedad de estímulos, entre los que se encuentran las citoquinas (Liuzzi y col., 2005), los lipopolisacáridos (Ishihara y col., 2006), diferentes factores de transcripción (Langmade y col., 2000; Liu y col., 2013; Miyai y col., 2014), el estrés oxidativo (Homma y col., 2013), la hipoxia (Zhao y col., 2015), la concentración misma de Zn^{+2} (Guo y col., 2010; Ryu y col., 2008) y hormonas como la testosterona y el estrógeno (Cousins y col., 2006; Thomas y col., 2014). Sin embargo, aún no se ha estudiado la regulación del transporte de Zn^{+2} en el COC del bovino.

El objetivo de este capítulo fue investigar si las hormonas FSH, LH y el 17-beta E_2 intervienen en la regulación de la homeostasis del Zn^{+2} , modificando la expresión génica de sus transportadores y su biodisponibilidad durante la MIV del COC bovino. Para ello se evaluó la expresión génica de Slc39a6 (ZIP 6), Slc39a8 (ZIP 8), Slc39a14 (ZIP 14), Slc30a3 (ZnT 3), Slc30a7 (ZnT 7), Slc30a9 (ZnT 9) y los niveles intracelulares del Zn^{+2} biodisponible en el ovocito y las CC luego de la MIV.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Todos los reactivos necesarios para la preparación de los medios se compraron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE. UU.), excepto que se indique lo contrario. Los COC se maduraron *in vitro* en medio TCM-199 suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO_3), suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v), 0,2 mM de piruvato de sodio, 1 mM de glutamina y 50 mg/ml de kanamicina. Además, se agregaron FSH (Bioniche Life Sciences Inc., Belleville, Canadá), LH, E_2 y sulfato de Zn^{+2} (ZnSO_4) (Merck, Tokio, Japón) al medio de MIV.

2.2 Complejos ovocito-cúmulus (COC)

Los COC se obtuvieron a partir de ovarios de frigorífico extraídos de hembras jóvenes Aberdeen Angus, independientemente de la etapa del ciclo estral. Los ovarios se colocaron en solución fisiológica a 37-39°C y se mantuvieron en termos hasta llegar al laboratorio donde se lavaron tres veces en solución fisiológica estéril. De cada ovario se aspiraron los folículos de 2 - 8 mm usando una aguja de 18 G conectada a una jeringa estéril de 10 ml. Los COC obtenidos se colectaron con un estereomicroscopio (Nikon, Tokio, Japón) a menor aumento (30 x) y se colocaron en medio TCM-199 suplementado con 15 mM de HEPES y 10% (v/v) de SFB (medio de mantenimiento). Se seleccionaron para la MIV los COC cuyos ovocitos presentaron el citoplasma homogéneo y las células del cúmulus compactas.

2.3 Maduración *in vitro* (MIV)

Para la maduración, se tomaron grupos de 10 COC que se transfirieron a microgotas de 40 μl de medio de MIV cubiertas por aceite mineral y se incubaron por 24 hs a 39 °C en atmósfera gaseada con 5 % de CO_2 y humedad a saturación

(Anchordoquy y col., 2011). El medio de MIV fue suplementado con FSH (1 $\mu\text{g/ml}$), LH (10 $\mu\text{g/ml}$) y/o E_2 (1 $\mu\text{g/ml}$) (Furnus y col., 1998), con o sin el agregado de 1,2 $\mu\text{g/ml}$ de Zn^{+2} (concentración considerada “adecuada” para el plasma sanguíneo; Picco y col., 2010). De esta forma quedaron constituidos los siguientes tratamientos; a) Control (sin hormonas, sin Zn^{+2}); b) Zn_T (sin hormonas, con Zn^{+2}); c) E_{2T} ; d) E_2+Zn_T ; e) FSH_T ; f) $\text{FSH}+\text{Zn}_T$; g) LH_T ; h) $\text{LH}+\text{Zn}_T$; i) 3H_T ($\text{E}_2+\text{FSH}+\text{LH}$); j) $3\text{H}+\text{Zn}_T$. Debido a la presencia de SFB en el medio de MIV se midieron las concentraciones de Zn^{+2} y de las mencionadas hormonas antes de constituir los diferentes tratamientos. Las mediciones hormonales se llevaron a cabo en el Departamento de Química Clínica del laboratorio comercial Iglesias-Haramburu (La Plata, Argentina). La cuantificación de Zn^{+2} se realizó en el Laboratorio de Nutrición Mineral de la Facultad de Cs. Veterinarias de la UNLP mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (GBC 902) (Anchordoquy y col., 2019; Picco y col., 2012). El análisis del medio de MIV indicó la presencia de 5,8 pg/ml de E_2 , 0,39 pg/ml de FSH y 0,3 $\mu\text{g/ml}$ de Zn^{+2} . No se detectó LH. Por lo tanto, las concentraciones halladas fueron consideradas despreciables.

2.4 Medición de los niveles de Zn^{+2} libre intracelular con el indicador selectivo FluoZin-3 AM

Para evaluar los niveles intracelulares de Zn^{+2} en el ovocito y las CC luego de la MIV, se utilizó el colorante fluorescente FluoZin-3 AM (InvitroGen, EE. UU.). Se trata de un indicador permeable a las células y selectivo de Zn^{+2} , capaz de unirse al Zn^{+2} libre o de enlaces intracelulares débiles y revelar los niveles de este mineral en la célula (Lisle y col., 2013). Para ello, se utilizaron un total de 45 COC por tratamiento

(obtenidos en 3 réplicas, $n= 15$ por réplica). Los COC madurados se lavaron con solución salina de Hanks equilibrada con HEPES (HHBSS) para eliminar el medio MIV. Luego, los COC se incubaron a temperatura ambiente en una solución $1 \mu\text{M}$ de FluoZin-3 AM (concentración final) durante 30 min en oscuridad, se lavaron con HHBSS durante 15 minutos y luego se los sometió a un lavado final en HHBSS para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, los COC se transfirieron a un portaobjetos para ser observados con un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX40, Japón). Para observar los COC se utilizó un filtro NB (longitudes de onda de 470-490 y 520 nm para la excitación y emisión, respectivamente) y un aumento de 100X. Los ovocitos y CC en cada COC mostraron fluorescencia verde y las intensidades obtenidas correspondieron a los niveles intracelulares de Zn^{+2} como se describió anteriormente. Las imágenes se tomaron con una cámara de alta resolución Sony CCD-IRIS (Sony, Japón).

En cada réplica experimental se incluyó un control de fluorescencia que consistió en 15 COC madurados en las condiciones del tratamiento Control e incubados con el colorante FluoZin-3 AM para luego ser fotografiados. Posteriormente, los COC se incubaron con $10 \mu\text{M}$ del quelante de metales pesados N,N,N',N'-tetrakis (2-piridilmetil) etano-1,2-diamina (TPEN) durante 30 min, y se fotografiaron nuevamente. La ausencia de fluorescencia en estos COC confirmó que la fluorescencia emitida por los COC tratados y teñidos se debía específicamente a la presencia de Zn^{+2} biodisponible y no a simple acumulación de reactivo (Que y col., 2019). Además, esta prueba también permitió descartar autofluorescencia por parte de los COC.

Para evaluar la intensidad de la fluorescencia, se utilizó el software ImageJ v 1.48 (Wayne Rasband, National Institute of Health, EE UU) que permitió determinar la

intensidad de la fluorescencia emitida en ovocitos y CC por separado en cada COC. Los valores de intensidad de fluorescencia observados corresponden a la intensidad promedio del área seleccionada (área del ovocito o área del cúmulus) menos el valor de fluorescencia del *background*. La intensidad promedio del área seleccionada (para cada tipo celular) equivale a la intensidad de píxeles dividida por la cantidad de píxeles (Ferreira y Rasband, 2012).

2.5 Obtención de ARN y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

En este ensayo, se utilizaron un total de 750 COC para tres réplicas (250 COC por réplica, 25 COC por tratamiento). Al finalizar la MIV, las CC se separaron de los ovocitos mediante pipeteo. Luego, se utilizó el RNeasy Micro Kit (Qiagen, Alemania) para extraer el ARN total de ovocitos y CC, respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El contenido de ARN y la calidad en cada muestra se verificaron con un espectrofotómetro NanoVue (NanoVue™ - GE Healthcare Limited, Reino Unido) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y a un *ratio* de 260/280 nm, respectivamente. Para la síntesis de ADNc, se preparó una mezcla de reacción que incluyó 1,5 µg de ARN total, hexámeros *random* y transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen-Life Technologies, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. En todas las reacciones de retrotranscripción se incluyó un control sin ARN y un control negativo de retrotranscripción (sin la enzima transcriptasa reversa).

Se prosiguió a evaluar la expresión génica de los transportadores Slc39a6 (ZIP 6), Slc39a8 (ZIP 8), Slc39a14 (ZIP 14), Slc30a3 (ZnT 3), Slc30a7 (ZnT 7) y Slc30a9 (ZnT 9) en los ovocitos y CC. Para el presente estudio se escogieron dichos

transportadores teniendo en cuenta que han mostrado alta expresión génica en ovocitos y/o CC en humanos (Ménézo y col., 2011) . Para llevar a cabo dicha determinación, se diseñaron *primers* por medio del software Primer Premier (PREMIER Biosoft International, EE UU). Se seleccionaron aquellos pares de *primers* que presentaban una temperatura de *melting* (Tm) similar, contenido GC intermedio (40- 60%) y la menor complementariedad de secuencia, para minimizar la formación de estructuras secundarias y dímeros de *primer*. También se tuvo en cuenta que fueran capaces de abarcar uniones exón-exón, para evitar una posible amplificación de ADN genómico (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 *Primers* utilizados en los ensayos de expresión génica.

Gen	Dirección	Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)
Slc39a6	Forward	CCCTCCAAAGACCTATTC	175	52
	Reverse	ATCACCACTCAGTGTCCC		
Slc39a8	Forward	GGA CTCAGCACCTCCATAGC	165	55
	Reverse	GCCACCAAGATGCCAAAAG		
Slc39a14	Forward	GAGTTCCAGGAGTTCTGCCC	146	60
	Reverse	ACGCAGAGGAGACCGTACC		
Slc30a3	Forward	ACGCAGAGGAGACCGTACC	170	60
	Reverse	TGATTGCCTCCATCCTCATC		
Slc30a7	Forward	CAAGGTCCCAACATAAAC	136	52
	Reverse	AATGCAAAGA ACTCCTCC		
Slc30a9	Forward	GCTTCGTAGGAGTGCTCG	164	57
	Reverse	GTGGGTTGCCTGTTATGG		
ACTB	Forward	GGCAGGTCATCACCATCGG	164	60
	Reverse	CAGCACCGTGTTGGCGTAG		
PPIA	Forward	GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	117	58
	Reverse	TCCTTGATCACACGATGGAA		

La RT- PCR se realizó en un termociclador Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemania) y la mezcla de reacción (de volumen final 20 µl) incluyó la PCR Master Mix

1X (KAPA HRM FAST Master Mix, Biosystems, Woburn, EE. UU.), 1 μ l de ADNc y 1 μ l de cada *primer* (concentración final de 0,5 μ M). Las condiciones de ciclado consistieron en: inicialización (95 °C, 3 min), desnaturalización (95 °C, 15 min), *annealing* (las temperaturas particulares para cada par de *primers* figuran en la Tabla 1.1; 20s, 40 ciclos) y extensión (72 °C, 25 s). La especificidad de cada amplicón se comprobó individualmente mediante una curva de *melting* proyectada por el termociclador. Los experimentos incluyeron controles negativos (sin ADNc) y se realizaron por triplicado.

Con el fin de calcular las eficiencias de amplificación para cada par de *primers*, se realizaron curvas de rango dinámico. Esto consistió en amplificaciones por duplicado de ADNc obtenido de tejido de abomaso e hipotálamo, en diluciones 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 y 1/1000. En todos los ensayos, las curvas de calibración tuvieron una pendiente entre -3,2 y -3,5. Entre los duplicados, la desviación estándar fue, en todos los casos, menor a 0,167. Estos valores se encontraron dentro de lo recomendado para realizar estudios de expresión génica relativos (Bustin, 2002). Finalmente, la eficiencia de la RT-PCR para cada gen se determinó mediante un modelo de regresión lineal, de acuerdo con la ecuación $E = 10^{-1 / \text{pendiente}}$, obteniéndose valores aceptables superiores al 90%.

Los valores de expresión relativa (ER) para cada gen y tratamiento se determinaron con el método 2^{-DDCt} utilizando β -actina (ACTB) y ciclofilina-A (PPIA) como normalizadores para los datos de ovocitos y CC, respectivamente. El tratamiento Control se tomó como referencia (ER = 1). Con el fin de establecer si los genes endógenos seleccionados eran aptos para utilizarlos en los estudios de expresión génica, se estudiaron los niveles de expresión de cada uno en las muestras de ovocitos y CC y

en los controles positivos de expresión de los transportadores (abomaso e hipotálamo bovino). Se efectuó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis para comparar los diferentes grupos, no encontrándose diferencias significativas en los valores de Ct de ACTB y PPIA, respectivamente, entre los mismos. De este modo, se validó su utilización como genes *housekeeping* para los estudios de expresión génica.

2.6 Secuenciación de amplicones

Los productos de PCR se secuenciaron (Macrogen Inc., Corea) con el objetivo de evaluar la calidad de los amplicones. Por otra parte, al momento de realizar los experimentos de expresión génica, la base de datos del NCBI contaba con secuencias no definitivas de ARNm de los transportadores (sólo presentaba secuencias predichas por bioinformática o provisionarias). Por lo tanto, su secuenciación permitiría obtener evidencia experimental de las mismas.

En primer lugar, se verificó la integridad y el tamaño de cada amplicón mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y luego se los cuantificó por espectrofotometría. Posteriormente, se purificó y secuenció en ambas cadenas utilizando los mismos *primers* de PCR. Las secuencias resultantes se alinearon y editaron por medio del software ProSeq 3.2 (Filatov, 2002) para después insertarlas en la herramienta bioinformática BLAST (NCBI), que permite hacer un chequeo de identidad contra la base de datos existente. Finalmente, se obtuvieron con éxito las secuencias de ADNc amplificado de los transportadores Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9 (Tabla 1.2) con una identidad verificada del 100% y sin sustituciones, deleciones o inserciones, lo que proporciona evidencia experimental de las secuencias sólo predichas hasta ese momento.

Tabla 1.2 Secuencias de ADNc de los transportadores Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9 obtenidas a partir de amplicones de PCR

Gen	Secuencia de ADNc (producto de PCR)	Tamaño del fragmento (pb)	Código de acceso de GenBank
Slc39a6	TCCCTCCAAAGACCTATTCTTTACAAAT AGCCTGGGTGGTGGCTTATAGCCATTT CCGTCATCAGTTTCTGTCTTTGCTGGGT GTGATCTTAGTGCCTCTCATGAATCGAG TGTTTTTCAAGTTTCTTCTGAGTTTCCTT GTGGCATTGGCTGTCGGGACACTGAGTG GT	173	MK332118
Slc39a8	ACTCAGCACCTCCATAGCCATCCTATGT GAGGAGTTCCCTCATGAATTAGGGGACT TTGTGATCCTACTCAATGCAGGAATGAG CACTCGACAAGCCTTGTTATTCAATTTC CTTCTGTCATGTTCTGCTATGTTGGGCT AGCTTTTGGCATCTTGGTGGGC	163	MK341547
Slc39a14	GAGTTCCAGGAGTTCTGCCCCACCATCC TCCAGCAGCTGGACTCCAGGGCCTGCTC CTCCGAGAACCAGGAGAATGAGGAGAA CGAGCAGACAGAAGAGGGGAGGCCAG CTCGGTGGAAGTTTGGGGGTACGGTCTC CTCTGCGTA	147	MK482694
Slc30a9	GCTTCGTAGGAGTGCTCGGGCCAAAGG AATGTCATTTTACAAGTATGTAATGGAA AGTCGTGATCCTAGTACAAATGTTATAT TACTGGAGGATACTGCAGCTGTGTTGGG AGTGACAATAGCAGCCACTTGTATGGG CCTTACCTCCATAACAGGCAACCCAC	164	MK425690

Como se mencionará más adelante, en ovocitos y en CC no se detectó la expresión de Slc30a7, en tanto que la de Slc30a3 fue muy leve. Por lo tanto, no fue posible secuenciarlos.

2.7 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño en bloque completamente aleatorio con 4 arreglos 2 x 2 factorial de las variables principales (Zn^{+2} , E_2 , FSH, LH o 3H). Los modelos estadísticos incluyeron el efecto aleatorio del bloque (día de la recolección de los COC, $n = 3$ para cada ensayo), el efecto fijo de las variables principales “ Zn^{+2} ” y “hormona” (E_2 , FSH, LH y 3H) y la interacción de segundo orden ($Zn^{+2} * E_2$, $Zn^{+2} * FSH$, $Zn^{+2} * LH$ y

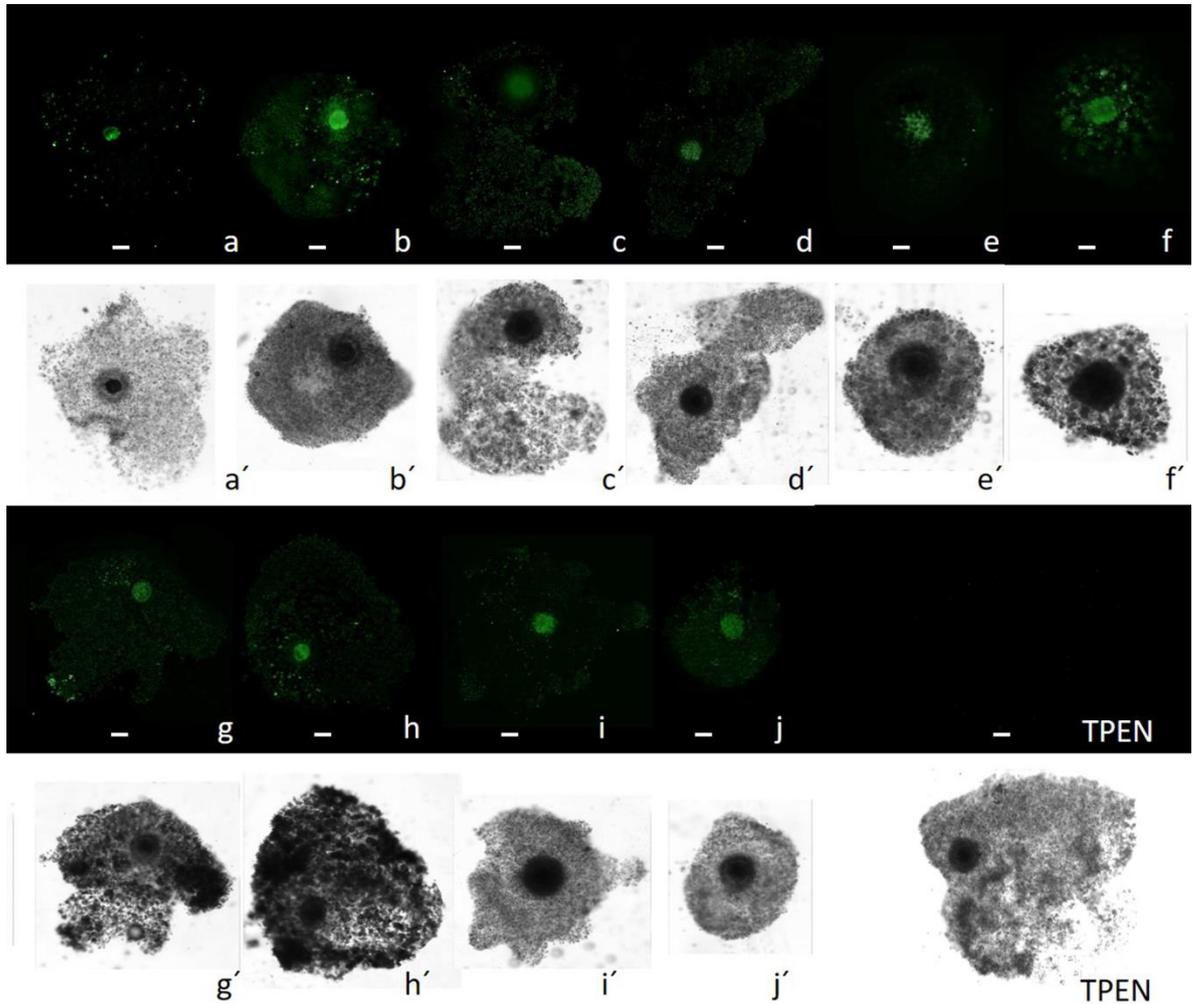
Zn⁺²*3H). Los efectos de las variables principales sobre las variables respuesta [intensidad de fluorescencia (IF) y ER del ARNm] se analizaron mediante un modelo de regresión lineal utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute, Cary, NC, EEUU). Además, se evaluó el efecto del tipo celular (ovocito vs CC) sobre la intensidad de la fluorescencia. Los resultados se expresan como medias de los mínimos cuadrados \pm error estándar de la media (EEM). Se estableció la significación estadística en $p \leq 0,05$ para los efectos principales y $p \leq 0,10$ para la tendencia e interacciones biológicas. Para cada uno de los arreglos factoriales el término “Control” hace referencia a la condición del medio en el cual no hay presencia de Zn⁺² ni de hormona (E₂, FSH, LH o 3H).

3 RESULTADOS

3.1 Niveles intracelulares de Zn⁺² en el COC luego de su exposición al tratamiento hormonal y al Zn⁺² durante la maduración *in vitro* (MIV)

En la Figura 1.1 se muestran imágenes representativas de los COC luego de su maduración y tinción con FluoZin-3 AM. Al emplear el quelante TPEN, de alta afinidad por el Zn⁺², la señal fluorescente disminuyó, indicando que la fluorescencia observada se debió específicamente a la presencia de Zn⁺².

Figura 1.1 Imágenes representativas de COC teñidos luego de la MIV con FluoZin-3 AM acompañados de su correspondiente contraste de interferencia diferencial (*DIC*).



Los COC se maduraron en medio de MIV suplementado con E_2 (1 $\mu\text{g/ml}$), FSH (1 $\mu\text{g/ml}$), LH (10 $\mu\text{g/ml}$) o $E_2 + \text{FSH} + \text{LH}$ (3H), con o sin el agregado de 1,2 $\mu\text{g/ml}$ de Zn^{+2} . Por lo tanto, quedaron conformados los siguientes tratamientos: a) Control (sin hormonas, sin Zn^{+2}); b) Zn_T (sin hormonas, con Zn^{+2}); c) E_{2T} ; d) $E_2 + \text{Zn}_T$; e) FSH_T ; f) $\text{FSH} + \text{Zn}_T$; g) LH_T ; h) $\text{LH} + \text{Zn}_T$; i) $3H_T$; j) $3H + \text{Zn}_T$. La concentración final del fluoróforo durante la incubación fue de 1 μM . Los COC emitieron fluorescencia, cuya intensidad corresponde a los niveles de Zn^{+2} libre intracelular. La correspondiente fotografía *DIC* de cada COC se muestra debajo de la fluorescente (imágenes a' a j'). Se incluyó un control de fluorescencia con TPEN. El aumento utilizado fue de 100X. Barra de escala = 400 μm . COC: complejo ovocito-cúmulo. MIV: maduración *in vitro*. Zn^{+2} : zinc; E_2 : estradiol 17-beta; FSH: hormona foliculo estimulante; LH: hormona luteinizante.

3.1.1 Ovocitos

En los ovocitos, el efecto de cada variable principal (hormonas y Zn^{+2}) sobre la IF se presenta en la Tabla 1.3. Sin embargo, el efecto que provoca cada hormona, es decir su presencia en el medio, varía según se encuentre o no presente el Zn^{+2} , dado que las hormonas presentaron interacción con el mineral ($3H*Zn^{+2}$, $p= 0,10$; $E2*Zn^{+2}$, $p= 0,08$; $FSH*Zn^{+2}$, $p= 0,03$ y $LH*Zn^{+2}$, $p= 0,03$). El efecto de cada hormona sobre la IF según se encuentre presente o no el Zn^{+2} se muestra en la Figura 1.2.

El panel correspondiente a la interacción $Zn^{+2}*3H$ (Figura 1.2 A) muestra que 3H redujo la IF cuando el Zn^{+2} estuvo presente (Zn^{+2} vs $3H+Zn^{+2}$) pero no lo hizo en ausencia de Zn^{+2} ($3H$ vs Control). El panel correspondiente a la interacción $Zn^{+2}*E_2$ (Figura 1.2 B) muestra que el E_2 aumentó la IF cuando el Zn^{+2} estuvo ausente (E_2 vs Control) pero no lo hizo cuando el Zn^{+2} estuvo incluido (E_2+Zn^{+2} vs Zn^{+2}). En la Figura 1.2 C ($Zn^{+2}*FSH$) se observa que la FSH aumentó la IF cuando el Zn^{+2} estuvo ausente (FSH vs Control) pero no lo hizo en presencia del mineral ($FSH+Zn^{+2}$ vs Zn^{+2}). En la Figura 1.2 D ($Zn^{+2}*LH$) se observa que la LH aumentó la IF en ausencia de Zn^{+2} (LH vs Control) pero no lo hizo en su presencia ($LH+Zn^{+2}$ vs Zn^{+2}).

3.1.2 Células del cúmulus

En las CC, la presencia de las diferentes hormonas, solas o combinadas, no modificó la IF; excepto el E_2 (tendencia al aumento) (Tabla 1.3). Por otro lado, la presencia de Zn^{+2} incrementó la IF (Tabla 1.3). No se observó interacción $Zn^{+2}*3H$ ($p = 0,78$) ni $Zn^{+2}*E_2$ ($0,55$). Sin embargo, la IF en respuesta a las hormonas FSH y LH, respectivamente, fue distinta ante la presencia del Zn^{+2} en el medio ($Zn^{+2}*LH$, $p < 0,01$; $Zn^{+2}*FSH$, $p = 0,15$; Figura 1.2).

La Figura 1.2 C (Zn^{+2} *FSH) muestra que no se registraron cambios significativos en la IF por efecto de la FSH (tanto en presencia como en ausencia de Zn^{+2}) a pesar de la interacción significativa entre esa hormona y el mineral. Por otro lado, en la Figura 1.2 D (Zn^{+2} *LH) se observa que la LH aumentó la IF en ausencia de Zn^{+2} (LH vs Control) pero la disminuyó en su presencia (LH+ Zn^{+2} vs Zn^{+2}).

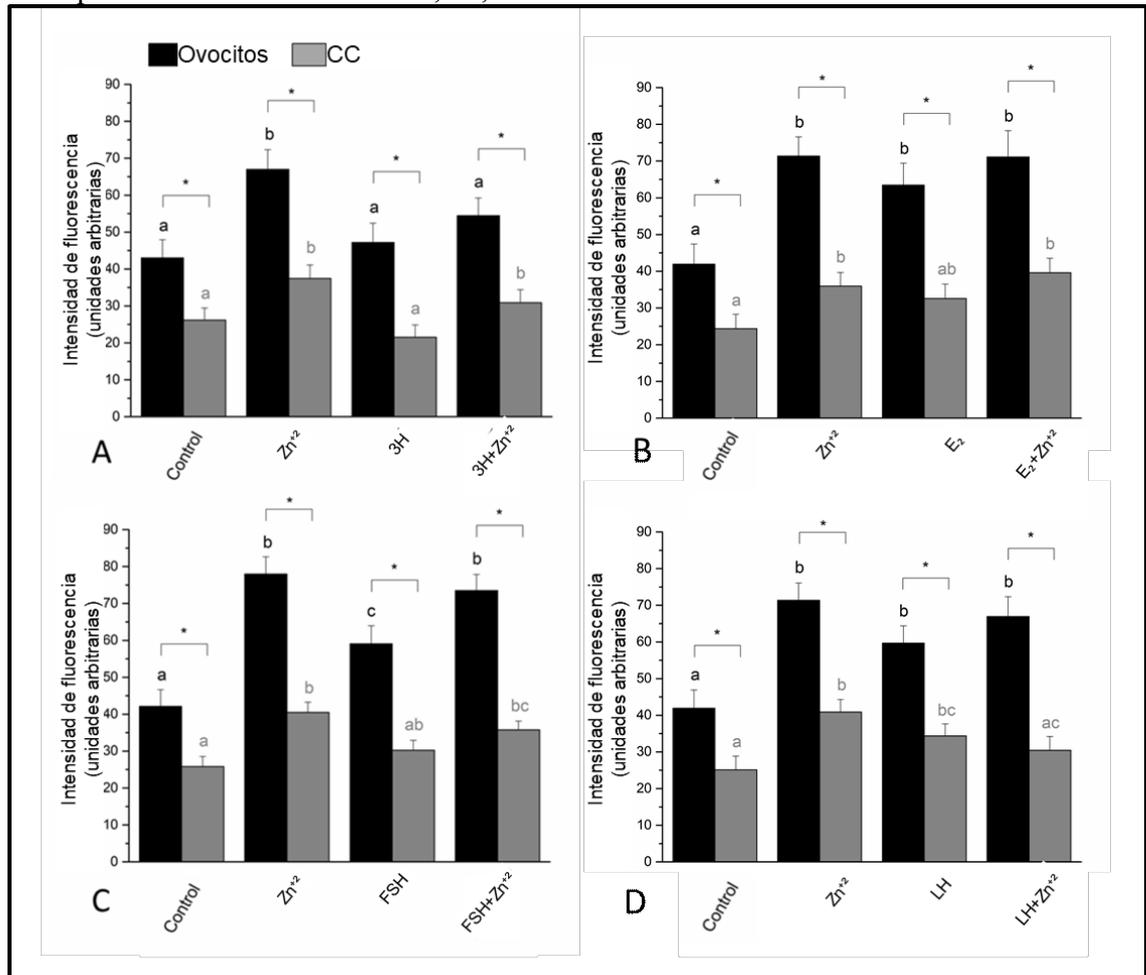
Finalmente, se comparó el valor de IF presente en ovocitos y CC en cada una de las condiciones estudiadas (Figura 1.2 A-D). Se observó que los niveles intracelulares de Zn^{+2} en ovocitos fueron mayores que en CC en todos los casos ($p < 0,01$).

Tabla 1.3 Efectos del Zn^{+2} , 3H, E_2 , FSH o LH sobre los niveles intracelulares de Zn^{+2} en ovocitos y CC luego de la MIV

Intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias)										
	Zn^{2+}		3H		E_2		FSH		LH	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
Ovocitos	49.62 ± 3.56 ^a	69.21 ± 3.70 ^b	55.00 ± 3.71	50.84 ± 3.61	56.65 ± 3.75	67.28 ± 4.61 [†]	60.04 ± 3.16	65.54 ± 3.26	56.65 ± 3.29	63.31 ± 3.46
Cúmulus	27.55 ± 2.22 ^a	37.27 ± 2.53 ^b	31.81 ± 2.46	26.22 ± 2.42	30.18 ± 2.48	36.09 ± 2.88 [†]	32.61 ± 2.13	32.95 ± 1.99	33.02 ± 2.45	32.42 ± 2.50

La tabla muestra el efecto de cada variable principal; Zn^{+2} , 3H (E_2 +FSH+LH), E_2 , FSH y LH como medias de los mínimos cuadrados ± EEM. Para cada tipo celular, la diferencia observada entre la ausencia o presencia de cada variable en el medio de MIV es estadísticamente significativa ($p < 0,05$) cuando los superíndices difieren (a,b) y muestran una tendencia ($p > 0,05$ y $p \leq 0,10$) cuando están marcados con una (†).

Figura 1.2 Intensidad de fluorescencia (IF) en ovocitos y CC luego de la MIV producto de la presencia combinada de 3H, E₂, FSH o LH con el Zn⁺².



Los paneles (A, B, C, D) muestran los resultados de las interacciones de segundo orden: **A)** Interacción Zn⁺²*3H; **B)** Interacción Zn⁺²*E₂; **C)** Interacción Zn⁺²*FSH; **D)** Interacción Zn⁺²*LH. Para cada uno de los arreglos factoriales (paneles), “Control” hace referencia al medio en el cual no hay Zn⁺² ni hormona (3H, E₂, FSH o LH). ^{abc}Diferencias significativas, p ≤ 0,05. (*) Indica diferencias significativas entre ovocitos y CC en el tratamiento de MIV correspondiente, p ≤ 0,05.

3.2 Expresión génica de transportadores de Zn²⁺ en ovocitos y CC

De los seis transportadores estudiados, pudieron ser cuantificados cuatro: Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9. A pesar de haber detectado la expresión de Slc30a3 tanto en ovocitos como en CC, no fue posible su cuantificación debido a los bajos niveles de ARNm presentes en dichas células. Por otro lado, no se detectó la expresión de Slc30a7 en ovocitos ni CC.

3.2.1 Ovocitos

Los efectos de las variables principales sobre la ER de los transportadores Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9 en los ovocitos se muestran en la Tabla 1.4. Cabe destacar que el efecto generado por las diferentes hormonas sobre los transportadores se vio modificado por la presencia de Zn^{+2} en casi todos los casos (excepto para el caso de FSH y LH sobre Slc39a14; Zn^{+2} *FSH y Zn^{+2} *LH, respectivamente, Tabla 1.5).

En la **Figura 1.3 A** (Zn^{+2} *3H) se muestra que la suplementación con las 3H generó un efecto diferente sobre la ER de todos los transportadores cuando el Zn^{+2} estuvo presente (observar 3H vs Control respecto a 3H+ Zn^{+2} vs Zn^{+2}). Lo mismo ocurre en la **Figura 1.3 B** (Zn^{+2} * E_2 ; observar E_2 vs Control respecto a E_2 + Zn^{+2} vs Zn^{+2}) y en la **Figura 1.3 C** (Zn^{+2} *FSH; observar FSH vs Control respecto a FSH+ Zn^{+2} vs Zn^{+2}) con excepción de Slc39a14, donde no existió interacción. La presencia de FSH descendió la ER de Slc39a14 independientemente de la presencia de Zn^{+2} (observar FSH vs Control respecto a FSH+ Zn^{+2} vs Zn^{+2}). En la **Figura 1.3 D** (Zn^{+2} *LH) se muestra que, en todos los transportadores, la suplementación con LH generó un efecto diferente sobre la ER cuando el Zn^{+2} estuvo presente (observar LH vs Control respecto a LH+ Zn^{+2} vs Zn^{+2}) con excepción de Slc39a14, donde no existió interacción. La presencia de LH descendió la ER de Slc39a14 independientemente de la presencia de Zn^{+2} (observar LH vs Control respecto a LH+ Zn^{+2} vs Zn^{+2}).

3.2.2 Células del cúmulus

Los efectos de las variables principales sobre la ER de Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9 en las CC se muestran en la Tabla 1.4. Al igual que en los ovocitos, el efecto de las hormonas sobre los transportadores se vio modificado por la presencia

de Zn^{+2} en casi todos los casos (excepto para el caso de FSH sobre Slc39a6 y Slc39a8; Zn^{2+} *FSH, Tabla 1.5).

La **Figura 1.4 A** (Zn^{+2} *3H) muestra que la suplementación con 3H generó, en todos los transportadores, un efecto diferente sobre la ER cuando el Zn^{+2} estuvo presente (observar 3H vs Control respecto a $3H+Zn^{+2}$ vs Zn^{+2}). Lo mismo ocurre en la **Figura 1.4 B** (Zn^{+2} * E_2 ; observar E_2 vs Control respecto a E_2+Zn^{+2} vs Zn^{+2}) y en la **Figura 1.4 C** (Zn^{+2} *FSH; observar FSH vs Control respecto a $FSH+Zn^{+2}$ vs Zn^{+2}) con excepción de Slc39a6 y Slc39a8, donde no existió interacción. La presencia de FSH incrementó la ER de ambos transportadores independientemente de la presencia de Zn^{+2} (observar FSH vs Control respecto a $FSH+Zn^{+2}$ vs Zn^{+2}). En la **Figura 1.4 D** (Zn^{+2} *LH) se muestra que la suplementación con LH generó sobre la ER de todos los transportadores un efecto diferente cuando el mineral estuvo presente durante la MIV (observar LH vs Control respecto a $LH+Zn^{+2}$ vs Zn^{+2}).

Tabla 1.4 Efectos del Zn^{+2} , 3H, E_2 , FSH o LH sobre la expresión relativa de los transportadores Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9 en ovocitos y CC luego de la MIV.

Transportador	Zn^{+2}		3H		E_2		FSH		LH		
	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	
Ovocitos	Slc39a6	1,64 ± 0,04 ^a	2,49 ± 0,02 ^b	2,04 ± 0,02 ^a	1,07 ± 0,02 ^b	2,04 ± 0,02 ^a	1,59 ± 0,01 ^b	2,04 ± 0,11 ^a	3,67 ± 0,08 ^b	2,04 ± 0,06	2,00 ± 0,04
	Slc39a8	1,07 ± 0,04 ^a	1,50 ± 0,04 ^b	1,49 ± 0,01 ^a	0,88 ± 0,01 ^b	1,49 ± 0,05 ^a	0,99 ± 0,03 ^b	1,49 ± 0,03 ^a	1,72 ± 0,02 ^b	1,49 ± 0,09 ^a	0,73 ± 0,06 ^b
	Slc39a14	0,77 ± 0,03 ^a	1,23 ± 0,04 ^b	1,39 ± 0,02 ^a	0,70 ± 0,01 ^b	1,39 ± 0,02 ^a	0,50 ± 0,02 ^b	1,39 ± 0,01 ^a	0,62 ± 0,01 ^b	1,39 ± 0,01 ^a	0,58 ± 0,01 ^b
	Slc30a9	1,00 ± 0,04 ^a	3,99 ± 0,03 ^b	2,80 ± 0,06 ^a	0,54 ± 0,04 ^b	2,80 ± 0,08 ^a	0,98 ± 0,05 ^b	2,80 ± 0,05 ^a	1,05 ± 0,03 ^b	2,80 ± 0,06 ^a	1,21 ± 0,04 ^b
Cúmulus	Slc39a6	0,94 ± 0,03	1,05 ± 0,03	0,86 ± 0,02 ^a	0,81 ± 0,02 ^b	0,86 ± 0,04	1,04 ± 0,03 [†]	0,86 ± 0,04 ^a	1,96 ± 0,03 ^b	0,86 ± 0,04	0,75 ± 0,03
	Slc39a8	1,16 ± 0,05 ^a	0,92 ± 0,05 ^b	0,63 ± 0,02 ^a	1,28 ± 0,02 ^b	0,63 ± 0,03 ^a	0,90 ± 0,02 ^b	0,63 ± 0,06 ^a	2,36 ± 0,04 ^b	0,63 ± 0,14	1,29 ± 0,09 [†]
	Slc39a14	0,65 ± 0,03 ^a	0,39 ± 0,03 ^b	0,71 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,01 ^b	0,71 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,01 ^b	0,71 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,01 ^b	0,71 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,01 ^b
	Slc30a9	0,72 ± 0,02 ^a	0,41 ± 0,02 ^b	0,61 ± 0,02 ^a	0,73 ± 0,02 ^b	0,61 ± 0,03 ^a	0,34 ± 0,02 ^b	0,61 ± 0,03	0,62 ± 0,03	0,61 ± 0,03 ^a	0,30 ± 0,02 ^b

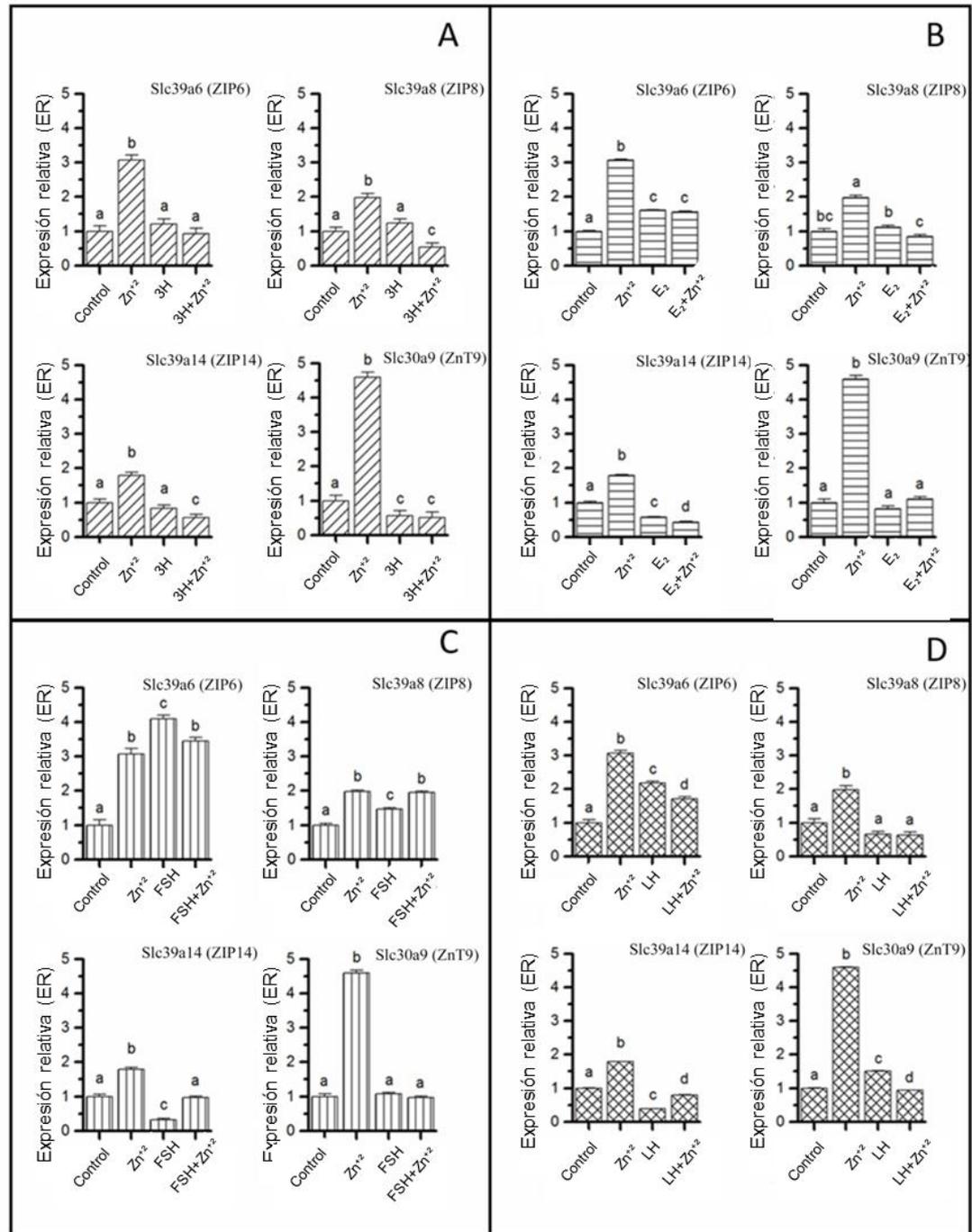
La tabla muestra el efecto de cada variable principal; Zn^{+2} , 3H (E_2 +FSH+LH), E_2 , FSH y LH como medias de los mínimos cuadrados ± EEM. Para cada tipo celular y transportador, la diferencia observada entre la ausencia o presencia de cada variable en el medio de MIV es estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) cuando los superíndices difieren (a,b) y mostraron una tendencia ($p > 0,05$ y $p \leq 0,10$) cuando están marcados con una (†). Los valores de expresión relativa (ER) para cada gen y tratamiento se determinaron con el método 2^{-DDCt} utilizando β -actina (ACTB) y ciclofilina-A (PPIA) como normalizadores para los datos de ovocitos y CC, respectivamente. El tratamiento Control se tomó como referencia (ER = 1).

Tabla 1.5 Efectos de la interacción entre el Zn^{+2} y 3H, E₂, FSH o LH en ovocitos y CC luego de la MIV

Transportador		<i>P</i> valor para la interacción Zn^{+2} *hormona			
		Zn^{+2} *3H	Zn^{+2} *E ₂	Zn^{+2} *FSH	Zn^{+2} *LH
Ovocitos	Slc39a6	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Slc39a8	<0,01	0,02	0,04	0,05
	Slc39a14	<0,01	<0,01	0,18	0,16
	Slc30a9	<0,01	0,03	<0,01	0,01
Cúmulus	Slc39a6	<0,01	<0,01	0,16	0,06
	Slc39a8	<0,01	<0,01	0,16	0,06
	Slc39a14	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Slc30a9	<0,01	<0,01	0,01	<0,01

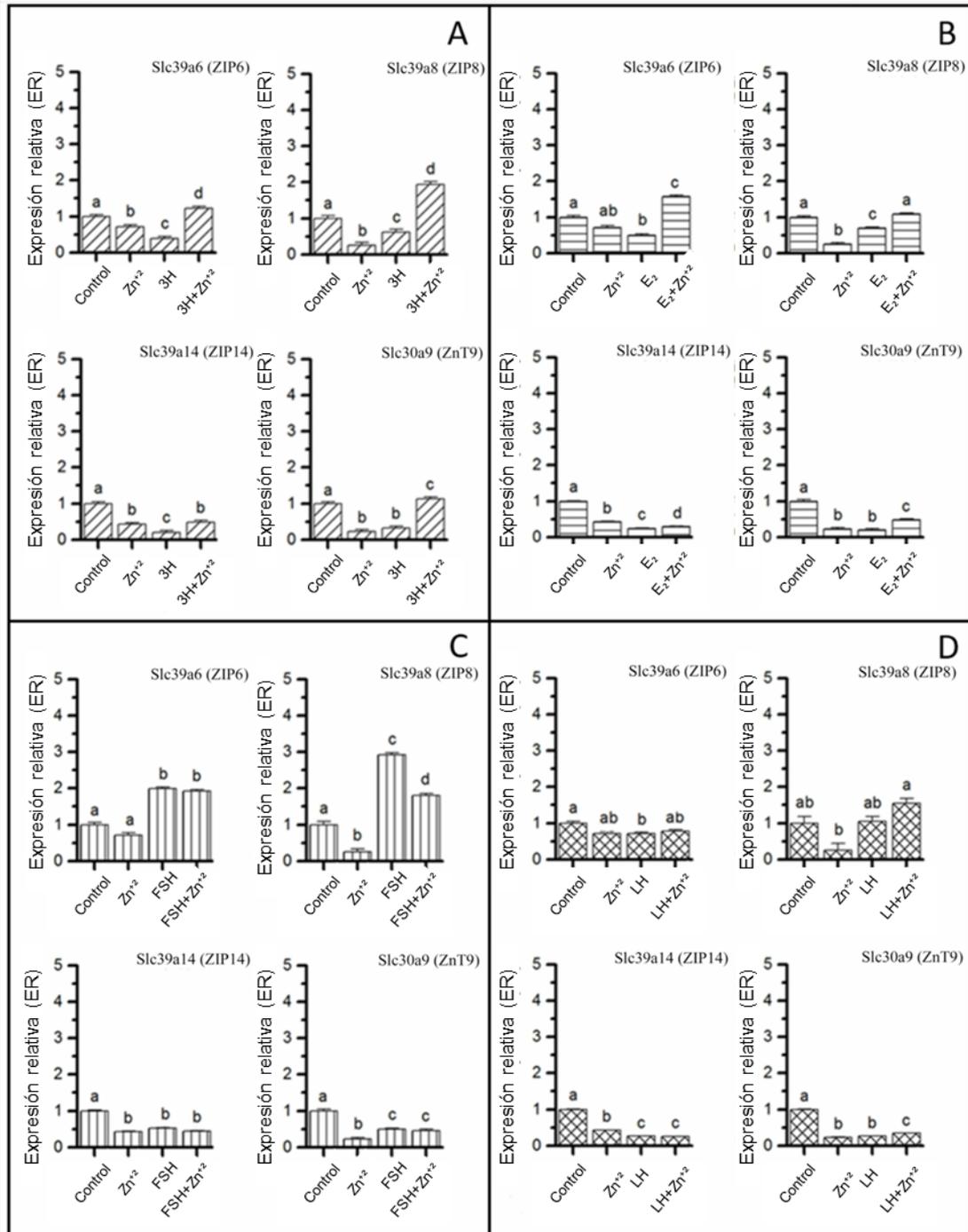
Se estableció la significancia estadística para la interacción Zn^{+2} *hormona en $p \leq 0,10$ y la tendencia en $0,10 < p \leq 0,15$.

Figura 1.3 Expresión relativa de los transportadores Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9 por el efecto combinado de 3H, E₂, FSH o LH con el Zn⁺² en ovocitos maduros



Los paneles (A, B, C y D) muestran los resultados de las interacciones de segundo orden de las variables principales Zn⁺², 3H, E₂, FSH y LH. **Panel A)** Interacción Zn⁺²*3H; **Panel B)** Interacción Zn⁺²*E₂; **Panel C)** Interacción Zn⁺²*FSH; **Panel D)** Interacción Zn⁺²*LH. Para cada uno de los arreglos factoriales (paneles), "Control" hace referencia al medio en el cual no hay Zn⁺² ni hormona (3H, E₂, FSH o LH). ^{a-d} Diferencias significativas, $p \leq 0,05$. Los resultados se expresan como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM.

Figura 1.4 Expresión relativa de los transportadores Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9 por el efecto combinado de 3H, E₂, FSH o LH con Zn⁺² en CC luego de la MIV



Los paneles (A, B, C y D) muestran los resultados de las interacciones de segundo orden de las variables principales Zn⁺², 3H, E₂, FSH y LH. **Panel A)** Interacción Zn⁺²*3H; **Panel B)** Interacción Zn⁺²*E₂; **Panel C)** Interacción Zn⁺²*FSH; **Panel D)** Interacción Zn⁺²*LH. Para cada uno de los arreglos factoriales (paneles) “Control” hace referencia al medio en el cual no hay Zn⁺² ni hormona (3H, E₂, FSH o LH). ^{a-d} Diferencias significativas, $p \leq 0,05$. Los resultados se expresan como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM.

4 DISCUSIÓN

En las últimas décadas, la evidencia científica en torno a la existencia de mecanismos de regulación hormonal involucrados en la homeostasis del Zn^{+2} , en general, y en la expresión génica de sus transportadores, en particular, ha ido en aumento (El-Tanani y Green, 1995; Cousins y col., 2006; Hara y col., 2017). Al respecto, se ha encontrado que la prolactina y la testosterona regulan la expresión génica del transportador Slc39a1 en células cancerosas de próstata (Costello y col., 1999; Cousins y col., 2006) y, que el tratamiento con estrógenos en células cancerosas de pulmón aumenta la expresión génica de los transportadores Slc39a6, Slc39a8 y Slc39a14 (Manning y col., 1988; Taylor y col., 2007). Slc30a9, que actúa además como coactivador de receptores nucleares, aumenta su expresión en respuesta al E_2 al realizar dicha función (Chen and others, 2005). En ovarios de corvina y en células MDA-MB-468, la expresión de Slc39a9 aumenta luego de la incubación con hormonas esteroides (Thomas y col., 2014). Además, se ha descrito que la homeostasis de Zn^{+2} en el cerebro y en el intestino de murino se encuentra regulada por andrógenos y estrógenos (Beltramini y col., 2004; Song y col., 1992).

De los resultados obtenidos en este capítulo se desprende que, en el COC bovino, las hormonas E_2 , FSH y LH y el Zn^{+2} modificarían la concentración intracelular de Zn^{+2} y la expresión génica de cuatro de los transportadores estudiados (Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9). Además, se ha demostrado que, salvo algunas excepciones, el E_2 , la FSH y la LH presentan interacción con el Zn^{+2} al evaluar la IF y la ER, tanto en el ovocito como en las CC. Es así que tanto la expresión de los transportadores como los niveles de Zn^{+2} libre no sólo se encontrarían determinados por la presencia de las hormonas o del mineral, sino que dichas variables producirían un

efecto diferente cuando se encuentran combinadas. Por lo tanto, no es posible entender el efecto regulador de las hormonas y del Zn^{+2} como hechos independientes.

En los ovocitos, la combinación de las 3 hormonas (3H) no modificó los niveles intracelulares de Zn^{+2} cuando el mineral estuvo ausente, pero los disminuyó en su presencia (Figura 1.2). Sin embargo, el E_2 , la FSH y la LH incrementaron los niveles intracelulares de Zn^{+2} en ausencia del mineral, pero no produjeron dicho aumento en su presencia. El incremento producido por el E_2 y la LH fue similar al obtenido por la presencia única del Zn^{+2} en el medio, mientras que el efecto de la FSH fue de menor intensidad. De lo expuesto, parece claro que la regulación hormonal de los niveles intracelulares de Zn^{+2} en el ovocito no resultaría simplemente de la suma de los efectos producidos por el E_2 , la FSH y la LH, dado que su combinación produjo una respuesta muy diferente a la generada por cada una de ellas.

En las CC, las 3H no modificaron los niveles intracelulares de Zn^{+2} , mientras que el agregado del mineral incrementó sus niveles intracelulares independientemente de la presencia de las 3H. Las CC tratadas con 3H, FSH o E_2 produjeron respuestas similares ante la ausencia y la presencia de Zn^{+2} , con patrones especialmente parecidos en 3H y FSH (Figura 1.2 A y C). Esto indicaría que la FSH y el E_2 juegan papeles preponderantes en el efecto producido por la combinación de las 3H sobre las CC, con especial participación de la FSH. Al contrario, la LH presentó un comportamiento diferenciado; en ausencia de Zn^{+2} incrementó la IF, mientras que, en presencia del mineral, la disminuyó.

Se conoce que los niveles de E_2 en el microambiente folicular están directamente relacionados a la calidad del ovocito (Kreiner y col., 1987). Por otra parte, como se encontró en este trabajo, el E_2 incrementa los niveles intracelulares del mineral en

ovocitos. En consecuencia, la combinación de estos dos factores podría contribuir, al menos en parte, a la formación de un ovocito maduro y de mejor calidad, dado que las variaciones de Zn^{+2} en dicha célula regulan su ciclo celular durante su maduración y fecundación e incrementa su capacidad de desarrollo embrionario posterior (Kim y col., 2011; Anchordoquy y col., 2014). En cuanto a las gonadotropinas FSH y LH, a lo largo del tiempo, se las ha utilizado combinadas en la confección de medios de MIV. Sin embargo, existen estudios que demuestran que es la FSH (y no la LH) la responsable de la maduración del ovocito *in vitro* (Bevers y col., 1997). La capacidad de la FSH de aumentar los niveles intracelulares de Zn^{+2} , hallazgo de este trabajo, refuerza la relevancia del uso de esta hormona durante la MIV ya que el aumento en la concentración de Zn^{+2} es necesario para el avance de la meiosis durante la maduración del ovocito (Kim y col., 2010). Con respecto a la LH, este trabajo ha mostrado su versatilidad para modificar los niveles intracelulares de Zn^{+2} , según el tipo celular y la presencia o no del mineral.

En todos los casos, los ovocitos presentaron IF más altas respecto a las CC. Se ha descrito que las CC tienen la capacidad de regular el Zn^{+2} libre intracelular en el ovocito, ejerciendo un efecto inhibitor sobre éste (Lisle y col., 2013). Hacia el final de la maduración, las CC pierden dicha capacidad, lo cual resulta esencial para que esta última pueda elevar su contenido de Zn^{+2} y en consecuencia se establezca la MII (Suzuki y col., 2010; Bernhardt y col., 2012; Lisle y col., 2013). Las diferencias encontradas en la IF de ovocitos y CC podrían reflejar dichas modificaciones. Es importante tener presente que tanto en el trabajo aquí realizado, como en el de Lisle y col. (2013), Suzuki y col. (2010) y Bernhardt y col. (2012), se utilizó un fluorocromo (FluoZin-3 AM) capaz de detectar únicamente variaciones en la concentración de

Zn⁺² libre, no siendo posible revelar cambios en la concentración de Zn⁺² unido a proteínas (Gee y col., 2002a; 2002b). Sin embargo, también es importante recordar que los cambios dinámicos en los procesos metabólicos dependientes de Zn⁺² son el resultado, fundamentalmente, de modificaciones en la biodisponibilidad del mineral (variación en la cantidad de Zn⁺² en estado iónico) (Kambe y col., 2015).

De acuerdo a indagaciones en la literatura, esta es la primera vez que se detecta la expresión génica de Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14, Slc30a3 y Slc30a9 en *Bos Taurus* y la segunda en el bovino (Xiong y col., 2018). Con respecto a los ovocitos, los transportadores Slc39a6 y Slc30a9 mostraron los niveles de respuesta más altos a los estímulos hormonales y al Zn⁺². La elevada expresión de Slc39a6 podría explicar, al menos en parte, el incremento en el Zn²⁺ intracelular observado en el ovocito durante su maduración (Kim y col., 2010). La presencia de las 3H en simultáneo redujo la capacidad del Zn⁺² de incrementar la ER de todos los transportadores aquí evaluados (3H+Zn⁺² vs Zn⁺²), indicando así un efecto regulador conjunto de las tres hormonas. En cuanto a las respuestas a E₂, FSH o LH, se obtuvieron diversos resultados entre los transportadores, hallándose o no interacción con el Zn⁺² según el caso. No obstante, considerando todos los transportadores, las hormonas dieron lugar a niveles más bajos de ER en comparación con Zn²⁺, excepto para FSH en Slc39a6 y Slc39a8. El comportamiento de Slc39a6 ante el estímulo de FSH es de especial interés debido a su papel en la transición ovocito-óvulo (Kong y col., 2014). Además, recientemente se ha comprobado que la FSH tiene la capacidad de regular la transcripción génica de ovocitos y CC en la cerda (Blaha y col., 2015).

En cuanto a las CC, el Zn⁺² produjo un resultado opuesto al observado en los ovocitos, ya que disminuyó la ER de la mayoría de sus transportadores. Este

hecho podría estar relacionado con los resultados obtenidos por Lisle y col. (2013), quienes proponen que las CC pierden la capacidad para modificar los niveles intracelulares de Zn^{2+} libre en el ovocito después de la maduración.

Por otro lado, en las CC, al igual que lo observado en ovocitos, la presencia de las 3H en el medio mantuvo bajos los niveles de expresión de los transportadores (3H vs Control). Sin embargo, en las CC en particular, el agregado de Zn^{+2} a las 3H provocó aumentos en la ER de cada transportador (Zn^{+2} vs 3H+ Zn^{+2}), salvo Slc39a14, que no sufrió cambios. Con respecto al efecto individual de cada hormona, el comportamiento de los transportadores bajo la acción de E_2 y LH fue similar a aquellos con 3H, con leves variaciones. Slc39a6 y Slc39a8 alcanzaron los niveles de respuesta más altos, y Slc39a14 y Slc30a9 los más bajos. Estos dos últimos transportadores respondieron de manera similar a la FSH. Tal como se observó en los ovocitos, Slc39a6 y Slc39a8 reaccionaron de manera particular a FSH, mostrando un incremento notable en su expresión en presencia de dicha hormona (FSH y FSH+ Zn^{+2}). En general, Slc39a14 y Slc30a9 mostraron respuestas similares bajo las diferentes condiciones estudiadas.

Para concluir, estos resultados revelan nueva información acerca de la homeostasis intracelular de Zn^{+2} en el COC bovino, donde las hormonas E_2 , FSH y LH junto al propio Zn^{+2} , participarían activamente en la regulación intracelular de este mineral. Además, se observaron diferencias en la expresión génica de los transportadores de Zn^{+2} entre los ovocitos y las CC, que podrían estar vinculados a los marcados cambios intracelulares de Zn^{+2} en el COC durante su maduración. Considerando las tres hormonas analizadas en este capítulo, se sugiere un papel especialmente destacado para la FSH en cuanto a la regulación de los niveles intracelulares de Zn^{+2} y a la expresión génica de sus transportadores. Además, este

trabajo refuerza los conocimientos sobre la influencia de las hormonas sobre la expresión génica de Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9.

CAPÍTULO 2

Efecto del E₂ y la P₄ sobre sobre la concentración de Zn⁺² libre intracelular y la expresión de sus transportadores en las células epiteliales del oviducto bovino (CEOB)

1 INTRODUCCIÓN

En los mamíferos, las células epiteliales del oviducto (CEO) desempeñan un papel trascendente en el establecimiento de un entorno óptimo para procesos reproductivos como la fecundación, el transporte de gametas, la capacitación final de los espermatozoides y el desarrollo temprano del embrión (King y col., 1994; Killian, 2004; Kölle y col., 2009; Holt y Fazeli, 2010; Besenfelder y col., 2012). Existen dos clases de CEO, las células secretoras y las células ciliadas (Yániz y col., 2000). Ambos tipos celulares se encuentran bajo la influencia de las hormonas E_2 y P_4 (Sawyer y col., 1984), que predominan en distintas fases del ciclo estral y generan respuestas a nivel morfológico (Abe y Oikawa, 1993), transcripcional (Ulbrich y col., 2010) y proteómico (Seytanoglu y col., 2008).

Desde hace tiempo se han establecido importantes asociaciones entre la nutrición y el rendimiento reproductivo. Es así que se han realizado estudios sobre la importancia de los oligoelementos esenciales durante el desarrollo embrionario y fetal en el ganado bovino (Hostetler y col., 2003). Sin embargo, aún no se ha estudiado el rol de los minerales traza sobre distintos aspectos que afectan a las CEO en el bovino (CEOB). En particular, hace tiempo que se conoce el papel del Zn^{+2} en múltiples procesos reproductivos (Falchuk, 1998; Hostetler y col., 2003; Anchordoquy y col., 2014) sumado a sus funciones celulares de orden más general, como la regulación de la transcripción génica y la actividad enzimática (Falchuk, 1998; Dreosti, 2001; Prasad, 2003; Cathomen y Joung, 2008; Jackson y col., 2008). En este contexto, resulta necesario conocer la homeostasis del Zn^{+2} en las CEOB. Además, dado que la homeostasis del Zn^{+2} en la célula responde al estímulo hormonal (Cousins y col., 2006;

Thomas y col., 2014), incluso en ovocitos y CC (Capítulo 1), es importante estudiar cómo impactarían las hormonas sobre el Zn^{+2} en las CEOB.

El objetivo de este capítulo fue investigar si el E_2 y la P_4 intervienen en la regulación de la homeostasis del Zn^{+2} al modificar i) su concentración intracelular como ión libre y ii) la expresión génica de sus transportadores. Para ello, se realizaron cultivos *in vitro* de CEOB de corta duración (24 horas) para preservar las características morfológicas de las células y su capacidad de respuesta al estímulo hormonal (Rottmayer y col., 2006) y se evaluó la concentración de Zn^{+2} intracelular y la expresión génica de los transportadores Slc39a6 (ZIP 6), Slc39a8 (ZIP 8), Slc39a14 (ZIP 14), Slc30a3 (ZnT 3), Slc30a7 (ZnT 7), Slc30a9 (ZnT 9) en respuesta al E_2 y la P_4 .

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos para el cultivo *in vitro* de CEOB

Todos los reactivos necesarios para la preparación de los medios de cultivo se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE. UU.), excepto que se indique lo contrario. Las CEOB se cultivaron *in vitro* en medio TCM-199 con 10% de SFB (v / v), anfotericina B al 1% (2,5 ug/ml) y un mix de antibióticos al 1% (kanamicina 5 mg/ml, penicilina G 5,9 mg/ml y estreptomicina 10 mg/ml).

2.2 Oviductos

Se obtuvieron oviductos de bovino a partir de hembras jóvenes de frigorífico, de raza Aberdeen Angus, independientemente de la fase del ciclo estral. Una vez en el laboratorio, se lavaron y desinfectaron con una solución salina *buffer* de fosfatos (*PBS*)

con antibióticos al 1%. Posteriormente, se separó el mesosalpinx y los restos de útero que pudieran quedar presentes con el fin procesar únicamente los oviductos.

2.3 Preparación de CEOB y cultivo *in vitro*

En primer lugar, se aislaron las CEOB utilizando un método mecánico en el que se aplica una leve presión sobre el órgano con un portaobjeto de vidrio estéril (Eyestone y First, 1989; Van Langendonck y col., 1995). Inmediatamente después, las células obtenidas se procesaron de acuerdo a lo descrito por Rottmayer y col. (2006). Primero, las células recolectadas se lavaron utilizando PBS con mix de antibióticos al 1%, y luego se transfirieron a un tubo con 5 ml de medio de cultivo. La suspensión de células se pipeteó suavemente para facilitar la disgregación celular y posteriormente se realizaron 5 pasajes a través de una aguja de 30 G. A continuación, la suspensión se dejó reposar por 30 minutos en la estufa a 39°C y atmósfera gaseada con 5% de CO₂ para sedimentar las células. El pellet obtenido fue resuspendido en medio de cultivo. Luego, se tomó una alícuota de esta suspensión y se la trató con una solución de tripsina para individualizar las células y así llevar a cabo un conteo. Dicho conteo y la prueba de viabilidad se realizaron mediante la tinción de azul de tripán. Se utilizaron placas de 12 pocillos en las que se sembraron 1x10⁶ células viables/ml de medio por pocillo. Luego de un pre-cultivo de 4 horas, se aplicaron los siguientes tratamientos: A) Control (sin hormonas, sin Zn⁺²); B) Zn_T: 1,2 µg/ml Zn⁺² (Picco y col., 2010); C) E_{2,T}: 10 pg/ml E₂ (Ulbrich y col., 2003); D) E₂+Zn_T; E) P_{4,T}: 10 ng/ml P₄ (Ulbrich y col., 2003); F) P₄+Zn_T; G) E₂+P_{4,T} y H) E₂+P₄+Zn_T. Debido a que el medio de cultivo fue suplementado con SFB, se midieron las concentraciones de Zn⁺², E₂ y P₄ antes de realizar los distintos tratamientos (procedimiento descrito en Capítulo 1). Las

concentraciones obtenidas de Zn^{+2} y E_2 se consideraron despreciables en comparación con las utilizadas en los tratamientos. No se registró la presencia de P_4 en el medio.

Las CEOB se cultivaron a $39^{\circ}C$, 5% de CO_2 y humedad a saturación por 24 horas (Rottmayer y col., 2006; Ulbrich y col., 2010). Tanto los cultivos realizados para el análisis de Zn^{+2} intracelular como aquellos destinados a los estudios de expresión génica se realizaron por triplicado. El cultivo de cada réplica se realizó en días diferentes, utilizando tres oviductos (obtenidos de tres animales diferentes) por réplica a partir de los cuales se hizo un *pool* de células. La morfología de las CEOB se examinó con un microscopio de contraste de fase (Diaphot; Nikon, Tokio, Japón) antes de la siembra en la placa y durante el progreso del cultivo.

2.4 Medición de los niveles intracelulares de Zn^{+2} con el indicador selectivo FluoZin-3 AM

Luego del cultivo, se evaluaron en las CEOB los niveles intracelulares de Zn^{+2} con el colorante fluorescente FluoZin-3 AM (método descrito en el Capítulo 1). Con el propósito de tomar fotografías de cada una de las células por separado, se realizó una incubación en tripsina antes de la tinción con FluoZin-3 AM. En cada réplica se incluyó un control de fluorescencia, siguiendo la misma metodología detallada en el Capítulo 1. Las observaciones se realizaron por medio de un microscopio de fluorescencia Olympus BX40 (Olympus, Japón) utilizando el filtro NB (longitudes de onda de 470 a 490 nm para excitación y de 520 nm para emisión, respectivamente) y una magnificación de 1000 X. Las imágenes se tomaron con una cámara de alta resolución Sony CCD-IRIS (Sony, Japón). Las CEOB mostraron fluorescencia verde, y las intensidades obtenidas correspondieron a los niveles intracelulares de Zn^{+2} . La intensidad de fluorescencia se

determinó por medio del software ImageJ 1.48 v, como se explicó previamente en el Capítulo 1.

2.5 Obtención de ARN y PCR

Para la extracción de ARN total, se utilizaron las 1×10^6 CEOB sembradas en el pocillo, por tratamiento y por réplica. La misma se realizó con Trizol (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La verificación de la cantidad y calidad del ARN, así como la síntesis de ADNc, se llevaron a cabo como se describió en el Capítulo 1.

Se evaluó la expresión génica de Slc39a6 (ZIP 6), Slc39a8 (ZIP 8), Slc39a14 (ZIP 14), Slc30a3 (ZnT 3), Slc30a7 (ZnT 7), Slc30a9 (ZnT 9) en las CEOB por medio de PCR punto final, empleando los *primers* utilizados en la evaluación de los COC (Capítulo 1, Tabla 1.1). Las PCR se corrieron en un ciclador Axygen (Corning, USA), y la mezcla de reacción (volumen final de 30 ul) incluyó la PCR MINT Master Mix 2X Highway (Inbio Highway, Argentina), 2 ul de ADNc y 2 ul de cada *primer* (concentración final de 0,5 uM). Las condiciones de ciclado incluyeron: inicialización (95 °C, 3 min), desnaturalización (95 °C, 15 seg), *annealing* (temperaturas de *annealing* de cada par de *primers*, 20s, 40 ciclos, ver Tabla 1.1 en Capítulo 1), extensión (72 °C, 15 seg) y extensión final (72 °C, 5 min). Las PCR incluyeron controles negativos (sin ADNc) y se realizaron por triplicado. En una última etapa, se examinó la presencia de cada transportador mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. Los resultados de la electroforesis se visualizaron con bromuro de etidio, y la presencia de una banda correspondiente al transcripto de interés (sin otros productos inespecíficos) se utilizó como comprobación de su expresión génica. Dado que la intensidad de la banda

obtenida brinda una estimación de la cantidad de producto obtenido, y por lo tanto de la magnitud de la expresión del transcripto, se clasificó la expresión de los transportadores en: expresión considerable (banda nítida/intensa; ++), baja expresión (banda tenue; +), o ausencia de expresión (ausencia de banda; -).

2.6 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorio. Los modelos estadísticos incluyeron el efecto aleatorio de bloque (día de recolección de oviductos, $n = 3$ para cada ensayo), el efecto fijo de E_2 , P_4 y Zn^{+2} , y la interacción de segundo orden de las variables principales ($E_2 * Zn^{+2}$, $P_4 * Zn^{+2}$ y $E_2 * P_4$). Los efectos de las hormonas y el Zn^{+2} sobre la intensidad de fluorescencia (IF) se analizaron con modelos de regresión lineal utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute, Cary, NC, EE. UU.). Los resultados se expresan como las medias de los mínimos cuadrados \pm EEM. Se estableció la significación estadística en $p \leq 0,05$ y en $p \leq 0,10$ para la tendencia y las interacciones.

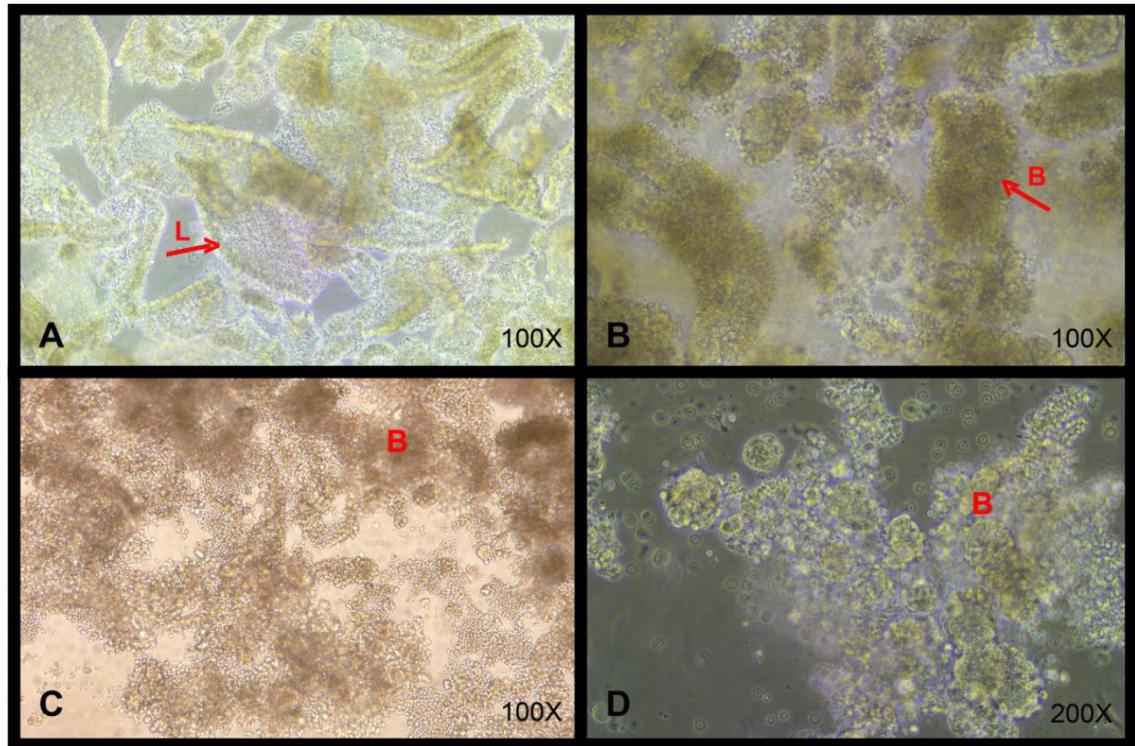
3 RESULTADOS

3.1 Cultivo de las CEOB

Luego del conteo con azul de tripán, previo al cultivo, se obtuvo un promedio de $61,7 \times 10^6$ CEOB por oviducto y una viabilidad del $91,7 \pm 0,03$ %. En esta instancia se verificó también la identidad de las células por microscopía óptica, observándose las características propias de las CEOB descritas en la literatura; esto es, células formando grandes fragmentos de epitelio oviductal en forma de bloque alargado y numerosas células ciliadas rápidamente distinguibles. Una vez sembradas las células y a lo largo de

las 24 horas de cultivo, se observó una vigorosa actividad de cilias en las superficies de los agregados celulares.

Figura 2.1 Fotografías de CEOB por microscopía de contraste de fase.

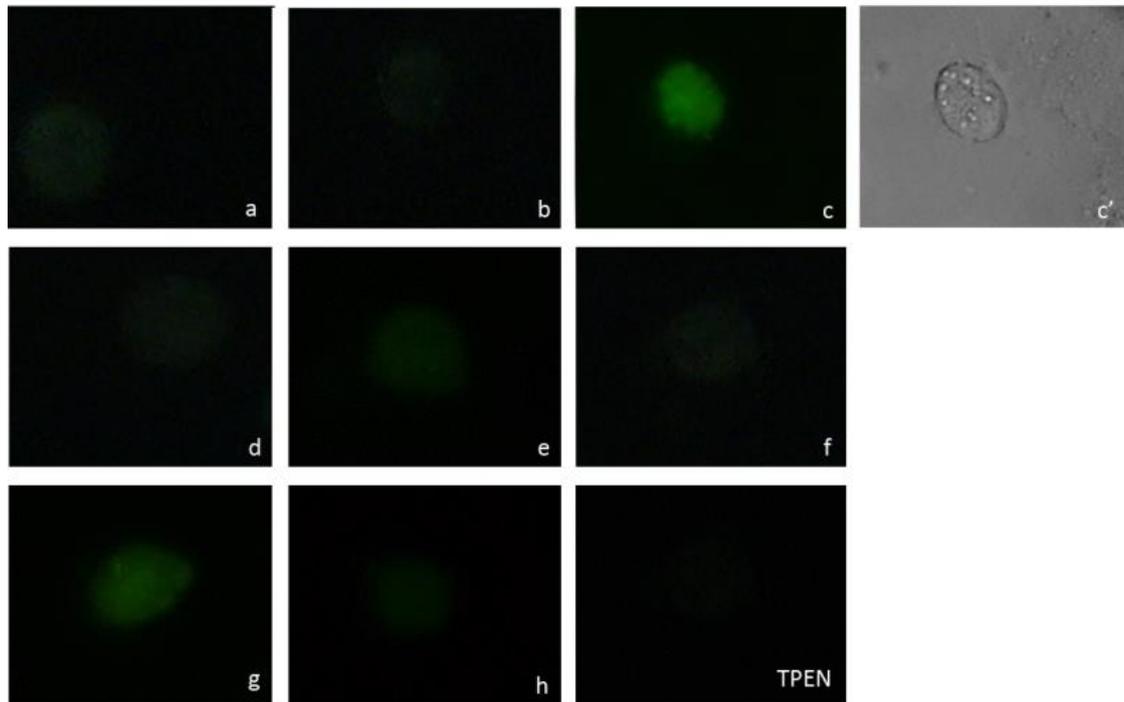


A) CEOB inmediatamente después de su aislamiento desde el oviducto, dispuestas en láminas (L) y agregados alargados. **B), C)** y **D)** Luego de 24 horas de cultivo, mostrando agregados más densos (bloques; B). Las CEOB mostraron un intenso movimiento de cilias a lo largo de todo el cultivo.

3.2 Niveles intracelulares de Zn^{+2} en las CEOB luego de su exposición a E_2 , P_4 y Zn^{+2} durante el cultivo *in vitro*

En la Figura 2.2 se muestran imágenes representativas de las CEOB teñidas con FluoZin-3 AM luego de los tratamientos. Después de emplear el quelante TPEN, la señal fluorescente disminuyó de manera notable, lo cual demostró que la emisión de fluorescencia fue producto de la presencia de Zn^{+2} , específicamente.

Figura 2.2 Imágenes representativas de CEOB teñidas con FluoZin-3 AM luego de 24 horas de cultivo



Las CEOB se cultivaron durante 24 horas en un medio que incluyó E₂ (10 pg/ml), P₄ (10 ng/ml) o E₂ + P₄, con o sin el agregado de 1,2 µg / ml Zn⁺², de acuerdo con los siguientes tratamientos: **a)** Control (sin hormonas, sin Zn⁺²), **b)** Zn⁺²_T, **c)** E₂_T, **d)** E₂+Zn⁺²_T, **e)** P₄_T, **f)** P₄+Zn⁺²_T, **g)** E₂+P₄_T, **h)** E₂+P₄+Zn⁺²_T. **c'** Es una imagen ilustrativa de las CEOB en campo claro, que corresponde a **c)**. La concentración final del fluoróforo durante la incubación fue de 1 µM. Las CEOB emitieron fluorescencia, cuya intensidad corresponde a los niveles de Zn⁺² libre intracelular. Se incluyó un control de fluorescencia (**TPEN**). La observación con el microscopio se realizó a 1000 X. Zn⁺²: zinc; E₂: 17-beta estradiol; P₄: progesterona.

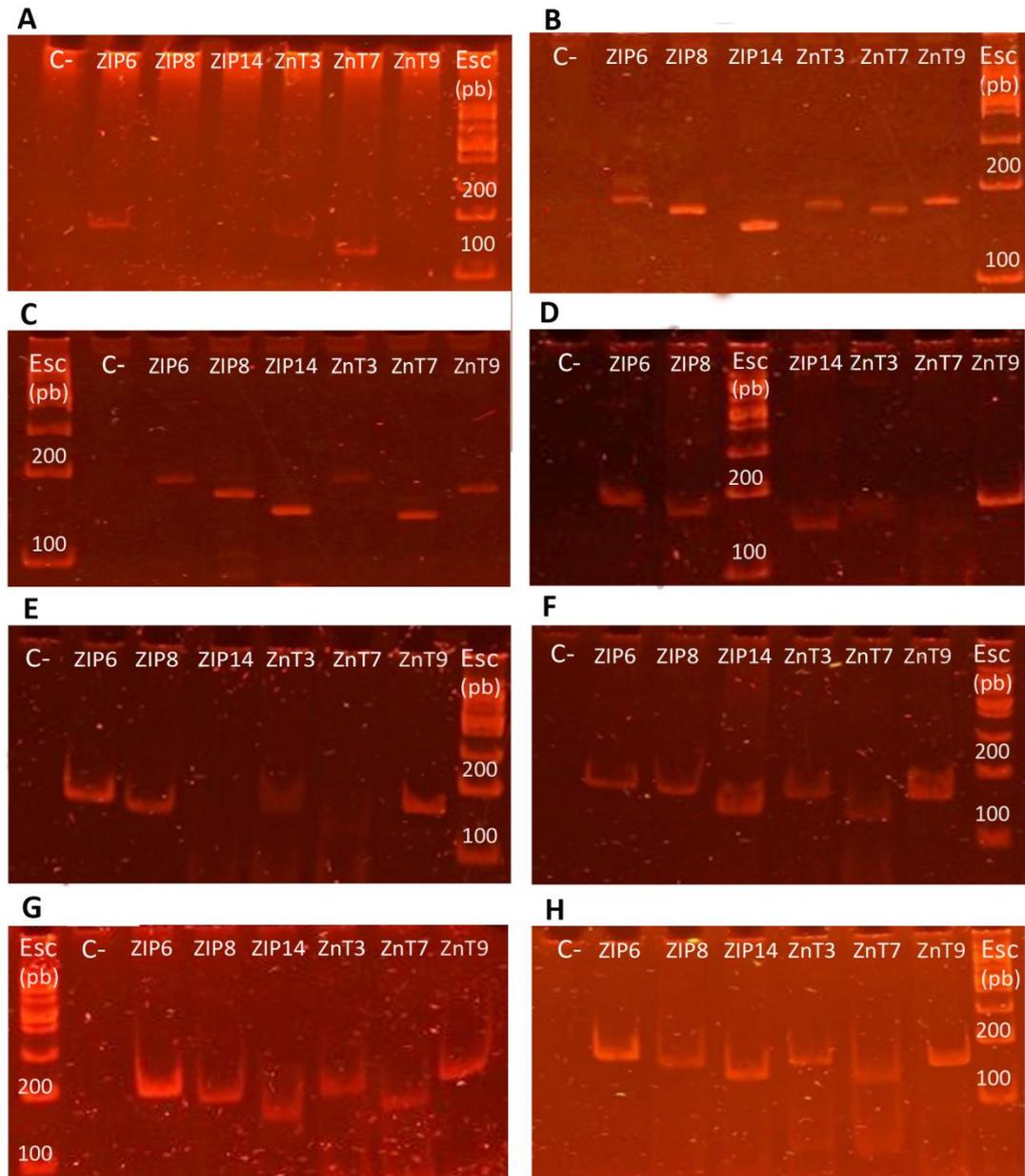
La presencia de E₂ en el medio de cultivo generó un aumento en los niveles intracelulares de Zn⁺² (IF de 3,96 ± 0,42 vs 6,19 ± 0,39 para la ausencia y presencia de E₂ respectivamente; p < 0,01), mientras que la P₄ no produjo un efecto significativo (IF de 4,87 ± 0,39 vs 5,29 ± 0,43 para la ausencia y presencia de P₄ respectivamente; p = 0,47). Por otra parte, la presencia de Zn⁺² en el medio de cultivo redujo los niveles intracelulares del mineral (IF de 6,03 ± 0,41 vs 4,13 ± 0,41 para la ausencia y presencia

de Zn^{+2} respectivamente; $p < 0,01$). No se registró interacción entre las variables evaluadas ($E_2 * Zn^{+2}$, $p = 0,38$; $P_4 * Zn^{+2}$, $p = 0,78$; $E_2 * P_4$, $p = 0,31$).

3.3 Expresión génica de transportadores de Zn^{2+} en CEOB

La expresión génica de los transportadores se vio modificada por los tratamientos. Los resultados revelados por electroforesis en gel de acrilamida al 6% se pueden observar en la Figura 2.3 y su resumen en la tabla a continuación (Tabla 2.1).

Figura 2.3 Electroforesis en gel de acrilamida al 6% luego de la amplificación por PCR de los transportadores de Zn^{+2} .



Los gels de acrilamida muestran los resultados de expresión génica de ZIP 6 (Slc39a6), ZIP 8 (Slc39a8), ZIP 14 (Slc39a14), ZnT 3 (Slc30a3), ZnT 7 (Slc30a7) y ZnT 9 (Slc30a9) en las CEOB, obtenidos en los distintos tratamientos (A-H). A) Control; B) ZnT : 1,2 $\mu\text{g/ml}$ Zn^{+2} ; C) $E_{2,T}$: 10 pg/ml E_2 ; D) E_2+ZnT ; E) $P_{4,T}$: 10 ng/ml P_4 ; F) P_4+ZnT ; G) $E_2+P_{4,T}$; H) E_2+P_4+ZnT . Las bandas obtenidas correspondieron a los tamaños esperados (pares de bases, pb) para cada transportador. C – indica control negativo de PCR.

Tabla 2.1 Expresión génica de los transportadores de Zn^{+2} en las CEOB luego del cultivo *in vitro* con E_2 , P_4 y Zn^{+2} .

Tratamiento	Código	ZIP6	ZIP8	ZIP14	ZnT3	ZnT7	ZnT9
Control	A	++	-	-	+	++	-
Zn	B	++	++	++	++	++	++
E_2	C	++	++	++	+	++	++
$E_2 + Zn$	D	++	++	++	+	+	++
P_4	E	++	++	-	+	+	++
$P_4 + Zn$	F	++	++	++	++	+	++
$E_2 + P_4$	G	++	++	++	++	++	++
$E_2+P_4+ Zn$	H	++	++	++	++	++	++

Se muestran los resultados de expresión de ZIP6 (Slc39a6), ZIP8 (Slc39a8), ZIP14 (Slc39a14), ZnT3 (Slc30a3), ZnT7 (Slc30a7) y ZnT9 (Slc30a9) luego de cultivar las células por 24 horas. De acuerdo a la intensidad de la banda obtenida en la electroforesis, se clasificó la expresión de los transportadores en: ++ (banda nítida/intensa, expresión considerable), + (banda tenue, baja expresión), o - (ausencia de banda). En cada fila se pueden apreciar los resultados por tratamiento, los cuales están indicados por las letras A hasta la H: A) Control; B) Zn_T : 1,2 $\mu\text{g/ml}$ Zn^{+2} ; C) $E_{2,T}$: 10 pg/ml E_2 ; D) E_2+Zn_T ; E) $P_{4,T}$: 10 ng/ml P_4 ; F) P_4+Zn_T ; G) $E_2+P_{4,T}$; H) $E_2+P_4+Zn_T$.

4 DISCUSIÓN

A lo largo del tiempo, numerosos trabajos han demostrado que las hormonas esteroideas ováricas regulan diversos fenómenos del epitelio oviductal en los mamíferos, tales como la formación de cilias y la secreción del fluido oviductal (Bishop, 1956; Hamner y Fox, 1968; McDonald y Bellve, 1969; Verhage y col., 1973), cambios en el tamaño celular (McDaniel y col., 1968) y en la proporción de células ciliadas y secretoras (McDaniel y col., 1968), así como también en el transporte del ovocito y del espermatozoide (Crisman y col., 1980; Hunter y Wilmut, 1983). Estas investigaciones han concluido que el E_2 incrementa la capacidad de secreción de fluido oviductal, la velocidad de transporte de gametas y la proliferación celular en el oviducto, mientras que la P_4 desacelera el transporte y la secreción, y genera un proceso de renovación del epitelio para el siguiente ciclo estral.

En el presente estudio, el E₂ incrementó los niveles intracelulares de Zn⁺² en las CEOB. Este incremento podría explicar, al menos en parte, la respuesta celular al E₂, como el aumento en la proliferación (Kamwanja y Hansen, 1993), la secreción (McDaniel y col., 1968) y la velocidad de transporte (Crisman y col., 1980; Hunter y Wilmut, 1983), dado que este mineral está involucrado en múltiples funciones celulares, incluyendo proliferación y expresión génica (Dreosti, 2001). Estudios anteriores han evidenciado la susceptibilidad del proceso de división celular ante la deficiencia del mineral (Chesters, 1989). Además, el Zn⁺² resulta fundamental en la estabilización de las membranas celulares y del citoesqueleto (Hesketh, 1982; O'Dell, 2000).

Por otra parte, la P₄ no modificó la concentración de Zn⁺² intracelular en las CEOB. En estas células, la P₄ inhibe fenómenos propios de la fase folicular, pues disminuye la secreción de fluido oviductal (McDaniel y col., 1968), reduce la frecuencia de movimiento de las cilias, lo cual repercute en su capacidad de transporte (Wessel y col., 2004), y disminuye el tamaño de las células secretoras (Eriksen y col., 1994) y la altura del epitelio (McDaniel y col., 1968). De esta manera, durante la fase luteal existe una disminución de los procesos que podrían requerir Zn⁺² y, por lo tanto, parecería probable que durante dicha fase las CEOB no requieran de un aumento significativo del mineral.

La presencia de Zn⁺² en el medio de cultivo disminuyó los niveles intracelulares del mineral. El Zn⁺² está involucrado en funciones celulares como la transducción de señales y el control del crecimiento y la proliferación, que requieren un control muy estricto de su concentración (Beyersmann y Haase, 2001). Por este motivo, resulta razonable pensar que ante un aumento de Zn⁺² las CEOB respondan disminuyendo la concentración del mineral en estado iónico, pudiéndolo unir a diferentes proteínas

reguladoras como la metalotioneína (Maret, 2000, 2003, 2005). Este cambio intracelular de Zn^{+2} refleja la capacidad del mineral de regular su propia homeostasis (Maret, 2005), incluso en estas células.

En cuanto al estudio de los transportadores de Zn^{+2} , se detectó la expresión génica de los transportadores Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14, Slc30a3, Slc30a7 y Slc30a9 en las CEOB. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 2.1, dicha transcripción se encontró condicionada por los tratamientos. Por otro lado, y a diferencia de lo observado en ovocitos y CC, en las CEOB se registró la presencia de ARNm de Slc30a7. Se conoce que este transportador traslada Zn^{+2} desde el citoplasma hasta el aparato de Golgi para su almacenamiento y su posterior unión con las enzimas y proteínas recientemente sintetizadas (Baltaci y Yuce, 2018). Esto podría sugerir una mayor actividad de síntesis de metaloproteínas dependientes de Zn^{+2} en las CEOB respecto del COC, lo cual podría vincularse al hecho de que las CEOB sufren ciclos de proliferación celular y remodelación epitelial a lo largo del ciclo estral que requerirían una alta actividad biosintética. Vale mencionar que el fluido oviductal, cuyo contenido proviene en buena parte de la secreción del epitelio, incluye una gran cantidad de proteínas que son específicas del oviducto (Avilés y col., 2010).

Al evaluar la expresión de Slc30a7 en respuesta a los tratamientos, el E_2 produjo mayores niveles de expresión que la P_4 . Esta observación podría indicar mayor expresión de Slc30a7 en la fase folicular respecto de la luteal. Es importante tener en cuenta que en el oviducto existe una mayor producción de proteínas en la fase folicular en comparación con la luteal (Malayer y col., 1988), lo cual está en concordancia con una mayor abundancia de Slc30a7, dado que posee funciones vinculadas a la regulación postraducciona, como se comentó más arriba.

Por otra parte, no se observaron diferencias en la expresión de Slc30a7 entre los tratamientos $E_{2,T}$ y Zn_T , pero sí al comparar cada uno de ellos con E_2+Zn_T , lo que indicaría la presencia de interacción entre ambos factores. Si bien el E_2 no modificó la expresión de Slc30a7 (Control vs $E_{2,T}$), al incluir Zn^{+2} al medio disminuyó la intensidad de la expresión (Zn_T vs E_2+Zn_T). Por otro lado, también existiría interacción entre E_2 y Zn^{+2} respecto a Slc30a3, dado que el E_2 no modificó su expresión (Control vs $E_{2,T}$) pero, en combinación con el Zn^{+2} , la hormona disminuyó los niveles de transcripción (Zn^{+2} vs E_2+Zn_T).

De todos modos, al tratarse de ensayos de PCR punto final, la existencia de interacción entre hormonas y Zn^{+2} debe considerarse un resultado preliminar, dado que la estimación de la cantidad de producto obtenido (cantidad de ARNm) a partir de las bandas de electroforesis no es altamente precisa por vía visual. En todo caso, la presencia de E_2 ($E_{2,T}$) en el medio de cultivo resultó en la expresión de más transportadores (y para Slc30a7, en mayor intensidad de banda) con respecto al grupo tratado con P_4 ($P_{4,T}$). Estas observaciones están en consonancia con los resultados de Zn^{+2} libre intracelular, donde el E_2 produjo un incremento en los niveles del mineral, mientras que la P_4 no lo modificó. Los presentes hallazgos indicarían que la homeostasis del Zn^{+2} en las CEOB se encuentra bajo la regulación de dichas hormonas ováricas. Dado que estas hormonas se encuentran presentes (de forma significativa) en diferentes momentos del ciclo estral y, que además, producen diferentes efectos en el Zn^{+2} intracelular de las CEOB, resulta probable que la concentración intracelular del Zn^{+2} en estas células varíe según la fase del ciclo estral. En este sentido, ya ha sido descrito que las CEOB presentan una expresión génica diferencial según las etapas de dicho ciclo (Bauersachs y col., 2004; Gonella-Díaz y col., 2015).

La presencia de Zn^{+2} en el medio (Zn_T) resultó en un patrón de expresión claramente diferente con respecto al Control. El agregado del mineral al cultivo generó en las CEOB la expresión de todos sus transportadores, mientras que en el grupo control sólo se detectó ARNm Slc39a6 y Slc30a7 y la expresión baja de Slc30a3. Este resultado guarda relación con lo encontrado en ovocitos y CC, donde el Zn^{+2} incrementó la expresión génica de casi todos sus transportadores.

Desde el punto de vista de los transportadores, los de mayor presencia entre los tratamientos fueron Slc39a6, Slc30a9 y Slc39a8, seguidos por Slc39a14, Slc30a7 y Slc30a3. Estos resultados marcan similitudes con el COC, dado que en los ovocitos se detectó mayor expresión de Slc39a6 y Slc30a9 y, en CC, de Slc39a6 y Slc39a8. Estudios previos han sugerido que Slc39a6 posee un papel importante como blanco y mediador de las funciones de STAT3 (*signal transducers and activators of transcription 3*; (Yamashita y col., 2004; Kagara y col., 2007). Los STAT3 median eventos celulares tales como la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular en respuesta a citoquinas y factores de crecimiento (Darnell, 1997; Hirano y col., 2000). Su expresión mantenida a través de los distintos tratamientos podría estar relacionada a procesos de proliferación celular por un lado y de remodelación epitelial por el otro, fenómenos presentes en los períodos folicular y luteal, respectivamente. La expresión de Slc39a6, como se vio en esta tesis (Capítulo 1) y en otros trabajos (Manning y col., 1988; Tozlu y col., 2006), se encuentra regulada por el E_2 ; sin embargo, hasta el momento no se ha reportado efecto alguno de P_4 sobre este transportador.

Con respecto al resto de los transportadores, se observó que los tratamientos hormonales influyeron en su expresión génica. Por otra parte, la expresión de todos

ellos se vio estimulada por el Zn^{+2} , tal como se observó en el COC, especialmente en los ovocitos (Capítulo 1).

Para concluir, los estudios realizados en CEOB cultivadas *in vitro* revelaron que el E_2 aumentaría los niveles de Zn^{+2} libre intracelular mientras que la P_4 no produciría cambio alguno. Por otra parte, se halló expresión de todos los transportadores de Zn^{+2} evaluados, y dichas expresiones variaron, en la mayoría de los casos, debido a la presencia de las hormonas y/o del propio Zn^{+2} . Los resultados obtenidos respaldan el carácter sensible de Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14 y Slc30a9 a la acción hormonal, y sugieren la misma característica para Slc30a3 y Slc30a7. Se destaca, además, la acción de E_2 por sobre la P_4 , dado que generó la expresión de un mayor número de transportadores. En base a lo expuesto previamente, se propone que la regulación de la homeostasis de Zn^{+2} en las CEOB involucra cambios intracelulares del mineral que varían en las distintas fases del ciclo estral.

CAPÍTULO 3

Efecto de la fase del ciclo estral sobre la expresión de los transportadores de Zn^{+2} en el COC y las CEOB

1 INTRODUCCIÓN

Tal como se ha descrito en los capítulos anteriores, el COC y las CEOB experimentan cambios significativos durante los períodos luteal y folicular del ciclo estral, en los que intervienen las hormonas FSH, LH, E₂ y P₄. Dichos cambios involucran aspectos fisiológicos, bioquímicos y morfológicos (Forde y col., 2011; Binelli y col., 2018). Además, se ha encontrado que estas hormonas participan en la regulación de la expresión génica en el COC (Endo y col., 2013) y las CEOB (Bauersachs y col., 2004; Gonella-Diaza y col., 2015), incluyendo la expresión de los transportadores de Zn⁺², como se vio en los Capítulos 1 y 2.

El objetivo de este capítulo consistió en evaluar el efecto de la fase del ciclo estral sobre la expresión de los transportadores de Zn⁺² en el COC y las CEO del bovino. Para ello, se analizó la expresión de los transportadores Slc39a6 (ZIP 6), Slc39a8 (ZIP 8), Slc39a14 (ZIP 14), Slc30a3 (ZnT 3), Slc30a7 (ZnT 7), Slc30a9 (ZnT 9) en COC y CEOB a partir de ovarios y oviductos de frigorífico obtenidos durante la fase luteal o folicular del ciclo estral.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de ovarios y oviductos

Se obtuvieron ovarios y oviductos de bovino a partir de hembras jóvenes de frigorífico (Aberdeen Angus) tal como se explicó en los Capítulos 1 y 2. En esta ocasión, al recolectar dichos órganos se los clasificó según correspondieran a la fase luteal o folicular del ciclo estral mediante la observación macroscópica de los ovarios y el útero (Miyamoto y col., 2000; Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Criterios morfológicos del ovario y el útero utilizados para clasificar la fase del ciclo estral en el bovino (Miyamoto y col., 2000)

Tejido	Criterio	Estro (0)	Temprana I* (2-3)	Temprana II* (5-6)	Media* (8-12)	Tardía* (15-17)	Folicular (19-21)
CL	Diámetro (mm)	5-15	3-10	10-15	15-25	15-25	10-15
	Superficie	Cubierta por tejido conectivo	Hemorrágica	Hemorrágica	Tejido luteal	Cubierta por tejido conectivo	Cubierta por tejido conectivo
	Color	Amarillo claro a blanco	Hemorrágico	Hemorrágico a rosado	Marrón a naranja	Naranja a amarillo	Amarillo claro
	Consistencia	Firme	Suave	Suave	Suave compacta	Compacta	Firme
Folículo	Folículo dominante	Ovulación					+
Endometrio	Color	Rosa pálido	Rosa a rojo	Rosa	Rosa a rojo	Rosa pálido	Rosa pálido
	Edema del estroma	+	+	-	-	-	+
	Moco	+	Leve	-	-	-	-

*Fases luteales. + indica presencia; -, ausencia. Se consideró que la hembra se encontraba en fase folicular cuando sus órganos presentaban las características descritas en la fase de Estro o Folicular; mientras que se la consideró en fase luteal cuando sus órganos presentaban las características de la fase Luteal Temprana I, II, Media o Tardía.

2.2 Obtención de COC y CEOB

Los COC se obtuvieron a partir de la aspiración de los ovarios recolectados y se los seleccionó siguiendo los mismos criterios que los descritos en el Capítulo 1. Por cada fase del ciclo estral, se dispusieron tres réplicas de 20 COC cada una. Por su parte, cada muestra de CEOB (de cada una de las fases del ciclo estral) se obtuvo a partir de dos pares de oviductos provenientes de 2 hembras mediante el método mecánico descrito en el Capítulo 2. En total, se realizaron tres réplicas de CEOB por fase (n=6). Las muestras de COC y CEOB se almacenaron a -80°C en Trizol (Invitrogen, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.3 Aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Se extrajo paralelamente el ARN de los COC y las CEOB de acuerdo a las instrucciones del fabricante del reactivo Trizol. La verificación de la cantidad y la calidad del ARN, así como la síntesis de ADNc, se llevaron a cabo como se detalló en los capítulos anteriores.

A continuación, se evaluó la expresión génica de los transportadores Slc39a6 (ZIP 6), Slc39a8 (ZIP 8), Slc39a14 (ZIP 14), Slc30a3 (ZnT 3), Slc30a7 (ZnT 7) y Slc30a9 (ZnT 9) en COC y CEOB. La RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador Step One Plus (ThermoFisher, USA) y la mezcla de reacción (de volumen final 20 ul) incluyó la Master Mix qPCR con SYBR (Inbio Highway, Tandil, Buenos Aires, Argentina), 5 ul de DNAc y 0,6 ul de primers (concentración final 0,5 uM). Las condiciones de ciclado fueron las mismas que se describieron en los capítulos anteriores. La especificidad de cada amplicón se comprobó individualmente mediante una curva de *melting* proyectada por el termociclador. Los experimentos incluyeron controles negativos y se realizaron por triplicado.

En esta ocasión, se utilizó el método de la Curva Estándar para la cuantificación de la expresión génica. Se generaron curvas estándar para cada par de primers a partir de amplificaciones por triplicado de *pools* de ADNc de tejido de abomaso e hipotálamo, en diluciones 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625. En todos los ensayos, las curvas tuvieron una pendiente de entre -3,2 y -3,6. Entre los triplicados, la desviación estándar fue, en todos los casos, menor a 0,161. Dichos valores se encontraron dentro de lo recomendado para estudios de expresión génica relativos (Bustin, 2002). Para evaluar la eficiencia de la RT-PCR para cada gen, se utilizaron los valores de las respectivas pendientes y se

calculó la eficiencia mediante un modelo de regresión lineal de acuerdo a la ecuación $E = 10 [-1 / \text{pendiente}]$, obteniéndose valores aceptables de entre 90 y 110%.

Los valores de ER para cada gen, según se tratara de COC o CEOB y de la fase luteal o folicular, se determinaron utilizando a ACTB como gen normalizador. Se tomó como referencia (ER = 1) arbitraria a la fase luteal para comparar expresión en la fase luteal vs fase folicular, tanto en COC como en CEOB. Con el fin de establecer si el gen endógeno seleccionado (ACTB) era apto para estudios de expresión génica, se analizaron sus niveles de expresión en las muestras problema y en los controles positivos (pool de ADNc de abomaso e hipotálamo). Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis para comparar los diferentes grupos, no encontrándose diferencias significativas en los valores de Ct de ACTB entre los mismos. Esto permitió validar el uso de ACTB como *housekeeping* para los estudios de expresión génica.

2.4 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño en bloque completamente aleatorio. El modelo estadístico incluyó el efecto aleatorio del bloque (réplica, $n = 3$ para cada ensayo) y el efecto fijo de la variable principal “fase estral” (folicular vs luteal). El efecto de la variable principal sobre la variable respuesta (ER de ARNm) se analizó mediante un modelo de regresión lineal utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute, Cary, NC, EEUU). Los resultados se expresaron como medias de los mínimos cuadrados \pm EEM. Se estableció la significación estadística en $p \leq 0,05$ para los efectos principales y $p \leq 0,10$ para la tendencia.

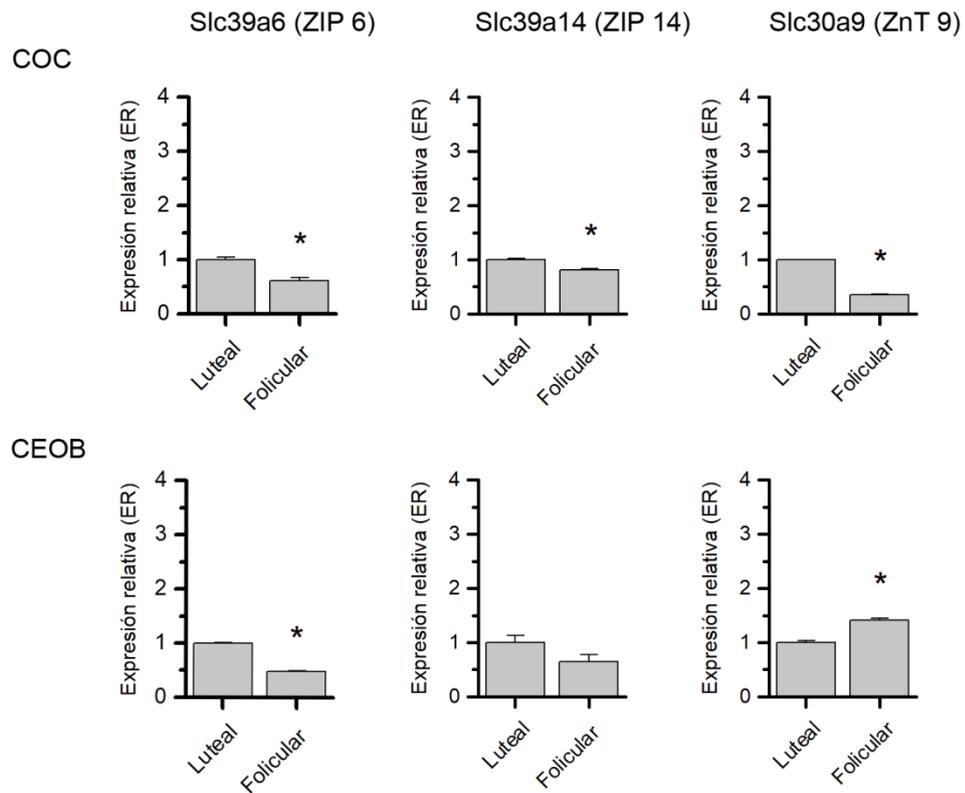
3 RESULTADOS

3.1 Expresión génica de los transportadores de Zn²⁺ en COC y CEOB en la fase luteal y folicular del ciclo estral

En COC y CEOB se cuantificó la expresión génica de Slc39a6, Slc39a14 y Slc30a9. El nivel de expresión en el resto de los transportadores no pudo ser cuantificado debido a los bajos niveles de ARNm (Slc39a8 y Slc30a3 en COC y CEOB; Slc30a7 en CEOB) o a la ausencia de expresión (Slc30a7 en COC). En la Figura 3.1 se muestra el efecto de la fase del ciclo estral sobre la ER de los transportadores en COC y CEOB.

En el COC, la ER fue mayor en la fase luteal respecto a la folicular para los tres transportadores (Figura 3.1). Las mayores diferencias de ER se registraron para Slc30a9, luego Slc39a6 y Slc39a14. En las CEOB, la fase luteal incrementó la ER de Slc39a6, disminuyó la ER de Slc30a9 y no modificó la ER de Slc39a14 respecto a la fase folicular.

Figura 3.1. Expresión de los transportadores Slc39a6, Slc39a14 y Slc30a9 según la fase del ciclo estral en COC y CEOB



Los valores de ER para cada gen se determinaron utilizando a ACTB como gen normalizador. Para realizar la comparación se tomó como referencia (ER = 1) la fase luteal. *Indica diferencias significativas entre la fase luteal y la folicular, $p \leq 0,05$. Los resultados se expresan como la media de los mínimos cuadrados \pm EEM.

4 DISCUSIÓN

Las fases folicular y luteal se suceden a lo largo del ciclo estral bovino generando cambios morfológicos, endocrinológicos y bioquímicos en el organismo de la hembra (Callejas, 2001). Las hormonas E_2 y P_4 , preponderantes en las fases folicular y luteal, respectivamente, junto con la FSH y la LH, tienen una importante participación en dichos cambios (Forde y col., 2011; Binelli y col., 2018). A lo largo de los capítulos

de esta tesis se comprobó, además, que estas hormonas regulan los niveles de Zn^{+2} intracelular y la expresión génica de (al menos) algunos de sus transportadores, tanto en el COC como en las CEOB. Profundizando en estos hallazgos, en el presente capítulo se comparó la expresión de los transportadores de Zn^{+2} en el COC y las CEOB en las fases folicular y luteal del ciclo estral. Dicha comparación fue posible sólo en aquellos transportadores que se expresaron en cantidad suficiente para su cuantificación, es decir, Slc39a6, Slc39a14 y Slc30a9.

En cuanto al COC, se registró una disminución en la ER de los transportadores Slc39a6, Slc39a14 y Slc30a9 en la fase folicular respecto de la luteal. Estos resultados están en concordancia con los hallazgos del Capítulo 1, donde se comprobó que la suplementación combinada de E_2 , LH y FSH (hormonas que alcanzan picos de concentración durante la fase folicular) durante la MIV disminuye la expresión de los tres transportadores en CC y, en ovocitos, disminuye la expresión de Slc30a9 y no modifica la de Slc39a6 y Slc39a14. Aunque el presente capítulo analiza la expresión de los transportadores en COC extraídos de folículos de 2-8 mm de diámetro (es decir, COC inmaduros) y no incluye un análisis de ovocitos y CC por separado, los resultados aquí obtenidos vía *ex vivo* coinciden con el modelo *in vitro* (Capítulo 1) en que las distintas condiciones hormonales influyen en la homeostasis del Zn^{+2} .

En el bovino, los COC obtenidos de folículos de igual tamaño (~2-8 mm) pero de diferente fase del ciclo estral presentan diferencias en su capacidad de desarrollo embrionario *in vitro* (Machatkova y col., 1996). Además, los ovocitos que crecen en presencia de altos niveles de P_4 presentan mayor dificultad para derivar en embriones con respecto a aquellos sometidos a bajos niveles de la hormona (Jaiswal y col., 2006). Estos hallazgos ponen de manifiesto que los COC poseen diferencias biológicas de

acuerdo a la fase del ciclo estral en la que se encuentran. Cada etapa del ciclo estral genera condiciones específicas e influyentes en el desarrollo del COC. En este sentido, los resultados de este capítulo han demostrado que la expresión de los transportadores de Zn^{+2} del COC varía de acuerdo a la fase de dicho ciclo. De esta forma, la regulación hormonal sobre la homeostasis de Zn^{+2} en el COC bovino no se limitaría únicamente al COC maduro (instancia final de desarrollo folicular) como se describió en el Capítulo 1, sino que existiría también en etapas más tempranas. Dado los múltiples roles del Zn^{+2} en procesos celulares como la expresión génica, la actividad enzimática y la defensa ante agentes oxidantes (Prasad, 1998, 2003; Powell, 2000) resulta lógico pensar que sus niveles intracelulares se encuentren regulados a lo largo de todo el desarrollo del COC. Respaldo esta idea, se ha demostrado muy recientemente que la disponibilidad de Zn^{+2} regula la actividad transcripcional, la metilación del ADN y contribuye a la adquisición de la competencia meiótica en ovocitos bovinos en crecimiento que provienen de folículos antrales tempranos (0,5 a 2 mm) (Lodde y col., 2020). Durante esta etapa temprana de su desarrollo, el ovocito transcribe y acumula activamente las sustancias que regularán y sostendrán las etapas posteriores del desarrollo del ovocito y el embrión (Lodde y col., 2020).

En cuanto a las CEOB, en la fase folicular disminuyó la expresión de Slc39a6 y se incrementó la de Slc30a9 (respecto de la fase luteal). Como miembro de la familia ZIP, Slc39a6 transporta Zn^{+2} del medio externo al intracelular a través de la membrana celular, a la vez que Slc30a9 (familia ZnT) traslada Zn^{+2} del citoplasma al núcleo (Baltaci y Yuce, 2018). Por lo tanto, si se toma en cuenta únicamente a estos transportadores como determinantes del nivel de Zn^{+2} intracelular, sería razonable pensar que durante la fase folicular dicho nivel en las CEOB se encuentre disminuido.

Anteriormente, en el Capítulo 2, se observó que el E₂ (presente de forma preponderante en la fase folicular) aumenta los niveles de Zn⁺² libre intracelular, mientras que la P₄ (presente de forma preponderante en la fase luteal) no modifica la concentración de Zn⁺² intracelular. Vale recordar que, en la fase folicular, el E₂ aumenta la capacidad de secreción de fluido, la velocidad de transporte del ovocito y la proliferación celular en el oviducto (procesos que podrían requerir de Zn⁺²), mientras que, en la fase luteal, la P₄ reduce la velocidad de dichos procesos (Binelli y col., 2018). A partir de lo expuesto, se podría inferir que los resultados del presente capítulo no concuerdan con las observaciones realizadas en el cultivo de CEOB; sin embargo, la regulación de la ER de los transportadores (y del propio Zn⁺² intracelular) depende de múltiples factores (además de las hormonas E₂ y P₄), como se ha comentado previamente. Por otro lado, es importante tener en cuenta que en el presente estudio no se evaluó el estatus de Zn⁺² de las hembras de las cuales se obtuvieron las CEOB. Por lo tanto, es posible que la existencia de diferencias en dicho estatus entre los animales condicionara los resultados de este capítulo (y los diferenciara del Capítulo 2), ya que, como se ha demostrado a lo largo de esta tesis, el Zn⁺² puede modificar la respuesta generada por las diferentes hormonas estudiadas. Si bien en el presente trabajo se halló que las fases del ciclo estral modifican la ER de los transportadores de Zn⁺², resta por conocer si dichas modificaciones se traducen en cambios en la concentración intracelular del mineral.

Una interesante observación en este trabajo reside en la baja expresión de Slc39a8, lo que impidió su cuantificación. En contraposición, su presencia fue reportada e incluso cuantificada en el COC maduro (Capítulo 1) y se la detectó claramente en las CEOB luego del cultivo (Capítulo 2). Una situación similar se observó (sólo en las CEOB) en cuanto a Slc30a7 y Slc30a3, que mostraron aquí bajos niveles de ARNm

pero tuvieron una expresión considerable en varios tratamientos del Capítulo 2. Los hallazgos del presente capítulo discrepan con la hipótesis planteada en el Capítulo 2, que proponía mayor expresión de Slc30a7 en la fase folicular que en la luteal. Estos resultados señalan cuan variable puede resultar la expresión de los transportadores de Zn^{+2} y ponen de manifiesto las diferencias que pueden presentarse entre el modelo *in vitro* y la experimentación con células *ex vivo*, donde participa un número mayor de factores regulatorios.

En conclusión, los resultados de este capítulo señalan diferencias en la expresión génica de los transportadores Slc39a6, Slc39a14 y Slc30a9 según la fase del ciclo estral (luteal o folicular) en los COC y CEO del bovino. Aunque la caracterización de la expresión de los transportadores de Zn^{+2} no es suficiente para predecir el balance general del mineral en el COC en desarrollo, el hecho de que estos transcritos se expresen diferencialmente a lo largo del ciclo estral sugiere los COC controlan activamente la abundancia de estos ARNm, probablemente para modular las funciones celulares dependientes de Zn^{+2} . Por otra parte, las discrepancias observadas entre los resultados de CEOB de este capítulo y los obtenidos luego de su cultivo (Capítulo 2) señalan que existirían factores adicionales de regulación génica además de la presencia de las hormonas evaluadas y el propio Zn^{+2} .

CAPÍTULO 4

Efecto del Zn^{+2} y el E_2 sobre el proteoma de las células
epiteliales del oviducto bovino (CEOB)

1 INTRODUCCIÓN

El oviducto es una parte estructural y funcional clave en el tracto reproductivo del mamífero (Besenfelder y col., 2012). Las CEOB sufren importantes modificaciones ante el estímulo de señales extrínsecas, como las hormonas esteroideas (revisión bibliográfica por Binelli y col., 2018). Al respecto, se conoce que el E₂ y la P₄ provocan modificaciones a nivel morfológico (Steinhauer y col., 2004) y transcripcional (Ulbrich y col., 2010) en las CEOB durante el ciclo estral, e incluso hay estudios sobre la influencia de dichas hormonas a nivel proteómico en CEO de cerdas, ovejas y otros mamíferos (Seytanoglu y col., 2008; Soleilhavoup y col., 2016). Además, estas hormonas juegan papeles relevantes en la homeostasis del Zn⁺² en las CEOB, como se comprobó a lo largo de los capítulos anteriores. En la actualidad, está bien establecido que el Zn⁺² cumple funciones esenciales en la célula en general (Falchuk, 1998; Dreosti, 2001; Prasad, 2003; Cathomen y Keith Joung, 2008; Jackson y col., 2008), y contribuye a la función reproductiva de los vertebrados en particular (Mcardle y Ashworth, 1999; Yamaguchi y col., 2009). Sin embargo, sólo en años recientes se ha comenzado a entender el rol del Zn⁺² en el tracto reproductivo a nivel celular, como su influencia en la maduración y fecundación en el ovocito (Kim y col., 2011; Anchordoquy y col., 2014; Que y col., 2019). En este contexto, el impacto que podría tener el Zn⁺² sobre las funciones celulares de las CEOB en general, y en momentos específicos del ciclo estral en particular, es aún desconocido.

El objetivo de este capítulo fue investigar el efecto del Zn⁺² en el proteoma de las CEOB en presencia de E₂. Como se halló en el Capítulo 2, la presencia de E₂ en el medio de cultivo incrementa la expresión de los transportadores de Zn⁺² y los niveles intracelulares del mineral en las CEOB. Por lo tanto, resulta razonable pensar que el E₂

podría incrementar el Zn^{+2} en las CEOB durante la fase folicular del ciclo estral, modificando el proteoma de estas células y por lo tanto su funcionamiento. Para ello, se utilizaron dos tipos de cultivo *in vitro* a corto plazo: a) un cultivo en suspensión (CS) y b) un cultivo *in situ* (CIS) (Georgiou y col., 2005). Al igual que en el Capítulo 2, los cultivos se establecieron por un período de 24 horas para preservar las características morfológicas y la capacidad de respuesta al estímulo hormonal. Se suplementó el medio de cultivo con Zn^{+2} para alcanzar un estatus adecuado (Kincaid, 2000; Picco y col., 2010), y se añadió E_2 para imitar las condiciones de la fase folicular (Ulbrich y col., 2003). Con el objetivo de identificar los cambios relativos de abundancia en el proteoma luego del cultivo con Zn^{+2} y E_2 , se realizó la extracción de las proteínas y se las analizó mediante espectrometría de masas acoplada a nano-cromatografía líquida de alta resolución (nano LC- MS/MS). Además, se llevó a cabo un análisis funcional mediante la red String (Szklarczyk y col., 2019) y se categorizó las proteínas identificadas.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos para el cultivo *in vitro* de CEOB

Todos los reactivos necesarios para la preparación de los medios de cultivo se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE. UU.), excepto que se indique lo contrario. Los CEOB se cultivaron *in vitro* en medio TCM-199, el cual incluyó SFB al 10% (v / v), un mix de antibióticos al 1% (kanamicina 5 mg/ml, penicilina G 5,9 mg/ml y estreptomina 10 mg/ml) y anfotericina B al 1% (2,5 ug/ml).

2.2 Cultivo celular

Se obtuvieron oviductos de bovino en el matadero local, a partir de hembras de raza Simmental, seleccionándose aquellos correspondientes a hembras en la fase folicular del ciclo estral. La selección de los oviductos se realizó por observación macroscópica de los ovarios y el útero (Miyamoto y col., 2000) y, una vez en el laboratorio, los oviductos se lavaron y desinfectaron, para luego separar el mesosalpinx y los restos de útero circundantes, tal como se explicó en el Capítulo 2. Para los cultivos, se utilizaron tres oviductos (de tres animales diferentes) por réplica a partir de los cuales se hizo un pool de células. Ante la ausencia de trabajos previos sobre el impacto del Zn^{+2} en las CEOB se decidió utilizar dos abordajes diferentes para el cultivo de las CEOB. Los resultados obtenidos a partir de estos ensayos permitirán establecer si el efecto producido por el mineral sobre dichas células se encuentra condicionado por el método de cultivo empleado. En el primer cultivo (CS) se evaluaron los efectos del Zn^{+2} y el E_2 tanto en conjunto como por separado, mientras que en el segundo (CIS) se evaluó específicamente el efecto del Zn^{+2} en presencia de E_2 .

Cultivo en suspensión (CS)

Se obtuvieron las CEOB mediante el mismo método para el cultivo explicado en el Capítulo 2. Esto incluyó la prueba de viabilidad y conteo celular con el colorante azul de tripán. Luego, en una placa de 12 *wells*, se sembraron por pocillo 1×10^6 células viables en 1 ml de medio de cultivo y se realizó un pre-cultivo sin estimulación por 4 horas. Posteriormente, se aplicaron los siguientes tratamientos: A) Control; B) 1,2 $\mu\text{g/ml}$ Zn^{+2} (Picco y col., 2010); C) 10 pg/ml E_2 (Ulbrich y col., 2003); D) 10 pg/ml E_2 1,2 $\mu\text{g/ml}$ Zn^{+2} . Debido al uso de SFB en el medio de cultivo, se evaluó la concentración de Zn^{+2} y E_2 antes de realizar los distintos tratamientos (como se describió en los capítulos anteriores). Todas las concentraciones halladas se

consideraron despreciables en comparación con las utilizadas en los tratamientos. Las CEOB se cultivaron a 39°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación por 24 horas (Rottmayer y col., 2006; Ulbrich y col., 2010). Posteriormente, se obtuvieron pellets de las células mediante una serie de centrifugaciones a 300 g por 5 minutos, para luego almacenarlos a -80°C. Se llevaron a cabo tres réplicas por tratamiento, y cada réplica estuvo compuesta por un *pool* de CEOB de tres oviductos.

Cultivo *in situ* (CIS)

Para la preparación de este cultivo, se manipularon los oviductos de acuerdo a un método publicado previamente (Georgiou y col., 2005). En primer lugar, se precintó uno de los extremos del órgano (el istmo) con hilo quirúrgico estéril y se inyectó por pipeteo a través del ampulla 1 ml de uno de los siguientes medios: C) 10 pg/ml E₂; D) 10 pg/ml E₂ 1.2 µg/mL Zn⁺², para luego cerrar ese extremo con hilo. Finalmente, los oviductos se colocaron en vasos de precipitado y se los cubrió con PBS tibio. Su incubación transcurrió a 39°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación por 24 horas. Al finalizar la incubación, se quitaron los cerramientos en los extremos y se lavó cada oviducto por pipeteo a través del ampulla con 2 ml de PBS. A continuación, se aislaron las CEOB mediante presión mecánica a lo largo del oviducto y salida por el ampulla (método mecánico explicado anteriormente). A las células obtenidas se las dejó sedimentar y se descartó el sobrenadante. Las CEOB se lavaron dos veces mediante centrifugación a 300 g por 5 min utilizando PBS con mix de antibióticos. Para terminar, se guardaron los pellets a -80 °C. El experimento incluyó tres réplicas biológicas de cada tratamiento.

2.3 Proteínas: preparación de muestras

Las células se lisaron con urea 7 M, tiourea 2 M y *buffer* ditioneitol (DTT) 50 mM con cóctel inhibidor de proteasas Halt 1X (Pierce®, Thermo Fisher Scientific). Luego, los lisados se aclararon por centrifugaron a 10 000 g durante 19 minutos a 4 °C para después precipitar las proteínas mediante el método “ácido tricloroacético-deoxicolato de sodio” (*TCA-DOC*) (Arnold y Ulbrich-Hofmann, 1999). Éste consistió, en primer lugar, en la dilución 1:6 de cada lisado usando PBS hasta alcanzar una concentración de urea de 1,5 M. A continuación, se agregó deoxicolato de sodio (*DOC*) al 1% en una proporción 1:10 v/v. Este preparado se incubó en hielo durante 15 minutos para luego añadir ácido tricloroacético (*TCA*) frío al 50% en una proporción 1:5 v/v. Al precipitado resultante se lo lavó con 800 ul de acetona fría (-20 °C) y se lo sometió a centrifugación tal como se describió más arriba. Este lavado se repitió dos veces y luego los pellets de proteína se airearon para su secado durante 5 minutos. Los pellets se resuspendieron en *Protease Max Buffer* (Promega) al 0,1 % y se determinó su concentración mediante el *bicinchoninic acid (BCA) protein assay Kit* (Pierce®, Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.4 Digestión de proteínas (método *in-solution*)

Se tomaron 5 ug de proteínas de cada muestra para su digestión enzimática, que se realizó siguiendo el protocolo “*in solution*” en dos pasos del mix *Trypsin/Lys-C* (*Mass Spec Grade*, Promega) según las instrucciones del fabricante y con ciertas modificaciones descritas previamente (Yu y col., 2019). El ensayo consistió en la mezcla de los 5 ug de proteínas con una proporción 1:1 de urea 8 M y 50 mM de bicarbonato de trietilamina (*TEAB*). Luego, las proteínas se redujeron con DTT 5 mM a

37 °C por 30 minutos y, a continuación, se alquilataron con iodoacetamida 15 mM (AppliChem, Germany) durante 30 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. Se añadió el mix *Trypsin/Lys-C* en un radio 30:1 de proteína:proteasa (p/p) y se llevó a cabo la digestión a 37 °C durante 4 horas. Después, las muestras se diluyeron en urea 1 M con TEAB 50 mM y se incubaron durante la noche a 37 °C. La digestión se detuvo con ácido fórmico (AF) al 5 % hasta alcanzar una concentración final de 1 % en el preparado. Después, se centrifugaron las muestras a 10 000 g por 10 minutos. Finalmente, los péptidos se purificaron mediante el *Pierce C18 Spin Tip purification* (Pierce®, Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

2.6 Análisis de espectrometría de masas

Las muestras analizadas por nano *LC-MS/MS* se muestran en la Tabla 4.1. En primer lugar, los péptidos secos se disolvieron en 5 ul de AF al 0,1 %. Luego, se tomó 1 ul de muestra (correspondiente a aproximadamente 1 ug de péptidos) para su análisis en un nano *HPLC Ultimate 3000 RSLC* (Dionex, Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolar Orbitrap (Q Exactive™ Plus, Thermo Fisher Scientific, USA). Se analizaron al menos dos réplicas técnicas por muestra.

Las muestras se separaron en una columna *Acclaim PepMap* de 50 cm (diámetro interno de 75 um, tamaño de partícula de 2 um, tamaño de poro de 100 Å, Thermo Fisher Scientific) a una velocidad de flujo de 300 nl/min y con fases móviles A (agua ultrapura con AF al 0,1 % v/v) y B (acetonitrilo al 80% con AF al 0,08 % v/v). Se utilizaron gradientes de 3 % a 35 % de B en 30 minutos y de 35% a 44% de B en 6 minutos adicionales, seguidos por un lavado con B al 95 %. El espectrómetro de masa se utilizó en un modo ion positivo mediante una estrategia de adquisición dependiente

de datos. El espectro de MS se adquirió en un rango de 375 – 1500 m/z con una resolución de 70000. Se seleccionaron los primeros 15 iones precursores para el análisis MS/MS, y se los excluyó dinámicamente para su fragmentación durante 50 segundos. Se consideraron rangos de entre 445,12003 m/z y 391,28429 m/z.

Tabla 4.1 Muestras para el análisis por espectrometría de masa

Cultivo	Tratamiento	ID de la muestra	Concentración de la proteína (ug/ul)
CS	A	PA1	1,06
		PA2	1,51
		PA3	2,31
	B	PB1	2,22
		PB2	1,08
		PB3	3,62
	C	PC1	2,23
		PC2	0,97
		PC3	3,10
	D	PD1	3,84
		PD2	1,01
		PD3	2,39
CIS	C	PC1	1,70
		PC2	1,68
		PC3	1,61
	D	PD1	0,97
		PD2	2,53
		PD3	1,16

Se prepararon tres réplicas por tratamiento y sistema de cultivo y se las analizó mediante nano LC-MS/MS. Los tratamientos fueron: A) Control; B) 1,2 µg/mL Zn⁺²; C) 10 pg/ml E₂; D) 10 pg/ml E₂ 1.2 µg/mL Zn⁺².

2.7 Análisis de datos

Se procesaron todos los datos crudos de espectrometría de masa con el software MaxQuant v. 1.6.2.6 (Cox y Mann, 2008; Tyanova y col., 2016a) utilizando el motor de búsqueda Andromeda (Cox y col., 2011) y la base de datos de proteínas de *Bos taurus* en Uniprot (descargada el 25 de marzo de 2019, 23965 accesos). Los parámetros de búsqueda utilizados fueron: se estableció a *Trypsin/P* como enzima y se permitieron hasta un máximo de dos sitios de corte fallidos; la carbamidometilación se estableció como modificación fija; la oxidación de metionina y la N-acetilación de proteínas se asignaron como modificaciones de variables. La estimación de la Tasa de Falsos Descubrimientos, (*FDR*, False Discovery Rate) se estableció en 1% tanto para proteínas como para péptidos. Las tablas de resultados crudos de MaxQuant se procesaron descartando aquellas proteínas marcadas como “contaminante potencial”, “reverso”, “identificado sólo por sitio” e identificadas con sólo un péptido único y/o *razor*. La cuantificación relativa de proteínas se basó en la transformación al logaritmo decimal de las intensidades de cuantificación sin marcaje (*LFQ*) y se llevó a cabo mediante el software Perseus (Tyanova y col., 2016b). Las proteínas identificadas pertenecientes a cada cultivo (CS o CIS) se filtraron para obtener al menos un 60 % de datos válidos en total. Los valores ausentes se reemplazaron por medio de una distribución normal y se promediaron las réplicas técnicas. Para las comparaciones entre grupos se utilizó el test T de Student. Para los análisis de función, se seleccionaron aquellas proteínas con $p < 0,05$ y cambios de abundancia mayores a 1,5 veces al comparar entre grupos.

2.8 Análisis funcional

Los ID de los genes correspondientes a las proteínas identificadas se procesaron en la red String (Szklarczyk y col., 2019) para asignarles anotaciones de *Gene Ontology* (GO) de tipo i) componente celular, ii) función molecular y iii) procesos biológicos.

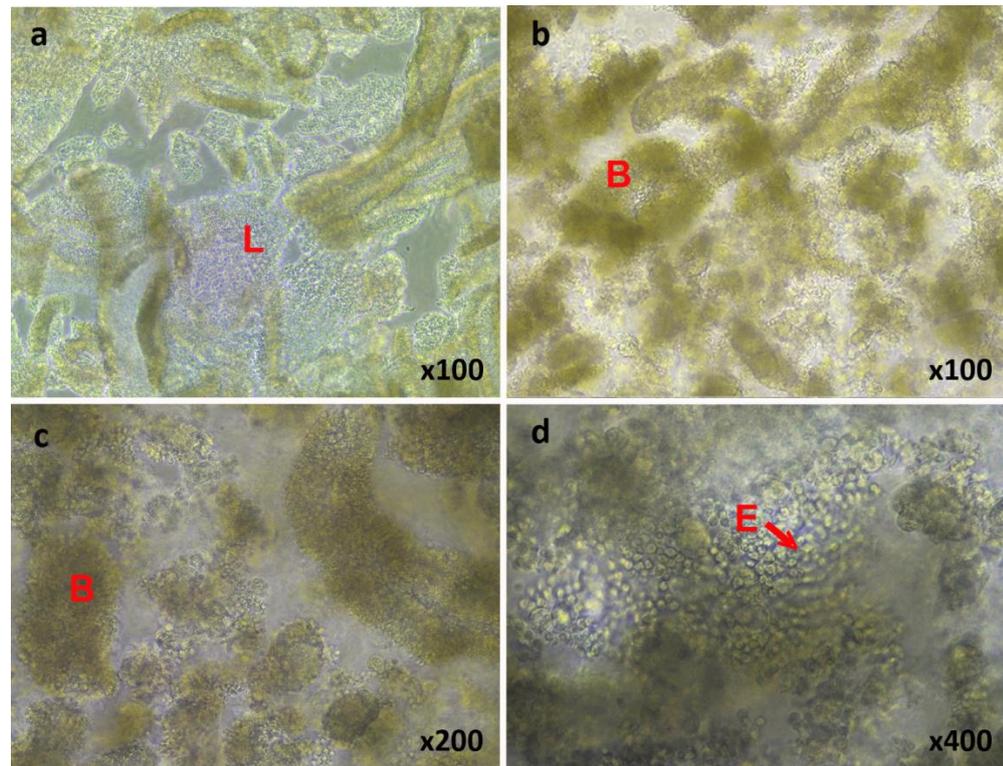
3 RESULTADOS

3.1 Sistemas de cultivo de CEOB

Previo al CS, se analizó una alícuota de las células aisladas mecánicamente mediante tinción con azul de tripán. En promedio se obtuvieron $71,2 \times 10^6$ células por oviducto y un porcentaje de $90,1 \pm 0,03$ % de ellas fue viable. Antes de la siembra en placa, se evaluó por microscopio invertido las características de la suspensión celular. Se observaron láminas y gruesos agregados celulares con presencia de cilias (Figura 4.1 A). Los bloques de células eran móviles y vibraban debido a la actividad ciliar. Esta morfología y actividad celular se mantuvo durante las 24 horas que duró el cultivo (Figura 1 B-D).

En el caso del CIS, al finalizar el cultivo y extraer las células de los oviductos, se evaluó la morfología celular mediante microscopía. Luego, se tiñeron las CEOB con azul de tripán para la prueba de viabilidad. Como las células no se individualizaron, no se realizó un conteo pero la mayoría de las células no tomó el colorante y se las observó organizadas en agregados y con signos de viabilidad como los mencionados en el CS.

Figura 4.1. Imágenes de las CEOB a través de un microscopio invertido



Las CEOB se organizaron en láminas y gruesos aglomerados y mantuvieron una actividad ciliar continua a lo largo del cultivo de 24 horas. a) Láminas y agregados de CEOB aislados mecánicamente en $t=0$ del cultivo (x100). b) y c) Agregados celulares (24 horas de cultivo; x100 y 200x, respectivamente). d) CEOB dispuestas en un entramado (24 horas de cultivo; x400). Las letras en rojo señalan la configuración del agregado celular; L: lámina, B: bloque, E: entramado.

3.2 Análisis proteómico general

Considerando todos los grupos analizados, en total se identificaron 2276 proteínas con al menos 2 péptidos únicos y/o *razor*. Con el objetivo de evaluar el impacto del Zn^{+2} y el E_2 en el proteoma de las CEOB, se estudiaron los cambios de abundancia proteica relativa entre los tratamientos de cada sistema de cultivo (CS o CIS; Tablas 4.3 y 4.4, respectivamente).

Para evaluar el impacto del Zn^{+2} en el proteoma de las CEOB, se compararon las células cultivadas en presencia de Zn^{+2} vs el grupo Control (B-A; Tabla 4.3), lo que arrojó 5 proteínas con diferencias en su abundancia. Luego, para ver el efecto específico que tendría el Zn^{+2} en la fase folicular, se comparó Zn^{+2} con E_2 vs sólo E_2 en el medio (D-C), con un resultado de 6 proteínas con diferencias en abundancia. El efecto de la exposición de las CEOB al E_2 se analizó al comparar el proteoma de células expuestas al E_2 vs el grupo control (C-A), que dio lugar a 24 proteínas con cambios en su abundancia. Para ver el impacto del E_2 junto con el Zn^{+2} en las CEOB, se comparó el proteoma de células expuestas a ambos estímulos vs sólo Zn^{+2} (D-B), con un resultado de 24 proteínas con diferencias en abundancia. Finalmente, se cotejaron las CEOB cultivadas en presencia de Zn^{+2} y E_2 vs el Control (D-A), lo que mostró 30 proteínas con cambios de abundancia entre grupos.

Tabla 4.3 Cambios en la abundancia relativa de las proteínas entre tratamientos (CS de CEOB)*

Proteína			Cambios de abundancia relativa entre tratamientos				
ID del gen	Nombre de la proteína	ID Uniprot	B-A	C-A	D-B	D-C	D-A
TJP2	Proteína de unión estrecha 2	F1MBN2	0,58				
RTCB	RNA-ligasa de empalme RtcB homóloga	Q5E9T9	0,47		3,01		
ARCN1	Coatómero subunidad delta	P53619	0,44		1,96		
SLC25A3	Proteína portadora de fosfato, mitocondrial	P12234	0,35				
PDLIM4	PDZ y proteína de dominio LIM 4	Q3T005	0,34				
PHPT1	14 kDa fosfohistidina fosfatasa	Q32PA4		0,60		2,00	
MOGS	Manonosil-oligosacárido glucosidasa	E1B7U1		0,18	0,37	1,95	
CRYZ	Zeta- cristalina	O97764				0,64	0,66
OLA1	ATPasa 1 tipo Obg	Q2HJ33				0,59	
ECII	Enoyl-CoA delta isomerasa 1	F1MTT7				0,52	
ATP2B4	ATPasa 4 transportadora de calcio de membrana plasmática	D3K0R6				0,41	
ALDH9A1	4-trimetilaminobutiraldehído deshidrogenasa	F1N2L9		1,67	2,95		
PDHA1	Piruvato deshidrogenasa E1 subunidad alfa, forma somática, mitocondrial	A7MB35				2,45	

SSR1	Proteína asociada a translocón, subunidad alfa	A6QLP7		2,19	
SSBP1	Proteína de unión a ADN monocatenaria, mitocondrial	F1N1S0		1,92	
TNPO1	Transportina-1	Q3SYU7		1,88	
USO1	Factor de transporte vesicular general p115	P41541		1,50	
RSPH3	Proteína "spoke head" radial 3, homóloga	A8E4N3		0,66	
SCCPDH	Sacarropina oxidoreductasa tipo deshidrogenasa	F1MX05		0,60	
NUP205	Nucleoporina 205	F1N1V3		0,59	
LRRRC59	Proteína rica en repeticiones de leucina 59	Q5E9X4	0,46	0,57	0,51
CKAP4	Proteína asociada al citoesqueleto 4	F1ME65	0,53	0,56	0,54
PBXIP1	Proteína 1 que interactúa con el factor de transcripción de la leucemia de células B	A6QLY7		0,56	0,59
NSFL1C	NSFL1 cofactor p47	Q3SZC4		0,55	0,60
LETM1	Proteína intercambiadora de protones / calcio mitocondrial	F1N3R4		0,51	
RAB18	Proteína relacionada con Ras Rab-18	Q0IIG8		0,46	0,41
BCAP31	Proteína asociada al receptor de células B 31	Q5E9F1		0,41	
RPS20	Proteína ribosómica 40S S20	Q3ZBH8		0,38	0,25
CANX	Calnexina	A7Z066	0,39	0,36	0,29
LPCAT4	Proteína LPCAT4	A0JNE8		0,29	0,29
ATP2B4	ATPasa 4 transportadora de calcio con membrana plasmática	D3K0R 6		0,28	
TMPO	Timopoyetina	F1MSQ9		0,19	0,17
ALDH9A1	4-trimetilaminobutiraldehído deshidrogenasa	Q3ZBH5	2,52		
KRT8	Queratina tipo II citoesqueleto 8	F1MU12	1,80		
APRT	Adenina fosforibosiltransferasa	Q56JW4	2,41		
ATP5MF	ATP sintasa subunidad f, mitocondrial	Q28851			0,63
MT-CO2	Subunidad 2 de citocromo c oxidasa	P68530	0,62		0,51
ALDH3A2	Aldehído deshidrogenasa	A6QQT4	0,56		0,51
IQGAP1	Motivo IQ que contiene la proteína activadora de GTPasa 1	F1MC48	0,28		
SEC22B	SEC22 homólogo B, proteína de tráfico de vesículas	F1MLE8	0,42		
EXOG	Exo / endonucleasa G	E1BAZ9			0,38
CYB5B	Proteína CYB5B	Q0P5F6	0,63		0,42
ARL6IP5	Proteína 3 de la familia PRA1	Q5E9M1			0,43
SCAMP2	Proteína de membrana asociada al portador, secretora	A6QR35			0,44
DHRS7B	Deshidrogenasa/reductasa SDR, miembro de la familia 7B	F1MN23			0,52
NDUFA7	NADH deshidrogenasa [ubiquinona]1, subunidad alfa subcomplejo7	Q05752			0,54
S100A11	S100	F1MX83			0,55
CYC1	Citocromo c1, proteína hemo, mitocondrial	P00125			0,61
TOMM70	Translocase de la membrana mitocondrial externa 70	Q08E34			0,65
CDC42	Homólogo de proteína 42 de control de división celular	F1MND1			0,66
NAP1L1	Ensamblaje de nucleosoma proteína 1 tipo 1	A6H767			1,63
PGM2	Proteína PGM2	A6QQ11			1,85
HRMT1L2	HM T1 hnRNP metiltransferasa tipo 2, isoforma 3	Q5E949			2,11

TPT1	Proteína tumoral controlada por traducción	Q5E984		2,19
PSMD11	Subunidad reguladora 11 del proteasoma 26S, no ATPasa	Q2KI42		2,20
DNAAF6	Marco de lectura abierto 41 del cromosoma X, ortólogo	Q2KIX9	2,19	2,25
PDXK	Piridoxal quinasa	Q0II59		2,64
COX4I1	Citocromo c oxidasa subunidad 4 isoforma 1, mitocondrial	P00423	0,64	
GDI1	Rab GDP inhibidor de disociación alfa	P21856	1,64	
NDUFB10	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1 subunidad beta subcomplejo 10	Q02373	2,64	
ATP5MF	ATP sintasa subunidad f, mitocondrial	Q28851	0,65	
RBBP4	Proteína de unión a histonas RBBP4	Q3MHL3	1,57	
NUDT21	Factor de especificidad de escisión y poliadenilación subunidad 5	Q3ZCA2	1,80	
SEC13	Proteína SEC13 homóloga	Q3ZCC9	1,85	
KCNRG	Proteína reguladora del canal de potasio	Q863D4	1,66	
TXNDC5	TXNDC5 proteína no caracterizada	G3MZD8	2,56	

* Proteínas con cambios de $\geq 1,5$ veces entre tratamientos; $p < 0,05$. Tratamientos en el cultivo: A) Control; B) 1,2 $\mu\text{g/ml}$ Zn^{+2} ; C) 10 pg/ml E_2 y D) 10 pg/ml E_2 con 1,2 $\mu\text{g/ml}$ Zn^{+2} .

En el sistema CIS, se analizó el impacto del Zn^{+2} en presencia de E_2 sobre el proteoma de las CEOB (D-C) con el mismo abordaje que en el CS. Un total de 57 proteínas mostraron cambios de abundancia entre los tratamientos ($p < 0,05$; Tabla 4.4).

Tabla 4. Cambios en la abundancia relativa de proteínas luego de la suplementación con Zn^{+2} en presencia de E_2 (CS de CEOB)*

Proteína			Cambios de abundancia relativa entre tratamientos
ID del gen	Nombre de la proteína	ID Uniprot	D-C
TPD52	Proteína no caracterizada	F1MBV6	4,46
HSBP1	Proteína de unión al factor de choque térmico 1	Q3ZC22	3,85
OCIAD1	Proteína 1 que contiene el dominio OCIA	Q5E948	3,58
PML	Proteína no caracterizada	F6R1H3	2,79
ST13	Proteína de unión al factor de choque térmico, 70kD	A7E3S8	2,59
C1QBP	Proteína de unión al subcomponente del complemento componente 1 Q, mitocondrial	Q3T0B6	2,56
NDUFV2	NADH deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína 2, mitocondrial	P04394	2,29
AHNAK	AHNAK nucleoproteína	F1MCK2	2,17

ANP32E	Fosfoproteína nuclear ácida rica en leucina, familia 32, miembro E	F1MPJ7	2,06
S100A14	Proteína S100-A14 (proteína de unión al calcio S100 A14)	Q3MHP3	1,76
FIS1	Proteína mitocondrial de fisión 1 (homólogo de Fis1)	Q3T0I5	1,70
TSGA10	Específica del testis, 10	E1BE64	1,70
PPL	Periplaquina	F1N2K8	1,64
PGRMC1	Componente receptor de progesterona asociado a la membrana 1	G5E5M5	1,55
IGBP1	Proteína IGBP1	A7YY24	1,53
PIH1D3 CXH XORF41	Marco de lectura abierto 41 del cromosoma X, ortólogo	Q2KIX9	1,52
ATP5PD ATP5H	ATP sintasa subunidad d, mitocondrial	P13620	1,51
ALDH18A1	Delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintasa	Q2KJH7	0,67
DNAJA1	Homóloga de DnaJ, subfamilia A miembro 1	Q5E954	0,67
SEC31A	Homóloga A de SEC31, componente complejo de recubrimiento COPII	E1BMP2	0,66
ECH1	Hidratasa de enoyl-CoA 1	F6PRB5	0,66
TES	Testina	Q2YDE9	0,66
SAR1A	SAR1a de unión a GTP	Q3T0D7	0,61
SND1	Proteína 1 que contiene el dominio de nucleasa estafilocócica	Q863B3	0,60
AP1G1	Subunidad compleja AP-1 gamma	F1MF68	0,58
RPL7	Proteína ribosómica 60S L7	Q58DT1	0,58
HYOU1	Proteína más abundante por hipoxia, 1	E1B748	0,57
VCP	ATPasa de retículo endoplásmico transitorio	G3X757	0,56
RBBP7	Proteína de unión a histonas RBBP7	Q3SWX8	0,56
AP2B1 CLA PB1	AP-2 subunidad compleja beta (AP105B)	P63009	0,56
RPS13	Proteína ribosómica 40S S13	Q56JX8	0,56
ARL8B	ADP- proteína similar al factor de ribosilación 8B	F2Z4I5	0,54
SERPINH1	Serpina H1	Q2KJH6	0,53
RHOC ARHC	Proteína de unión a GTP relacionada con Rho RhoC	Q1RMJ6	0,50
RPS4	Proteína ribosómica 40S S4	P79103	0,49
ACTN4	Alfa-actinina-4 (alfa actinina 4, no muscular)	A5D7D1	0,49
CSRP1	Proteína 1 rica en cisteína y glicina	Q3MHY1	0,47
TCP1	Proteína 1 subunidad alfa del complejo T	G5E531	0,47
COPZ1	Coatómero subunidad zeta-1	P35604	0,46
TMED2	RNP24	C3V9V7	0,44
GNE	Glucosamina (UDP-N- acetil)-2-epimerasa/N-acetilmannosamina quinasa	F1MIL9	0,43
NSDHL	Esterol-4-alfa-carboxilato 3 deshidrogenasa, descarboxilante	Q3ZBE9	0,42
DNAJB11	Homóloga de DnaJ, subfamilia B miembro 11	Q3ZBA6	0,41

RPL27	Proteína ribosómica 60S L27	P61356	0,40
ARL1	Proteína 1 similar al factor de ribosilación de ADP	Q2YDM1	0,40
SDF2L1	Proteína similar al factor 2, derivada de células estromales	Q3T083	0,40
OVGP1 OGP	Glucoproteína específica de oviducto (proteína de oviducto dependiente de estrógenos)	Q28042	0,36
HDLBP	Proteína de unión a lipoproteínas de alta densidad	F1MT25	0,33
ATP2A2	ATPasa transportadora de calcio	F1MPR3	0,30
PYCR1	Pirrolina-5-carboxilato reductasa 1, mitocondrial	Q58DT4	0,25
RPL6	Proteína ribosómica 60S L6	Q58DQ3	0,25
RPS11	Proteína ribosómica 40S S11	Q3T0V4	0,24
RPS27	Proteína ribosómica 40S S27	Q2KHT7	0,19
RPL4	Proteína ribosómica 60S L4	Q58DW0	0,19
H2AFJ	Histona H2A.J	Q3ZBX9	0,17
RPL13	Proteína ribosómica 60S L13	Q56JZ1	0,16
GFPT1	Glutamina --fructosa-6-fosfato transaminasa 1	F1MZY2	0,11

* Proteínas con cambios de $\geq 1,5$ veces entre tratamientos; $p < 0,05$. Tratamientos en el cultivo: C) 10 pg/ml E₂ y D) 10 pg/ml E₂ con 1,2 $\mu\text{g/ml Zn}^{+2}$.

3.3 Análisis funcional

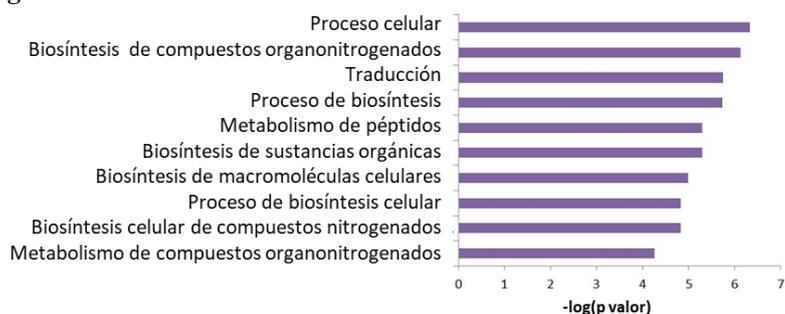
El análisis funcional mediante String mostró los principales términos GO encontrados para las proteínas identificadas al comparar D-C en el CIS (Figura 4.2). En cuanto a localización celular, las proteínas se asociaron principalmente a los términos “citoplasma”, “organela intracelular” y “ribosoma” (Figura 4.2 A). Con respecto a los procesos biológicos, en primer lugar se encontró “biosíntesis” y “traducción de compuestos organonitrógenos” (Figura 4.2 B). Sobre la función molecular, los principales términos fueron “constituyente estructural del ribosoma” e “involucrado en la unión a macromoléculas” (Figura 4.2 C).

Figura 4.2 Análisis funcional de las proteínas que modificaron su abundancia por efecto del Zn^{+2} en presencia de E_2 (CIS de CEOB).

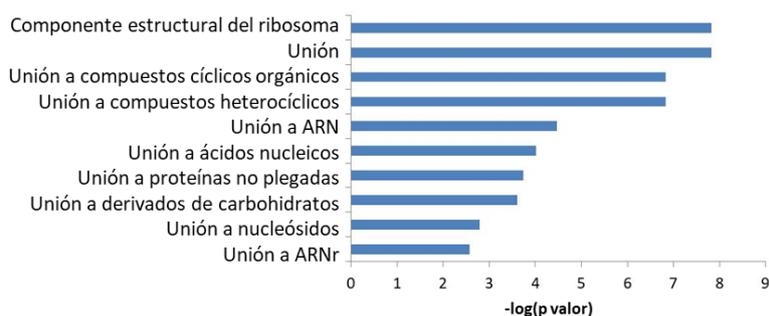
A) Localización celular



B) Proceso biológico



C) Función molecular



4 DISCUSIÓN

Las CEOB experimentan marcados cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos a lo largo de las fases folicular y luteal del ciclo estral. Estas modificaciones son necesarias para que el oviducto se convierta en el ambiente adecuado donde comenzará la formación de un nuevo individuo. Se sabe que entre los factores externos que influyen en dichos procesos se encuentran las hormonas esteroideas E_2 y P_4 , que además regulan la expresión génica y la abundancia de proteínas (revisión bibliográfica por Binelli y col., 2018). En este capítulo, el objetivo

fue estudiar el efecto del Zn^{+2} junto con el E_2 en el proteoma de las CEOB *in vitro*. Para este fin, se usaron dos sistemas de cultivo (CS y CIS) y se analizaron los proteomas luego de los tratamientos correspondientes mediante nano LC-MS/MS. En ambos sistemas, la morfología celular, la actividad y la viabilidad se mantuvieron visiblemente durante las 24 horas de cultivo, en concordancia con los fenotipos de CEOB informados previamente en cultivos cortos (De Pauw y col., 2002; Rottmayer y col., 2006).

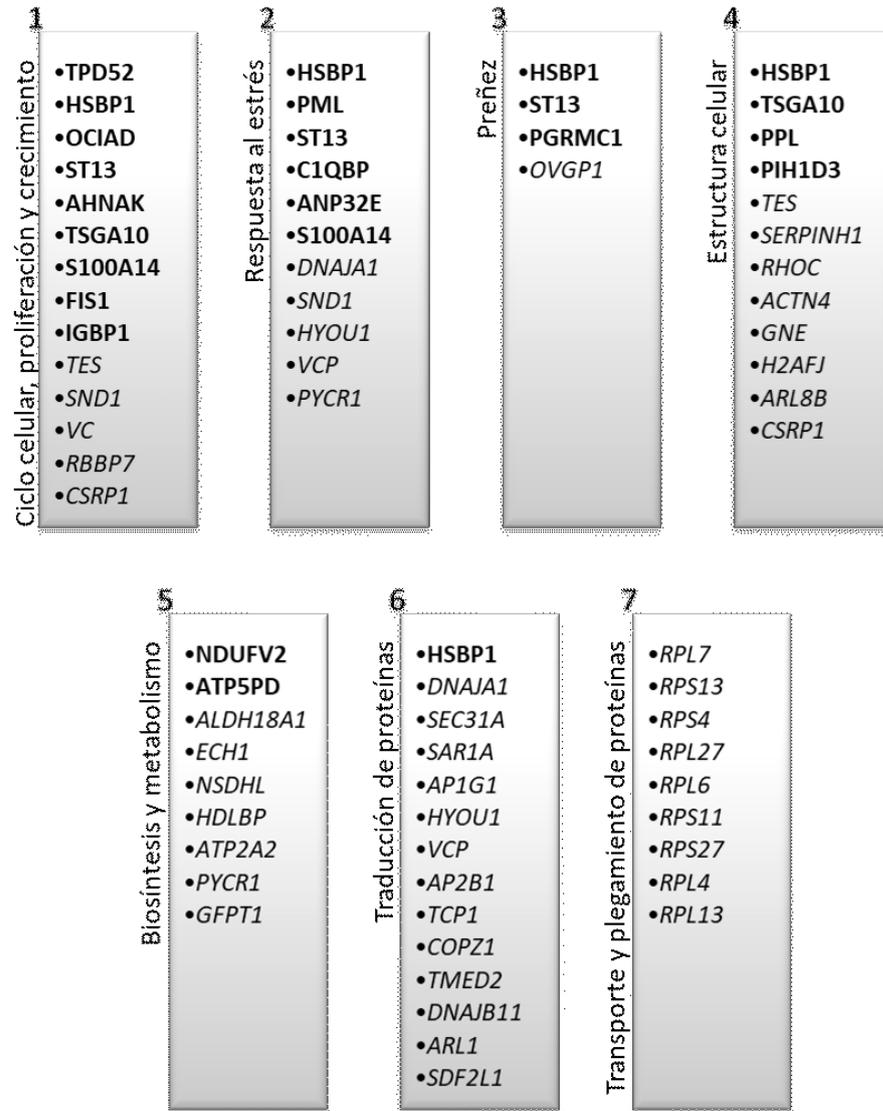
En el CS, al analizar los cambios de abundancia relativa entre tratamientos (Tabla 4.3) no se halló una regulación consistente por parte del Zn^{+2} sobre las proteínas, ya sea en presencia o no de E_2 (columnas D-C y B-A, respectivamente). Por otro lado, al evaluar el efecto del E_2 (C-A y D-B), hubieron proteínas cuya abundancia fue influenciada de manera consistente por el E_2 y en similar medida, independientemente de la presencia de Zn^{+2} . El efecto del E_2 en las CEOB podría deberse a la marcada regulación que ejercen las hormonas esteroideas sobre la fisiología del oviducto (revisión bibliográfica por Binelli y col., 2018).

Al analizar el CIS, se identificaron 57 proteínas cuya abundancia cambió con la exposición al Zn^{+2} en presencia de E_2 . Para una discusión más clara, estas proteínas se organizaron en 7 categorías funcionales: 1) ciclo celular, proliferación y crecimiento, 2) respuesta al estrés, 3) preñez, 4) estructura celular, 5) biosíntesis y metabolismo, 6) traducción de proteínas y 7) transporte y plegamiento de proteínas (Figura 4.3). Las dos últimas categorías se unificaron dado que sus implicaciones se encuentran conectadas.

Algunas de las proteínas identificadas poseen múltiples funciones, por lo que aparecen en más de una categoría (p. ej., HSBP1 y ST13, entre otras). Se discutió sobre ellas dentro de cada categoría en un contexto de proteínas con roles similares.

Puntualmente, HSBP1 figura en la mayoría de las columnas (Figura 4.3) y es la segunda proteína con mayor regulación positiva por parte del Zn^{+2} en el CIS. HSBP1 es un inhibidor de la respuesta al choque térmico y actúa sinérgicamente con HSP70 en el desarrollo de termotolerancia (Huang y col., 2007b). Miembro de la familia de proteínas de choque térmico (*HSP, Heat shock proteins*), HSBP1 protege a las células de la oxidación proteica, el daño al ADN y la ruptura de la estructura del citoesqueleto (Mehlen y col., 1995; Prévaille y col., 1998, 1999) y la apoptosis (Huang y col., 2007b). Además, se considera que HSBP1 (entre otras proteínas de la familia, como HSPA8, HSP90AA1 y HSPA1A) es indispensable para la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Neuer y col., 2000). En particular, HSBP1 es un regulador negativo del receptor de P_4 en el bovino (Park y Song, 2003). Además, esta proteína está involucrada en programas de diferenciación celular (Arrigo, 2005) y plegamiento de proteínas (Arrigo, 2017).

Figura 4.3 Categorización funcional de las proteínas cuya abundancia varió al comparar D-C (efecto del Zn^{+2} en presencia de E_2 ; ISC).



Proteínas en **negrita**: incremento de abundancia
 Proteínas en *italica*: disminución de la abundancia

Ciclo celular, proliferación y crecimiento

Varios miembros de esta categoría son proteínas conocidas por estar involucradas en la regulación de la división celular (p. ej., TPD52, OCIAD1, RBBP7,

CSR1P1). Se ha relacionado a TPD52 con la división celular rápida por su papel en el almacenamiento de lípidos intracelulares, importante para la síntesis de la membrana celular (Frost, 2018). Por su parte, OCIAD1 es un regulador positivo de múltiples vías de señalización, tales como JAK/STAT y Notch (Kulkarni y col., 2011; Trivedi y Starz-Gaiano, 2018). Estas vías determinan el destino celular, la migración, el crecimiento y la proliferación (Kulkarni y col., 2011; Sinha y col., 2013; Trivedi y Starz-Gaiano, 2018). RBBP7 y CSR1P1 están involucradas no sólo en la proliferación celular, sino también en la diferenciación (Louis y col., 1997; He y col., 2015). Además, CSR1P1 está implicada en el crecimiento celular y se la considera como un marcador temprano de la diferenciación en células de músculo liso (He y col., 2013).

Durante el ciclo estral, la proporción de células secretoras y ciliadas cambia (Abe y Oikawa, 1993) en un proceso llamado “remodelación del epitelio”. Éste es necesario para que el oviducto se constituya en el ambiente óptimo para el transporte de gametas, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Binelli y col., 2018). Dicha remodelación está principalmente regulada por la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células secretoras; fenómenos controlados por cambios endocrinos durante el ciclo estral (Ito y col., 2016). En este sentido, aquí se encontró que un estatus nutricional adecuado de Zn^{+2} durante la fase folicular produciría cambios en la abundancia de muchas especies de proteínas involucradas en tales eventos celulares. De hecho, el Zn^{+2} es ampliamente conocido por su rol esencial en el crecimiento celular, la proliferación, el desarrollo y la diferenciación (Vallee y Falchuk, 1993). Por lo tanto, los hallazgos del presente estudio denotarían la influencia de Zn^{+2} en la regulación de proteínas involucradas en la remodelación del epitelio oviductal bovino durante la fase folicular.

Respuesta al estrés

En esta categoría se incluyeron proteínas de diversos mecanismos celulares de defensa. ST13, una proteína vinculada a la respuesta al choque térmico, ejerce funciones de termotolerancia a través de la asociación con las proteínas HSP70 y HSP90 (Frydman y Höhfeld, 1997), mientras que PYCR1 está implicada en la respuesta celular al estrés oxidativo (Phang, 2019), al igual que PML (Niwa-Kawakita y col., 2017) y S100A14 (Jin y col., 2011). Otras funciones entre las proteínas involucradas a la respuesta al estrés son: reorganización de nucleosomas y reparación de ADN por ANP32E (Gursoy-Yuzugullu y col., 2015), respuesta del metabolismo lipídico al estrés por SND1 (Navarro-Imaz y col., 2020) y regulación de la apoptosis por HYOU1 (Ozawa y col., 1999), DNAJA1 (Gotoh y col., 2004) y VCP (Lim y col., 2009).

Desde hace tiempo que se reconoce al Zn^{+2} como un importante citoprotector que protege y estabiliza los complejos macromoleculares (p. ej., microtúbulos), moléculas celulares (p. ej., proteínas y ADN) y orgánulos subcelulares (p. ej., membranas) (Vallee y Falchuk, 1993). En este sentido, su capacidad para reducir el daño oxidativo es sustancial ya que los oxidantes o generadores de especies reactivas de oxígeno (EROS) son los principales inductores de la apoptosis. Los mecanismos antiapoptóticos del Zn^{+2} involucran dos características principales. Primero, limita la extensión del daño producido por los oxirradicales y otros agentes, lo que suprime varias vías de señalización que, de otro modo, impulsarían la activación de las caspasas y la apoptosis. En segundo lugar, ejerce una acción directa sobre algunos de los reguladores apoptóticos, especialmente sobre las caspasas (Truong-Tran y col., 2001) y las endonucleasas que fragmentan el ADN (Duvall y Wyllie, 1986). También se ha sugerido que el Zn^{+2} frena un paso anterior a la activación de las endonucleasas

(Lazebnik y col., 1993). En vista de lo expuesto, los cambios de abundancia de las proteínas de esta sección luego de su exposición al Zn^{+2} se encuentran en concordancia con las propiedades protectoras de este mineral traza. Además, dichos cambios sugieren que el Zn^{+2} estaría implicado en algún nivel de las cascadas de señalización antioxidante y/o antiapoptótica de esas proteínas. Asimismo, es posible que dichos procesos se vean afectados por cambios en la expresión génica y/o en la actividad de proteínas con dedo de Zn^{+2} luego de la exposición al mineral, como se ha reportado anteriormente (Berendji y col., 1997; Ahn y col., 1998).

Preñez

Entre las proteínas de este grupo, se ha descrito a ST13 como una de las chaperonas indispensables para que el receptor de P_4 madure en su capacidad de unión a la hormona (Pratt y Toft, 2003). Por su parte, PGRMC1 es miembro de un complejo proteico de unión a P_4 (Kaluka y col., 2015; Ryu y col., 2017) y está involucrada en la maduración de los ovocitos (Luciano y col., 2010). Notablemente, la abundancia de las tres proteínas involucradas en la regulación del receptor de P_4 (HSBP1, ST13 y PGRMC1) aumentó en respuesta a la exposición al Zn^{+2} , lo que indicó un posible papel para el Zn^{+2} en la activación de tales procesos. Por otro lado, la abundancia de OVGP1 disminuyó en contacto con el mineral. Esta proteína de secreción participa en la fecundación y el desarrollo temprano del embrión y se la considera como el factor embriotrófico más importante (Avilés y col., 2010). Además, OVGP1 es regulada positivamente por el E_2 durante la fase folicular (Bauersachs y col., 2004; Briton-Jones y col., 2004), por lo que la disminución de su abundancia implicaría una mayor influencia por parte del Zn^{+2} .

Estructura celular

Se identificaron también proteínas con roles centrales en la organización de la citoesqueleto. En particular, se conoce que PIH1D3 está involucrada en el movimiento ciliar (Olcese y col., 2017) y TSGA10 se encuentra comúnmente en estructuras ciliares conservadas (Arnaboldi y col., 2014). El incremento en la abundancia de estas proteínas tras la exposición al Zn^{+2} podría estar directamente vinculado a la función de este mineral traza como estabilizador de los microtúbulos (Hesketh, 1982). Además, se han encontrado grandes cantidades de Zn^{+2} dentro de los microtúbulos de cuerpos basales y cilias en células epiteliales de las vías respiratorias (Truong-Tran y col., 2000).

El marcado cambio en la abundancia de H2AFJ después de la exposición al Zn^{+2} (fue la tercera proteína menos abundante) es de destacar dado que esta histona es un componente central del nucleosoma, donde el ADN está envuelto y compactado y se limita su accesibilidad y transcripción (Nishida y col., 2005). Por lo tanto, los presentes hallazgos podrían indicar una importante influencia del Zn^{+2} en la regulación de la transcripción del ADN durante la fase folicular.

Biosíntesis y metabolismo

El Zn^{+2} influyó en la abundancia de varias proteínas relacionadas a la biosíntesis y el metabolismo, con el mayor cambio para GFPT1 (disminuyó 9,09 veces). La mayoría de estas proteínas son enzimas involucradas en la biosíntesis de las siguientes moléculas: aminoácidos por ALDH18A1 (Hu y col., 2008) y PYCR1 (de Ingeniis y col., 2012), ácidos grasos por ECH1 (Zhang y col., 2010), colesterol por NSDHL (Caldas y Herman, 2003) y glucosamina por GFPT1 (Sutton-McDowall y col., 2006).

En el oviducto, en la fase folicular se produce una mayor actividad biosintética y producción de proteínas (procesos que exigen grandes cantidades de energía) en comparación con la luteal (Malayer y col., 1988). La presente disminución en la abundancia de proteínas relacionadas a la actividad biosintética le daría al Zn^{+2} un papel modulador de tales procesos en el período folicular. Este hallazgo se vincula con aquellos del Capítulo 2, que mostraron que *Slc30a7*, que tiene un rol en la actividad biosintética, disminuye su expresión al incluir Zn^{+2} a un medio de cultivo con E_2 (el E_2 en ausencia de Zn^{+2} no produjo cambios).

Resulta importante discutir el abrupto cambio en la abundancia de GFPT1 (glutamina -fructosa-6-fosfato transaminasa 1), la primera enzima de la vía de biosíntesis de hexosamina (*HBP; hexosamine biosynthesis pathway*) y limitante de la velocidad de reacción. La vía HBP tiene influencia en procesos celulares esenciales, como el ciclo celular (Yang y Suh, 2014) y la transcripción y la traducción (Comer y Hart, 2000). Además, cataliza la formación de glucosamina-6-fosfato (Marshall y col., 1991), componente que influye negativamente en el desarrollo embrionario (Sutton-McDowall y col., 2006; Pantaleon y col., 2010). Dada su vinculación con tales procesos críticos, la regulación de esta enzima debe ser estrictamente controlada. Los resultados aquí presentados sugieren que el Zn^{+2} juega un papel importante en dicha modulación.

Transporte y plegado de proteínas - Traducción

La gran mayoría de las proteínas de esta sección disminuyeron su abundancia cuando las CEOB se expusieron al Zn^{+2} en presencia de E_2 . Como se mencionó anteriormente, durante el estro, el oviducto (y su capa de células epiteliales en particular) muestra una alta actividad biosintética y se traducen grandes cantidades de

proteínas (Malayer y col., 1988; Buhi y col., 1989). En este contexto, un desequilibrio entre la capacidad y la demanda de plegamiento de proteínas puede causar estrés en el retículo endoplásmico (RE), seguido por la Respuesta de Proteínas Desplegadas (*UPR*, *unfolded protein response*), un mecanismo para restaurar la homeostasis del RE a través de la sobreproducción de chaperonas y enzimas de plegamiento (Schröder y Kaufman, 2005). En el presente estudio, se encontró que VCP, una proteína que al inhibirse activa el fenómeno de estrés en el RE (Shah y Beverly, 2015), disminuyó su abundancia ante la presencia de Zn^{+2} , lo que señalaría elevados niveles de estrés en las CEOB. Por otra parte, otro estudio halló que la abundancia de HSBP1 aumenta cuando las células sufren alteraciones en el plegamiento de proteínas (Arrigo, 2017). De todos modos, aquí el Zn^{+2} disminuyó la abundancia de proteínas involucradas en la traducción, el plegamiento y el transporte, por lo que estos hallazgos marcarían que el mineral participa en el alivio del estrés del RE y en el mantenimiento de la proteostasis. La única proteína que tuvo una regulación positiva en este listado, HSBP1, favorece el replegado o la degradación proteolítica de los polipéptidos con plegados incorrectos causados por estrés en el RE (Ehrensperger y col., 2000).

Vale mencionar que el presente trabajo muestra que el Zn^{+2} influenciaría la abundancia de componentes regulatorios o estructurales de las HSP (HSBP1, ST13 y AP1G1) en las CEOB en la fase folicular. A pesar de que tradicionalmente se las ha clasificado como funcionales a los procesos de estrés celular, las HSP poseen funciones adicionales en las CEOB sanas (Boilard y col., 2004) y están asociadas no sólo a la maduración de las gametas, sino también al control del diálogo de éstas últimas y el embrión con el sistema reproductivo materno (Georgiou y col., 2005; Seytanoglu y col., 2008)

En un hallazgo interesante, el Zn^{+2} modificó la abundancia de numerosas proteínas cuya presencia está relacionada con la progresión del cáncer, como TPD52 (Frost, 2018), OCIAD1 (Wang y col., 2010) y TSGA10 (Dianatpour y col., 2012), o RPL27 (Kondoh y col., 2001) y OVGP1 (Woo y col., 2004), entre otros. Por lo tanto, las alteraciones en el proteoma de las CEOB por efecto del Zn^{+2} también resultarían útiles en el estudio de procesos metabólicos en células oncogénicas que expresen estas proteínas.

Tanto en CS como en CIS, no se detectó la presencia de los transportadores de Zn^{+2} estudiados en los capítulos anteriores entre las proteínas cuya abundancia cambió más de 1,5 veces al comparar los tratamientos. Tampoco se detectó al resto de los transportadores pertenecientes a las familias SLC39A y SLC30A. Al menos dos posibles explicaciones podrían aplicarse a estos resultados: 1) la presencia de mecanismos de regulación traduccionales y postraduccionales en dichos transportadores y/o 2) la regulación de la homeostasis celular del mineral requeriría de mínimos cambios en la abundancia de los transportadores (por tanto, aquí no detectados), al menos en respuesta al E_2 y Zn^{+2} . No existen aún estudios de inmunomarcación de estas familias de transportadores en las CEO de mamíferos, por lo que todavía se desconoce cómo es su expresión proteica y su localización en la célula. Es importante destacar que en la actualidad los conocimientos acerca de estos transportadores en las CEO resultan escasos (sino nulos). Asimismo, de acuerdo a lo relevado en la literatura, los experimentos de expresión génica del Capítulo 2 han sido los primeros en detectar los transcriptos de los transportadores de Zn^{+2} en las CEO de un mamífero. Por lo tanto, serán necesarios más estudios para comprender el efecto que poseen las hormonas reproductivas y el propio Zn^{+2} sobre la presencia de sus transportadores en las CEOB.

Por otra parte, se observaron diferencias en los resultados obtenidos entre los dos sistemas de cultivo implementados (CS y CIS). Estas diferencias probablemente se deban a que el CIS contribuyó a mantener un ambiente más cercano al natural para las células y a que éstas casi no se manipularon hasta el final del cultivo, a diferencia de las del CS. Es por esto que el uso del CIS permitió aguzar los hallazgos sobre el impacto del Zn^{+2} en presencia de E_2 (aproximación a la fase folicular) sobre el proteoma de las CEOB

Para terminar, el uso del sistema CIS posibilitó un análisis más profundo de la respuesta celular al Zn^{+2} en presencia del E_2 en las CEOB. Se realizaron análisis de las funciones biológicas de las proteínas identificadas así como su categorización según sus principales roles en la célula. Esto incluyó funciones celulares que habían sido previamente descritas por otros autores como influenciadas e incluso potenciadas por el Zn^{+2} , como la transducción de señales, la respuesta al estrés, el crecimiento y el metabolismo energético (Cousins y col., 2003). Asimismo, numerosas proteínas identificadas en este trabajo están vinculadas a importantes vías de transducción de señales en las que el Zn^{+2} y sus transportadores están involucrados, tales como OCIAD1 en las cascadas STAT-3 (Yamashita y col., 2004), IGBP1 en la regulación de fosfatasa (Kong y col., 2009) y SND1 en la activación de factores de transcripción (Navarro-Imaz y col., 2020). En particular, los hallazgos aquí expuestos sugieren que, en la fase folicular, el Zn^{+2} influye en la remodelación del epitelio oviductal, la desaceleración de la biosíntesis, la disminución del estrés del RE y el mantenimiento de la proteostasis. Finalmente, la presencia del Zn^{+2} modificó la abundancia de varias proteínas conocidas por sus diversos roles en la reproducción de los mamíferos, como HSBP1, OVGP1 y GFPT1.

Conclusiones finales

Efecto de las hormonas E₂, FSH y LH sobre la concentración de Zn⁺² libre intracelular y la expresión de sus transportadores en el COC bovino

- ❖ Los transportadores de Zn⁺² cuya expresión génica se comprobó tanto en los ovocitos como las CC fueron: Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14, Slc30a3 y Slc30a9.
- ❖ Las hormonas E₂, FSH y LH y el Zn⁺² modificaron la concentración intracelular de Zn⁺² y la expresión de sus transportadores en el ovocito y las CC del bovino luego de la MIV. En numerosas ocasiones, la FSH produjo un efecto diferencial respecto al resto de las hormonas sobre la homeostasis del Zn⁺².
- ❖ Salvo algunas excepciones, tanto en el ovocito como en las CC, el E₂, la FSH y la LH presentaron interacción con el Zn⁺² al evaluar el nivel intracelular de Zn⁺² y la ER de sus transportadores.
- ❖ Los ovocitos mostraron niveles intracelulares de Zn⁺² superiores a las CC en todos los casos. En general, el Zn⁺² aumentó la ER de los transportadores en los ovocitos y la disminuyó en las CC.

Efecto del E₂ y la P₄ sobre sobre la concentración de Zn⁺² libre intracelular y la expresión de sus transportadores en las células epiteliales del oviducto bovino (CEOB)

- ❖ Los transportadores de Zn⁺² cuya expresión génica se comprobó en las CEOB fueron: Slc39a6, Slc39a8, Slc39a14, Slc30a3, Slc30a7 y Slc30a9. En general, los tratamientos con E₂, P₄ y Zn⁺² condicionaron dicha expresión.
- ❖ El E₂ incrementó los niveles intracelulares de Zn⁺² y la expresión de sus transportadores en las CEOB.
- ❖ La P₄ no modificó la concentración de Zn⁺² intracelular en las CEOB y produjo menor expresión de los transportadores que el E₂.

Efecto de la fase del ciclo estral sobre la expresión de los transportadores de Zn^{+2} en el COC y las CEOB

- ❖ En el COC y las CEOB, los transportadores Slc39a6, Slc39a14 y Slc30a9 se expresaron de manera diferente según la fase del ciclo estral evaluada (luteal o folicular).
- ❖ En los COC, la expresión de los transportadores Slc39a6, Slc39a14 y Slc30a9 fue menor en la fase folicular que en la luteal.
- ❖ Se observaron discrepancias en los resultados de expresión génica entre las CEOB *ex vivo* (fase folicular y luteal) y las cultivadas *in vitro* con E_2 , P_4 y Zn^{+2} .

Efecto del Zn^{+2} y el E_2 sobre el proteoma de las células epiteliales del oviducto bovino (CEOB)

- ❖ El Zn^{+2} no influyó de manera consistente sobre el proteoma de las CEOB, pero sí lo hizo el E_2 (CS).
- ❖ La exposición de las CEOB al Zn^{+2} en presencia de E_2 (E_2+Zn^{+2} vs E_2 ; CIS) dio lugar a la expresión diferencial de 57 proteínas, las cuales se encuentran involucradas en la remodelación del epitelio oviductal, la desaceleración de la biosíntesis, la disminución del estrés del RE y el mantenimiento de la proteostasis.
- ❖ No se detectaron proteínas transportadoras de Zn^{+2} de las familias SLC39A y SLC30A que cambiaran su abundancia en respuesta al Zn^{+2} o al E_2 .
- ❖ El Zn^{+2} modificó la abundancia de varias proteínas conocidas por sus diversos roles en la reproducción de los mamíferos, como HSBP1, OVGP1 y GFPT1.

Finalmente, todas las evidencias sugieren que las hormonas estudiadas participarían activamente en la regulación intracelular del Zn^{+2} en el COC y en las CEOB.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe H, Oikawa T. Observations by scanning electron microscopy of oviductal epithelial cells from cows at follicular and luteal phases. Anat. Rec. 1993; 235: 399–410.
- Abe H. The mammalian oviductal epithelium: Regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. Histol. Histopathol. 1996; 11: 743–768.
- Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, Huhtaniemi I, Knight PG, Charlton HM. The Effect of a Null Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene on Mouse Reproduction¹. Endocrinology. 2000; 141: 1795–1803.
- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. Reproduction. 1992; 94: 177–188.
- Aerts J, Bols P. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. Reprod. Domest. Anim. 2010a; 45: 171–179.
- Ahn YH, Kim YH, Hong SH, Koh JY. Depletion of intracellular zinc induces protein synthesis-dependent neuronal apoptosis in mouse cortical culture. Exp. Neurol. 1998; 154: 47–56.
- Akagi S, Kaneko H, Nakanishi Y, Takedomi T, Watanabe G, Taya K. Ovarian Response and FSH Profile in Cows Following Injection of Various Doses of Inhibin Antiserum. J. Vet. Med. Sci. 1997; 59: 1129–1135.
- Akahori T, Woods DC, Tilly JL. Female Fertility Preservation through Stem Cell-based Ovarian Tissue Reconstitution In Vitro and Ovarian Regeneration In Vivo. Clin. Med. Insights Reprod. Heal. 2019; 13: 117955811984800.
- Almiñana C, Bauersachs S. Extracellular Vesicles in the Oviduct: Progress, Challenges and Implications for the Reproductive Success. Bioengineering. 2019; 6: 32.
- Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. Rom. J. Morphol. Embryol. 2007; 48: 323–334.
- Ambekar AS, Nirujogi RS, Srikanth SM, Chavan S, Kelkar DS, Hinduja I, Zaveri K, Prasad TSK, Harsha HC, Pandey A, Mukherjee S. Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. J. Proteomics. 2013; 87: 68–77.
- Anchordoquy JM, Picco SJ, Seoane A, Anchordoquy JP, Ponzinibbio M V, Mattioli GA, Peral García P and Furnus CC. Analysis of apoptosis and DNA damage in bovine cumulus cells after exposure in vitro to different zinc concentrations. Cell Biol. Int. 2011; 35: 593–597.
- Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Sirini M, Picco S, Peral-García P and Furnus C. The Importance of Having Zinc During In Vitro Maturation of Cattle Cumulus-Oocyte Complex: Role of Cumulus Cells. Reprod. Domest. Anim. 2014; 49: 865–874.
- Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Galarza EM, Farnetano NA, Giuliodori MJ, Nikoloff N, Fazio LE and Furnus CC. Parenteral Zinc Supplementation Increases Pregnancy Rates in Beef Cows. Biol. Trace Elem. Res. 2019; 192: 175–182.
- Anchordoquy JP, Anchordoquy JM, Lizarraga RM, Nikoloff N, Pascua AM, Furnus CC. The

- importance of trace minerals copper, manganese, selenium and zinc in bovine sperm–zona pellucida binding. *Zygote*. 2019; 1–8.
- Anderson LL, Hard DL, Carpenter LS, Awotwi EK, Diekman MA. Neuroendocrine Regulation of Luteinizing Hormone secretion in Beef Calves I. *Biol. Reprod.* 1981; 24: 795–800.
- Andrade GM, Collado M del, Meirelles FV, Silveira JC da, Perecin F, Andrade GM, Collado M del, Meirelles FV, Silveira JC da, Perecin F. Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development. *Anim. Reprod.* 2019; 16: 485–496.
- Andreini C, Bertini I. A bioinformatics view of zinc enzymes. *J. Inorg. Biochem.* 2012; 111: 150–156.
- Andreini C, Bertini I, Cavallaro G. Minimal functional sites allow a classification of zinc sites in proteins. *PLoS One*. 2011; 6:.
- Arnaboldi F, Menon A, Menegola E, Renzo F Di, Mirandola L, Grizzi F, Figueroa JA, Cobos E, Jenkins M, Barajon I, Chiriva-Internati M. Sperm Protein17 is an Oncofetal Antigen: A Lesson From a Murine Model. *Int. Rev. Immunol.* 2014; 33: 367–374.
- Arnold U, Ulbrich-Hofmann R. Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride- containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Anal. Biochem.* 1999; 271: 197–199.
- Arrigo A. In search of the molecular mechanism by which small stress proteins counteract apoptosis during cellular differentiation. *J. Cell. Biochem.* 2005; 94: 241–246.
- Arrigo A. Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell. *Cell Stress Chaperones*. 2017; 22: 517–529.
- Austin C. Observations on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg. *Aust. J. Biol. Sci.* 1951; 4: 581.
- Avilés M, Gutiérrez-Adán A, Coy P. Oviductal secretions: Will they be key factors for the future ARTs? *Mol. Hum. Reprod.* 2010; 16: 896–906.
- Baltaci AK, Yuce K. Zinc Transporter Proteins. *Neurochem. Res.* 2018; 43: 517–530.
- Bauersachs S, Rehfeld S, Ulbrich SE, Mallok S, Prella K, Wenigerkind H, Einspanier R, Blum H, Wolf E. Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J. Mol. Endocrinol.* 2004; 32: 449–466.
- Bazer FW. Mediators of Maternal Recognition of Pregnancy in Mammals. *Exp. Biol. Med.* 1992; 199: 373–384.
- Bazer FW, First NL. Pregnancy and Parturition. *J. Anim. Sci.* 1983; 57: 425–460.
- Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia*. 1994; 50: 626–640.
- Beltramini M, Zambenedetti P, Wittkowski W and Zatta P. Effects of steroid hormones on the Zn, Cu and MTI/II levels in the mouse brain. *Brain Res.* 2004; 1013: 134–141.
- Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Grapenthin O, Weber H, Wahn V, Kröncke K-D. Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. *FEBS Lett.* 1997; 405: 37–41.

- Bernhardt ML, Kong BY, Kim AM, O'Halloran T V. and Woodruff TK. A Zinc-Dependent Mechanism Regulates Meiotic Progression in Mammalian Oocytes1. Biol. Reprod. 2012; 86:.
- Besenfelder U, Havlicek V, Brem G. Role of the oviduct in early embryo development. Reprod. Domest. Anim. 2012; 47: 156–163.
- Bevers MM, Dieleman SJ, Van den Hurk R and Izadyar F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. Theriogenology. 1997; 47: 13–22. Elsevier.
- Beyersmann D, Haase H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. BioMetals. 2001; 14: 331–341.
- Bin B-H, Fukada T, Hosaka T, Yamasaki S, Ohashi W, Hojyo S, Miyai T, Nishida K, Yokoyama S, Hirano T. Biochemical characterization of human ZIP13 protein: a homo-dimerized zinc transporter involved in the spondylocheiro dysplastic Ehlers-Danlos syndrome. J. Biol. Chem. 2011; 286: 40255–40265.
- Binelli M, Gonella-Diaza AM, Mesquita FS, Membrive CMB. Sex steroid-mediated control of oviductal function in cattle. Biology (Basel). 2018; 7:.
- Bishop DW. Active secretion in the rabbit oviduct. Am. J. Physiol. 1956; 187: 347–352.
- Blaha M, Nemcova L, Kepkova KV, Vodicka P and Prochazka R. Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. Reprod. Biol. Endocrinol. 2015; 13: 113.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard M-A. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes1. Biol. Reprod. 2002; 66: 38–43.
- Boilard M, Reyes-Moreno C, Lachance C, Massicotte L, Bailey JL, Sirard M-A, Leclerc P. Localization of the Chaperone Proteins GRP78 and HSP60 on the Luminal Surface of Bovine Oviduct Epithelial Cells and Their Association with Spermatozoa1. Biol. Reprod. 2004; 71: 1879–1889.
- Borowczyk E, Johnson ML, Bilski JJ, Borowicz P, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. Gap Junctional Connexin 37 Is Expressed in Sheep Ovaries. Endocrine. 2006; 30: 223–230.
- Bosch P, Wright RW. The oviductal sperm reservoir in domestic mammals. Arch. Med. Vet. 2005; 37: 95–104.
- Bousfield G, Perry W, Ward N. Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. En: *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press, 1994, p. 1749–92.
- Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1995; 52: 113–133.
- Braw-Tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. Reproduction. 1997; 109: 165–171.
- Briton-Jones C, Lok IH, Cheung CK, Chiu TTY, Cheung LP, Haines C. Estradiol regulation of oviductin/oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid expression in human oviduct mucosal cells in vitro. Fertil. Steril. 2004; 81: 749–756.

- Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. J. Assist. Reprod. Genet. 2018; 35: 735–751.
- Buhi WC, Vallet JL, Bazer FW. De novo synthesis and release of polypeptides from cyclic and early pregnant porcine oviductal tissue in explant culture. J. Exp. Zool. 1989; 252: 79–88.
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. Reprod. Biol. Endocrinol. 2004; 2: 20.
- Bustin S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J. Mol. Endocrinol. 2002; 29: 23–39.
- Calandra R. *Endocrinología Molecular*. Buenos Aires, Ed. El Ateneo, 1985.
- Caldas H, Herman G. NSDHL, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, traffics through the Golgi and accumulates on ER membranes and on the surface of lipid droplets. Hum. Mol. Genet. 2003; 12: 2981–2991.
- Callejas S. Fisiología del ciclo estral bovino. En: *Biotecnología de La Reproducción*. 1ra. Edición. Buenos Aires, Argentina, Ediciones INTA, 2001, p. 37–52.
- Carmel PW, Araki S, Ferin M. Pituitary Stalk Portal Blood Collection in Rhesus Monkeys: Evidence for Pulsatile Release of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). Endocrinology. 1976; 99: 243–248.
- Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A, Mermillod P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. Theriogenology. 1995; 43: 1115–1128.
- Cathomen T, Joung J. Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges. Mol. Ther. 2008; 16: 1200–1207.
- Chang MC. In vitro Fertilization of Mammalian Eggs. J. Anim. Sci. 1968; 27: 15–21.
- Chang MC, Austin CR, Bedford JR, Brackett BG, Hunter RHF, Yanagimachi R. Capacitation of spermatozoa and fertilization in mammals. En: *Frontiers in Reproduction and Fertility Control*. Cambridge, UK, Ford Foundation Publications, 1977, p. 434–451.
- Chase CC, Kirby CJ, Hammond AC, Olson TA, Lucy MC. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. J. Anim. Sci. 1998; 76: 212.
- Chen Y-H, Kim JH and Stallcup MR. GAC63, a GRIP1-Dependent Nuclear Receptor Coactivator. Mol. Cell. Biol. 2005; 25: 5965–5972.
- Chen X, Zhou B, Yan J, Xu B, Tai P, Li J, Peng S, Zhang M, Xia G. Epidermal growth factor receptor activation by protein kinase C is necessary for FSH-induced meiotic resumption in porcine cumulus–oocyte complexes. J. Endocrinol. 2008; 197: 409–419.
- Chesters JK. Biochemistry of Zinc in Cell Division and Tissue Growth. En: *Zinc in Human Biology*. Londres, UK, Springer, 1989, p. 109–118.
- Colvin RA, Bush AI, Volitakis I, Fontaine CP, Thomas D, Kikuchi K, Holmes WR. Insights into Zn²⁺ homeostasis in neurons from experimental and modeling studies. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 2008; 294:.

- Combarrous Y. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. Reprod. Nutr. Dev. 1988; 28: 211–228.
- Combelles CMH, Rawe VY. Determinants of Oocyte Quality: Impact on In Vitro Fertilization Failures. En *Oogenesis*. Londres, UK, Springer London, 2013, p. 307–327.
- Comer FI, Hart GW. O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. J. Biol. Chem. 2000; 275: 29179–29182.
- Conn PM, Janovick JA, Stanislaus D, Kuphal D, Jennes L. Molecular and Cellular Bases of Gonadotropin-Releasing Hormone Action in the Pituitary and Central Nervous System. Vitam. Horm. 1995; 50: 151–214.
- Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. Hum. Reprod. 1998; 13: 1292–1302.
- Costello LC, Liu Y, Zou J and Franklin RB. Evidence for a zinc uptake transporter in human prostate cancer cells which is regulated by prolactin and testosterone. J. Biol. Chem. 1999; 274: 17499–17504.
- Coudray N, Valvo S, Hu M, Lasala R, Kim C, Vink M, Zhou M, Provasi D, Filizola M, Tao J, Fang J, Penczek PA, Ubarretxena-Belandia I, Stokes DL. Inward-facing conformation of the zinc transporter YiiP revealed by cryoelectron microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013; 110: 2140–2145.
- Cousins RJ. Zinc. En *Conocimientos Actuales Sobre Nutrición*. Washington, EEUU, OPS, 1999, p 312–327.
- Cousins RJ, Blanchard RK, Moore JB, Cui L, Green CL, Liuzzi JP, Cao J, Bobo JA. Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes. J. Nutr. 2003; 133: 1521S-6S.
- Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. J. Biol. Chem. 2006; 281: 24085–24089.
- Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat. Biotechnol. 2008; 26: 1367–1372.
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V., Mann M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. J. Proteome Res. 2011; 10: 1794–1805.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. Cell. Mol. Life Sci. 2002; 59: 627–647.
- Crisman RO, McDonald LE, Thompson FN. Effects of progesterone or estradiol on uterine tubal transport of ova in the cow. Theriogenology. 1980; 13: 141–154.
- Danet-Desnoyers G, Wetzels C, Thatcher W. Natural and recombinant bovine interferon tau regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2 alpha and E2 by epithelial cells and stromal cells in the endometrium. Reprod. Fertil. Dev. 1994; 6: 193.
- Darnell JE. STATs and gene regulation. Science (80-.). 1997; 277: 1630–1635.
- Dianatpour M, Mehdipour P, Nayernia K, Mobasheri M-B, Ghafouri-Fard S, Savad S,

- Modarressi MH. Expression of Testis Specific Genes TSGA10, TEX101 and ODF3 in Breast Cancer. Iran. Red Crescent Med. J. 2012; 14: 722–726.
- Dejarnette M, Nebel R. Reproductive Anatomy and Physiology of Cattle. Sel. Reprod. Solut. 2013; 1–6.
- Deyab G. Using in vitro epithelial cell culture to mimic the in vivo conditions in the oviduct. 2013;
- Dreosti I. Zinc and the gene. Mutat. Res. 2001; 475: 161–167.
- Driancourt MA. Follicular dynamics in sheep and cattle. Theriogenology. 1991; 35: 55–79.
- Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. Theriogenology. 2001; 55: 1211–1239.
- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. Rev. Reprod. 2000; 5: 143–152.
- Dufner-Beattie J, Wang F, Kuo YM, Gitschier J, Eide D, Andrews GK. The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. J. Biol. Chem. 2003; 278: 33474–33481.
- Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. Immunol. Today. 1986; 7: 115–119.
- Edelstam GA, Lundkvist OE, Wells AF, Laurent TC. Localization of hyaluronan in regions of the human female reproductive tract. J. Histochem. Cytochem. 1991; 39: 1131–1135.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. Endocr. Rev. 2009; 30: 624.
- Eide DJ. The SLC39 family of metal ion transporters. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 2004; 447: 796–800.
- Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 2006; 1763: 711–722.
- El-Hayek S, Clarke HJ. Follicle-Stimulating Hormone Increases Gap Junctional Communication Between Somatic and Germ-Line Follicular Compartments During Murine Oogenesis1. Biol. Reprod. 2015; 93: 47.
- El-Tanani MKK, Green CD. Oestrogen-induced genes, pLIV-1 and pS2, respond divergently to other steroid hormones in MCF-7 cells. Mol. Cell. Endocrinol. 1995; 111: 75–81.
- Endo M, Kawahara-Miki R, Cao F, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y, Iwata H. Estradiol supports in vitro development of bovine early antral follicles. Reproduction. 2013; 145: 85–96.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. Murine Oocytes Suppress Expression of Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid by Granulosa Cells1. Biol. Reprod. 1997; 56: 976–984.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002; 99: 2890–2894.
- Eriksen T, Terkelsen O, Hyttel P, Greve T. Ultrastructural features of secretory cells in the

- bovine oviduct epithelium. Anat. Embryol. (Berl). 1994; 190: 583–590.
- Erickson GF. The Graafian Follicle: A Functional Definition. En: *Ovulation*, Nueva York, EEUU, Springer New York, 2000, p. 31–48.
- Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The Ovarian Androgen Producing Cells: A Review of Structure/Function Relationships 1 , 2. Endocr. Rev. 1985; 6: 371–399.
- Erickson KL, Medina EA, Hubbard NE. Micronutrients and innate immunity. J. Infect. Dis. 2000; 182 Suppl 1: S5-10.
- Ehrnsperger M, Gaestel M, Buchner J. Analysis of chaperone properties of small Hsp's. Methods Mol. Biol. 2000; 99: 421–429.
- Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducal tissue or in conditioned medium. Reproduction. 1989; 85: 715–720.
- Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Anim. Reprod. Sci. 2003; 78: 203–216.
- Falchuk KH. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. Mol. Cell. Eff. Nutr. Dis. Process. 1998; 41–48.
- Fan H-Y, Sun Q-Y. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals1. Biol. Reprod. 2004; 70: 535–547.
- Favier AE. The role of zinc in reproduction. Biol. Trace Elem. Res. 1992; 32: 363–382.
- Fernández V. Desarrollo de herramientas bioinformáticas para estudios de proteómica a gran escala de *Candida albicans*. 2016; Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Ferreira T, Rasband W. ImageJ User Guide ImageJ User Guide IJ 1.46r. 2012;
- Findlay JK. An Update on the Roles of Inhibin, Activin, and Follistatin as Local Regulators of Folliculogenesis1. Biol. Reprod. 1993; 48: 15–23.
- Findlay J. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. Reprod. Fertil. Dev. 1994; 6: 127.
- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. Anim. Reprod. Sci. 2011; 124: 163–169.
- Frandsen RD, Wilke WL, Fails AD. *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Wiley-Blackwell.
- Frost S. Functional significance of Tumor Protein D52 amplification and overexpression in cancer. 2018
- Frydman J, Höhfeld J. Chaperones get in touch: The Hip-Hop connection. Trends Biochem. Sci. 1997; 22: 87–92.
- Fujishiro H, Yano Y, Takada Y, Tanihara M, Himeno S. Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. En: *Metallomics*, Royal Society of Chemistry, 2012, p. 700–708.
- Fukada T, Kambe T. *Zinc Signals in Cellular Functions and Disorders*.
- Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, Migaki H, Okumura

- K, Masuda S, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, Kambe T. Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. J. Biol. Chem. 2009; 284: 30798–30806.
- Furnus CC, de Matos DG and Moses DF. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: Relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. Mol. Reprod. Dev. 1998; 51: 76–83.
- Gaither LA, Eide DJ. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. J. Biol. Chem. 2000; 275: 5560–5564.
- Gaither LA, Eide DJ. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. BioMetals. 2001; 14: 251–270.
- Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP. Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. Trends Biochem. Sci. 2007; 32: 63–70.
- Gao J, Zhao N, Knutson MD, Enns CA. The hereditary hemochromatosis protein, HFE, inhibits iron uptake via down-regulation of Zip14 in HepG2 Cells. J. Biol. Chem. 2008; 283: 21462–21468.
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. Enhanced Rates of Cleavage and Development for Sheep Zygotes Cultured to the Blastocyst Stage in Vitro in the Absence of Serum and Somatic Cells: Amino Acids, Vitamins, and Culturing Embryos in Groups Stimulate Development1. Biol. Reprod. 1994; 50: 390–400.
- Garrido C, Saule S, Gospodarowicz D. Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Ovarian Bovine Granulosa Cells. Growth Factors. 1993; 8: 109–117.
- Gee KR, Zhou ZL, Qian WJ and Kennedy R. Detection and imaging of zinc secretion from pancreatic, β -cells using a new fluorescent zinc indicator. J. Am. Chem. Soc. 2002a; 124: 776–778.
- Gee K., Zhou Z-L, Ton-That D, Sensi S. and Weiss J. Measuring zinc in living cells. Cell Calcium. 2002b; 31: 245–251.
- Georgiou AS, Sostaric E, Wong CH, Snijders APL, Wright PC, Moore HD, Fazeli A. Gametes Alter the Oviductal Secretory Proteome*. Mol. Cell. Proteomics. 2005; 4: 1785–1796.
- Gilchrist R., Ritter L., Armstrong D. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. Anim. Reprod. Sci. 2004; 82–83: 431–446.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum. Reprod. Update. 2008; 14: 159–177.
- Girijashanker K, He L, Soleimani M, Reed JM, Li H, Liu Z, Wang B, Dalton TP, Nebert DW. Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: Similarities to the ZIP8 transporter. Mol. Pharmacol. 2008; 73: 1413–1423.
- Goff JP. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. J. Dairy Sci. 2018; 101: 2763–2813.
- Gonella-Diaza AM, Da Silva Andrade SC, Sponchiado M, Pugliesi G, Mesquita FS, Van Hoeck V, De Francisco Strefezzi R, Gasparin GR, Coutinho LL, Binelli M. Size of the ovulatory

- follicle dictates spatial differences in the oviductal transcriptome in cattle. PLoS One. 2015; 10: e0145321.
- González K. El ciclo estral de la vaca. 2018.
- Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. Cell Death Differ. 2004; 11: 390–402.
- Guérin P, El Mouatassim S, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Hum. Reprod. Update. 2001; 7: 175–189.
- Guo L, Lichten LA, Ryu M-S, Liuzzi JP, Wang F, Cousins RJ. STAT5-glucocorticoid receptor interaction and MTF-1 regulate the expression of ZnT2 (Slc30a2) in pancreatic acinar cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 2010; 107: 2818–2823.
- Gupta SK. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. J. Reprod. Immunol. 2015; 108: 90–97.
- Gupta SK, Bhandari B. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. Asian J. Androl. 2011; 13: 97–105.
- Gupta S, Chai J, Cheng J, D’Mello R, Chance MR, Fu D. Visualizing the kinetic power stroke that drives proton-coupled zinc(II) transport. Nature. 2014; 512: 101–104.
- Gursoy-Yuzugullu O, Ayrapetov MK, Price BD. Histone chaperone Anp32e removes H2A.Z from DNA double-strand breaks and promotes nucleosome reorganization and DNA repair. Proc. Natl. Acad. Sci. 2015; 112: 7507–7512.
- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture In Vitro. Biol. Reprod. 2000; 62: 1322–1328.
- Haase H. Review Article Zinc signals and immune function. Int. Union Biochem. Mol. Biol. 2014; 40: 27–41.
- Hafez ESE (Elsayed SE, Palacios Martínez R. *Reproducción e Inseminación Artificial En Animales*. Interamericana/McGraw-Hill.
- Hamner CE, Fox SB. Effect of oestrogen and progesterone on physical properties of rabbit oviduct fluid. J. Reprod. Fertil. 1968; 16: 121–122.
- Hara T, Takeda T aki, Takagishi T, Fukue K, Kambe T and Fukada T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. J. Physiol. Sci. 2017; 67: 283–301.
- Hartshorne GM. In vitro culture of ovarian follicles. Rev. Reprod. 1997; 2: 94–104.
- Hashimoto S. Application of In Vitro Maturation to Assisted Reproductive Technology. J. Reprod. Dev. 2009; 55: 1–10.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H. Bovine Immature Oocytes Acquire Developmental Competence During Meiotic Arrest In Vitro. Biol. Reprod. 2002; 66: 1696–1701.

- Hazum E, Conn PM. Molecular Mechanism of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Action. I. The GnRH Receptor*. Endocr. Rev. 1988; 9: 379–386.
- He H, Liu XL, Zhang HL, Yang J, Niu FB, Li ZX, Liu Y, Chen L. SNV and haplotype analysis reveals new CSRP1 variants associated with growth and carcass traits. Gene. 2013; 522: 206–213.
- He H, Kong S, Liu F, Zhang S, Jiang Y, Liao Y, Jiang Y, Li Q, Wang B, Zhou Z, Wang H, Huo R. Rbbp7 Is Required for Uterine Stromal Decidualization in Mice1. Biol. Reprod. 2015; 93:.
- He L, Girijashanker K, Dalton TP, Reed J, Li H, Soleimani M, Nebert DW. ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. Mol. Pharmacol. 2006; 70: 171–180.
- Hesketh JE. Zinc-stimulated microtubule assembly and evidence for zinc binding to tubulin. Int. J. Biochem. 1982; 14: 983–990.
- Hill JL, Wade MG, Nancarrow CD, Kelleher DL, Boland MP. Influence of ovine oviducal amino acid concentrations and an ovine oestrus-associated glycoprotein on development and viability of bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 1997; 47: 164–169.
- Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. Hum. Reprod. 1994; 9: 188–191.
- Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. Oncogene. 2000; 19: 2548–2556.
- Hirshfield AN. Development of Follicles in the Mammalian Ovary. En: *International Review of Cytology.* 1991a, p. 43–101.
- Hirshfield AN. Theca Cells may be Present at the Outset of Follicular Growth1. Biol. Reprod. 1991b; 44: 1157–1162.
- Hoelker M, Held E, Salilew-Wondim D, Schellander K, Tesfaye D. Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. Reprod. Fertil. Dev. 2014; 26: 22.
- Holy L. *Bases Biológicas de La Reproducción Bovina.* México: Editorial Diana.
- Holt W V., Fazeli A. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. Mol. Reprod. Dev. 2010; 77: 934–943.
- Homma K, Fujisawa T, Tsuburaya N, Yamaguchi N, Kadowaki H, Takeda K, Nishitoh H, Matsuzawa A, Naguro I, Ichijo H. SOD1 as a Molecular Switch for Initiating the Homeostatic ER Stress Response under Zinc Deficiency. Mol. Cell. 2013; 52: 75–86.
- Hostetler CE, Kincaid RL, Miranda M a. The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. Vet. J. 2003; 166: 125–139.
- Hu CAA, Khalil S, Zhaorigetu S, Liu Z, Tyler M, Wan G, Valle D. Human Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase: Function and regulation. Amino Acids. 2008; 35: 665–672.
- Huang L, Kirschke CP. A di-leucine sorting signal in ZIP1 (SLC39A1) mediates endocytosis of the protein. FEBS J. 2007a; 274: 3986–3997.

- Huang L, Min J-N, Masters S, Mivechi NF, Moskophidis D. Insights into function and regulation of small heat shock protein 25 (HSPB1) in a mouse model with targeted gene disruption. Genesis. 2007b; 45: 487–501.
- Huang L, Tepasamorndech S. The SLC30 family of zinc transporters-A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. Mol. Aspects Med. 2013; 34: 548–560.
- Hulbooy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. Mol. Hum. Reprod. 1997; 3: 27–45.
- Hunter RHF. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. J. Reprod. Fertil. 1981; 63: 109–117.
- Hunter RHF, Wilmut I. The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. Anim. Reprod. Sci. 1983; 5: 167–173.
- Hunter RHF. Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins. Mol. Reprod. Dev. 1994; 39: 176–181.
- van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology. 2005; 63: 1717–1751.
- Hurnik JF. Sexual behavior of female domestic mammals. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 1987; 3: 423–461.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology. 1997; 47: 23–32.
- de Ingeniis J, Ratnikov B, Richardson AD, Scott DA, Aza-Blanc P, De SK, Kazanov M, Pellecchia M, Ronai Z, Osterman AL, Smith JW. Functional Specialization in Proline Biosynthesis of Melanoma. PLoS One. 2012; 7:.
- Iritani A, Niwa K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. Reproduction. 1977; 50: 119–121.
- Ishihara K, Yamazaki T, Ishida Y, Suzuki T, Oda K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, Kambe T. Zinc Transport Complexes Contribute to the Homeostatic Maintenance of Secretory Pathway Function in Vertebrate Cells. J. Biol. Chem. 2006; 281: 17743–17750.
- Ito S, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Kimura K, Okuda K. Remodeling of bovine oviductal epithelium by mitosis of secretory cells. Cell Tissue Res. 2016; 366: 403–410.
- Itsumura N, Inamo Y, Okazaki F, Teranishi F, Narita H, Kambe T, Kodama H. Compound heterozygous mutations in SLC30A2/ZnT2 results in low milk zinc concentrations: a novel mechanism for zinc deficiency in a breast-fed infant. PLoS One. 2013; 8: e64045.
- Jackson KA, Valentine RA, Coneyworth LJ, Mathers JC, Ford D. Mechanisms of mammalian zinc-regulated gene expression. Biochem. Soc. Trans. 2008; 36: 1262–1266.
- Jaiswal R, Singh J, Nagra H, Grafton T, Ratto M, Malhi P, Adams G. Oocyte competence under different pregestational environments. Biol. Reprod. 2006; 109–109.
- Jenkitkasemwong S, Wang CY, MacKenzie B, Knutson MD. Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. BioMetals. 2012; 25: 643–655.

- Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters. Mol. Aspects Med. 2013; 34: 612–619.
- Jin Q, Chen H, Luo A, Ding F, Liu Z. S100A14 stimulates cell proliferation and induces cell apoptosis at different concentrations via receptor for advanced glycation end products (RAGE). PLoS One. 2011; 6:.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature. 2004; 428: 145–150.
- Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. Gap junctional connexin messenger RNA expression in the ovine uterus and placenta: effects of estradiol-17 β -treatment, early pregnancy stages, and embryo origin. Domest. Anim. Endocrinol. 2017; 58: 104–112.
- Kagara N, Tanaka N, Noguchi S, Hirano T. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. Cancer Sci. 2007; 98: 692–697.
- Kaluka D, Batabyal D, Chiang BY, Poulos TL, Yeh SR. Spectroscopic and mutagenesis studies of human pgrmc1. Biochemistry. 2015; 54: 1638–1647.
- Kambe T. Molecular architecture and function of ZnT transporters. Curr. Top. Membr. 2012; 69: 199–220.
- Kambe T. Regulation of zinc transport. En: *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry-Metals in Cells*. John Wiley & Sons, 2013, p. 301–309.
- Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, Sasaki R, Mori K, Iwanaga T, Nagao M. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic β cells. J. Biol. Chem. 2002; 277: 19049–19055.
- Kambe T, Suzuki T, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y. Sequence similarity and functional relationship among eukaryotic ZIP and CDF transporters. Genomics, Proteomics Bioinforma. 2006; 4: 1–9.
- Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. Physiol. Rev. 2015; 95: 749–784.
- Kamwanja L, Hansen P. Regulation of proliferation of bovine oviductal epithelial cells by estradiol. Horm. Metab. Res. 1993; 25: 500–502.
- Kaneko H, Terada T, Taya K, Watanabe G, Sasamoto S, Hasegawa Y, Igarashi M. Ovarian follicular dynamics and concentrations of oestradiol-17 beta, progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. Reprod. Fertil. Dev. 1991; 3: 529.
- Kaneko H, Nakanishi Y, Taya K, Kishi H, Watanabe G, Sasamoto S, Hasegawa Y. Evidence that inhibin is an important factor in the regulation of FSH secretion during the mid-luteal phase in cows. J. Endocrinol. 1993; 136: 35–41.
- Kaneko H, Taya K, Watanabe G, Noguchi J, Kikuchi K, Shimada A, Hasegawa Y. Inhibin is involved in the suppression of FSH secretion in the growth phase of the dominant follicle during the early luteal phase in cows. Domest. Anim. Endocrinol. 1997; 14: 263–271.
- Kelleher SL, Lönnerdal B. Zip3 plays a major role in zinc uptake into mammary epithelial cells

- and is regulated by prolactin. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2005; 288: C1042-7.
- Killian GJ. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. Animal Reproduction Science. 2004; 82–83: 141–153.
- Kim JY. Control of ovarian primordial follicle activation. Clin. Exp. Reprod. Med. 2012; 39: 10–14.
- Kim J-H, Niwa K, Lim J-M, Okuda K. Effects of Phosphate, Energy Substrates, and Amino Acids on Development of in Vitro-Matured, in Vitro-Fertilized Bovine Oocytes in a Chemically Defined, Protein-Free Culture Medium1. Biol. Reprod. 1993; 48: 1320–1325.
- Kim AM, Vogt S, O'Halloran T V and Woodruff TK. Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. Nat. Chem. Biol. 2010; 6: 674–681.
- Kim AM, Bernhardt ML, Kong BY, Ahn RW, Vogt S, Woodruff TK, O'Halloran T V. Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. ACS Chem. Biol. 2011; 6: 716–723.
- Kincaid RL. Assessment of trace mineral status of ruminants: A review. J. Anim. Sci. 2000; 77: 1.
- Kindahl H, Edqvist LE, Bane A, Granstrom E. Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin F2alpha during the normal oestrous cycle and early pregnancy in heifers. Eur. J. Endocrinol. 1976; 82: 134–149.
- King RS, Anderson SH, Killian GJ. Effect of Bovine Oviductal Estrus-Associated Protein on the Ability of Sperm to Capacitate and Fertilize Oocytes. J. Androl. 1994; 15: 468–478.
- Knickerbocker JJ, Thatcher WW, Foster DB, Wolfenson D, Bartol FF, Caton D. Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol-17 β in cyclic cattle. Prostaglandins. 1986; 31: 757–776.
- Kong BY, Duncan FE, Que EL, Kim AM, O'Halloran T V and Woodruff TK. Maternally-derived zinc transporters ZIP6 and ZIP10 drive the mammalian oocyte-to-egg transition. Mol. Hum. Reprod. 2014; 20: 1077–1089.
- Kondoh N, Shuda M, Tanaka K, Wakatsuki T, Hada A, Yamamoto M. Enhanced expression of S8, L12, L23a, L27 and L30 ribosomal protein mRNAs in human hepatocellular carcinoma. Anticancer Res. 2001; 21: 2429–2433.
- Kong M, Ditsworth D, Lindsten T, Thompson CB. α 4 Is an Essential Regulator of PP2A Phosphatase Activity. Mol. Cell. 2009; 36: 51–60.
- Kölle S, Dubielzig S, Reese S, Wehrend A, König P, Kummer W. Ciliary Transport, Gamete Interaction, and Effects of the Early Embryo in the Oviduct: Ex Vivo Analyses Using a New Digital Videomicroscopic System in the Cow1. Biol. Reprod. 2009; 81: 267–274.
- Kreżel A, Maret W. Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. J. Biol. Inorg. Chem. 2006; 11: 1049–1062.
- Kreiner D, Liu H-C, Itskovitz J, Veeck L and Rosenwaks Z. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality. Fertil. Steril. 1987; 48: 991–994.
- Krishna SS, Majumdar I, Grishin N V. Structural classification of zinc fingers. Nucleic Acids Res. 2003; 31: 532–550.

- Kucker HA. Lactation and Its Hormonal Control. En: *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd, 1994, p. 1065–1098.
- Kulkarni V, Khadilkar RJ, Srivathsa MS, Inamdar MS. Asrij maintains the stem cell niche and controls differentiation during drosophila lymph gland hematopoiesis. PLoS One. 2011; 6:.
- Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. Curr. Opin. Struct. Biol. 2001; 11: 39–46.
- Van Langendonck A, Vansteenbrugge A, Dessy-Doize C, Flechon JE, Charpigny G, Mermillod P, Massip A, Dessy F. Characterization of bovine oviduct epithelial cell monolayers cultured under serum-free conditions. Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim. 1995; 31: 664–670.
- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The Transcription Factor MTF-1 Mediates Metal Regulation of the Mouse ZnT1 Gene. J. Biol. Chem. 2000; 275: 34803–34809.
- Larose H, Shami AN, Abbott H, Manske G, Lei L, Hammoud SS. Gametogenesis: A journey from inception to conception. En: *Organ Development*. Academic Press, 2019, p. 257–310.
- Lasry I, Golan Y, Berman B, Amram N, Glaser F, Assaraf YG. In situ dimerization of multiple wild type and mutant zinc transporters in live cells using bimolecular fluorescence complementation. J. Biol. Chem. 2014; 289: 7275–7292.
- Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG, Earnshaw WC. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. J. Cell Biol. 1993; 123: 7–22.
- Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturme R. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. Mol. Hum. Reprod. 2008; 14: 667–672.
- Leibfried L, First NL. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro. J. Anim. Sci. 1979; 48: 76–86.
- Li S, Winuthayanon W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. J. Endocrinol. 2017; 232: R1–R26.
- Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. Annu. Rev. Nutr. 2009; 29: 153–176.
- Lichten LA, Ryu M, Guo L, Embury J, Cousins RJ. MTF-1-Mediated Repression of the Zinc Transporter Zip10 Is Alleviated by Zinc Restriction. PLoS One. 2011; 6: e21526.
- Lim PJ, Danner R, Liang J, Doong H, Harman C, Srinivasan D, Rothenberg C, Wang H, Ye Y, Fang S, Monteiro MJ. Ubiquilin and p97/VCP bind erasin, forming a complex involved in ERAD. J. Cell Biol. 2009; 187: 201–217.
- Lin W, Chai J, Love J, Fu D. Selective electrodiffusion of zinc ions in a Zrt-, Irt-like protein, ZIPB. J. Biol. Chem. 2010; 285: 39013–39020.
- Lipner H. Mechanism of mammalian ovulation. En: *Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988, p. 447–488.
- Liu Z, Li H, Soleimani M, Girijashanker K, Reed JM, He L, Dalton TP, Nebert DW. Cd²⁺ versus Zn²⁺ uptake by the ZIP8 HCO₃⁻-dependent symporter: kinetics, electrogenicity and trafficking. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008; 365: 814–820.

- Liu M-J, Bao S, Gálvez-Peralta M, Pyle CJ, Rudawsky AC, Pavlovicz RE, Killilea DW, Li C, Nebert DW, Wewers MD, Knoell DL. ZIP8 Regulates Host Defense through Zinc-Mediated Inhibition of NF- κ B. Cell Rep. 2013; 3: 386–400.
- Liuzzi JP, Bobo JA, Lichten LA, Samuelson DA, Cousins RJ. Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004; 101: 14355–14360.
- Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, Ganz T, Cousins RJ. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2005; 102: 6843–6848.
- Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006; 103: 13612–13617.
- Lodde V, Garcia Barros R, Dall'Acqua PC, Dieci C, Robert C, Bastien A, Sirard MA, Franciosi F, Luciano AM. Zinc supports transcription and improves meiotic competence of growing bovine oocytes. Reproduction. 2020; 159: 679–691.
- Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. Mol. Reprod. Dev. 1994; 37: 48–53.
- Louis HA, Pino JD, Schmeichel KL, Pomiès P, Beckerle MC. Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. J. Biol. Chem. 1997; 272: 27484–27491.
- Lu KH (University CDN (Ireland). D of A, Gordon I, Chen HB, McGovern H. In vitro culture of early bovine embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. 1987;
- Lu M, Fu D. Structure of the zinc transporter YiiP. Science (80-.). 2007; 317: 1746–1748.
- Lu M, Chai J, Fu D. Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP. Nat. Struct. Mol. Biol. 2009; 16: 1063–1067.
- Luciano AM, Lodde V, Franciosi F, Cecilian F, Peluso JJ. Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. Reproduction. 2010; 140: 663–672.
- Luque EH, Hutter JC, Montes GS. Regulacion hormonal de los ciclos reproductivos en la vaca. Rev. Med. Vet. (Bogota). 1983; 64: 190–211.
- Machatkova M, Jokešová E, Petelíková J, Dvořáček V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. Theriogenology. 1996; 45: 801–810.
- Makarevich AV, Markkula M. Apoptosis and Cell Proliferation Potential of Bovine Embryos Stimulated with Insulin-Like Growth Factor I During In Vitro Maturation and Culture1. Biol. Reprod. 2002; 66: 386–392.
- Malayer JR, Hansen PJ, Buhi WC. Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. J. Exp. Zool. 1988; 248: 345–353.

- Manning DL, Daly RJ, Lord PG, Kelly KF, Green CD. Effects of oestrogen on the expression of a 4.4 kb mRNA in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. Mol. Cell. Endocrinol. 1988; 59: 205–212.
- Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation In Vitro. Biol. Reprod. 2002; 67: 1197–1203.
- Mao X, Kim BE, Wang F, Eide DJ, Petris MJ. A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity. J. Biol. Chem. 2007; 282: 6992–7000.
- Maret W. *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis: Recent insights and current trends.* Springer Science & Business Media, 2013.
- Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. J. Nutr. 2000; 130: 1455s-1458s.
- Maret W. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair. J. Nutr. 2003; 133: 1460S-2S.
- Maret W. Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. J. Trace Elem. Med. Biol. 2005; 19: 7–12.
- Maret W. Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. Adv. Nutr. 2013; 4: 82–91.
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system: role of hexosamine in the induction of insulin resistance. J. Biol. Chem. 1991; 266: 4706–4712.
- Mcardle HJ, Ashworth CJ. Micronutrients in fetal growth and development. 1999; 55: 499–510.
- McCall KA, Huang C, Fierke CA. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. J. Nutr. 2000; 130: 1437S-1446S.
- McCranor BJ, Bozym RA, Vitolo MI, Fierke CA, Bambrick L, Polster BM, Fiskum G, Thompson RB. Quantitative imaging of mitochondrial and cytosolic free zinc levels in an in vitro model of ischemia/reperfusion. J. Bioenerg. Biomembr. 2012; 44: 253–263.
- McDaniel JW, Scalzi H, Black DL. Influence of Ovarian Hormones on Histology and Histochemistry of the Bovine Oviduct. J. Dairy Sci. 1968; 51: 754–761.
- McDonald LE. *Reproducción y Endocrinología Veterinarias.* México D. F., Ed. Interamericana, 1978.
- McDonald MF, Bellve AR. Influence of oestrogen and progesterone on flow of fluid from the Fallopian tube in the ovariectomized ewe. J. Reprod. Fertil. 1969; 20: 51–61.
- McGee EA, Hsueh AJW. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles¹. Endocr. Rev. 2000; 21: 200–214.
- McGee EA, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiriri A, Hsueh AJW. Follicle-Stimulating Hormone Enhances the Development of Preantral Follicles in Juvenile Rats¹. Biol. Reprod. 1997; 57: 990–998.

- McLaughlin M, Bromfield JJ, Albertini DF, Telfer EE. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. Mol. Hum. Reprod. 2010; 16: 644–653.
- Méduri G, Charnaux N, Driancourt M-A, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E. Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Oocytes? J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002; 87: 2266–2276.
- Mehlen P, Kretz-Remy C, Briolay J, Fostan P, Mirault ME, Arrigo AP. Intracellular reactive oxygen species as apparent modulators of heat-shock protein 27 (hsp27) structural organization and phosphorylation in basal and tumour necrosis factor α -treated T47D human carcinoma cells. Biochem. J. 1995; 312: 367–375.
- Menezo Y, Guerin P. The mammalian oviduct: Biochemistry and physiology. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 1997; 73: 99–104.
- Miyai T, Hojyo S, Ikawa T, Kawamura M, Irie T, Ogura H, Hijikata A, Bin B-H, Yasuda T, Kitamura H, Nakayama M, Ohara O, Yoshida H, Koseki H, Mishima K, Fukada T. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. Proc. Natl. Acad. Sci. 2014; 111: 11780–11785.
- Miyamoto Y, Skarzynski DJ, Okuda K. Is tumor necrosis factor alpha a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F(2alpha) release at luteolysis in cattle? Biol. Reprod. 2000; 62: 1109–1115.
- Monget P, Bobe J, Gougeon A, Fabre S, Monniaux D, Dalbies-Tran R. The ovarian reserve in mammals: A functional and evolutionary perspective. Mol. Cell. Endocrinol. 2012; 356: 2–12.
- Moniruzzaman M, Miyano T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. J. Reprod. Dev. 2010; 56: 559–566.
- Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. Theriogenology. 2016; 86: 41–53.
- Murgia C, Devirgiliis C, Mancini E, Donadel G, Zalewski P, Perozzi G. Diabetes-linked zinc transporter ZnT8 is a homodimeric protein expressed by distinct rodent endocrine cell types in the pancreas and other glands. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2009; 19: 431–439.
- Naor Z. Signal Transduction Mechanisms of Ca²⁺ Mobilizing Hormones: The Case of Gonadotropin-Releasing Hormone*. Endocr. Rev. 1990; 11: 326–353.
- National Research Council. *Nutrient Requirements of Beef Cattle: Seventh Revised Edition: Update 2000.* 2000; The National Academies Press.
- Navarro-Imaz H, Ochoa B, García-Arcos I, Martínez MJ, Chico Y, Fresnedo O, Rueda Y. Molecular and cellular insights into the role of SND1 in lipid metabolism. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids. 2020; 1865: 158589.
- Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, Dieterle S, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. Hum. Reprod. Update. 2000; 6: 149–159.
- Nikoloff N, Pascua AM, Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Sirini MA, Seoane A, Furnus CC. Effect of eicosapentaenoic acid on bovine cumulus–oocyte complex in vitro. Cell Biol. Int. 2017; 41:.
- Nishida H, Suzuki T, Ookawa H, Tomaru Y, Hayashizaki Y. Comparative analysis of

- expression of histone H2a genes in mouse. BMC Genomics. 2005; 6: 1–6.
- Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC. Luteal Function: The Estrous Cycle and Early Pregnancy. Biol. Reprod. 1994; 50: 239–247.
- Niwa-Kawakita M, Ferhi O, Soilihi H, Le Bras M, Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. PML is a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. J. Exp. Med. 2017; 214: 3197–3206.
- O’Shea LC, Mehta J, Lonergan P, Hensey C, Fair T. Developmental competence in oocytes and cumulus cells: candidate genes and networks. Syst. Biol. Reprod. Med. 2012; 58: 88–101.
- O’Dell BL. Role of Zinc in Plasma Membrane Function. J. Nutr. 2000; 130: 1432S-1436S.
- Ohana E, Hoch E, Keasar C, Kambe T, Yifrach O, Hershinkel M, Sekler I. Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. J. Biol. Chem. 2009; 284: 17677–17686.
- Olcese C and others. X-linked primary ciliary dyskinesia due to mutations in the cytoplasmic axonemal dynein assembly factor PIH1D3. Nat. Commun. 2017; 8: 1–15.
- Outten CE, O’Halloran T V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. Science. 2001; 292: 2488–2492.
- Ozawa K, Kuwabara K, Tamatani M, Takatsuji K, Tsukamoto Y, Kaneda S, Yanagi H, Stern DM, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Ogawa S, Tohyama M. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. J. Biol. Chem. 1999; 274: 6397–6404.
- Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. EMBO J. 1995; 14: 639–649.
- Palmiter RD, Huang L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 2004; 447: 744–751.
- Pantaleon M, Tan HY, Kafer GR, Kaye PL. Toxic Effects of Hyperglycemia Are Mediated by the Hexosamine Signaling Pathway and O-Linked Glycosylation in Early Mouse Embryos1. Biol. Reprod. 2010; 82: 751–758.
- Park KM, Song JW. HspBP1 is the negative regulator of the bovine progesterone receptor. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 2003; 16: 1261–1267.
- Park JG, Qin Y, Galati DF, Palmer AE. New Sensors for Quantitative Measurement of Mitochondrial Zn²⁺. ACS Chem. Biol. 2012; 7: 1636–1640.
- De Pauw IMC, Van Soom A, Laevens H, Verberckmoes S, de Kruif A. Sperm Binding to Epithelial Oviduct Explants in Bulls with Different Nonreturn Rates Investigated with a New In Vitro Model1. Biol. Reprod. 2002; 67: 1073–1079.
- Pepling ME, Spradling AC. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. Development. 1998; 125: 3323–3328.
- Peters AR. Studies of hormone patterns during the oestrous cycle of beef cows. Reprod. Nutr. Dev. 1985; 25: 919–927.
- Peters H, Pedersen T. Origin of Follicle Cells in the Infant Mouse Ovary. Fertil. Steril. 1967; 18: 309–313.

- Peters KE, Bergfeld EG, Cupp AS, Kojima FN, Mariscal V, Sanchez T, Wehrman ME, Grotjan HE, Hamernik DL, Kittok RJ, Kinder JE. Luteinizing Hormone has a Role in Development of Fully Functional Corpora Lutea (CL) But is not Required to Maintain CL Function in Heifers1. Biol. Reprod. 1994; 51: 1248–1254.
- Phang JM. Proline metabolism in cell regulation and cancer biology: Recent advances and hypotheses. Antioxidants Redox Signal. 2019; 30: 635–649.
- Picco SJ, Anchordoquy JM, de Matos DG, Anchordoquy JP, Seoane A, Mattioli GA, Errecalde AL, Furnus CC. Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. Theriogenology. 2010; 74: 1141–1148.
- Pincus G, Enzmann E V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: i. the activation of ovarian eggs. J. Exp. Med. 1935; 62: 665–675.
- Pincus G, Saunders B. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. VI. The maturation of human ovarian ova. Anat. Rec. 1939; 75: 537–545.
- Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. Biol. Reprod. 1991; 44: 102–107.
- Powell SR. The Antioxidant Properties of Zinc. J. Nutr. 2000; 130: 1447S–1454S.
- Poyser NL. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids. 1995; 53: 147–195.
- Prange RW, Duby RT. Anatomy of the Cow's Reproductive Tract. Dairy Integr. Reprod. Manag. 2011; 1–5.
- Prasad AS. Zinc Deficiency in Humans: A Neglected Problem. J. Am. Coll. Nutr. 1998; 17: 542–543.
- Prasad AS. Zinc deficiency. BMJ. 2003; 326: 409–410.
- Prasad AS, Kucuk O. Zinc in Cancer Prevention. Cancer Metastasis Rev. 2002; 21: 291–295.
- Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. Exp. Biol. Med. 2003; 228: 111–133.
- Prévile X, Gaestel M, Arrigo AP. Phosphorylation Is Not Essential for Protection of L929 Cells by Hsp25 Against H₂O₂-mediated Disruption Actin Cytoskeleton, a Protection Which Appears Related to the Redox Change Mediated by Hsp25. Cell Stress Chaperones. 1998; 3:.
- Prévile X, Salvemini F, Giraud S, Chaufour S, Paul C, Stepien G, Ursini MV, Arrigo AP. Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. Exp. Cell Res. 1999; 247: 61–78.
- Qian L, Lopez V, Seo YA, Kelleher SL. Prolactin regulates ZNT2 expression through the JAK2/STAT5 signaling pathway in mammary cells. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 2009; 297:.
- Qin Y, Dittmer PJ, Park JG, Jansen KB, Palmer AE. Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn²⁺ with genetically encoded sensors. Proc. Natl.

- Acad. Sci. U. S. A. 2011; 108: 7351–7356.
- Que EL, Duncan FE, Lee HC, Hornick JE, Vogt S, Fissore RA, O'Halloran T V., Woodruff TK. Bovine eggs release zinc in response to parthenogenetic and sperm-induced egg activation. Theriogenology. 2019; 127: 41–48.
- Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* Elsevier, 2006, p. 383–424.
- Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. Trends Endocrinol. Metab. 2010; 21: 96–103.
- Reischl J, Prella K, Wolf E. Physiological characteristics of bovine oviduct epithelial cells are maintained in perfusion culture. Eur. J. Cell Biol. 1997; 74: 132.
- Reischl J, Prella K, Sch??l H, Neum??ller C, Einspanier R, Sinowatz F, Wolf E. Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells in vitro. Cell Tissue Res. 1999; 296: 371–383.
- Rieger D, Loskutoff NM. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. J. Reprod. Fertil. 1994; 100: 257–262.
- Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Kittok RJ, Kinder JE. Luteinizing Hormone Secretion and Corpus Luteum Function in Cows Receiving two Levels of Progesterone1. Biol. Reprod. 1989; 41: 997–1003.
- Roche JF. Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. Rev. Reprod. 1996; 1: 19–27.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid1. Biol. Reprod. 2010; 82: 1021–1029.
- Rodriguez RE, Wise ME. Ontogeny of Pulsatile Secretion of Gonadotropin-Releasing Hormone in the Bull Calf during Infantile and Pubertal Development*. Endocrinology. 1989; 124: 248–256.
- Rose TA, Bavister BD. Effect of oocyte maturation medium on in vitro development of in vitro fertilized bovine embryos. Mol. Reprod. Dev. 1992; 31: 72–77.
- Rossi G, Di Nisio V, Macchiarelli G, Nottola SA, Halvaei I, De Santis L, Cecconi S. Technologies for the Production of Fertilizable Mammalian Oocytes. Appl. Sci. 2019; 9: 1536.
- Rottmayer R, Ulbrich SE, K?lle S, Prella K, Neumueller C, Sinowatz F, Meyer HHD, Wolf E, Hiendleder S. A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions: Morphological and functional characterization. Reproduction. 2006; 132: 637–648.
- Ryu M-S, Lichten LA, Liuzzi JP, Cousins RJ. Zinc Transporters ZnT1 (Slc30a1), Zip8 (Slc39a8), and Zip10 (Slc39a10) in Mouse Red Blood Cells Are Differentially Regulated during Erythroid Development and by Dietary Zinc Deficiency. J. Nutr. 2008; 138: 2076–2083.
- Ryu CS, Klein K, Zanger UM. Membrane associated progesterone receptors: Promiscuous proteins with pleiotropic functions - Focus on interactions with cytochromes P450. Front. Pharmacol. 2017; 8:.

- Salazar G, Falcon-Perez JM, Harrison R, Faundez V. SLC30A3 (ZnT3) oligomerization by dityrosine bonds regulates its subcellular localization and metal transport capacity. PLoS One. 2009; 4:.
- Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. J. Assist. Reprod. Genet. 2018; 35: 1741–1750.
- Sato E, Miyamoto H, Koide SS. Glycosaminoglycans in porcine follicular fluid promoting viability of oocytes in culture. Mol. Reprod. Dev. 1990; 26: 391–397.
- Sawyer HR, Olson PN, Gorell TA. Effects of progesterone on the oviductal epithelium in estrogen-primed prepubertal beagles: Light and electron microscopic observations. Am. J. Anat. 1984; 169: 75–87.
- Schallenberger E, Schöndorfer AM, Walters DL. Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the oestrous cycle. Acta Endocrinol. (Copenh). 1985; 108: 312–321.
- Schmalen I, Reischl S, Wallach T, Klemz R, Grudziecki A, Prabu JR, Benda C, Kramer A, Wolf E. Interaction of circadian clock proteins CRY1 and PER2 is modulated by zinc binding and disulfide bond formation. Cell. 2014; 157: 1203–1215.
- Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 2005; 569: 29–63.
- Schoot DC, Harlin J, Shoham Z, Mannaerts BMJL, Lahlou N, Bouchard P, Bennink HJTC, Fauser BCJM. Endocrinology: Recombinant human follicle-stimulating hormone and ovarian response in gonadotrophin-deficient women. Hum. Reprod. 1994; 9: 1237–1242.
- Senger PL. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Pullman WA: Current Conceptions, 2003.
- Sensi SL, Canzoniero LMT, Yu SP, Ying HS, Koh JY, Kerchner GA, Choi DW. Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: Routes of entry. J. Neurosci. 1997; 17: 9554–9564.
- Seytanoglu A, Georgiou AS, Sostaric E, Watson PF, Holt W V., Fazeli A. Oviductal Cell Proteome Alterations during the Reproductive Cycle in Pigs. J. Proteome Res. 2008; 7: 2825–2833.
- Shabankareh HK, Zandi M. Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. Fertil. Steril. 2010; 94: 335–340.
- Shah PP, Beverly LJ. Regulation of VCP/p97 demonstrates the critical balance between cell death and epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress. Oncotarget. 2015; 6: 17725–17737.
- Shemesh M, Dombrowski L, Gurevich M, Shore LS, Fuchs A-R, Fields MJ. Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. Reprod. Fertil. Dev. 1997; 9: 525.
- Shimizu T, Tetsuka M, Miyamoto A, Uchida T. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates the expression of Pin1, a peptidyl–prolyl isomerase, in the bovine granulosa cells. Domest. Anim. Endocrinol. 2007; 32: 226–234.
- Shusterman E, Beharier O, Shiri L, Zarivach R, Etzion Y, Campbell CR, Lee I-H, Okabayashi

- K, Dinudom A, Cook DI, Katz A, Moran A. ZnT-1 extrudes zinc from mammalian cells functioning as a Zn(2+)/H(+) exchanger. Metallomics. 2014; 6: 1656–1663.
- Sinha A, Khadilkar RJ, Vinay KS, Sinha ARC, Inamdar MS. Conserved regulation of the JAK/STAT pathway by the endosomal protein asrij maintains stem cell potency. Cell Rep. 2013; 4: 649–658.
- Smith MF, McIntush EW, Smith GW. Mechanisms associated with corpus luteum development. J. Anim. Sci. 1994; 72: 1857–1872.
- Soleilhavoup C, Riou C, Tsikis G, Labas V, Harichaux G, Kohnke P, Reynaud K, De Graaf SP, Gerard N, Druart X. Proteomes of the female genital tract during the oestrous cycle. Mol. Cell. Proteomics. 2016; 15: 93–108.
- Spey LL, Lipner H. Ovulation. En: *The Physiology of Reproduction*. John Wiley & Sons, Ltd, 1994, p. 725–780.
- Steinhauer N, Boos A, Gunzel-Apel A-R. Morphological Changes and Proliferative Activity in the Oviductal Epithelium during Hormonally Defined Stages of the Oestrous Cycle in the Bitch. Reprod. Domest. Anim. 2004; 39: 110–119.
- Stuart GW, Searle PF, Palmiter RD. Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. Nature. 1985; 317: 828–831.
- Stumpf TT, Roberson MS, Wolfe MW, Hamernik DL, Kittok RJ, Kinder JE. Progesterone, 17 β -Estradiol, and Opioid Neuropeptides Modulate Pattern of Luteinizing Hormone in Circulation of the Cow1. Biol. Reprod. 1993; 49: 1096–1101.
- Sugiura K, Eppig JJ. Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. Reprod. Fertil. Dev. 2005; 17: 667.
- Sun Q-Y, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. Reproduction. 2006; 131: 193–205.
- Sutton-McDowall ML, Mitchell M, Cetica P, Dalvit G, Pantaleon M, Lane M, Gilchrist RB, Thompson JG. Glucosamine Supplementation During In Vitro Maturation Inhibits Subsequent Embryo Development: Possible Role of the Hexosamine Pathway as a Regulator of Developmental Competence1. Biol. Reprod. 2006; 74: 881–888.
- Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. REPRODUCTION. 2010; 139: 685–695.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effect of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. Hum. Reprod. Update. 2003; 9: 35–48.
- Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Ishihara K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, Kambe T. Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells. J. Biol. Chem. 2005; 280: 30956–30962.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Von Mering C. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res. 2019; 47: D607–D613.

- Tajima K, Orisaka M, Yata H, Goto K, Hosokawa K, Kotsuji F. Role of granulosa and theca cell interactions in ovarian follicular maturation. Microsc. Res. Tech. 2006; 69: 450–458.
- Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. Biomed. Pharmacother. 2003; 57: 399–411.
- Taylor KM, Nicholson RI. The LZT proteins; The LIV-1 subfamily of zinc transporters. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 2003; 1611: 16–30.
- Taylor KM, Morgan HE, Smart K, Zahari NM, Pumford S, Ellis IO, Robertson JFR, Nicholson RI. The Emerging Role of the LIV-1 Subfamily of Zinc Transporters in Breast Cancer. Mol. Med. 2007; 13: 396–406.
- Taylor KM, Hiscox S, Nicholson RI, Hogstrand C, Kille P. Cell biology: Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7. Sci. Signal. 2012; 5:.
- Thiers RE, Vallee BL. Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver. J. Biol. Chem. 1957; 226: 911–920.
- Thomas P, Pang Y, Dong J, Berg AH. Identification and Characterization of Membrane Androgen Receptors in the ZIP9 Zinc Transporter Subfamily: II. Role of Human ZIP9 in Testosterone-Induced Prostate and Breast Cancer Cell Apoptosis. Endocrinology. 2014; 155: 4250–4265.
- Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. Mol. Hum. Reprod. 2009; 15: 795–803.
- Tozlu S, Girault I, Vacher S, Vendrell J, Andrieu C, Spyrtos F, Cohen P, Lidereau R, Bieche I. Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-PCR approach. Endocr. Relat. Cancer. 2006; 13: 1109–1120.
- Trivedi S, Starz-Gaiano M. Drosophila Jak/STAT signaling: Regulation and relevance in human cancer and metastasis. Int. J. Mol. Sci. 2018; 19:.
- Trounson A. The production of ruminant embryos in vitro. Anim. Reprod. Sci. 1992; 28: 125–137.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction. 2001; 121: 51–75.
- Truong-Tran AQ, Ruffin RE, Zalewski PD. Visualization of labile zinc and its role in apoptosis of primary airway epithelial cells and cell lines. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. 2000; 279:.
- Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. BioMetals. 2001; 14: 315–330.
- Turzillo AM, Fortune JE. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. Reproduction. 1990; 89: 643–653.
- Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. Nat. Protoc. 2016a; 11: 2301–2319.

- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. Nat. Methods. 2016b; 13: 731–740.
- Ulbrich SE, Kettler A, Einspanier R. Expression and localization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2003; 84: 279–289.
- Ulbrich SE, Zitta K, Hiendleder S, Wolf E. In vitro systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. Theriogenology. 2010; 73: 802–816.
- Underwood EJ (Eric J, Suttle NF. *The Mineral Nutrition of Livestock*. CABI Pub.
- Vale W. Reproductive and other roles of inhibins and activins. En: *The Physiology of Reproduction*. New York, EEUU, Raven Press, 1994, p. 1861–1878.
- Vallee BL, Auld DS. Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and Other Proteins. Biochemistry. 1990; 29: 5647–5659.
- Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. Physiol. Rev. 1993; 73: 79–118.
- Verhage HG, Abel JH, Tietz WJ, Barrau MD. Development and maintenance of the oviductal epithelium during the estrous cycle in the bitch. Biol. Reprod. 1973; 9: 460–474.
- Vinkenburg JL, Nicolson TJ, Bellomo EA, Koay MS, Rutter GA, Merckx M. Genetically encoded FRET sensors to monitor intracellular Zn²⁺ homeostasis. Nat. Methods. 2009; 6: 737–740.
- Vizcarra JA, Wettemann RP, Braden TD, Turzillo AM, Nett TM. Effect of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Pulse Frequency on Serum and Pituitary Concentrations of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone, GnRH Receptors, and Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Subunits in Cows*. Endocrinology. 1997; 138: 594–601.
- Walter I. Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). Anat. Rec. 1995; 243: 347–356.
- Walters DL, Schallenberger E. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. Reproduction. 1984; 71: 503–512.
- Wang L, Wang D, Zou X, Xu C. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2009; 10: 483–492.
- Wang C, Michener CM, Belinson JL, Vaziri S, Ganapathi R, Sengupta S. Role of the 18:1 Lysophosphatidic Acid-Ovarian Cancer Immunoreactive Antigen Domain Containing 1 (OCIAD1)-Integrin Axis in Generating Late-Stage Ovarian Cancer. Mol. Cancer Ther. 2010; 9: 1709–1718.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. Theriogenology. 2002; 57: 2105–2117.
- Warzych E, Cieslak A, Madeja ZE, Pawlak P, Wolc A, Lechniak D. Multifactorial analysis of the follicular environment is predictive of oocyte morphology in cattle. J. Reprod. Dev. 2014; 60: 1–8.

- Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T, Andrews GK. Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). Biol. Chem. 2007; 388: 1301–1312.
- Weems YS, Lammoglia MA, Vera-Avila HR, Randel RD, King C, Sasser RG, Weems CW. Effect of luteinizing hormone (LH), PGE2, 8-EPI-PGE1, 8-EPI-PGE2, trichosanthin, and pregnancy specific protein B (PSPB) on secretion of progesterone in vitro by corpora lutea (CL) from nonpregnant and pregnant cows. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 1998; 55: 27–42.
- Wessel T, Schuchter U, Walt H. Ciliary motility in bovine oviducts for sensing rapid non-genomic reactions upon exposure to progesterone. Horm. Metab. Res. 2004; 36: 136–141.
- Wijayagunawardane MPB, Kodithuwakku SP, Yamamoto D, Miyamoto A. Vascular endothelial growth factor system in the cow oviduct: A possible involvement in the regulation of oviductal motility and embryo transport. Mol. Reprod. Dev. 2005; 72: 511–520.
- Wiltbank MC. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. J. Anim. Sci. 1994; 72: 1873–1883.
- Wimmer U, Wang Y, Georgiev O, Schaffner W. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. Nucleic Acids Res. 2005; 33: 5715–5727.
- De Wit AAC, Wurth YA, Kruip TAM. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. J. Anim. Sci. 2000; 78: 1277–1283.
- Wolf E, Arnold GJ, Bauersachs S, Beier HM, Blum H, Einspanier R, Fröhlich T, Herrler A, Hiendleder S, Kölle S, Prella K, Reichenbach HD, Stojkovic M, Wenigerkind H, Sinowatz F. Embryo-maternal communication in bovine - Strategies for deciphering a complex cross-talk. Reprod. Domest. Anim. 2003; 38: 276–289.
- Woo MMM, Gilks CB, Verhage HG, Longacre TA, Leung PCK, Auersperg N. Oviductal glycoprotein, a new differentiation-based indicator present in early ovarian epithelial neoplasia and cortical inclusion cysts. Gynecol. Oncol. 2004; 93: 315–319.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. Theriogenology. 2007; 68: S77–S83.
- Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RML, Franks S, Hardy K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. Hum. Reprod. 1999; 14: 1555–1562.
- Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Pau KY, Barrett SL, Zelinski MB, Stouffer RL. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. Hum. Reprod. 2011; 26: 1061–1072.
- Yamaguchi S, Miura C, Kikuchi K, Celino FT, Agusa T, Tanabe S, Miura T. Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009; 106: 10859–10864.
- Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosaki T,

- Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K, Hirano T. Zinc is a novel intracellular second messenger. J. Cell Biol. 2007; 177: 637–645.
- Yamashita S, Miyagi C, Fukada T, Kagara H, Che YS, Hirano T. Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. Nature. 2004; 429: 298–302.
- Yang MY, Fortune JE. The Capacity of Primordial Follicles in Fetal Bovine Ovaries to Initiate Growth In Vitro Develops During Mid-Gestation and Is Associated with Meiotic Arrest of Oocytes1. Biol. Reprod. 2008; 78: 1153–1161.
- Yang YR, Suh PG. O-GlcNAcylation in cellular functions and human diseases. Adv. Biol. Regul. 2014; 54: 68–73.
- Yániz JL, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mullins KJ. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. Anat. Rec. 2000; 260: 268–278.
- Yoshida M. Role of glutathione in the maturation and fertilization of pig oocytes in vitro. Mol. Reprod. Dev. 1993; 35: 76–81.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG. Glutathione Concentration during Maturation and after Fertilization in Pig Oocytes: Relevance to the Ability of Oocytes to Form Male Pronucleus1. Biol. Reprod. 1993; 49: 89–94.
- Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. REPRODUCTION. 2010; 140: 489–504.
- Yu H, Hackenbroch L, Meyer FRL, Reiser J, Razzazi-Fazeli E, Nöbauer K, Besenfelder U, Vogl C, Brem G, Mayrhofer C. Identification of Rabbit Oviductal Fluid Proteins Involved in Pre-Fertilization Processes by Quantitative Proteomics. Proteomics. 2019; 19: 1800319.
- Zeleznik AJ. Premature Elevation of Systemic Estradiol Reduces Serum Levels of Follicle-Stimulating Hormone and Lengthens the Follicular Phase of the Menstrual Cycle in Rhesus Monkeys*. Endocrinology. 1981; 109: 352–355.
- Zhang H, Machutta CA, Tonge PJ. Fatty acid biosynthesis and oxidation. En: *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology.* Kidlington, UK, Elsevier Ltd., 2010, p. 231–275.
- Zhao J, Taverne MAM, van der Weijden GC, Bevers MM, van den Hurk R. Effect of Activin A on In Vitro Development of Rat Preantral Follicles and Localization of Activin A and Activin Receptor II. Biol. Reprod. 2001; 65: 967–977.
- Zhao L and others. The zinc transporter ZIP12 regulates the pulmonary vascular response to chronic hypoxia. Nature. 2015; 524: 356–360.
- Zuelke KA, Brackett BG. Increased Glutamine Metabolism in Bovine Cumulus Cell-Enclosed and Denuded Oocytes after in Vitro Maturation with Luteinizing Hormone1. Biol. Reprod. 1993; 48: 815–820.