

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**

**FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**



**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**PRODUZIONE E SANITÀ DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

**INDIRIZZO: SCIENZE DELL'ALLEVAMENTO ANIMALE**

**XIX CICLO**

***Studio di alcune proteine del fluido oviduttale: effetto  
dell'osteopontina sulla produzione embrionale in vitro  
nella specie bovina***

**Tutor:**

**Chiar.ma Prof.ssa Bianca Gasparrini**

**Candidata:**

**Dott.ssa Elisa Monaco**

**Coordinatore:**

**Chiar.ma Prof.ssa Maria Luisa Cortesi**

**NOVEMBRE 2006**

## Indice dei Contenuti

<b>1 INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1 IVEP.....	10
1.2 Ovidutto .....	27
1.3 Fluido oviduttale (ODF) .....	31
Lipidi.....	35
Composizione ionica.....	37
Proteine .....	38
1.4 Associazione delle proteine dell'odf con i gameti.....	54
<b>2 PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>57</b>
I PARTE .....	57
2.1.1 Scopo del lavoro .....	57
2.1.2 Materiali e metodi.....	58
2.1.3 Disegno sperimentale.....	65
2.1.4 Risultati.....	70
II PARTE .....	76
2.2.1 Esperimento 1. Ruolo dell'OPN sulla capacitazione spermatica e reazione acrosomiale .....	76
2.2.1.1 Scopo del lavoro .....	77
2.2.1.2 Materiali e metodi.....	78
2.2.1.3 Risultati.....	81
2.2.2 Esperimento 2. Valutazione del ruolo dell'OPN sulla fecondazione in vitro e sullo sviluppo embrionale precoce .....	83

2.2.2.1 Scopo del lavoro .....	83
2.2.2.2 Materiali e metodi .....	84
2.2.2.3 Disegno sperimentale.....	89
2.2.2.4 Risultati.....	92
2.2.2.5 Discussione .....	96
2.2.2.6 Conclusioni .....	109
Riferimenti bibliografici .....	110

# 1 INTRODUZIONE

Le tecnologie coinvolte nella produzione di animali geneticamente migliori occupano ormai, da circa cinquanta anni, un ruolo di rilevante importanza nell'ambito delle produzioni animali. Il successo economico dei sistemi produttivi in campo zootecnico, infatti, oggi dipende dal miglioramento genetico, che consente di ottenere incrementi produttivi in tempi brevi, oltre che dalla capacità di risposta delle aziende alle esigenze di un consumatore più attento e sensibile alla qualità del prodotto. È in questo contesto che biotecnologie riproduttive quali l'inseminazione strumentale (IS), la superovulazione (SO), l'embryo transfer (ET), l'ovum pick-up (OPU), la produzione embrionale in vitro (IVEP), la criopreservazione, il sessaggio del seme e degli embrioni, la clonazione, assumono un ruolo fondamentale, poichè consentono di ridurre i tempi necessari alla diffusione di genotipi di elevato valore zootecnico. Ognuna di queste biotecnologie ha diversi vantaggi e limitazioni; gli allevatori possono scegliere di utilizzare solo una o più di esse per raggiungere gli obiettivi che si sono prefissi nella loro azienda. In più è importante precisare che la sfera delle loro applicazioni è ben più ampia. Nel mondo animale esse contribuiscono potenzialmente al mantenimento della biodiversità, permettono a geni,

altrimenti destinati all'estinzione, di essere preservati, e vengono anche impiegati nella salvaguardia delle numerose specie animali in via di estinzione o, comunque, a ridotta consistenza numerica. In campo umano, hanno permesso di fronteggiare con successo quadri d'infertilità e risultano dei validi strumenti nella lotta contro il cancro, l'invecchiamento cellulare, patologie pre e post natali. Infatti, grazie alle numerose acquisizioni scientifiche che caratterizzano il loro studio, sono in grado di fornire preziose informazioni su processi biologici e patologici dell'organismo. Inoltre, poichè sono state affiancate nella loro applicazione da tecniche di biologia cellulare e molecolare, da tecniche di genomica, sono diventate dei validi strumenti di ricerca per la caratterizzazione genica e la produzione di animali transgenici.

*Inseminazione strumentale (AI).* Per la prima volta il miglioramento genetico degli animali d'allevamento ha subito un notevole impulso nel 1950, quando cioè è stato possibile ottimizzare il contributo paterno grazie all'introduzione dell'inseminazione strumentale. I vantaggi di questa tecnica vanno dalla prevenzione di malattie veneree alla possibilità di generare multiple generazioni filiarie per toro, in poco tempo. Ciò permette una rapida valutazione genetica dell'animale attraverso le prestazioni delle figlie. L'AI si è sviluppata primariamente negli allevamenti bovini e si è poi espansa a

macchia d'olio anche in altre specie domestiche ed in gran parte del mondo. La sua diffusione è stata massiva intorno agli anni '60-'70 grazie al perfezionamento dei metodi di criopreservazione che hanno permesso di congelare con successo il seme dei tori miglioratori.

*Superovulazione (SO) e trasferimento embrionale (ET).* All'inizio degli anni '70 tecnologie finalizzate all'incremento della produzione embrionale e, quindi, della prolificità della femmina, sono state sviluppate con lo scopo di esaltare il contributo materno al miglioramento genetico. La superovulazione e il trasferimento embrionale rappresentano i precursori delle tecnologie a ciò finalizzate. La SO consiste nella somministrazione di ormoni esogeni, ad animali donatori generalmente monovulanti, per indurre ovulazioni multiple. Successivamente, si esegue il recupero degli embrioni ottenuti, mediante lavaggio delle corna uterine, al 6°-7° giorno, delle donatrici che sono state coperte o inseminate al momento dell'ovulazione. Gli embrioni saranno quindi trasferiti (ET) in animali riceventi, previamente sincronizzati, che porteranno a termine la gravidanza. I programmi MOET (multiple ovulation and Embryo transfer) oltre che aumentare l'intensità di selezione genetica, riducendo gli intervalli generazionali (Smith, 1988), oggi sono anche comunemente usati per selezionare i tori da utilizzare per l' AI (Bondoc et al., 1989; Teepker et al., 1989). In questo caso le donatrici scelte

vengono fecondate con il seme di tori miglioratori e le femmine della progenie che ne deriva vengono messe in produzione, mentre i fratelli vengono messi in attesa dei risultati di produzione delle sorelle (Smith C e Ruane, 1987). I maschi vengono quindi testati e scelti in base alle prestazioni delle sorelle, invece che della loro prole, come accadeva con la sola AI. In questo modo è possibile testare geneticamente un toro in tre anni e mezzo invece che in cinque anni e mezzo usando i tradizionali test di progenie. Con questa tecnica si recuperano, mediamente, 6 embrioni per femmina donatrice. I programmi MOET sono stati sempre più perfezionati nel corso degli anni ed ancora oggi rappresentano la tecnica che produce il maggior numero di embrioni nel mondo, per un totale di 500000 embrioni all'anno, di cui circa 440000 vengono trasferiti (Thibier, 1998). Nonostante ciò, esistono svariati fattori limitanti il suo utilizzo che sono rappresentati dalla necessità di utilizzare soggetti in perfette condizioni sanitarie del tratto genitale, con pervietà delle tube, non gravidi, con ciclo sessuale regolare e dopo un idoneo periodo post partum.

*Ovum pick-up (OPU).* Nel tentativo di superare gli svantaggi legati ai programmi MOET, nel 1987, la tecnica OPU, utilizzata in umana, venne adattata alla specie bovina. L' OPU consiste nel recupero di oociti immaturi da animali noti, vivi, per via transvaginale attraverso puntura follicolare

ecoguidata. Le uova recuperate vengono poi introdotte nel sistema di produzione embrionale in vitro (IVEP), che comporta le fasi di maturazione, fecondazione e coltura in vitro fino allo stadio di blastocisti, stadio in cui gli embrioni possono essere trasferiti oppure sottoposti a sessaggio e/o congelamento. Il prelievo degli oociti immaturi può essere effettuato una o due volte alla settimana, per tempi anche molto lunghi, senza effetti negativi sulla fertilità degli animali (Chastant-Maillard et al., 2003). E' stato osservato che il numero di oociti di buona qualità recuperati (oociti cioè che una volta inseriti nel sistema IVEP sono in grado di svilupparsi fino allo stadio di blastocisti) risulta maggiore con il prelievo fatto due volte alla settimana, a distanza di 3-4 giorni, rispetto a quello eseguito una volta a settimana (Merton et al., 2003, Hanenberg et al 1997). In quest'ultimo caso, infatti, c'è un maggiore numero di uova che presentano espansione del cumulo e atresia (Garcia et al., 1998). Poichè è stato osservato che un follicolo dominante emerge approssimativamente tre giorni dopo l'OPU, ripetere la tecnica dopo questo stesso intervallo di tempo, preserva l'ovaio dall'impatto negativo che il follicolo dominante ha sulla competenza allo sviluppo di oociti di follicoli minori.

*Vantaggi dell'OPU.* Come abbiamo precedentemente accennato la tecnica OPU aveva fatto la sua comparsa nel mondo zootecnico nel tentativo

di superare i fattori limitanti i programmi MOET. Essa infatti, può essere utilizzata in animali che non rispondono ai trattamenti di stimolazione ormonale, con patologie del tratto riproduttivo, in animali aciclici, prepuberi, gravidi e in quelli a fine carriera (di età avanzata). Inoltre, diversamente dalla tecnica MOET, non presenta alcuna ripercussione negativa sull'animale trattato, anzi può anche avere un effetto terapeutico in animali con cisti ovariche o simili patologie; non interferisce con i normali cicli riproduttivi e produttivi dell'animale e non necessita di un pretrattamento con gonadotropine. Quest'ultimo è un importante vantaggio specialmente per gli animali giovani, nei quali, la stimolazione con le gonadotropine può causare edema mammario e cisti ovariche. I vantaggi dell'OPU rispetto ai programmi MOET sono, dunque, svariati. Questa metodica consente in un determinato intervallo di tempo, una produzione di embrioni per donatrice, superiore rispetto a qualsiasi altra tecnica oggi disponibile (in media un vitello all'anno per l'AI, 20-25 e 80-100 vitelli all'anno rispettivamente per MOET e OPU/IVP).

Attualmente, il numero di oociti ricavati in un programma OPU con due prelievi a settimana va da 0 a 26 oociti per sessione e da 0.5 a 15 per animale con circa il 20% di oociti nudi o degenerati (Hasler et al., 1995).

## 1.1 IVEP

Nel 1978 con la nascita di Louise Brown, la prima bambina nata da IVF (Steptoe et al., 1978), gli sforzi dei ricercatori, nel campo delle produzioni animali, si indirizzarono allo sviluppo di una simile tecnica anche nella specie bovina. Così come accadeva inizialmente nell'uomo, oociti maturi venivano ricavati chirurgicamente dalle ovaie o dalle tube di vacche stimulate con ormoni. Successivamente le uova venivano fecondate e coltivate in vitro, prima di essere trasferite in riceventi, e questo ha portato, nel 1981, alla nascita di Virgil, il primo vitello nato da IVF (Brackett et al., 1982). Da allora diversi laboratori di fecondazione in vitro sono nati negli Stati Uniti, in Canada e in Europa. Con l'avvento della tecnica OPU, la produzione embrionale in vitro (IVEP) è presto diventata una valida alternativa ai programmi MOET.

*Recupero degli oociti immaturi.* Originariamente, il recupero degli oociti per la produzione embrionale in vitro veniva fatto da ovaie di animali da macello; solo successivamente la tecnica OPU è stata affiancata all'IVEP. Nella routine di laboratorio, comunque, per ridurre i tempi e i costi, si ricorre ancora oggi, più comunemente, ad ovaie di animali da macello.

Il recupero degli oociti immaturi può essere fatto in PBS Dulbecco oppure in TCM 199 (tamponato con hepes) e con diversi metodi quali la

dissezione follicolare, lo “slicing” (tagliuzzamento), la “Transillumination-aspiration ovary” (TAO) (Arav, 2001) e l’aspirazione follicolare. La dissezione follicolare permette di recuperare un considerevole numero di oociti e di identificare e scartare gli oociti dei follicoli atresici. Con lo slicing si ricavano sia le uova dei follicoli più superficiali che quelle dei follicoli più profondi non visibili sulla superficie dell’ovario; ne consegue che il numero di oociti recuperabili è maggiore ma la popolazione oocitaria risulta eterogenea. L’aspirazione follicolare invece, permette di reclutare le sole uova presenti nei follicoli più superficiali. La dissezione follicolare, lo slicing e la TAO permettono di ottenere il recupero di un maggiore numero di oociti rispetto all’aspirazione follicolare (Vajta et al., 1996; Mantovani et al. 1999). Nel caso però dei primi due metodi è richiesto più tempo rispetto all’aspirazione, essendo delle procedure meno pratiche, soprattutto quando si dispone di un elevato numero di ovaie; in questo caso, la vitalità degli oociti può essere compromessa. Per quanto riguarda la TAO i tempi di recupero non sono così lunghi e la tecnica permette di recuperare circa il 50% di oociti in più rispetto all’aspirazione, grazie alla diretta visualizzazione, tramite transilluminazione, dei follicoli corticali da aspirare. Tuttavia, la TAO non è ancora così diffusa e la metodica più frequentemente utilizzata attualmente risulta l’aspirazione perchè più pratica e più efficiente in termini

di rapporto n° oociti/tempo. In questo modo nella vacca si recuperano, mediamente da ciascun ovaio, 10 oociti di buona qualità.

Il metodo e le condizioni di recupero (terreni impiegati, temperatura, etc), le dimensioni dei follicoli aspirati, l'età degli animali (Yang et al., 1998), sono tutti fattori d'importanza fondamentale perchè in grado di condizionare le varie fasi della coltura in vitro successiva.

*Qualità degli oociti.* Dopo la fase di recupero, si passa alla selezione degli oociti di buona qualità. È stata stabilita nella vacca una precisa correlazione tra la morfologia dell'oocita e la sua competenza, intesa come capacità di essere fecondato e di svilupparsi fino allo stadio di blastocisti. È stato recentemente dimostrato che, oociti con cellule del cumulo meno compatte e più scure, producono più blastocisti che oociti con cellule del cumulo compatte e più chiare (Wurth et al., 1992). Dagli studi di Blondin et al. (1995) e Fukuda et al. (1993) la maturazione e la competenza allo sviluppo in vitro di oociti bovini con citoplasma eterogeneo è risultata superiore rispetto a quella di oociti con citoplasma omogeneo. Questo è stato ulteriormente confermato, nel 1999, da Nagano et al. che hanno osservato una maggiore capacità degli oociti con citoplasma eterogeneo ad andare incontro ad una normale fertilizzazione, per una ridotta incidenza di polispermia. Anche nella specie suina è stato dimostrato che la maggior

parte delle blastocisti prodotte in vitro derivano da oociti con citoplasma eterogeneo (Nagascima et al., 1996).

*Maturazione in vitro (IVM).* Ad opera di Hunter et al., nel 1972, per la prima volta, oociti bovini venivano maturati in vitro. Da allora, numerosi studi sono stati condotti con lo scopo di elucidare il meccanismo di quello che sembra essere un momento cruciale dell'IVEP. In vivo, la crescita della cellula uovo, all'interno del follicolo, è fortemente condizionata dalla presenza di ormoni quali l'FSH (ormone follicolo stimolante), l'LH (ormone luteinizzante) e l'estradiolo 17- $\beta$ . L'oocita va incontro ad una serie di modulazione di organelli e di inclusi cellulari, così come di trascrizioni genomiche, che sono indispensabili per il raggiungimento della sua competenza meiotica e, quindi, della capacità di sviluppo. Durante l'IVM, gli oociti devono disporre di un terreno di coltura che gli permetta di raggiungere la maturazione nucleare e citoplasmatica, considerando che, si aspirano, di norma, follicoli con un diametro compreso tra i 2 e gli 8 mm, quindi con oociti immaturi. Il terreno più comunemente usato è il TCM 199 (Tissue Culture Medium 199) supplementato con il 10% di siero fetale di vitello (FCS) che apporta proteine, fattori di crescita e previene l'indurimento della zona pellucida (ZP) che potrebbe ostacolare la fertilizzazione. Altri elementi che possono rientrare nella costituzione del

terreno di maturazione sono: l'FSH l'LH, l'estradiolo 17- $\beta$  ed alcuni fattori di crescita come, ad esempio, il fattore di crescita epidermale (EGF) (Majerus et al., 1999; Mermillod et al., 1993). L'EGF, addizionato al medium di coltura, permette di utilizzare per l'IVM anche oociti di animali giovani (3-4 mesi di età) che hanno una più bassa competenza allo sviluppo embrionale in vitro (Khatir et al., 1998) La durata della maturazione nel bovino varia tra le 20 e le 24 ore, al termine delle quali si ha l'estrusione del primo corpo polare e le uova sono pronte per essere fecondate. In condizioni ottimali di coltura più del 90% degli oociti raggiunge la metafase II. Come suggerito da Holm e Callesen (1998), la maturazione degli oociti in vitro è condizionata da specifiche condizioni fisiche dell'ambiente di coltura e da altre condizioni non ben definite. L'osmolarità (Yamauchi et al., 1999), la composizione ionica, la temperatura (Lenz et al., 1983), il pH, la CO<sub>2</sub> (Geshi et al., 1999), e la tensione di ossigeno, così come, il volume di coltura sono importanti parametri facenti parte della prima categoria, mentre il siero e le cellule somatiche sono esempi appartenenti alla seconda categoria (Gordon, 1994).

Risultati migliori, nella produzione embrionale in vitro del bovino, sono stati ottenuti con l'aggiunta di cisteamina, composto tiolico di basso peso molecolare, al terreno di maturazione. È stato infatti dimostrato che la

cisteamina migliora lo sviluppo e la quantità di embrioni bovini ed ovini incrementando la sintesi di glutathione (GSH) (De Matos et al., 1996; De Matos et al., 2000). Quest'ultimo, riveste un ruolo fondamentale nella protezione delle cellule dallo stress ossidativo, che rappresenta uno dei maggiori fattori che ostacolano lo sviluppo in vitro degli embrioni di mammifero. Anche nella specie bufalina è emerso che l'aggiunta di cisteamina alla concentrazione di 50 $\mu$ M (Gasparri et al., 2000) è in grado di migliorare significativamente l'efficienza dell'IVEP. L'aggiunta di siero, al medium IVM, se da un lato ha un effetto positivo sulle cellule in maturazione, dall'altro comporta una certa variabilità dei risultati, perchè non permette di avere un terreno di maturazione definito in tutti i suoi componenti. A questo proposito, sono stati sviluppati sistemi di IVM privi di siero (definiti) nel bovino (Saeki et al., 1991; e Watson et al., 2000) e nel suino (Abeydeera et al., 1998), ma, nonostante ciò, il siero è ancora un elemento ampiamente utilizzato durante la maturazione.

È generalmente accettato, dalla maggior parte degli autori, che le cellule del cumulo sono coinvolte nella maturazione citoplasmatica dell'oocita, così come nella formazione del pronucleo maschile, dopo la fecondazione, specialmente nel suino (Nagai et al., 1993), e nello sviluppo fino allo stadio di blastocisti, nel bovino (Hashimoto et al., 1998; Sirard et

al., 1988). Tuttavia, dagli studi di Geshi et al. (2000), è emersa la possibilità di ottenere dei nati, da un sistema IVEP, che vede la messa in maturazione degli oociti senza le cellule del cumulo e senza siero. Il ruolo, quindi, che le cellule del cumulo giocano durante la maturazione va ancora chiarito e approfondito con ulteriori studi.

Uno dei problemi che rimane irrisolto dell' IVEP e che è strettamente legato al grado di maturazione degli oociti, è caratterizzato dal fatto che, nonostante un'alta percentuale di oociti maturati in vitro si divide dopo l'IVF, solo un ristretto numero raggiunge lo stadio di blastocisti. Quanto detto è vero sia quando si usano oociti di ovaie di animali da macello, sia quando gli stessi derivano da OPU. C'è da tenere presente, che tra gli oociti immaturi collezionati, un certo numero, è fisiologicamente destinato ad andare incontro ad apoptosi (Hsueh et al., 1997). A tutt'oggi non c'è una reale conoscenza del fenomeno apoptotico oocitario e follicolare. Studi mirati ad una maggiore conoscenza del processo apoptotico, a questo livello, potrebbero fornire delle utili informazioni per migliorare l'IVM. Al fine di ottimizzare la maturazione in vitro degli oociti è anche importante ricordare che oggi, una considerevole quantità d'informazioni è disponibile sul ruolo di numerosi sistemi di trasduzione di segnale, durante la maturazione e la successiva attivazione degli oociti. A tale proposito ricordiamo l'AMPc

(Tornell et al., 1991; Conti et al., 1998), il  $\text{Ca}^{++}$  (Homa 1995), l'inositolo trifosfato (Carroll et al., 1996; Stricker, 1999) e il  $\text{PtdIns (3,4,5)P}_3$  (Anas et al., 1998; Carnero e Lacal, 1998). Inoltre, una vasta gamma d'informazioni riguardanti il controllo molecolare del ciclo cellulare è disponibile in numerosi lavori, soprattutto sulla cellula uovo (Parrish et al., 1992; Dekel, 1996; Whitaker, 1996; Sagata, 1997; Taieb et al., 1997; Winston, 2001). Dunque, l'applicazione unitaria di queste informazioni di base, riguardanti l'apoptosi, i segnali di trasduzione, e di regolazione del ciclo cellulare, potrebbe portare ad un miglioramento del sistema di IVM.

*Fecondazione in vitro (IVF.* Alla maturazione segue l'IVF, dove la sola co-incubazione dei due gameti, maschile e femminile, non è sufficiente affinché l'evento fecondante avvenga. È necessario infatti, indurre la capacitazione del seme e, intorno al 1980, diversi approcci sono stati tentati in questa direzione da numerosi scienziati. Agenti chimici e biologici quali l'alta forza ionica (Brackett et al 1982), il fluido follicolare bovino (Fukui et al 1983), l'eparina (Parrish et al., 1984) ed altri ancora sono stati testati. Il metodo d'elezione rimane, ancora oggi, l'impiego di eparina in presenza di  $\text{Ca}^{++}$  extracellulare. Inoltre, affinché si inneschi la capacitazione spermatica è necessario l'efflusso di colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo. A questo proposito, albumina sierica bovina (BSA) può essere

aggiunta con successo al terreno di fecondazione perchè funge da accettore di colesterolo. Si può utilizzare sia seme fresco che congelato, ed in quest'ultimo caso, è necessario isolare per la fertilizzazione solo gli spermatozoi vivi e mobili dopo scongelamento (Galli et al., 1996). Tra i metodi di separazione che si possono utilizzare ricordiamo lo swim-up e il metodo Percoll. Quest'ultimo, pur essendo più pratico del precedente è però meno selettivo, perchè non in grado di selezionare gli spermatozoi vivi mobili da quelli non mobili. A questo inconveniente si può facilmente ovviare aumentando il numero di spermatozoi da aggiungere al terreno IVF al momento della fecondazione. Il numero di spermatozoi da utilizzare è determinato empiricamente, testando diverse concentrazioni di seme e scegliendo quella che ha dato le percentuali più alte di fertilizzazione con il più basso grado di polispermia. Per migliorare la motilità e la capacità fecondante del seme si aggiungono al terreno di fertilizzazione penicillamina, ipotaurina ed epinefrina (PHE). La penicillamina, è in grado di aumentare la percentuale di spermatozoi che vanno incontro alla reazione acrosomiale quando usata in presenza di epinefrina. L'ipotaurina, aumenta la motilità spermatica ed, in combinazione con l'adrenalina, è responsabile di un aumento della percentuale di penetrazione oocitaria del seme. Il terreno più comunemente utilizzato per l'IVF è il "Tyrode's modified medium"

(TALP), con l'aggiunta di bicarbonato di sodio e substrati energetici. Un altro terreno utilizzato nell' IVF è l' mSOF (Synthetic Oviductal fluid). Lazzari et al (1999) hanno messo a confronto il TALP con il SOF ed è risultato che la qualità degli embrioni al giorno 7 era significativamente superiore per gli oociti che erano stati fecondati in SOF supplementato con aminoacidi essenziali (EAA) e non (NEAA), glutammina e glicina. La fecondazione si può considerare terminata dopo 18-20 ore dalla coincubazione dei due gameti.

Tra i fattori che possono condizionare l'IVF ricordiamo la competenza degli oociti, il tempismo nell'intervento fecondativo e il seme utilizzato. In quest' ultimo caso, ci sono tori che hanno delle migliori prestazioni rispetto ad altri e, una piccola parte (<5%) hanno delle performance veramente molto basse. Inoltre, quando si usa seme congelato/scongelato gli spermatozoi possono riportare danni all'acrosoma, perdita di enzimi e perdita di motilità. In futuro, nel tentativo d'incrementare l'IVF, un approccio utile potrebbe essere quello indirizzato alla standardizzazione delle procedure per la preparazione degli oociti alla fecondazione. Il fine è quello di avere una popolazione omogenea di oociti con cellule del cumulo, quanto più possibile, simili per numero e per distribuzione, tra gli oociti di una stessa replica e tra repliche diverse. Questo perchè la quantità di cellule del cumulo

è correlata alla concentrazione spermatica richiesta. Oociti con un minore numero di cellule del cumulo sono più suscettibili di polispermia, mentre quelli con un numero elevato sono più difficilmente fertilizzabili.

*Coltura in vitro (IVC).* L'ultimo step dell' IVEP è l'IVC degli zigoti fino allo stadio di blastocisti. Un punto di non facile risoluzione, nella prospettiva di migliorare sempre di più l'efficienza IVEP, è rappresentato proprio dal riconoscimento di un sistema capace di supportare lo sviluppo embrionale in vitro. Numerosi protocolli sono stati sviluppati ed applicati nel corso degli anni. Essi includono vari tipi di co-colture così come sistemi privi di cellule e anche procedure di coltura in vivo nell'ovidutto di pecora (Galli et al., 1996; Eyestone et al., 1987). In quest'ultimo caso, la qualità degli embrioni è comparabile a quella dei programmi MOET, specialmente quando si parla di embrioni congelati/scongelati prima del trasferimento in riceventi. Gli embrioni vengono coltivati in vitro fino a 48-72 ore dopo la fertilizzazione e poi sono trasferiti nell'ovidutto. La coltura in vivo richiede un esperto in chirurgia e delle strutture adeguate che, se pure giustificate dalla qualità degli embrioni che si ricavano, rendono comunque l'uso di ospiti intermedi una procedura poco pratica, soprattutto se la produzione embrionale è su larga scala. Naturalmente la via più pratica ed economica è quella di continuare la coltura in vitro degli zigoti dopo la fertilizzazione. È

con questo obiettivo in mente e tenendo presente gli effetti benefici della precedente coltura in vivo degli zigoti che, nel 1987, si giunse ad opera di Gandolfi et al. all'impiego dei sistemi di co-coltura. Monostrati di cellule oviduttali vennero impiegate per la prima volta con successo nell'IVC ovina e suina. È diventato più tardi evidente che non solo cellule oviduttali, ma anche altre linee cellulari come cellule di fegato di ratto bufalino (BRL) (Hasler et al., 1995) e cellule renali di scimmia (VERO) (Carnegie et al., 1997) sono capaci di fornire un'ambiente idoneo alla crescita dell'embrione.

L'introduzione delle co-culture di embrioni con cellule somatiche, è stata una tappa importante perchè ha permesso di superare il problema dell'arresto dello sviluppo embrionale bovino a 8-16 cellule (Eyestone et al., 1989). Tuttavia, questo sistema presenta diversi svantaggi perchè richiede la gestione di cellule soggette a variazioni biologiche ed implica l'uso di terreni complessi, come il TCM addizionato di siero, che non permettono ai ricercatori di avere un sistema di coltura definito che faciliti lo studio della fisiologia embrionale. Inoltre il siero sembra essere implicato nel determinismo di diverse anomalie embrionali, prima fra tutte la sindrome della macrosomia fetale o large-offspring syndrome (LOS).

Un evento importante, nel campo della produzione embrionale *in vitro*, è stato la formulazione del primo medium di coltura semi-definito, il

Synthetic Oviductal fluid (SOF) (Keskintepe et al., 1995; Tervit et al., 1972), che ha dato delle più alte percentuali di blastocisti ed embrioni morfologicamente migliori. Era ormai evidente che per migliorare il sistema di coltura in vitro, era necessario basarsi sulle caratteristiche dell'ambiente tubarico per formulare dei sistemi di coltura in vitro definiti. Il SOF originariamente basato sulle analisi biochimiche del fluido oviduttale ovino, è stato poi modificato con l'aggiunta di aminoacidi. Oggi sistemi totalmente definiti sono stati sviluppati sostituendo alla BSA del SOF altre macromolecole come il polivinilpirrolidone (PVP) (Keskintepe et al., 1996).

Recentemente, nel campo della produzione embrionale *in vitro* nell'uomo e nel bovino, sono nati dei sistemi di coltura con media sequenziali (Gardner e Lane, 1998). In questo modo è stato possibile adattare alcuni componenti del medium di coltura alle diverse fasi dello sviluppo embrionale, nel tentativo di assecondare le esigenze metaboliche embrionali che, verosimilmente, cambiano tra le prime fasi di divisione ed il raggiungimento dello stadio di blastocisti. All'orizzonte, c'è poi la possibilità d'impiego di nuovi sistemi di coltura, basati su principi di ingegneria meccanica dei microfluidi, che offrono degli enormi vantaggi ed embrioni qualitativamente migliori (Wheeler et al., 2004).

*Limiti e prospettive future dell'IVEP.* La sopravvivenza degli embrioni prodotti in vitro è influenzata da uno svariato numero di fattori, quali la composizione dei terreni impiegati (Thompson et al., 2000), l'atmosfera (Watson et al., 1994), la qualità degli oociti (Blondin et al., 1995; Sinclair et al., 2000) e lo stesso genotipo embrionale. Quest'ultimo dipende, a sua volta, dal genotipo paterno e materno (Hasler et al., 1995; Holm et al., 1998; Looney et al., 1994) ed è influenzato dal sesso (Avery et al., 1991; King et al., 1991; Xu et al., 1992). Lo sviluppo embrionale in vitro è oltremodo soggetto all'espressione di specifici alleli che caratterizzano lo sviluppo durante la coltura (Wu et al., 1998) e/o le capacità metaboliche dell'embrione (Niemann et al., 2000). Anche se, dal 1990 fino ad arrivare ai giorni nostri, numerose scoperte sono state fatte sulle necessità metaboliche degli embrioni, una chiara differenza di qualità rimane, ancora oggi, tra gli embrioni prodotti in vitro e quelli prodotti in vivo. È noto che tra le due categorie esistono diversità a livello cellulare, in termini di profilo metabolico, morfologico (Betteridge et al., 1988; Hyttel et al., 1989; Lindner et al., 1983; Plante et al., 1994; Shamsuddin et al., 1992) e dell'espressione genica.

È stato dimostrato che la crescita dei presunti zigoti in vitro, avviene con ritardo rispetto a quelli in vivo (Grisart et al., 1994; Hyttel et al., 1989),

particolarmente per gli zigoti di sesso femminile (Avery et al., 1991; Carvalho et al., 1996; King et al., 1991; Xu et al., 1992). Le morule prodotte in vitro presentano un minore grado di compattazione (Van Soom et al., 1992), un aspetto granuloso ed un ridotto spazio perivitellino (Van Soom et al., 1992). Le blastocisti coltivate in presenza di siero appaiono più scure e posseggono più granuli e gocce lipidiche. L'accumulo dei lipidi è probabilmente imputabile ad un'insufficiente funzione mitocondriale. Sembra, infatti, che l'attività mitocondriale sia parzialmente compromessa negli embrioni IVP. Oltretutto, poichè la funzione mitocondriale è di fondamentale importanza per lo sviluppo embrionale, è possibile che le più basse percentuali di gravidanza, che si hanno con embrioni IVP, siano dovute ad alterazioni a carico di tali organuli.

Le gravidanze che attecchiscono dopo trasferimento di embrioni prodotti in vitro oscillano dal 40 al 75% in base al sistema di coltura, al congelamento degli embrioni o meno prima del trasferimento, al numero degli embrioni trasferiti per ricevente e alla loro qualità (Hasler, 2000; Hasler et al., 1995; Looney et al., 1994; Thompson et al., 1998; Van Wagendonk-de Leeuw et al., 2000). Embrioni IVP hanno una minore resistenza al congelamento/scongelo rispetto quelli prodotti in vivo e le percentuali di gravidanza dopo trasferimento di questi embrioni sono

inferiori (Hasler et al., 1995; Looney et al., 1994). Al giorno 17 di gravidanza Farin et al. (1999) hanno osservato che circa il 19% degli embrioni IVP era degenerato, mentre nessun embrione presentava degenerazione nel gruppo di controllo prodotto in vivo. In molti studi effettuati, gli aborti durante il periodo fetale (da 42 a 280 giorni di gestazione) e a media e tarda gestazione sono risultati superiori dopo il trasferimento di embrioni IVP (Agca et al., 1998; Hasler et al., 2000; Hasler et al., 1995; Thompson et al., 1998; Van Wagtendonk-de Leeuw et al., 2000). Inoltre, una variabile ma significativa percentuale di feti, vitelli e agnelli, derivanti da embrioni prodotti in coltura presentano delle peculiari anomalie di sviluppo che prendono il nome di LOS (Behboodi et al., 1995; Farin et al., 1999; Farin et al., 1995; Kruip et al., 1997; McEvoy et al., 1998; Sinclair et al., 1995; Van Wagtendonk-de Leeuw et al., 1998; 2000; Walker et al., 1996).

Le anomalie più frequentemente riportate, associate alla LOS, includono un peso maggiore dei vitelli alla nascita, mortalità intorno al periodo perinatale, idroallantoide e aborti. I feti di dimensioni più grandi sono responsabili, a loro volta, di un aumento nell'incidenza di distocie e di morte perinatale. Alcuni autori considerano l'aggiunta del siero nel medium e l'uso delle co-culture cellulari le principali cause della LOS (Sinclair et al.,

1999; Thompson et al., 1995). L'uso del siero nel terreno di coltura, rimane una questione fortemente dibattuta tra gli scienziati. Non è chiaro se escludendo il siero dall'IVC si possa eliminare completamente la comparsa della LOS (McEvoy et al., 1999; Sinclair et al., 1999; Thompson et al., 1995; McMillan et al., 1999; Van Wagtendonk-de Leeuw et al., 2000). Ad ogni modo, è evidente che la minore vitalità degli embrioni IVP e, conseguentemente, la peggiore resistenza al congelamento degli stessi, l'elevata incidenza di riassorbimenti embrionali e morte fetale, le anomalie che si osservano nelle diverse fasi dello sviluppo sono imputabili a condizioni subottimali di coltura in vitro.

In vivo, lo sviluppo dell'embrione avviene nell'ovidutto. L'ambiente tubarico provvede al trasporto del gamete maschile e femminile e allo sviluppo embrionale precoce. L'ovidutto interagisce in maniera dinamica con l'embrione, provvedendo, di volta in volta, alle differenti necessità metaboliche che caratterizzano la sua crescita. Numerose ricerche effettuate sulla fisiologia oviduttale dei mammiferi, hanno fornito evidenze inconfutabili dell'importanza di questo tratto dell'apparato genitale femminile, e del fluido contenuto in esso, nel corso della riproduzione.

Abbiamo precedentemente visto, gli effetti benefici dell' ovidutto sugli zigoti dell'IVF coltivati in vivo, e la necessità oggi di sistemi di coltura

definiti per agevolare la produzione embrionale su larga scala. Nella prospettiva, quindi, di migliorare sempre di più l'IVEP, è indispensabile la formulazione di sistemi definiti di coltura in vitro che mimino l'ambiente tubarico. Affinchè questo avvenga è di fondamentale importanza lo studio e la comprensione degli eventi della riproduzione in vivo e del suo ambiente.

## **1.2 Ovidutto**

*Anatomia dell'ovidutto.* L'ovidutto (o tuba uterina o salpinge o tromba di falloppio) dei mammiferi è un condottino che, da ciascun lato, va dal polo anteriore dell'ovario al corrispondente corno uterino. Esso assicura la discesa dell'uovo fecondato in utero, e per quanto riguarda il gamete maschile, la sua risalita dall'utero verso il luogo della fecondazione.

Procedendo dall'ovario verso l'utero, nella tuba si distinguono tre regioni in base al diametro ed alla struttura interna (Weeth and Herman, 1952): infundibolare, ampollare ed istmica. La regione infundibolare o padiglione, include la fimbria e si apre verso l'ovario con l'estremità slargata ad imbuto mentre con quella più stretta si continua nella porzione ampollare (A). Quest'ultima è la regione più sviluppata della tuba ed in caso di accoppiamento fertile è qui che ha luogo la fecondazione delle uova. In

prossimità dell'utero, la tuba si assottiglia rapidamente; questa parte costituisce l'istmo (I).

*Interazione dei gameti con l'ovidutto.* Nell'ovidutto dei mammiferi hanno luogo la capacitazione spermatica, la reazione acrosomiale, la fertilizzazione e lo sviluppo embrionale precoce. L'ovidutto ed il suo fluido forniscono inoltre un ambiente ideale per il trasporto e la sopravvivenza dei gameti stessi. Entrambi i gameti maschile e femminile entrano in contatto con l'epitelio oviduttale. L'ocita interagisce con l'ovidutto, durante il trasporto dall'ovaio al sito della fertilizzazione e, da qui, fino alla giunzione utero-tubarica. El-Banna e Hafez (1970) hanno visto che l'ocita impiega circa 8-10 ore per raggiungere la giunzione istmica-ampollare dell'ovidutto. A questo punto il trasporto dell'ocita si arresta temporaneamente permettendo alla fertilizzazione di aver luogo.

La velocità di trasporto dell'ocita attraverso la regione istmica è ridotta rispetto al resto dell'ovidutto. Questo ritardo nell'istmo potrebbe essere necessario per il conseguente impianto dell'embrione in utero (Hafez, 1987). Il metodo di trasporto dell'ocita attraverso la regione ampollare non è stato ancora del tutto chiarito (Ellington, 1991). L'attività delle cellule ciliate dell'ovidutto sembra essere importante a questo riguardo perchè, al momento dell'ovulazione, il flusso del fluido oviduttale e le contrazioni

muscolari si muovono in direzione opposta rispetto a quella del trasporto dell'oocita (Stone and Hamner, 1975). Le cellule del cumulo che circondano l'oocita forniscono una larga superficie di contatto con le ciglia. Lorton and First (1979) hanno riportato che gli oociti bovini non posseggono più cellule del cumulo appena dopo l'ovulazione e, che per questo, non risulterebbero implicate nel trasporto dell'oocita. Tuttavia, in uno studio successivo, è stato osservato che gli oociti bovini si denudano solamente 9-14 ore dopo l'ovulazione, suggerendo che, quindi, le cellule del cumulo sono presenti durante il trasporto del gamete femminile attraverso l'ampolla, e possono migliorare il concepimento (Harper, 1988).

Il gamete maschile potrebbe apparire a livello oviduttale dopo pochi minuti dalla deposizione, ma sembra ormai certo che i primi spermatozoi ad arrivare non sono capaci di fecondare (VanDemark and Hays, 1954; Hunter and Wilmut, 1983). Invece, gli spermatozoi che sostano nell'istmo per più di 20 ore prima della fecondazione acquisiscono la capacità fecondante (Hunter 1986). Molti spermatozoi aderiscono alla mucosa del basso istmo (Smith and yanagimachi, 1990). È probabile che una lectina sulla superficie dello spermatozoo si lega all'epitelio e, durante la capacitazione, la stessa si modifica, o viene rimossa dalla superficie spermatica, favorendo il rilascio del gamete maschile nel lume oviduttale (Lefebvre et al., 1997). Questo

sequestro nell'istmo servirebbe ad estendere la durata della sopravvivenza dello spermatozoo (Pollard et al., 1991). Smith e Yanagimachi (1989) suggeriscono che l'istmo potrebbe ritardare la capacitazione spermatica fino a poco prima dell'ovulazione in modo da sincronizzare lo stato fisiologico di entrambi i gameti per garantire il successo della fecondazione. Recentemente, Murray and Smith (1997) hanno visto che il contatto diretto dello spermatozoo con la membrana plasmatica apicale delle cellule oviduttali porta al mantenimento di basse concentrazioni del calcio intracellulare; meccanismo quest'ultimo, verosimilmente responsabile del ritardo nella capacitazione e nella reazione acrosomiale spermatica.

In breve, il processo di capacitazione spermatica, inizia con un efflusso di colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo e prosegue con 1) una iperpolarizzazione di membrana, 2) un aumento della fluidità di membrana, 3) un aumento del flusso ionico di  $\text{Ca}^{++}$  e bicarbonato. L'entrata di  $\text{Ca}^{++}$  induce la formazione di una riserva endogena a livello dell'acrosoma, dei mitocondri e forse del nucleo. Inoltre, l'iperpolarizzazione della membrana e l'aumento del flusso di ioni  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{HCO}_3^-$ , innescano una reazione a catena che porta all'iperattivazione del flagello. In questo modo lo spermatozoo è pronto ad attraversare le cellule del cumulo per incontrare la zona pellucida dell'ocita. Quindi l'aumento di

$\text{Ca}^{++}$  intracellulare è alla base del processo di capacitazione così come della successiva reazione acrosomiale. Da questo momento in poi, infatti, inizia la cascata degli eventi caratterizzanti la reazione acrosomiale. Lo spermatozoo si lega con le glicoproteine ZP dell'ocita e questo provoca, da un lato, l'attivazione dell'adenilato ciclastasi con produzione di AMPc, dall'altro, l'attivazione della fosfolipasi C (PLC). A questo punto segue il rilascio di  $\text{Ca}^{++}$  acrosomiale, che attiva i SOCC (store operated calcium channels) e comporta l'entrata di calcio per riempire le riserve endogene. L'innalzamento del  $\text{Ca}^{++}$  intracellulare porta all'esocitosi della vescicola acrosomiale e alla fusione dei due gameti.

Dunque, poichè l'ovidutto dei mammiferi è il luogo della capacitazione spermatica, della fertilizzazione e dello sviluppo embrionale precoce, le componenti del fluido oviduttale contenute in esso verosimilmente influenzano questi eventi.

### **1.3 Fluido oviduttale (ODF)**

*Prelievo dell'ODF.* La raccolta del fluido oviduttale a scopo sperimentale può essere eseguita secondo diversi metodi. Tra questi ricordiamo la procedura di flushing e stripping del tratto genitale (Olds and VanDemark, 1957; Heap, 1962) e la legatura di specifiche regioni dell'ovidutto (David et al., 1969). Comunque, il metodo d'elezione utilizzato ancora oggi è quello

della cannulazione tubarica. Clewe e Mastroianni hanno sviluppato nel 1960, con la cannulazione dell'ovidutto, un metodo che permette il prelievo continuo dell'ODF. La loro tecnica, ideata per il coniglio, è stata presto adattata alla pecora (Restall, 1966), al cavallo (Engle et al., 1970) ed al bovino (Carlson et al., 1970). La procedura chirurgica per la cannulazione della tuba nel bovino è stata, inoltre, modificata affinché si potesse ottenere separatamente il recupero del fluido ampollare ed istmico della stessa tuba (Kavanaugh et al., 1992). Lo sviluppo di questa tecnica ha reso possibile il prelievo giornaliero dell'ODF e l'indagine biochimica dello stesso durante la progressione del ciclo riproduttivo dell'animale. Esami anatomici ed istologici di ovidutti cannulati hanno inoltre dimostrato che la cannulazione non danneggia l'ovidutto (Perkins et al., 1965).

*Funzioni dell'ODF.* Sono stati pubblicati diversi lavori che offrono una visione collettiva delle funzioni dell'ovidutto e delle componenti trovate nelle sue secrezioni (Bavister, 1988; Leese, 1988; Nancarrow and Hill, 1994; Buhi, 2000). McNutt e Killian nel 1991 (McNutt e Killian, 1991) hanno dimostrato che il seme bovino si capacita più rapidamente nel fluido oviduttale non luteale (NL) rispetto a quello luteale (L) e che il fluido oviduttale sostiene la motilità spermatica.

Nel 1995, ad opera di Grippo et al., sono state valutate la motilità, la capacitazione e l'abilità fecondante del seme eiaculato di toro previamente incubato in presenza di ODF ampollare ed istmico luteale (ODF-AL/IL) e ODF ampollare ed istmico non luteale (ODF-ANL/INL). E' stato visto che l'ODF-INL sopprime la motilità spermatica dando supporto all'ipotesi che l'istmo ha, tra le altre funzioni, quella di mantenere gli spermatozoi in uno stato quiescente (Grippo et al., 1995). Inoltre il numero di spermatozoi che è stato in grado di andare incontro alla reazione acrosomiale, dopo induzione della stessa con lisofosfatidilcolina, è risultato superiore in questo gruppo rispetto gli spermatozoi incubati in ODF-ANL (Topper et al., 1999). Quanto detto conferma l'ipotesi che l'istmo è anche il luogo d'elezione per la capacitazione spermatica. Inoltre Grippo et al. hanno osservato che un maggior numero di spermatozoi è in grado di legarsi all'oocita quando il seme è previamente incubato in fluido oviduttale istmico rispetto a quello oviduttale ampollare. Gli spermatozoi incubati, invece, in ODF-ANL hanno dato percentuali di fertilizzazione più alte rispetto a quelli incubati in ODF-INL. Questo porta a pensare che a livello ampollare gli spermatozoi vengono preparati a penetrare la cellula uovo.

Nel 1997 Way et al. hanno riproposto *in vitro*, la naturale sequenza di esposizione *in vivo* al fluido oviduttale dei gameti prima della fecondazione:

gli oociti sono stati prima esposti al fluido oviduttale ANL e poi a quello INL, mentre gli spermatozoi sono stati prima incubati in ODF-INL e poi in ODF-ANL. In vivo infatti, l'oocita incontra prima le secrezioni ampollari mentre gli spermatozoi sono prima esposti alle secrezioni dell'istmo. Mimando *in vitro* la naturale successione degli eventi *in vivo*, Way et al. hanno ottenuto una riduzione del numero di spermatozoi che si legava all'oocita ed un aumento nelle percentuali di fertilizzazione. Il minor numero di spermatozoi capace di legare l'oocita, pertanto, potrebbe avere la funzione di ridurre l'incidenza di polispermia.

*Composizione dell'ODF.* L'ODF è un fluido dinamico costituito in parte da siero trasudato che dal lume vascolare oviduttale passa all'interno della tuba (Shapiro et al., 1971), e in parte dai prodotti di secrezione dell'epitelio oviduttale (Roberts et al., 1975; Fazleabas and Verhage, 1986; Verhage et al., 1988; Gerena and Killian, 1990).

Sebbene la maggior parte delle proteine che si ritrovano nell'ODF siano rappresentate dalle proteine del siero, primariamente dall'albumina e dalle immunoglobuline (Shapiro et al., 1971; Leese, 1988), il contenuto proteico totale dell'ODF è pari solamente al 5-10% di quello presente nel siero. Questo suggerisce che il passaggio delle proteine del siero nell'ODF è selettivo (Leese, 1988). L'ODF può essere diviso, in base ai livelli di

progesterone nel sangue, durante il ciclo estrale (Killian et al., 1989), in luteale (L; progesterone nel sangue > 1.5 ng/ml) e non luteale (NL; progesterone nel sangue < 1.5 ng/ml). Diversi cambiamenti avvengono nell'ODF durante il ciclo estrale. La sua stessa produzione può arrivare ad essere 10 volte maggiore durante l'estro rispetto alla fase luteinica (Gerena and Killian, 1990). La quantità totale di ODF varia da un bovino all'altro e tra cicli diversi dello stesso bovino (Carlson et al., 1970; Roberts et al., 1975; Killian et al., 1989; Gerena and Killian 1990).

L'isolamento e l'identificazione, dunque, dei costituenti del fluido oviduttale sono essenziali per elucidare il loro ruolo durante le varie fasi del processo riproduttivo.

## **Lipidi**

Sembra che i lipidi presenti nel fluido oviduttale siano coinvolti positivamente nella capacitazione spermatica, nella fertilizzazione e nello sviluppo embrionale precoce. È noto che il contenuto lipidico può influenzare il comportamento delle membrane cellulari e, poichè gli eventi della riproduzione poch'anzi citati sono il risultato di fusioni di membrane, riarrangiamenti e cambiamenti di composizione, l'ambiente lipidico oviduttale potrebbe avere un ruolo chiave nel successo del processo

riproduttivo (Henault and Killian, 1993). Durante la fase non luteinica del ciclo, l'ambiente oviduttale cambia rispetto alla fase luteinica. La quantità di colesterolo diventa più bassa e quella dei fosfolipidi s'innalza (Grippo et al., 1994). Questo cambiamento nel rapporto colesterolo/fosfolipidi è possibile influenzi positivamente la capacitazione spermatica (Davis et al., 1979). Ehrenwald et al. (1990) hanno riscontrato nel bovino alte concentrazioni di lipoproteine ad elevato peso molecolare (HDL) nel fluido oviduttale della fase estrale, favorenti l'efflusso di colesterolo dalla membrana plasmatica degli spermatozoi. Questo potrebbe rappresentare un primo possibile passo verso la capacitazione.

Henault e Killian (1993) ritengono che gli alti livelli di colesterolo nella regione istmica sarebbero in grado di assicurare la stabilità della membrana plasmatica dello spermatozoo, ed essere fonte di energia quando lo spermatozoo sosta nell'istmo durante il periodo che precede la capacitazione e la fertilizzazione. Inoltre è stato dimostrato che il colesterolo agisce direttamente sulla funzione di alcune proteine di membrana. Regola, ad esempio, i trasportatori ionici associati alle membrane che giocherebbero un importante ruolo nei cambiamenti ionici che avvengono sul gamete maschile durante la capacitazione e la reazione acrosomiale (Shouffani and Kanner, 1990).

Nel fluido oviduttale prelevato durante i giorni dell'ovulazione, si riscontrano più alte concentrazioni di lisofosfatidilcolina (Grippe et al., 1994). Questo lipide induce la reazione acrosomiale del seme bovino *in vitro* (Parrish et al., 1988) influenzando i gradienti ionici della membrana plasmatica e inducendo la depolarizzazione (Calzada et al., 1991).

I lipidi presenti nell'ovidutto potrebbero giocare un importante ruolo durante lo sviluppo embrionale precoce. *In vitro*, gli acidi grassi sono essenziali per la sopravvivenza degli embrioni di coniglio (Kane, 1979) e di topo (Quinn and Whittingham, 1982). I lipidi dell'ambiente tubarico potrebbero garantire i substrati necessari agli embrioni per sintetizzare alcuni costituenti delle membrane cellulari, come fosfolipidi (Pratt, 1980) e steroli (Pratt, 1982).

### **Composizione ionica**

La composizione ionica dell'ODF potrebbe essere importante per gli eventi che si susseguono durante la fertilizzazione. La concentrazione del Potassio nel fluido oviduttale bovino è maggiore rispetto a quella del siero ematico. La quantità di Sodio e Magnesio nell'ODF è simile a quella che si riscontra nel siero (Borland et al., 1980). Le concentrazioni di Calcio e Magnesio riscontrate nel fluido oviduttale durante la fase non luteinica del ciclo sono

rispettivamente maggiore e minore a quelle riscontrate durante la fase luteinica (Grippo et al., 1992). Il Calcio extracellulare potrebbe giocare un ruolo fondamentale nella reazione acrosomiale. La quantità di Calcio e Magnesio presente nell'ODF sarebbe simile a quella utilizzata *in vitro* per promuovere la capacitazione spermatica e la reazione acrosomiale (Handrow et al., 1989). Un innalzamento del Potassio nei terreni di coltura *in vitro* provoca la depolarizzazione degli spermatozoi bovini (Florman et al., 1992) e ovini (Babcock and Pfeiffer, 1987).

### **Proteine**

Negli ultimi anni studi condotti sulle secrezioni dell'ovidutto hanno portato all'identificazione di proteine specifiche di questo tratto che sono capaci di legame con il gamete maschile, femminile e con gli embrioni. Nonostante la loro funzione non sia stata ancora del tutto chiarita si ipotizza che queste proteine giochino un ruolo importante nel corso del processo riproduttivo.

*Albumina sierica bovina (BSA)*. Abbiamo già visto che le proteine del siero rappresentano la maggior parte delle proteine presenti nell'ODF (Leese, 1988). La BSA, a questo proposito, è sicuramente la proteina più abbondante. Essa rappresenta nell'uomo circa il 34% del contenuto proteico totale dell'ODF collezionato intorno al periodo dell'ovulazione (Lippes et

al., 1981). Attraverso l'uso dell'SDS-PAGE e Western blot Staros e Killian hanno identificato la BSA come una proteina del fluido oviduttale di 74 KDa.

La BSA potrebbe essere di rilevante importanza durante la capacitazione perchè in grado di rimuovere il colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo (Davis et al., 1979; Suzuki and Yanagimachi, 1989; Cross 1998). L'allontanamento del colesterolo innescherebbe il processo della capacitazione. Eckert e Niemann (1995) hanno dimostrato che nel bovino l'assenza di BSA nel terreno di maturazione e fecondazione *in vitro* ritarda la formazione dei pronuclei e che, quindi, la proteina è necessaria per il regolare svolgersi dell' IVF. In un'altra ricerca si è visto che il seme di ariete può essere capacitato *in vitro* anche in assenza di BSA ma la velocità di capacitazione però, risulta minore (Uto and Yamahama, 1996). Nel gatto l'aggiunta di BSA al terreno di fecondazione ha dato delle percentuali più alte di fertilizzazione rispetto al gruppo di controllo privo della proteina (Johnston et al., 1991).

Le rimanenti proteine dell'ODF sono secrete dall'epitelio oviduttale. Alcune proteine specifiche dell'ovidutto sono state identificate in diverse specie: nella pecora (Sutton et al., 1984), nel bovino (Roberts et al., 1975; Gerena and Killian, 1990), nel coniglio (Barr and Oliphant, 1981), nel

babbuino (Fazleabas and Verhage,1986) e nell'uomo (Lippes et al., 1981; Verhage et al., 1988).

*bOP-40*. Tra le proteine d'interesse che sono state recentemente identificate nel fluido oviduttale bovino ricordiamo una proteina di 40 KDa (bOP-40) che, però, non è specifica dell'ovidutto (Way et al., 1997; 1998). Essa è presente nel fluido oviduttale ampollare ed istmico ed appare in più alte concentrazioni durante la fase luteinica del ciclo rispetto a quella non luteinica (Way et al., 1998). Studi di immunocitochimica hanno reso possibile la localizzazione della proteina a livello della sottomucosa della tuba e dell'utero, ma non è ancora ben chiaro se questi tessuti sintetizzano bOP-40 accanto ad un trasporto selettivo della stessa dal siero nel fluido oviduttale.

*Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS)*. Un'altra glicoproteina identificata è la L-PGDS, enzima che catalizza l'isomerizzazione della PGH<sub>2</sub> in PGD<sub>2</sub>. Da studi precedenti, la proteina è risultata essere presente in elevate quantità a livello cerebrale e negli organi genitali maschili (Ujihara et al., 1988). Delucidazioni sulla sua struttura primaria l'hanno resa classificabile come facente parte della superfamiglia delle lipocaline. Le lipocaline sono una famiglia di diverse proteine extracellulari di trasporto (come la proteina legante il retinolo, la

lactoglobulina e la proteina secretoria epididimale) che dimostrano avere un'alta affinità di legame per piccoli ligandi idrofobici e specifici recettori cellulari (Nagata et al., 1991). La L-PGDS è stata recentemente identificata come una proteina associata alla fertilità, di 26 kDa, presente nel plasma seminale bovino in quantità maggiore in tori di fertilità superiore alla media rispetto a quelli di media e bassa fertilità (Gerena et al., 1998).

Il ruolo biologico della L-PGDS nella riproduzione maschile è ancora sconosciuto. Anche se nel plasma seminale sono state riscontrate solo piccole quantità di PGD<sub>2</sub>, una correlazione positiva è stata comunque dimostrata tra le concentrazioni di PGDS e PGD<sub>2</sub> (Tanaka et al., 1997). Oltre che nel plasma seminale, la L-PGDS è presente anche nel fluido oviduttale bovino. Staros (1999) ha identificato la L-PGDS, attraverso l'uso dell'SDS-PAGE e Western blot come una proteina del fluido oviduttale di 23 kDa. Fatta eccezione per il bovino non ci sono altri lavori che testimonino la presenza della proteina nel tratto riproduttivo femminile di altre specie animali.

*Osteopontina (OPN)*. La terza proteina dell'ODF che ricordiamo è l'OPN. L'OPN è presente sia nell' ODF che nell'epitelio oviduttale (Gabler et al., 2003). È una glicoproteina acida di secrezione con un dominio di legame cellulare composto da GRGDS, glicina-arginina-glicina-aspartato-

serina (Oldberg et al., 1986; Wrana et al., 1989). Questo dominio è presente anche in un'ampia varietà di proteine extracellulari che legano membri della famiglia delle integrine presenti sui recettori cellulari di superficie (Hynes, 1992). L'OPN lega inoltre i componenti della matrice extracellulare (idrossiapatite) probabilmente attraverso legami non ancora ben caratterizzati.

Anche se è stato generalmente accettato che l'OPN si lega primariamente agli eterodimeri integrinici  $\alpha\nu\beta3$ , sono stati recentemente identificati altri recettori e sequenze di legame capaci di legare l'OPN. Tra questi ricordiamo le integrine  $\alpha\nu\beta1$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha8\beta1$  (Hu et al., 1995) e varie isoforme di CD44 (CD44v3-v6). L'interazione dell'OPN con i domini CD44 di superficie cellulare gioca un importante ruolo negli eventi dell'adesione cellulare, della trasduzione di segnali, migrazione delle cellule e attività anti-apoptotica (Weber et al., 1996). Essa presenta inoltre un sito di legame per il calcio e due domini di legame per l'eparina. È stata descritta come una fosfoproteina specifica di trasformazione, come una proteina della matrice mineralizzata extracellulare delle ossa e dei denti (Franzen et al., 1985; Prince et al., 1987) capace di fare da ponte tra le cellule e l'idrossiapatite (Oldberg et al., 1986) ed infine come citochina, prodotta dai linfociti attivati e dai macrofagi (Patarca et al., 1993).

Inizialmente era stata isolata dalla matrice ossea mineralizzata delle diafisi bovine (Frazen and Heinegard 1985). Il nome “osteopontina” infatti riflette la capacità della proteina a fare da ponte tra le cellule e l'idrossiapatite. In seguito è stata identificata anche sulle cellule epiteliali e nelle secrezioni del tratto gastrointestinale, reni, tiroide, ghiandola mammaria, ovario e testicoli (Johnson et al., 1999; Senger et al., 1989; Brown et al., 1992; Kohri et al., 1993; Daiter et al., 1996; Luedtke et al., 2002). L'OPN è anche espressa dai leucociti, dalle cellule della muscolatura liscia e cellule tumorali altamente metastatiche (Ashkar et al. 2000; Malyankar et al. 2000; Hotte et al. 2002). La sua presenza, quindi, è risultata essere ampiamente ubiquitaria: è inoltre presente anche in una varietà di fluidi come il sangue (Bautista et al. 1996), il latte (Senger et al., 1989), le urine (Shiraga et al., 1992; Khori et al., 1993) e il fluido seminale (Cancel et al., 1997). In generale, l'OPN è un monomero che varia in lunghezza da 264 a 301 aminoacidi e soggiace a numerose modificazioni post-trasduzionali incluse fosforilazione e glicosilazione che portano a delle variazioni della massa molecolare da 25 a 75 KDa. Il risultato è quello di una proteina altamente versatile, con multiple funzioni.

È noto che l'OPN ha 1) un ruolo nell'adesione cellulare, 2) interviene nella comunicazione tra cellule e ECM (matrice extracellulare), 3) promuove

la migrazione delle cellule del sistema immunitario, degli osteociti e delle cellule tumorali, 4) stimola la produzione di immunoglobuline da parte dei linfociti B, 5) altera i livelli intracellulari di calcio, 6) interviene nella mineralizzazione dei tessuti e promuove la deposizione di fosfati di calcio nelle ossa (Miyachi et al., 1991; Flores et al., 1992; Singh et al., 1990; Weber et al., 1996; McKee et al., 1995; Goldberg et al., 1995). Inoltre le interleuchine (IL) 1 $\alpha$  e  $\beta$ , il transforming growth factor  $\beta$ -1, il fibroblastic growth factor, il tumor necrosis factor  $\alpha$ , l'interferone (IFN)  $\gamma$ , gli estrogeni, il progesterone, i glucocorticoidi, e la 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamina D3 aumentano la sintesi di OPN (Rittling et al., 1997; Mukherjee et al., 1995; Singh et al., 1995; Craig et al., 1991; Omigbodun et al., 1997; Safran et al., 1998).

La sequenza aminoacidica GRGDS interagisce con i recettori integrinici di superficie cellulare e media la funzione immunitaria, di adesione cellulare, migrazione, differenziazione e sopravvivenza della proteina (Miyachi et al., 1991; Hynes et al., 1992; Albelda et al., 1990; Ruoslahti et al., 1994; Ross et al., 1993). L'OPN è stata descritta da Cantor e colleghi (Patarca et al., 1993) come Eta1 (early T cell activation gene 1) perchè veniva espressa subito dopo l'attivazione non specifica dei linfociti, inclusi i linfociti T. Questi ultimi poi, insieme ai macrofagi, verrebbero reclutati con azione chemiotattica dall'OPN nei siti d'infiammazione (Singh

et al., 1990). L'OPN quindi, contribuirebbe alla difesa immunitaria dell'organismo. A questo proposito inoltre, l'ubiquitaria diffusione dell'OPN sulla superficie di molti epitelii comunicanti con l'ambiente esterno, potrebbe essere spiegata con un possibile ruolo protettivo della stessa durante l'interazione tra la superficie di questi epitelii e l'ambiente esterno. A testimonianza di quanto detto è stato riportato che alcune linee batteriche legano *in vitro* i siti recettoriali integrinici di cellule simil-epiteliali per poi invaderle (Isberg and leong, 1990; Falkow, 1991; Isberg, 1991). Dunque, l'OPN potrebbe preservare gli epitelii dall'invasione batterica attraverso un meccanismo di competizione recettoriale. Inoltre è stata descritta anche come un fattore di sopravvivenza cellulare in quanto capace di prevenire l'apoptosi delle cellule endoteliali attivando il NFkB (the pro-survival transcription factor) (Scatena et al., 1998). Il legame, infatti, della proteina ai recettori integrinici  $\alpha\beta3$  delle cellule endoteliali attiva il NFkB, proteggendo le cellule dall'andare incontro all'apoptosi (Scatena et al., 1998).

L'abbondante presenza dell'OPN nella matrice ossea e la regolazione della sua espressione da parte di ormoni osteotrofici hanno fatto sì che l'attenzione di molti ricercatori si focalizzasse sul ruolo della proteina durante lo sviluppo e nel rimodellamento osseo (Prince and Butler, 1987;

Yoon et al., 1987; Kubota et al., 1989; Noda et al., 1990; Reinholt et al., 1990; Chen et al., 1991; Moore et al., 1991).

L'OPN sembra essere intimamente coinvolta nella regolazione della mineralizzazione sia fisiologica che patologica. Essa è espressa sia dagli osteoclasti che dagli osteoblasti che sono le cellule responsabili del rimodellamento osseo, ed è quindi considerata importante sia durante la mineralizzazione che durante il riassorbimento della matrice ossea (Reinholt et al., 1990; Weinreb et al., 1990; Flores et al., 1992; Sodek et al., 1992; Tezuka et al., 1992; Chen et al., 1993). La sua distribuzione è limitata a specifiche regioni della matrice extracellulare (ECM) e cioè a livello delle linee cementanti dove l'OPN potrebbe garantire l'ancoraggio degli osteoclasti e promuovere il riassorbimento della matrice, così come permettere l'ancoraggio degli osteoblasti e quindi guidare gli eventi della calcificazione precoce.

Fino ad oggi poco è stato riportato sulla presenza dell'OPN nei tessuti riproduttivi. Killian et al. (1993) e Cancel et al., (1997), hanno dimostrato, con l'uso di anticorpi specifici, che una delle proteine del plasma seminale bovino, associata alla fertilità, in particolare quella di 55KDa è risultata essere proprio l'OPN. Inoltre, poichè il plasma seminale bovino è l'insieme delle secrezioni provenienti dalle ghiandole sessuali accessorie,

dall'epididimo e dalla rete testis, ulteriori studi sono stati condotti su queste secrezioni per meglio individuare la provenienza della proteina in questione. Ciò ha portato all'identificazione dell'OPN nelle ghiandole sessuali accessorie (Cancel et al., 1999). Lo stesso gruppo di ricercatori non è riuscito, invece, ad identificare l'OPN a livello dell'epididimo e della rete testis in accordo con quanto riportato da Yoon et al. (1987) nel ratto e Craig e Denhardt (1991) nel topo. I risultati riportati da Cancel et al. (1999), da Yoon et al. (1987) e da Craig e Denhardt (1991) però, contrastano con gli studi di Siiteri et al. (1995) che hanno dimostrato la presenza di OPN e del suo RNAm nella rete testis e nell'epididimo di ratto. Brown et al. (1992) hanno riscontrato la proteina nelle cellule epiteliali della prostata e della rete testis dell'uomo. L'OPN è stata anche identificata nell'epitelio dell'ampolla e delle vescicole seminali di tori Holstein (Cancel et al., 1999), sulle cellule del Sertoli, sull'epitelio dei tubuli seminiferi, sulla membrana plasmatica della coda e della testa dello spermatozoo (Siiteri et al., 1995).

Nel bovino Henault et al. (1995) hanno dimostrato che le secrezioni delle ghiandole sessuali accessorie (AGF) influenzano le caratteristiche del seme dell'epididimo; infatti l'attività fecondante di quest'ultimo ha subito un miglioramento in tori di bassa fertilità quando è stato trattato con AGF di tori con alta fertilità. Dagli studi di Moura et al. (2006) è poi emerso che tori

Holstein di elevata fertilità presentavano più osteopontina nel AGF rispetto i tori di bassa fertilità. Nei tubuli seminiferi l'OPN, sintetizzata dalle cellule del sertoli e dalle cellule germinali, è potenzialmente coinvolta nell'adesione cellulare e nella migrazione.

L'OPN è stata trovata anche nel tratto riproduttivo femminile a livello dell'ovidutto, dell'utero e della placenta. Nel topo RNAm codificante per l'OPN è stato riscontrato nell'ovario (Craig and Denhardt, 1991). Nell'uomo la proteina è stata identificata a livello ovarico e dell'endometrio (Brown et al., 1992). Diverse forme molecolari di OPN sono state trovate nell'ODF bovino di ogni regione dell'ovidutto durante l'intero ciclo estrale, incluse le forme da 55, 48, e 25 KDa (Gabler et al., 2003). La maggiore quantità totale di Osteopontina è stata riscontrata nell' ANL-ODF, mentre la minore quantità è stata osservata sia nell'istmo che nell'ampolla durante la fase luteinica. Parallelamente l'espressione delle subunità integriniche  $\alpha v$  e  $\beta 1$  nell'ovidutto durante la fase luteinica è stata più bassa rispetto a tutte le altre fasi del ciclo estrale. In più la quantità di RNAm della subunità integrinica  $\beta 3$  è aumentata significativamente a partire dalla tardiva fase luteinica fino a quella poco prima dell'ovulazione (Gabler et al., 2003). Complessivamente il lavoro di Gabler et al. (2003) indica che l'OPN è sintetizzata dall'epitelio oviduttale per poi essere secreta o rilasciata da questo nel fluido oviduttale, e

che l'ovidutto risulta essere ricco di questa proteina e di diverse integrine che sembrano interagire tra di loro per il normale svolgimento degli eventi della riproduzione.

Le integrine sono degli eterodimeri con un dominio composto da una sottofamiglia di specifiche catene  $\beta$  e distinte catene  $\alpha$  (Hynes, 1992). Si conoscono all'incirca otto subunità  $\beta$  (90-110 KDa) e quattordici subunità  $\alpha$  (120-180 KDa). Le integrine sono presenti sulla superficie di svariate cellule ed hanno, tra le altre funzioni, quella di promuovere l'adesione cellulare. Diverse integrine sono state descritte sulla superficie degli oociti umani e del topo (Fusi et al., 1992; Almeida et al., 1995), sulla membrana degli spermatozoi nell'uomo (Klentzeris et al., 1995) e sull'endometrio della pecora e dell'uomo (Lessey et al., 1992, Johnson et al., 1999). È inoltre stato dimostrato che le integrine intervengono durante la fertilizzazione (Almeida et al., 1995), facilitando il legame cellula uovo-spermatozoo. La scoperta, quindi, della presenza dell'Osteopontina e di diverse integrine sui tessuti e sulle cellule del tratto riproduttivo maschile e femminile suggerisce che esse collaborino durante l'adesione dello spermatozoo alla cellula uovo e, successivamente, durante l'adesione del trofoblasto all'endometrio. È stato dimostrato, infatti, che le integrine  $\alpha\beta3$  legano l'OPN attraverso il dominio RGD presente su quest'ultima (Rodan, 1995). Liaw et al. (1994) e Yue et al.

(1994) hanno visto che l'uso di anticorpi contro le integrine  $\alpha v \beta 3$  inibiva l'effetto mediato dall'OPN di adesione e migrazione cellulare. Dunque, quanto detto farebbe ipotizzare che le integrine presenti sulla membrana degli spermatozoi e dell'oocita sarebbero dei siti di adesione tra gameti via osteopontina. Una simile ipotesi di legame è stata proposta per l'impianto dell'embrione in utero che avverrebbe cioè attraverso l'interazione dell'OPN con le integrine (Johnson et al., 1999).

In uno studio condotto nella specie suina, Hao et al (2006) hanno evidenziato che l'OPN ha un'effetto positivo sulla reazione acrosomiale degli spermatozoi, riduce la polispermia, il numero di spermatozoi che legano l'oocita ed aumenta l'efficienza della fertilizzazione durante IVF (Hao et al., 2006). Una forma molecolare da 50 KDa della proteina è stata identificata nell'ovidutto al giorno 0, 3 e 5 in scrofe giovani gravide e non (Hao et al., 2006). È stato inoltre dimostrato che la proteina è anche espressa nel lume uterino della pecora, scrofa, vacca, topo, babuino e dell'uomo (Johnson et al., 2003). Nel maiale due forme molecolari da 70 e 45 KDa sono state riscontrate nell'endometrio di animali gravidi e non (Garlow et al., 2002). Complessive analisi dei modelli temporali e spaziali della proteina, della sua espressione, e del suo RNAm nell'utero delle diverse specie animali, suggeriscono che la proteina possa avere a questo livello

diverse funzioni biologiche durante il ciclo estrale, durante la fase iniziale della gravidanza e dell'impianto in utero fino ad arrivare alla fine della gestazione (Johnson et al., 2003).

L'espressione dell'OPN è stata dimostrata durante il periodo dell'impianto in utero del prodotto del concepimento nell'uomo (Apparao et al., 2001; Von Wolff et al., 2001), nel maiale (Garlow et al., 2002) e nel coniglio (Apparao et al., 2003). Questo indicherebbe che l'OPN è un'importante proteina epiteliale coinvolta nell'impianto dell'embrione, in diverse specie e con diversi tipi di placenta. L'impianto in utero del prodotto del concepimento è un processo complesso e progressivo per il quale le citochine e le molecole di adesione giocano un ruolo essenziale nel preparare l'endometrio e il trofoectoderma all'evento. Johnson et al. hanno ipotizzato che l'OPN sia capace di influenzare l'ambiente uterino come 1) componente dell'istotrofo necessaria per l'adesione e la trasduzione del segnale sull'interfaccia utero-placentare, 2) proteina espressa dallo stroma uterino durante la formazione della placenta, 3) prodotto derivante dalle cellule immunitarie della placenta e dell'utero che ne regola il comportamento e la produzione di citochine. Inoltre, nella pecora gli stessi autori hanno dimostrato che la proteina è presente sulla superficie del lume epiteliale e ghiandolare dell'utero, che viene secreta nel lume uterino di animali gravidi

e che è riscontrabile anche a livello del trofoblasto. Secondo Johnson et al. l'OPN secreta sarebbe così disponibile come ligando per i recettori integrinici presenti sia sul trofoblasto che sull'epitelio uterino e 1) stimolerebbe i cambiamenti morfologici del trofoblasto, 2) medierebbe l'adesione tra l'epitelio uterino e il trofotoderma indispensabile affinché avvenga l'impianto dell'embrione e la formazione dell placenta (Johnson et al., 1991).

*Proteine associate all'estro (EAP).* Gerena e Killian (1990) hanno identificato due proteine specifiche dell'ovidutto attraverso la cannulazione tubarica degli animali; una proteina di 47KDa, presente durante tutto il ciclo estrale ed un'altra, di 80-95 kDa, presente in elevate concentrazioni solo nei tre-quattro giorni attorno al periodo dell'ovulazione. Quest'ultima è stata denominata proteina associata all'estro (EAP). Diverse EAP sono state osservate in numerose specie come: coniglio (Urzua et al., 1970), scimmia (Mastroianni et al., 1970), pecora (Sutton et al., 1984), topo (Kapur and Johnson, 1985), maiale (Brown and Cheng, 1986; Buhi et al., 1989), babbuino (Fazleabas and Verhage, 1986), uomo (Lippes et al., 1981; Verhage et al., 1988), bovino (Boice et al., 1990; Gerena and Killian, 1990) e cavallo (Willis et al., 1994).

Una correlazione tra la comparsa dell'EAP nel fluido oviduttale e la fase estrale del ciclo è stata descritta in molte specie. Il numero delle EAP presenti nell'ovidutto dipende dalla specie. In molte delle specie studiate esiste solo una di queste proteine glicosilate: nel topo quella da 215 KDa (Horvat et al., 1992), nel babbuino da 120 KDa (Fazleabas and Verhage, 1986), nell'uomo da 130 KDa (Verhage et al., 1988), nel bovino da 97 KDa (Gerena and Killian, 1990) e nel cavallo da 50 KDa (Willis et al., 1994). Nella pecora e nel maiale, invece, è stata identificata più di una EAP. Gandolfi et al. (1989) hanno descritto una proteina di 92 KDa e una di 46 KDa presenti nell'ovidutto durante i primi quattro-cinque giorni dopo l'estro. Buhi et al. (1989) hanno identificato tre proteine specifiche dell'ovidutto, apparentemente di 335, 115 e 85 KDa presenti solo durante il proestro, l'estro e il metaestro. Queste stesse sono risultate assenti durante gli altri giorni del ciclo.

Parziali o complete sequenze di DNAC per le EAP sono state ottenute in diverse specie. È stato visto che queste proteine facilitano la capacitazione spermatica, aumentano la capacità fecondante del seme (King et al., 1994), sono positivamente coinvolte nel mantenimento della motilità spermatica (Abe et al., 1995) e migliorano la sopravvivenza embrionale (Nancarrow and Hill, 1994).

Utilizzando fluido oviduttale arricchito con EAP, Hill et al. (1992) hanno riscontrato un miglioramento nello sviluppo embrionale. Ulteriori evidenze vengono dagli studi di Archibong et al., (1989) che hanno dimostrato come lo sviluppo di embrioni porcini fino allo stadio di blastocisti è superiore in embrioni messi in coltura con ODF porcino non luteale rispetto a quelli in ODF della fase luteinica. Anche se non è stato dimostrato che l'ODF non luteale conteneva EAP, è certo che le EAP sono presenti in alte concentrazioni durante la fase non luteinica e questo porterebbe a pensare che le EAP possano essere uno dei fattori responsabili dell'aumento della percentuale di embrioni.

#### **1.4 Associazione delle proteine dell'odf con i gameti**

Le proteine dell'ODF interagiscono sia *in vivo* che *in vitro* con i gameti maschile e femminile di diverse specie. Secondo gli studi di Voglmayr and Sawyer (1986), nella pecora cinque proteine dell'ODF (140, 95, 78, 66 e 55 KDa) legano il gamete maschile. Lippes and Wagh (1989) hanno dimostrato che una glicoproteina oviduttale umana di 54 KDa è capace di legarsi alla testa dello spermatozoo. Nel bovino è stato osservato che cinque proteine dell'ODF (90, 66, 53, 34 e 24 KDa) si legano al gamete maschile (McNutt et al., 1992) e le modalità di legame non differiscono in

base allo stadio del ciclo o alla regione (Rodríguez and Killian, 1998). King and Killian (1994) hanno dimostrato che la EAP bovina (90-95 KDa) si lega alla testa e alla porzione centrale dello spermatozoo. Abe et al. (1995) hanno invece osservato che la EAP bovina si lega alla regione posteriore della testa, alla porzione centrale e alla coda dello spermatozoo.

Le proteine dell'ODF interagiscono anche con il gamete femminile e gli embrioni. Nel topo, è stato trovato che una EAP di 215 KDa si lega agli oociti ovulati ed agli embrioni, ma non si lega agli oociti preovulatori, suggerendo che l'interazione con questa proteina in vivo avviene all'interno dell'ovidutto (Kapur and Johnson, 1985). Per di più questa stessa glicoproteina è stata trovata specificatamente nello spazio perivitellino di oociti ovulati e di embrioni (Kapur and Johnson, 1986). Nel maiale una proteina superiore ai 200 KDa e una di 90 KDa si associano con la ZP di oociti ovulati (Brown and Cheng, 1986). Nella pecora, una proteina di 46 KDa si associa con la ZP di oociti ovulati. Nella stessa specie una glicoproteina di 92 KDa si ritrova a livello di ZP, spazio perivitellino, e membrane dei blastomeri (Gandolfi et al., 1989). Le EAP sono presenti anche sulla ZP, nello spazio perivitellino e sulla membrana vitellina di oociti ovulati ed embrioni precoci di babbuino (Boice et al., 1990). La EAP del bovino si ritrova sulla ZP, nello spazio perivitellino, e sulla membrana

vitellina di oociti sia *in vivo* che *in vitro* e rimane associata con la ZP di embrioni recuperati con flushing dall'utero (Wegner and Killian, 1991).

Nel bovino fatta eccezione per l'EAP il ruolo delle rimanenti proteine dell'ovidutto deve ancora essere investigato, sebbene la loro presenza a questo livello suggerisce che siano coinvolte nella fertilizzazione e nello sviluppo embrionale precoce. Si è ritenuto, pertanto, interessante approfondire gli studi in questo senso, per individuare quelle proteine che, giocando un ruolo chiave nei processi di fertilizzazione e di sviluppo embrionale precoce, possano essere utilizzate *in vitro* per il miglioramento dell'efficienza IVEP.

## **2 PARTE SPERIMENTALE**

### **I PARTE**

#### **2.1 Interazione di alcune proteine del fluido oviduttale con gli oociti**

##### **2.1.1 Scopo del lavoro**

Lo scopo della prima parte del presente lavoro è stato quello di verificare, mediante l'uso della microscopia confocale a fluorescenza, se alcune proteine dell'ODF, in particolare la BSA, l'OPN e la L-PGDS, interagiscono con l'oocita.

Questa tecnica fornisce una visione tridimensionale dell'oocita e sezioni dello stesso su differenti piani. Il vantaggio che ne deriva, rispetto al semplice microscopio a fluorescenza, è quello di poter avere un'immagine della cellula uovo che ci permette di localizzare meglio le proteine dell'ODF sulla sua superficie.

In particolare è stata investigata l'interazione di legame di alcune proteine quali la BSA, l'OPN e la L-PGDS con oociti maturati in vitro denudati, non denudati e dezonati. Questo per capire se le proteine d'interesse del fluido oviduttale sono capaci di interagire solo con la ZP dell'oocita o con le cellule del cumulo o entrambi, e se sono capaci di legare la membrana plasmatica. Inoltre, lo stesso esperimento, è stato ripetuto con oociti immaturi per esplorare la presenza di queste stesse proteine nel fluido follicolare ed eventualmente caratterizzare la loro interazione di legame con oociti immaturi.

## **2.1.2 Materiali e metodi**

### **Prelievo del fluido oviduttale**

Il fluido oviduttale, ampollare e istmico, di 2 bovine Holstein (A e B) è stato raccolto ogni 24 ore come precedentemente descritto da Kavanaugh et al. (1992), e immediatamente conservato a -25°C. I campioni così ottenuti, di ambedue le regioni, sono stati poi divisi in NL e L in base alle concentrazioni giornaliere di progesterone nel sangue. I livelli di progesterone nel sangue sono stati determinati attraverso RIA di campioni ematici dell'animale, prelevati ogni giorno insieme all'ODF (Killian et al.,

1989). Non luteali sono stati denominati tutti i campioni di ODF collezionati quando la concentrazione di progesterone nel sangue è risultata  $\leq 1.5$  ng/ml ed è stato presupposto che questi includevano i giorni dell'estro e dell'ovulazione. Luteali sono stati denominati, invece, tutti i campioni di ODF collezionati quando la concentrazione ematica di progesterone è risultata  $> 1.5$  ng/ml. Quindi, una volta stabilite le fasi (luteale e non luteale) del ciclo estrale, i campioni di ODF che erano stati conservati a  $-25$ , sono stati scongelati e raggruppati per ogni regione (ampollare ed istmica) in NL e L. Il fluido oviduttale, sia nella componente ampollare (ANL) che istmica (INL), di due cicli (Ic + IIc) di ciascun animale è stato raggruppatto, filtrato ( $0.45 \mu\text{m}$ ), e conservato a  $-70^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'uso. La concentrazione proteica di ogni gruppo così ottenuto (ANL (Ic + IIc) A e INL (Ic + IIc) B) è stata determinata con il metodo del Folin Phenol Reagent (Lowry et al J.Biol. Chem. 193:265, 1951) e variava da 5.28 – 37.12 mg/ml.

### **Reagenti e media**

Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA), se non diversamente specificato.

## *Oociti*

La prova e' stata eseguita su oociti maturi denudati, non denudati, dezonati e oociti immaturi. Gli oociti maturi sono stati forniti dalla ditta BoMed (Madison, Wis).

## *Incubazione di oociti maturi denudati in ODF*

L'incubazione degli oociti con il fluido oviduttale è stata eseguita in un medium TALP modificato (Parrish et al., 1986) senza glucosio e senza albumina sierica bovina (BSA), tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio.

Oociti maturi sono stati denudati in 1 ml di medium TALP contenente 10 mg/ml di ialuronidasi tramite vortex per 3 minuti. Gli oociti denudati, sono stati lavati tre volte nello stesso terreno e solo quelli che esibivano il primo corpo polare estruso (indice di avvenuta maturazione), sono stati selezionati e assegnati ad uno dei seguenti trattamenti per 2,5 ore: (1) medium TALP, (controllo), (2) medium TALP e ODF-ANL dell'animale A, (3) medium TALP e ODF-ANL dell'animale B, (4) medium TALP e ODF-INL dell'animale A, (5) medium TALP e ODF-INL dell'animale B.

Gli oociti sono stati messi in 400 µl di terreno (25 per pozzetto), ricoperto da 400 µl di olio minerale e sono stati incubati a 39 °C, in atmosfera umidificata con il 5 % di CO<sub>2</sub>.

#### **Incubazione di oociti maturi non denudati in ODF**

Oociti maturi sono stati processati e incubati come appena descritto, con l'unica eccezione che non sono stati denudati, ma direttamente lavati in terreno TALP e assegnati ad uno dei trattamenti riportati sopra.

#### **Incubazione di oociti maturi dezonati in ODF**

Oociti maturi sono stati denudati come precedentemente riportato, lavati tre volte in medium TALP e solo quelli che esibivano il corpo polare estruso, sono stati esposti a 0.5% protease (type XXIV) per la digestione della ZP. Gli oociti che presentavano la ZP digerita sono stati, a questo punto, assegnati ai vari trattamenti precedentemente descritti e incubati.

#### **Recupero degli oociti immaturi**

Le ovaie bovine sono state raccolte presso un macello locale e trasportate in laboratorio in soluzione fisiologica salina (0.9% NaCl) antibiotata con 150mg/L di Kanamicina. Dal momento del prelievo fino all'arrivo in

laboratorio, le gonadi sono state mantenute in un termos portatile alla temperatura di 30-35 °C per circa 3-4 ore. In laboratorio le ovaie sono state lavate ripetutamente con la medesima soluzione fisiologica supplementata di antibiotico, al fine di ridurre al minimo i rischi di contaminazione.

I complessi cumulo oocita (COC) sono stati aspirati dai follicoli di piccolo e medio calibro (2-8 mm) visibili sulla superficie dell'ovaio, utilizzando un ago di 19 Gauge collegato ad una pompa di aspirazione operante a pressione negativa controllata (40-50 mmHg).

Il fluido follicolare è stato esaminato in piastre Petri, dove si è proceduto con la valutazione morfologica dei COC così raccolti e loro selezione: solo quelli caratterizzati da cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo sono stati utilizzati per la fase sperimentale.

I COC selezionati sono stati posti in un terreno commerciale, Medium 199 tamponato con 25 mM di HEPES e 2 mM di bicarbonato di sodio e addizionato con 2 mM di sodio piruvato, 1 mM di L-glutamina, 10 µl/ml di amfotericina B e 540 µg/ml di eparina (TCM-Aspiration). I COC sono stati denudati in 1 ml di questo stesso terreno, contenente 10 mg/ml di ialuronidasi, tramite vortex per 3 minuti. Gli oociti denudati, sono stati lavati due volte in TCM-Aspiration e un'ultima volta in Medium 199

supplementato con 0.8 mM di L-glutammina e 50 µg/ml di gentamicina (TCM), prima di essere assegnati ai vari gruppi sperimentali.

**Incubazione degli oociti maturi con  $\alpha$ -BSA,  $\alpha$  OPN,  $\alpha$  L-PGDS**

Dopo l'incubazione in ODF gli oociti maturi denudati, non denudati e dezonati sono stati incubati con gli anticorpi verso le tre proteine d'interesse. Differenti concentrazioni anticorpali, per ciascuna proteina, sono state testate e, per ogni proteina, è stata scelta la minima concentrazione anticorpale capace di dare il migliore risultato d'immagine al microscopio confocale. Le concentrazioni scelte sono state: 0,35 µg/ml  $\alpha$ -BSA (Biomeda CORP # D22), 100 µg/ml  $\alpha$ -purified bovine milk OPN, e 100 µg/ml  $\alpha$ -recombinant bovine L-PGDS. Per tutte le proteine investigate, gli anticorpi secondari, goat F(ab)<sub>2</sub>-anti rabbit IgG (H+L)-FITC (Southern Biotech Associates, Birmingham, AL, USA), sono stati diluiti 1:300, nel terreno d'incubazione.

Dopo 2,5 ore d'incubazione, gli oociti del trattamento (1) sono stati in parte lasciati in medium TALP (1a) e in parte assegnati al trattamento con anticorpi policlonali contro le proteine d'interesse (1b):  $\alpha$ -BSA (Biomeda CORP # D22),  $\alpha$ -purified bovine milk OPN, e  $\alpha$ -recombinant bovine L-PGDS. Ugualmente, Anche gli oociti dei trattamenti (2), (3), (4) e (5), dopo

essere stati lavati abbondantemente in medium TALP, sono stati assegnati, al trattamento con anticorpi policlonali contro la BSA, l'OPN e la L-PGDS. Tutti i gruppi sperimentali, sono stati quindi incubati per un'altra ora al termine della quale, gli oociti del trattamento (1a) sono stati in parte lasciati in medium TALP (1ax) e in parte incubati per altri 30 minuti in goat F (ab)<sub>2</sub>-anti rabbit IgG (H+L)-FITC (Southern Biotech Associates, Birmingham, AL, USA) (1ay), ad una diluizione di 1:300. Allo stesso modo anche gli oociti dei trattamenti (1b), (2), (3), (4), (5), previo diversi lavaggi in medium TALP, sono stati incubati per altri 30 minuti in goat F (ab)<sub>2</sub>-anti rabbit IgG (H+L)-FITC. Infine gli oociti di tutti i gruppi sperimentali sono stati lavati un'ultima volta, montati (10 per vetrino) e immediatamente analizzati al confocale.

#### **Incubazione degli oociti immaturi con $\alpha$ -BSA, $\alpha$ OPN, $\alpha$ L-PGDS**

Le concentrazioni anticorpali utilizzate sono le stesse riportate per gli oociti maturi. Gli oociti, dopo essere stati lavati un'ultima volta in medium TCM sono stati assegnati ad uno dei seguenti trattamenti: (I) medium TCM, (II) medium TCM +  $\alpha$ -BSA, (III) medium TCM +  $\alpha$ -purified bovine milk OPN, e (IV) medium TCM +  $\alpha$ -recombinant bovine L-PGDS. Dopo 1 ora d'incubazione gli oociti del trattamento (I) sono stati in parte lasciati in

medium TCM (Ia) e in parte trasferiti in medium TCM + goat F (ab)<sub>2</sub>-anti rabbit IgG (H+L)-FITC (Ib). Ugualmente, gli oociti dei trattamenti II, III e IV, dopo ripetuti lavaggi in TCM-Hepes, sono stati trasferiti in medium TCM contenente goat F (ab)<sub>2</sub>-anti rabbit IgG (H+L)-FITC. Tutti gli oociti sono stati così incubati per un'altra mezz'ora, poi lavati abbondantemente, posti 10 per vetrino e immediatamente analizzati al confocale.

### **Microscopia confocale**

Gli oociti sono stati analizzati ad un microscopio confocale a scansione laser (IX 70 Fluoview, Olympus, Japan). Il fluorocromo è stato rilevato a 40x lens NA 0.8, 50 laser intensity. I risultati della fluorescenza sono stati analizzati attraverso Fluoview V2.0 (Olympus Japan).

### **2.1.3 Disegno sperimentale**

Nella seguente prova è stato utilizzato il fluido oviduttale ANL e INL di due cicli (Ic + IIc) di due animali (A e B). La prova è stata suddivisa in quattro esperimenti, condotti in giorni differenti, in base al tipo di oociti utilizzati (oociti maturi senza cumulo, con cumulo, senza ZP e oociti immaturi).

### ***Esperimento 1 – Oociti maturi denudati***

Un totale di circa 425 oociti maturi ottenuti da BoMed sono stati denudati, per poi essere assegnati a random ad uno dei seguenti gruppi sperimentali:

**Gruppo 1)** medium TALP, (controllo): del totale di 125 oociti assegnati al gruppo controllo:

- A) 25 oociti sono stati incubati in 300  $\mu$ l di medium TALP ( controllo negativo)
- B) 25 oociti sono stati incubati in 300  $\mu$ l di medium TALP + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC (controllo negativo)
- C) 25 oociti sono stati incubati in 300  $\mu$ l di medium TALP + 0,35  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -BSA + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC
- D) 25 oociti sono stati incubati in 300  $\mu$ l di medium TALP + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -purified bovine milk OPN + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC
- E) 25 oociti sono stati incubati in 300  $\mu$ l medium TALP + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -recombinant bovine L-PGDS. + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

**Gruppo 2)** medium TALP + ODF-ANL A.

- A) 25 oociti sono stati incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-ANL A + 0,35  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -BSA + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC
- B) 25 oociti sono stati incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-ANL A + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -purified bovine milk OPN + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC
- C) 25 oociti sono stati incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-ANL A + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -recombinant bovine L-PGDS + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

**Gruppo 3)** medium TALP + ODF-ANL B:

- A) 25 oociti sono stati incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-INL A + 0,35  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -BSA + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC
- B) 25 oociti sono stati incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-INL A + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -purified bovine milk OPN + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

C) 25 oociti sono stati incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-INL A + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -recombinant bovine L-PGDS + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

**Gruppo 4)** medium TALP + ODF-INL A:

A) 25 oociti sono stati incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-ANL B + 0,35  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -BSA + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

B) 25 oociti sono stati incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-ANL B + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -purified bovine milk OPN + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

C) 25 oociti incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-ANL B + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -recombinant bovine L-PGDS + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

**Gruppo 5)** medium TALP + ODF-INL B:

A) 25 oociti incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-INL B + 0,35  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -BSA + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

B) 25 oociti incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150  $\mu$ l di ODF-INL B + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -purified bovine milk OPN + goat F (ab)<sub>2</sub>-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

C) 25 oociti incubati in 150  $\mu$ l di medium TALP e 150 di  $\mu$ l ODF-INL B + 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -recombinant bovine L-PGDS + goat F (ab)<sub>2</sub>-anti rabbit IgG (H+L)-FITC.

### ***Esperimento 2 e 3***

.Negli esperimenti 2 e 3 è stato eseguito lo stesso procedimento con la sola differenza che gli oociti dell' esperimento 2 (N=425) non sono stati denudati e quelli dell'esperimento 3 (N=425) sono stati dezonati.

### ***Esperimento 4***

Nell'esperimento 4 un totale di circa 175 oociti immaturi sono stati collezionati, selezionati e assegnati a random ad uno dei seguenti gruppi sperimentali:

Gruppo A), 25 oociti incubati in 400 $\mu$ l medium TCM (controllo)

Gruppo B), 25 oociti incubati in 400 $\mu$ l medium TCM + goat F (ab)<sub>2</sub>-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

Gruppo C), 25 oociti incubati in 400µl medium TCM + 0,35 µg/ml α-BSA + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

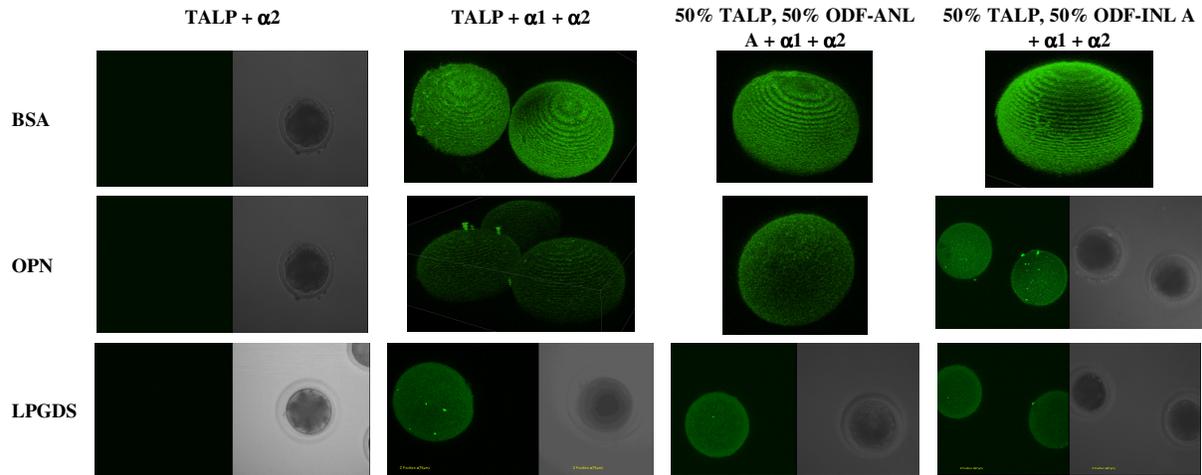
Gruppo D), 25 oociti incubati in 400µl medium TCM + 100 µg/ml α-purified bovine milk OPN + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

Gruppo E, 25 oociti incubati in 400µl medium TCM + 100 µg/ml α-recombinant bovine L-PGDS + goat F (ab)2-anti rabbit IgG (H+L)-FITC

#### **2.1.4 Risultati**

##### **Esperimento 1. Associazione in vitro delle proteine dell'ODF con la ZP di oociti maturi denudati**

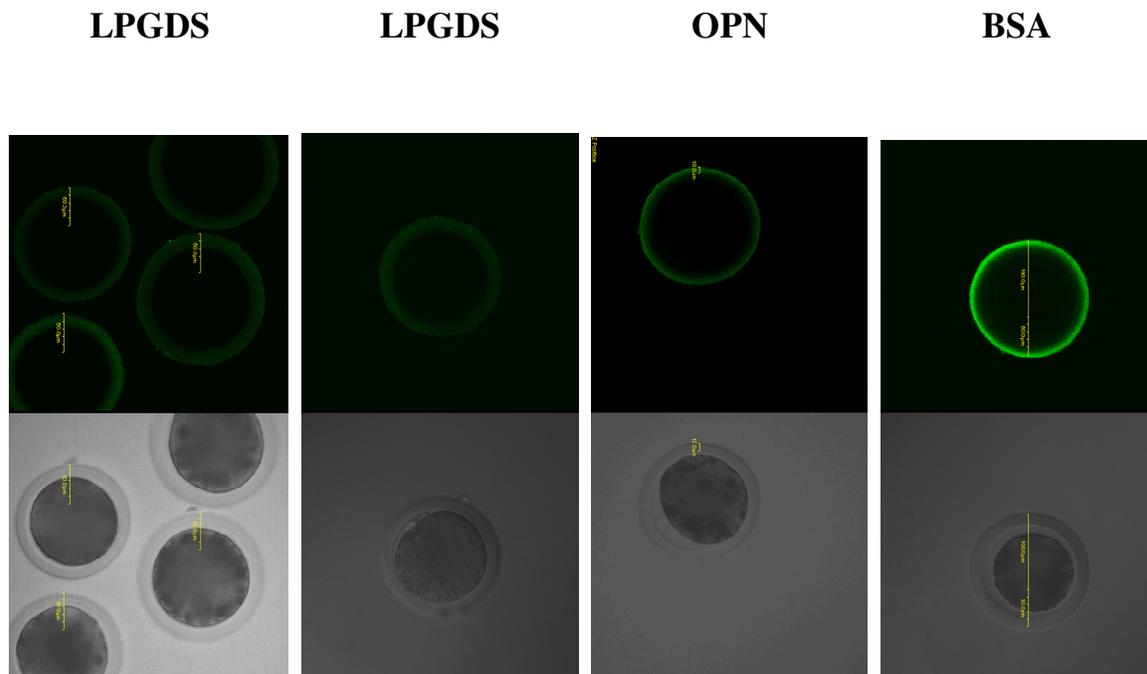
Per tutte le proteine investigate, l'intensità e la distribuzione di fluorescenza è stata simile tra gli oociti di uno stesso gruppo sperimentale. La ZP degli oociti che non sono stati incubati con gli anticorpi primari contro le tre proteine d'interesse, non è risultata fluorescente in nessun caso e questo è servito come controllo negativo. Invece, la ZP degli oociti che sono stati incubati con gli anticorpi primari contro le tre proteine d'interesse, ha emesso fluorescenza sia quando gli oociti maturi denudati sono stati incubati nel medium TALP, sia quando sono stati esposti all'ODF,



**Figure 1** – Interazione di legame delle proteine BSA, OPN e L-PGDS con la zona pellucida di oociti maturi denudati. Le immagini si riferiscono all'animale A.

indipendentemente dalla regione anatomica di origine e dall'animale. Non sono emerse, infatti, differenze nei pattern di fluorescenza tra i gruppi. La fluorescenza ha indicato che le tre proteine testate (la BSA, l'OPN e la L-PGDS) sono presenti su tutta la superficie della zona pellucida dell'oocita in modo uniforme (Fig. 1)

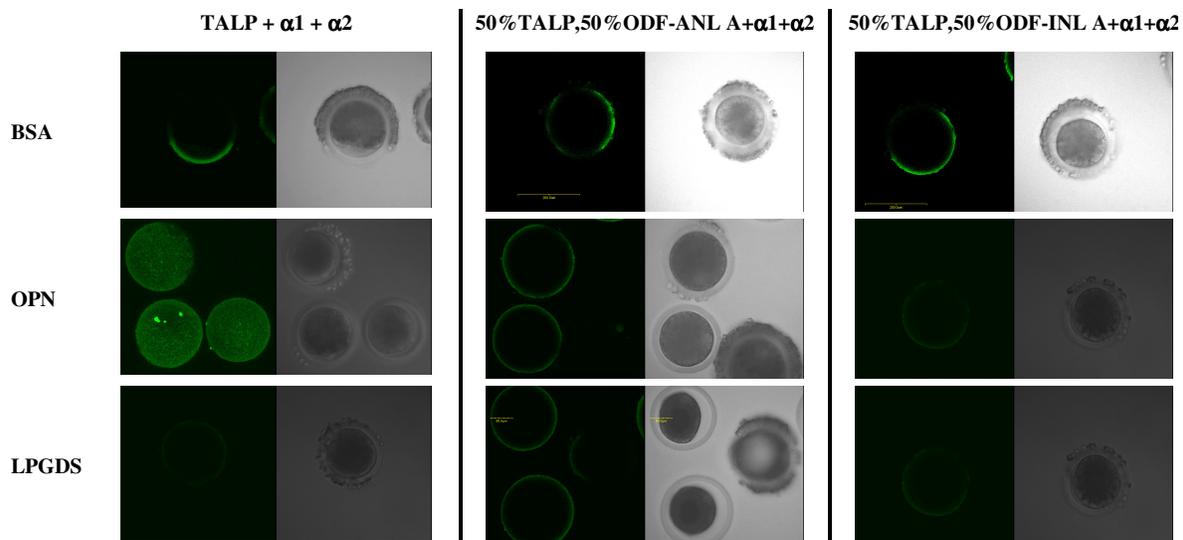
La distribuzione della fluorescenza delle proteine BSA e OPN è apparsa limitata alla ZP degli oociti, mentre, per la L-PGDS è apparsa più profonda. Sembra infatti, che la fluorescenza interessi oltre la ZP degli oociti anche la membrana vitellina e talvolta lo spazio perivitellino (Fig. 2).



**Figure 2** – Distribuzione della fluorescenza per le proteine BSA, OPN e L-PGDS negli oociti maturi denudati.

**Esperimento 2. Associazione in vitro delle proteine dell'ODF con oociti maturi non denudati**

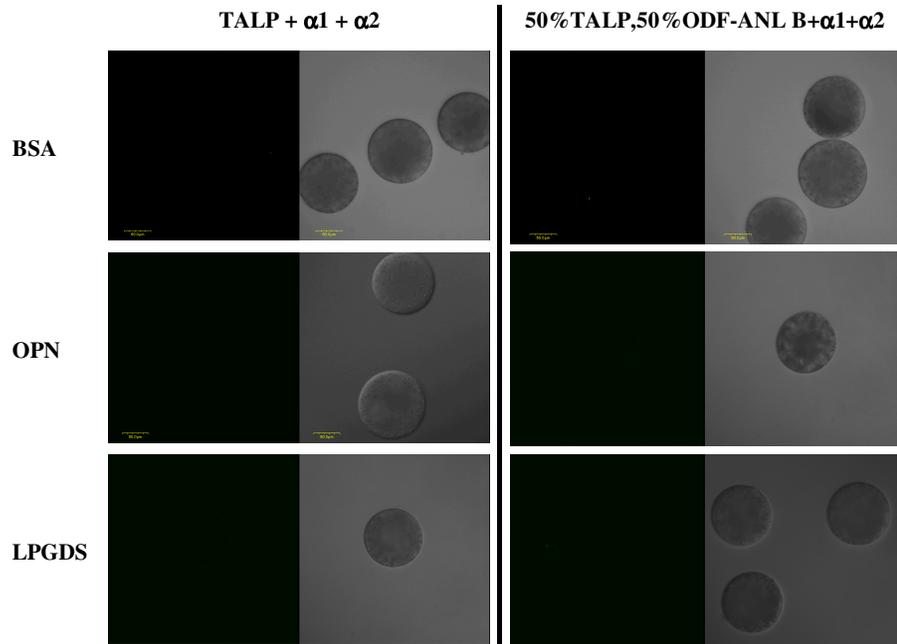
Dagli studi di localizzazione delle proteine su complessi cumulo-oocita è emerso che le cellule del cumulo non hanno un' affinità di legame per le tre proteine d'interesse. In nessuno dei gruppi di trattamento, infatti, le cellule del cumulo hanno emesso fluorescenza (Fig. 3).



**Figura 3** - Assenza di legame, evidenziabile dalla mancanza di fluorescenza, delle proteine BSA, OPN e L-PDGS con le cellule del cumulo di oociti maturi. Le immagini si riferiscono all'animale A

**Esperimento 3. Associazione in vitro delle proteine dell'ODF con oociti maturi dezonati.**

In nessuno dei gruppi trattati è stata evidenziata la presenza delle proteine in esame a livello della membrana vitellina, come indicato dall'assenza di fluorescenza osservata sugli oociti maturi dezonati (fig.4).

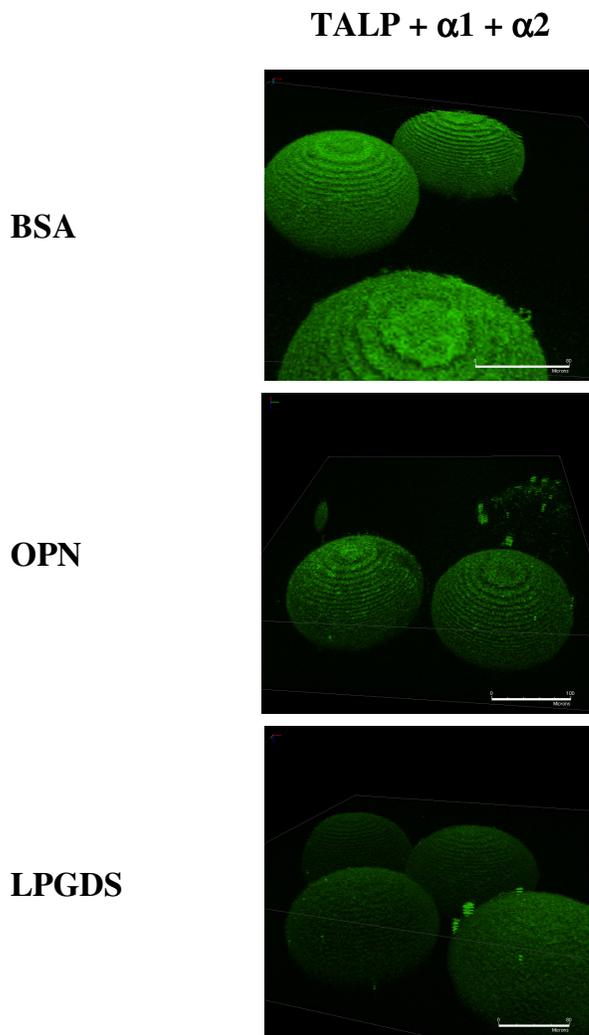


**Figure 4** - Assenza di legame, evidenziabile dalla mancanza di fluorescenza, delle proteine BSA, OPN e L-PDGS con la membrana plasmatica di oociti maturi dezonati

**Esperimento 4. Associazione in vitro delle proteine dell'ODF con la ZP di oociti immaturi**

Per tutte le proteine investigate l' intensità e la distribuzione di fluorescenza è stata simile tra gli oociti di uno stesso gruppo sperimentale. La ZP degli oociti che non sono stati incubati con anticorpi primari contro le tre proteine d'interesse non è risultata fluorescente in nessun caso e questo è servito come controllo negativo. La ZP ha emesso fluorescenza, invece, in tutti gli altri casi in cui gli oociti sono stati incubati in medium TCM + anticorpi

primari contro le proteine d'interesse (fig. 5). La distribuzione della fluorescenza delle proteine BSA e OPN è apparsa limitata alla ZP degli oociti, mentre, per la L-PGDS è apparsa più profonda. Sembra infatti, che la fluorescenza interessi oltre la ZP degli oociti anche la membrana vitellina e talvolta lo spazio perivitellino.



**Figure 5** - Interazione di legame delle proteine BSA, OPN e L-PGDS con la zona pellucida di oociti immaturi denudati.

## **II PARTE**

Nella seconda parte del presente lavoro ci si è proposti di approfondire gli studi su una delle proteine precedentemente esaminate, in particolare l'OPN, e valutarne gli effetti: 1) sulla capacitazione spermatica in vitro, 2) sulla fertilizzazione e sullo sviluppo embrionale in vitro e 3) sulla resistenza alla crioconservazione. Tale scelta è stata motivata dalla mole di informazioni esistente a riguardo in letteratura, cui si rimanda, che suggerisce per l'OPN un ruolo importante nel corso di tali eventi riproduttivi.

### **2.2.1 Esperimento 1. Ruolo dell'OPN sulla capacitazione spermatica e reazione acrosomiale**

Gli spermatozoi di mammifero acquisiscono la capacità fecondante all'interno delle vie genitali femminili attraverso un processo denominato capacitazione. Diversi studi hanno dimostrato che la capacitazione è uno step maturazionale degli spermatozoi che culmina nella loro iperattivazione (Yanagimachi et al., 1988) e li prepara all'esocitosi dell'acrosoma (Vrendenburgh-Wilberg et al., 1995). Affinchè gli eventi biochimici della capacitazione spermatica e della successiva reazione acrosomiale avvengano è indispensabile la presenza di  $Ca^{++}$  nell'ambiente extracellulare. In vitro, tra i vari agenti capacitanti, al momento, l'eparina in presenza di  $Ca^{++}$ , sembra

essere ancora il metodo più efficiente utilizzato nella maggior parte delle specie domestiche (Parrish et al., 1988).

Come abbiamo precedentemente detto, l'OPN è una glicoproteina del fluido oviduttale capace di influenzare i livelli intracellulari di  $Ca^{++}$ . In uno studio condotto nella specie suina, Yanhong et al (2006) hanno evidenziato un effetto positivo dell'OPN, aggiunta al terreno di IVF, sulla reazione acrosomiale degli spermatozoi.

### **2.2.1.1 Scopo del lavoro**

Lo scopo della seconda parte del presente lavoro è stato quindi quello di valutare l'efficienza di differenti concentrazioni di OPN ad indurre la capacitazione in vitro di spermatozoi bovini.

La capacitazione è stata valutata indirettamente, stimando la capacità degli spermatozoi ad andare incontro alla reazione acrosomiale dopo incubazione con lisofosfatidilcolina, un lipide fusogenico, noto per indurre la reazione acrosomiale solo negli spermatozoi capacitati senza effetti sulla motilità.

## 2.2.1.2 Materiali e metodi

### Preparazione del seme

Spermatozoi congelati-scongelati di un toro precedentemente testato per l'IVF sono stati separati mediante gradienti di percoll in modo da selezionare solo la popolazione integra. Un campione di spermatozoi (N = 333) è stato valutato, immediatamente dopo lo scongelamento, per valutare l'incidenza della perdita acrosomiale negli spermatozoi non trattati (tempo 0). I rimanenti spermatozoi sono stati incubati: (1) in medium TALP (controllo) per 2 ore (N = 495); 2) in presenza di 0.01 mM eparina per 2 ore (N = 431); (3) in presenza di 10 µg/ml di OPN per 2 ore (N = 452) e (4) con 20 µg/ml di OPN per 2 ore (N = 482).

Dopo l'incubazione con questi agenti, gli spermatozoi sono stati esposti a lisofosfatidilcolina, precedentemente dissolta in metanolo per HPLC con una concentrazione di 5mg/ml, divisa in aliquote da 60µl e conservata a -20°C.

Il giorno dell'uso, il metanolo è stato evaporato sotto azoto, e il medium (TALP con 60mg/ml di albumina) è stato aggiunto per ottenere una soluzione stock contenente 600 µg/ml di lisofosfatidilcolina. L'albumina è stata aggiunta per ridurre l'influenza negativa della lisofosfatidilcolina sulla

vitalità spermatica. Un volume di 112,5 µl di sospensione spermatica è stato coincubato con 60 µg/ml di lisofosfatidilcolina (12.5µl di soluzione stock) per 15 minuti a 38.5°C in atmosfera umidificata con il 5% CO<sub>2</sub>.

### **Fissazione e colorazione degli spermatozoi**

Il seme è stato fissato e colorato mediante colorazione Trypan blue-Giemsa (Kovács e Foote, 1992). Una goccia di una soluzione Trypan blue allo 0.27%, ottenuta aggiungendo 1 ml di Trypan blue ad 1 ml di fisiologica (0.9% NaCl), ed una goccia di seme diluito, sono state deposte sul bordo di un vetrino. Con l'ausilio di un secondo vetrino le due gocce sono state mescolate ed è stato effettuato uno striscio, mantenendo i due vetrini in posizione parallela durante l'operazione. In questo modo sono stati preparati due vetrini da ciascun campione. Dopo lo striscio i vetrini sono stati asciugati all'aria in posizione pressoché verticale.

I vetrini sono stati posti in giare contenenti il fissativo per 2 minuti, e poi lavati con acqua distillata. Il fissativo è stato preparato miscelando 86 ml di una soluzione 1N di HCl a 14 ml di una soluzione al 37% di Formaldeide con l'aggiunta di 0.2 g di Neutral red.

Una volta asciugati, i vetrini sono stati immersi per diverse ore in apposite giare contenenti il colorante Giemsa, preparato fresco prima

dell'uso, aggiungendo 7,5% di una soluzione Giemsa stock. Dopo la colorazione i vetrini sono stati ancora una volta lavati con acqua distillata e lasciati asciugare all'aria, verticalmente. Alla fine della procedura è stata posizionata sui vetrini una coverslip con Entellan.

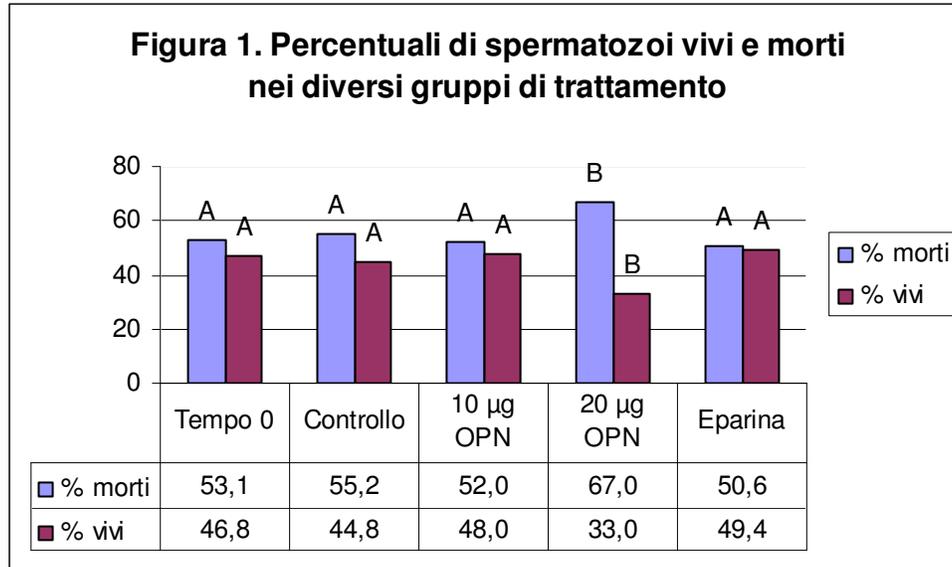
### **Valutazione microscopica**

L'avvenuta reazione acrosomiale è stata valutata microscopicamente mediante ingrandimenti 40x e 100x con immersione ad olio e per ciascun vetrino sono state contate tutte le cellule presenti.

### **Analisi statistica**

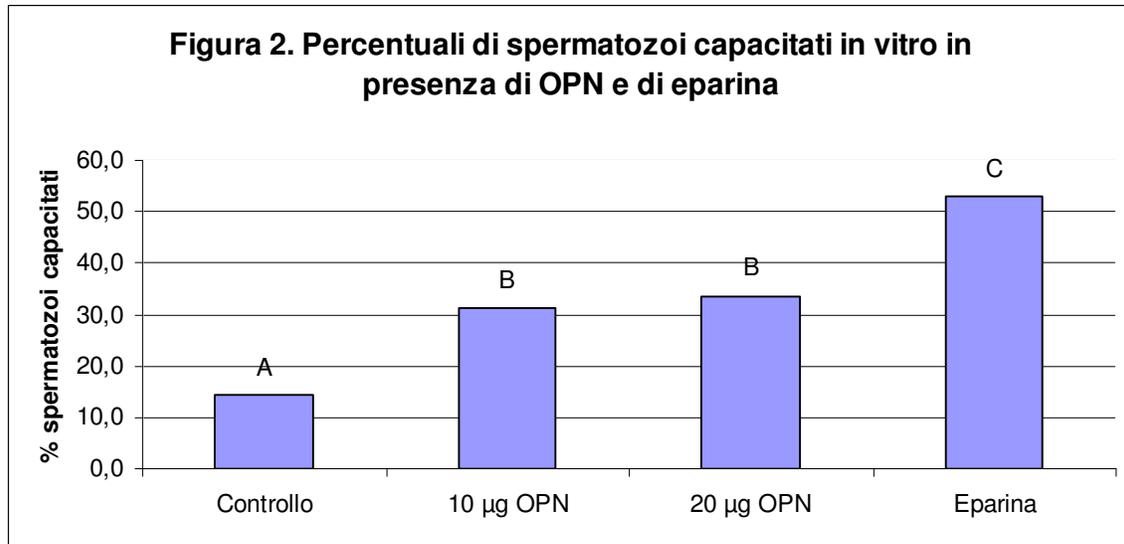
La percentuale di spermatozoi che presentavano reazione acrosomiale dopo induzione con LPC, calcolata sui vivi, è stata usata per valutare l'efficienza della capacitazione nelle differenti condizioni di incubazione. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante test Chi quadro.

### 2.2.1.3 Risultati



Come mostrato nella figura 1, una maggiore percentuale di spermatozoi morti è stata osservata nel gruppo trattato con 20µg/ml di OPN rispetto a tutti gli altri gruppi.

Allo scongelamento (tempo 0) nessuno spermatozoo ha mostrato perdita dell'acrosoma.



Come si evince dalla figura 2, le percentuali di spermatozoi capacitati sono risultate incrementate in tutti i gruppi di trattamento del seme rispetto al controllo (14,4 vs 31,3, 33,3 e 53,1 % rispettivamente nel controllo e nei gruppi trattati con 10 µg di OPN, con 20 µg di OPN e con l'eparina;  $P < 0,01$ ). L'OPN, ad entrambe le concentrazioni testate, ha determinato un incremento ( $P < 0,01$ ) della percentuale di spermatozoi capacitati rispetto al controllo. Comunque, il trattamento del seme con eparina ha dato le percentuali di spermatozoi capacitati più elevate ( $P < 0,01$ ), con valori maggiori sia rispetto al controllo, sia rispetto ad entrambe le concentrazioni di OPN.

## **2.2.2 Esperimento 2. Valutazione del ruolo dell'OPN sulla fecondazione in vitro e sullo sviluppo embrionale precoce**

Gongalves et al. (2006) hanno recentemente riportato che, nel bovino, le percentuali di fecondazione si riducono notevolmente quando gli oociti, maturati in vitro, e gli spermatozoi vengono pretrattati con anticorpi contro l'OPN. Nel suino, la fecondazione è stata positivamente influenzata dall'aggiunta della proteina, nel terreno IVF, alle concentrazioni di 0.01 e 0.1 µg/ml (Hao et al., 2006).

### **2.2.2.1 Scopo del lavoro**

Sulla base di queste osservazioni, lo scopo del presente lavoro è stato quello di verificare se l'OPN, aggiunta al medium di IVF possa migliorare:

- a) la fecondazione e lo sviluppo embrionale in vitro
- b) la resistenza degli embrioni prodotti alla crioconservazione

## **2.2.2.2 Materiali e metodi**

### ***Recupero degli oociti e maturazione in vitro (IVM)***

Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA), se non diversamente specificato.

Le ovaie bovine sono state raccolte presso un macello locale e trasportate in laboratorio in soluzione fisiologica salina (0.9% NaCl), antibiotata con 150mg/L di Kanamicina, a 30-35 °C entro 4 ore dall'avvenuta macellazione. I complessi cumulo oocita (COC) sono stati aspirati dai follicoli di piccolo e medio calibro (2-8 mm) visibili sulla superficie dell'ovaio, utilizzando un ago di 19 Gauge collegato ad una pompa di aspirazione operante a pressione negativa controllata (40-50 mm Hg).

Il fluido follicolare è stato esaminato in piastre Petri, dove si è proceduto con la valutazione morfologica dei COC così raccolti e loro selezione: solo quelli caratterizzati da cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo sono stati utilizzati per la fase sperimentale.

I COC selezionati sono stati lavati 2 volte in TCM-Aspiration e una volta nel medium di maturazione (TCM-IVM).

I COC sono stati posti in gruppi da 25 in pozzetti contenenti 400  $\mu$ l di TCM-IVM, ciascuno ricoperto da 400  $\mu$ l di olio minerale, e incubati per 24 ore in un incubatore a 39°C, in atmosfera umidificata con il 5 % di CO<sub>2</sub>.

### ***Fecondazione in vitro (IVF)***

Gli spermatozoi utilizzati per la fecondazione in vitro sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato di un toro precedentemente testato per la IVF. Il terreno di fecondazione utilizzato è stato il Fert-TALP modificato (Parrish et al., 1986) senza glucosio e senza albumina sierica bovina (BSA), supplementato con 30  $\mu$ g/ml eparina, 30  $\mu$ M penicillamina, 15  $\mu$ M ipotaurina, 0.15  $\mu$ M epinefrina e 1% di BS (IVF-TALP).

Le paillettes di seme sono state scongelate in acqua a 37 °C per 40 secondi e aperte in una eppendorf sterile. Il seme è stato posto in una provetta da 15 ml sulla superficie di un gradiente Percoll discontinuo costituito da 2 ml di 80% e 2 ml di 45% di Isopercoll disciolto in una soluzione Tyrode's modificata (Parrish et al 1986) senza glucosio e BSA (Sperm-TALP). La provetta è stata centrifugata per 25 minuti a 1500 rpm, in modo da selezionare gli spermatozoi vitali. Il pellet ottenuto è stato risospeso con 2 ml di Sperm-Talp e ricentrifugato per due volte a 1100 rpm e 900 rpm. Dopo l'ultimo lavaggio il pellet è stato diluito con il medium

IVF-TALP in modo da ottenere una concentrazione finale nei pozzetti di fecondazione di  $1 \times 10^6$  spermatozoi/ml.

I COC maturi, in gruppi da 25, sono stati trasferiti, previo lavaggio nell'IVF-TALP, nei pozzetti di fecondazione contenenti ciascuno 300  $\mu$ l di medium ricoperto da olio minerale. I gameti sono stati coincubati per 20-22 ore a 39 °C in atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub>.

### ***Coltura in vitro (IVC)***

Dopo 20-22 ore di co-incubazione i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fecondazione e sono stati trasferiti in 300  $\mu$ l di un terreno commerciale Medium 199 tamponato con 25 mM di HEPES e 2 mM di bicarbonato di sodio, addizionato di 2 mM di sodio piruvato, 1 mM di L-glutamina (TCM-HEPES) e ulteriormente supplementato con 5 % di BS. I presunti zigoti sono stati denudati delle cellule del cumulo tramite vortex alla massima velocità per 2 minuti. Successivamente sono stati recuperati mediante lavaggio della provetta e, previo lavaggio, trasferiti in gruppi da 30-50/pozzetto in 400  $\mu$ l di medium Synthetic Oviduct Fluid (SOF) modificato (Tervit et al., 1972), supplementato con 30  $\mu$ l/ml di aminoacidi essenziali, 10  $\mu$ l/ml di aminoacidi non essenziali, 0.34 mM tri-sodio citrato, 2.77 mM di mio-inositolo e 5% di BS.

La coltura in vitro è stata effettuata in camere modulari a tenuta (Forma Scientific, USA), nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5% di CO<sub>2</sub>, il 7% di O<sub>2</sub> e l'88% di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 39°C.

La valutazione del cleavage, ovvero la % di embrioni divisi a 2 cellule, e la resa embrionale, intesa come % di morule compatte e blastocisti sono state effettuate direttamente al giorno 7 di coltura (giorno 0 = giorno della fecondazione).

Le blastocisti prodotte nelle diverse condizioni sperimentali sono state vitrificate mediante cryotop (Kuwayama et al., 2005), scongelate e messe in coltura per 24 ore, al termine della quale ne è stata valutata la sopravvivenza.

### **Vitrificazione degli embrioni mediante cryotop**

La metodica Cryotop (Kuwayama et al., 2005) è una metodica innovativa, ideata sull'approccio dei minimi volumi di vitrificazione. Lo strumento che si utilizza è costituito da una sottile linguetta di polipropilene che misura 0,4 mm di diametro, 20 mm di lunghezza e 0,1 mm di spessore ed è collegata ad un manico di plastica provvisto di un cappuccio protettivo per la protezione del campione vitrificato durante lo stoccaggio in LN<sub>2</sub> (Kitazato Sully Co).

Tutti i media di vitrificazione sono stati preparati a partire da una soluzione base (SB1) di TCM-199 tamponato con 15 mM di HEPES e 5 mM di bicarbonato di sodio e supplementato con il 20% di siero fetale bovino (FCS). Questo protocollo di vitrificazione e riscaldamento è stato precedentemente impiegato da Vajta per vitrificare embrioni di bovino mediante Open Pulled Straw (OPS) (Vajta et al., 1998).

**Steps di vitrificazione:**

1. Dopo lavaggio in un terreno tamponato con HEPES, per eliminare i residui di olio minerale derivanti dai pozzetti di coltura, ciascun embrione è stato posto in 200 µl di SB1 contenente 7.5% di dimetilsolfossido (DMSO) e 7.5% di glicole etilenico (GE) (SV1) per 3 minuti;
2. l'embrione è stato poi trasferito, mediante una pipetta a bocca, in una goccia da 50 µl di SB1 allo 0.5 M di saccarosio contenente 16.5 % di DMSO e 16.5 % di GE (SV2) per 20-25 secondi;
3. l'embrione è stato caricato nel minor volume possibile di SV2 sull'estremità di un cryotop, immediatamente immerso in azoto liquido (LN<sub>2</sub>).

**Steps di riscaldamento:**

1. Il cryotop è stato prelevato dall'LN<sub>2</sub> e il film sottile, sul quale era stato precedentemente posto l'embrione, è stato immediatamente immerso in circa 1ml di SB1 allo 0.25 M di saccarosio per 1 minuto;
2. l'embrione recuperato è stato poi esposto per 5 minuti ad una seconda soluzione di riscaldamento costituita da SB1 allo 0.15 M di saccarosio;
3. successivamente, l'embrione è stato lavato due volte in medium SOF tamponato con HEPES e trasferito in gocce di 20 µl di SOF tamponato con bicarbonato di sodio (Tervit et al., 1972). Le piastrine con le gocce contenenti gli embrioni sono state poi messe in camere modulari a tenuta, nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5% di CO<sub>2</sub>, il 7% di O<sub>2</sub> e l' 88% di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 39 °C.

### **2.2.2.3 Disegno sperimentale**

#### **Esperimento 2.1**

Nell'Esperimento 2.1 un totale di 570 COC sono stati selezionati e maturati in vitro. Nel giorno 0 di coltura sono stati suddivisi a random in 4 gruppi sperimentali per valutare l'effetto di differenti concentrazioni di OPN aggiunte al terreno di fecondazione.

In modo specifico sono state confrontate 4 condizioni di fecondazione differenti:

- 1) Gruppo A, 182 oociti sono stati fecondati in IVF-TALP senza OPN (controllo)
- 2) Gruppo B, 191 oociti sono stati fecondati in IVF-TALP con 0.1  $\mu\text{g/ml}$  di OPN
- 3) Gruppo C, 189 oociti sono stati fecondati in IVF-TALP con 1  $\mu\text{g/ml}$  di OPN
- 4) Gruppo D, 190 oociti sono stati fecondati in IVF-TALP con 10  $\mu\text{g/ml}$  di OPN

Al giorno 7 di coltura sono state valutate le % di cleavage e di resa embrionale.

Questa prova è stata ripetuta 4 volte.

## **Esperimento 2.2**

Nell'esperimento 2.2, basandoci sui dati ottenuti dall'esperimento A, abbiamo approfondito lo studio sull'individuazione di una efficiente concentrazione di OPN sulla fecondazione. A tal proposito si è voluto aumentare la concentrazione della proteina in quanto, tranne che per la concentrazione di 10  $\mu\text{g/ml}$ , alle più basse concentrazioni non si è osservato

alcun effetto rispetto al controllo. Un totale di 829 COC sono stati selezionati e maturati in vitro. Nel giorno di fecondazione sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali:

- 1) Gruppo A, 211 oociti sono stati fecondati in IVF-TALP senza OPN (controllo)
- 2) Gruppo B, 209 oociti sono stati fecondati in IVF-TALP con 10 µg/ml di OPN
- 3) Gruppo C, 209 oociti sono stati fecondati in IVF-TALP con 20 µg/ml di OPN
- 4) Gruppo D, 200 oociti sono stati fecondati in IVF-TALP con 40 µg/ml di OPN

Al giorno 7 di coltura sono state valutate le % di cleavage e di resa embrionale.

Questa prova è stata ripetuta 3 volte.

### **Esperimento 2.3**

Nell'Esperimento 2.3, le blastocisti ottenute, al giorno 7 di coltura, nel gruppo controllo (N = 94), e nei gruppi trattati con 0.1 µg/ml (N = 26), 1 µg/ml (N = 34), 10 µg/ml (N = 67), 20 µg/ml (N = 23) e 40 µg/ml (N = 23) di OPN sono state vitrificate. Dopo 24 ore di coltura post-riscaldamento è

stata valutata la vitalità embrionale basandosi sulla riespansione del blastocele e sul ripristino di una normale morfologia.

### **Analisi statistica**

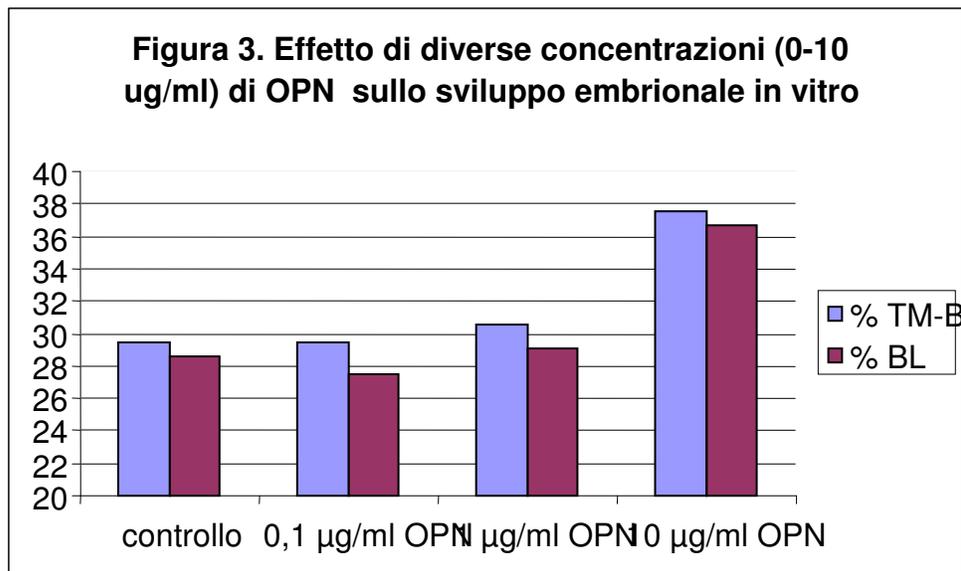
Negli Esperimenti 2.1 e 2.2 le differenze tra gruppi nelle percentuali di cleavage di TM-BI e di sole BI sono state analizzate mediante test del Chi quadro.

Nell'Esperimento 2.3, le differenze nelle percentuali di sopravvivenza a 24 ore fra i diversi trattamenti in ciascun esperimento sono stati analizzati mediante Chi quadro.

### **2.2.2.4 Risultati**

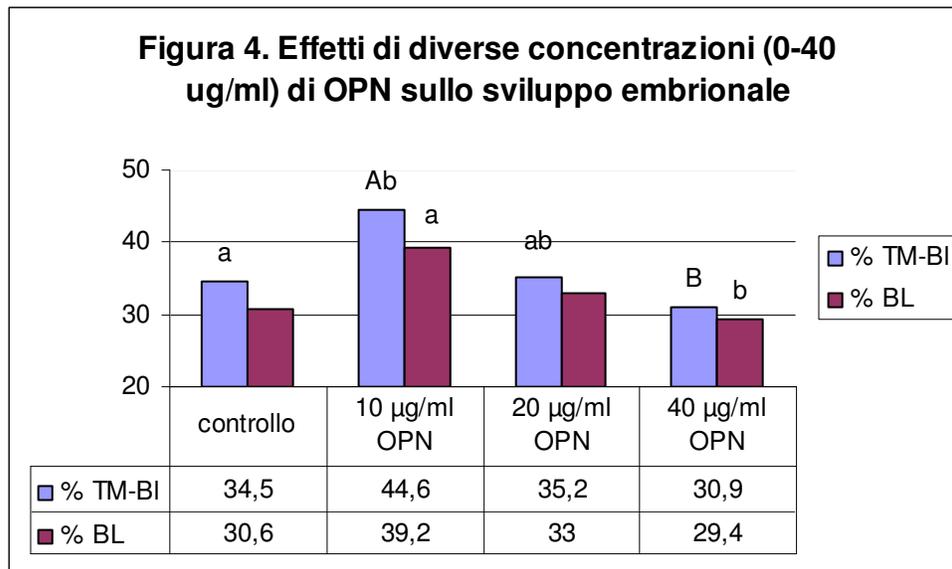
Nell'esperimento 2.1, dai confronti tra il controllo e le concentrazioni inferiori testate (0, 0.1, 1 e a 10 µg/ml) non sono emerse differenze nelle percentuali di cleavage (81.6, 78.2, 77.6 e 81.2 % rispettivamente nel controllo e nei gruppi trattati con 0.1, 1 e 10 µg/ml) di TM-BI (29.5, 29.5, 30.5 e 37.5 % rispettivamente nel controllo e nei gruppi trattati con 0.1, 1 e

10 µg/ml) e di BI (28.6, 27.5, 29.1 e 36.7 rispettivamente nel controllo e nei gruppi trattati con 0.1, 1 e 10 µg/ml) tra i gruppi (figura 3). E' stata, tuttavia, osservata una tendenza a valori più elevati di TM-BI e di BI alla concentrazione 10 µg/ml.



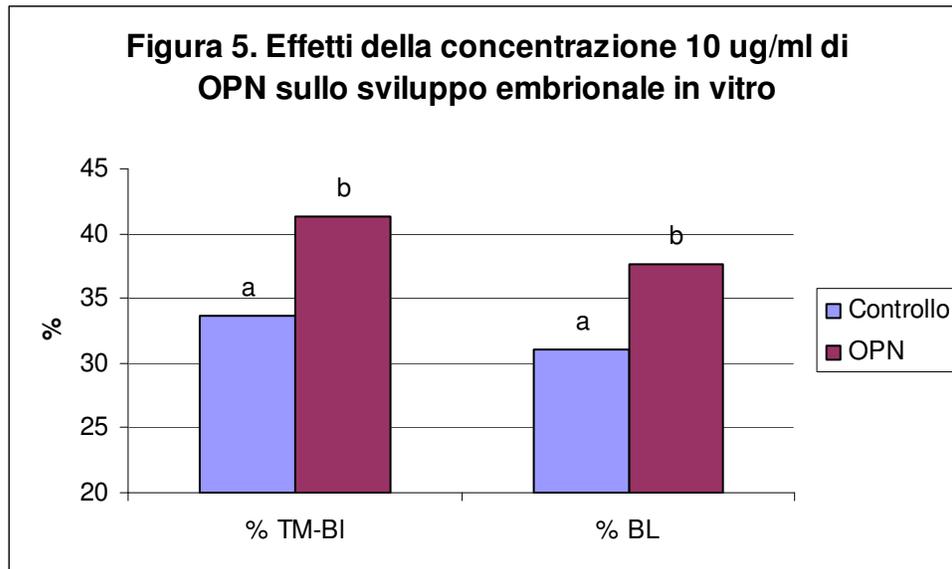
Per questo motivo, nell'Esperimento 2.2, sono state abbandonate le due concentrazioni di OPN inferiori e sono state testate le concentrazioni 10, 20 e 40 µg/ml di OPN, rispetto al controllo. In questo caso l'analisi dei dati ha evidenziato un miglioramento del cleavage (80.0 % vs 71.3 %) e della percentuale di TM-BI (44.6 vs 34.5 %) con 10 µg/ml di OPN rispetto al controllo, mentre non sono emerse differenze nelle percentuali di BI (39.2 vs

30.6, come mostrato nella figura 4. E' stato, inoltre, notato che l'effetto promuovente lo sviluppo embrionale, indicato dalla maggiore produzione di TM-BI, descritto con la concentrazione 10 µg/ml di OPN rispetto al controllo, scompare già alla concentrazione 20 µg/ml. E' stato osservato, addirittura, un decremento significativo nelle percentuali di TM-BI e di BI con la concentrazione 40 µg/ml rispetto a quella di 10 µg/ml.

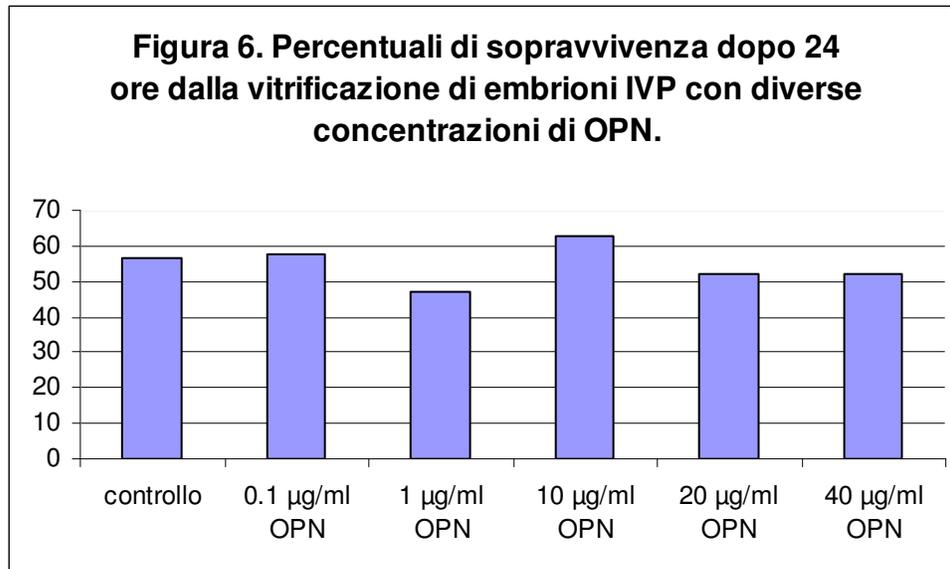


Comunque, il dato più saliente, che si evince dalla figura 5, è che, sul totale dei casi, l'OPN, alla concentrazione 10 µg/ml, ha determinato un incremento significativo delle percentuali di TM-BI (41.3 vs 33.6 % rispettivamente;  $P < 0.05$ ) e di sole BI 37.7 vs 31 % rispettivamente  $P < 0.05$ ),

rispetto al controllo, senza, però, influenzare la percentuale di cleavage (79.5 vs 76.6 % rispettivamente).



I risultati dell'esperimento 2.3, mostrati in figura 6, indicano che, a nessuna delle concentrazioni testate, l'OPN ha influenzato la sopravvivenza embrionale a 24 ore dallo scongelamento.



### 2.2.2.5 Discussione

Le biotecnologie innovative, applicate alla riproduzione animale, rappresentano una vera sfida per una radicale trasformazione della zootecnia e dei sistemi produttivi dei prossimi anni. La competitività degli allevamenti, in una prospettiva futura, dipenderà sempre più, da una parte dal miglioramento genetico e, quindi, delle produzioni, dall'altra dalla capacità di adeguamento alle esigenze del nuovo consumatore, sensibile alla qualità del prodotto e al benessere degli animali utilizzati per le produzioni. In questo scenario le biotecnologie della riproduzione assumono un ruolo

fondamentale in quanto consentono di programmare gli indirizzi selettivi e il loro conseguimento in tempi brevi.

La tecnologia della IVEP si propone come lo strumento elettivo per accelerare il contributo materno al miglioramento genetico perchè può essere impiegata nei casi in cui la tecnica di SO non è applicabile, come nei soggetti gravidi, aciclici, negli individui con occlusione tubarica, in presenza di patologie oviduttali-uterine, in animali prepuberi e in animali non responsivi ai trattamenti di stimolazione ormonale. Inoltre la suddetta tecnica consente, in un determinato intervallo di tempo, una produzione di embrioni per donatrice maggiore rispetto a qualsiasi altra tecnica oggi disponibile.

Il XXI sec. ha segnato una svolta nell'applicazione delle procedure biotecnologiche agli animali d'allevamento. Questa svolta è iniziata con la produzione del primo topo transgenico ad opera di Brinster et al. (1982), alla quale è seguita rapidamente la produzione della prima vacca, della prima pecora e dei primi maiali transgenici (Wall et al., 1992; Ebert and Schindler, 1993). Contemporaneamente è stata perfezionata la tecnica del sessaggio del seme bovino (Seidel et al., 1997, 1999; Seidel e Garner, 2002) e nel 1996 ad opera di Campbell et al. e Wilmut et al (1997) si è giunti alla clonazione della pecora Dolly a partire da cellule somatiche. Tuttavia lo sviluppo,

l'applicazione ed il perfezionamento di tutte queste tecniche all'avanguardia è strettamente dipendente dalle tecnologie riproduttive di base che prevedono la maturazione, la fertilizzazione e la coltura degli embrioni in vitro. Senza dei miglioramenti significativi della produzione embrionale in vitro, l'applicazione delle suddette tecniche biotecnologiche avanzate rimarrà sempre molto limitata ed estremamente costosa.

Sebbene nell'arco degli anni si sia ottenuto un notevole miglioramento dell'efficienza IVEP nella specie bovina, arrivando a rese medie in embrioni trasferibili di circa il 40 %, diverse problematiche restano irrisolte. E' noto che condizioni subottimali di coltura sono responsabili della minore percentuale di gravidanze che si ottengono dal trasferimento di embrioni prodotti in vitro rispetto a quelli ottenuti in vivo, nonché della più elevata incidenza di riassorbimenti e mortalità embrionali, del prolungamento della gestazione e della maggiore incidenza di anomalie fetali e neonatali che rientrano nella c.d. sindrome della macrosomia fetale e neonatale, o LOS, condizione spesso riscontrata nelle specie bovina ed ovina. Inoltre una minore vitalità degli embrioni prodotti in vitro è attestata dal ritardo di sviluppo, dal minor numero di cellule e ridotto metabolismo e da una bassa resistenza al congelamento. L'ottimizzazione dei sistemi di coltura è,

pertanto, una *conditio sine qua non* perché si giunga ad una maggiore diffusione della tecnologia IVEP nel mondo operativo.

Grazie a numerosi studi condotti nel corso degli ultimi 50 anni, si è giunto ad un sensibile miglioramento dell'efficienza IVEP ed all'acquisizione di maggiori conoscenze nel merito dei fabbisogni embrionali durante la coltura *in vitro*. Dalla coltura *in vivo*, nelle tube legate di un ospite intermedio (Galli et al., 1996), si è passati allo sviluppo di sistemi di co-coltura con cellule somatiche (Gandolfi et al., 1996) fino all'avvento dei media definiti (Tervit et al., 1972; Keskinetepe et al., 1996). Oggi la maggior parte degli sforzi dei ricercatori si concentra sulla ottimizzazione dei terreni di coltura definiti perché questi ultimi consentono di studiare le interazioni dinamiche tra gli embrioni e i vari costituenti dell'ambiente colturale, indispensabili ai fini del progresso scientifico. Le interazioni tra embrioni e cellule somatiche in coltura, invece, “mascherano” la vera natura dei fattori embriotrofici; inoltre la coltura in presenza di cellule e di siero è attualmente considerata un fattore predisponente nel determinismo della LOS.

La formulazione di terreni di coltura definiti ottimali assume, quindi, un'enorme importanza, in considerazione del fatto che l'ambiente colturale in cui si sviluppano gli embrioni *in vitro* condiziona profondamente tutti gli

eventi post-impianto. Nonostante tutti gli sforzi finora fatti da un gran numero di ricercatori nelle diverse parti del mondo, il miglior sistema di coltura rimane tuttora l'ovidutto, che fornisce un microambiente insostituibile, come indicato dal fatto che gli zigoti ottenuti mediante IVM ed IVF e coltivati in vivo sono di migliore qualità, si congelano meglio e danno percentuali di attecchimento e gravidanze a termine sovrapponibili a quelle riportate per gli embrioni da MOET. L'ovidutto è l'organo in cui si verificano la capacitazione spermatica, la reazione acrosomiale, la fertilizzazione e lo sviluppo embrionale precoce. Entrambi i gameti e gli embrioni vengono in contatto con l'epitelio tubarico e con le secrezioni presenti a questo livello. Ne consegue che la costituzione di terreni sintetici non può prescindere dalla composizione del microambiente tubarico.

Il primo terreno definito, denominato SOF, infatti, è stato formulato da Tervit et al nel 1972 (Tervit et al., 1972), sulla base della composizione del liquido tubarico di pecora. La messa a punto di una tecnica di cannulazione tubarica nella specie bovina (Carlson et al., 1970), per il prelievo giornaliero di fluido oviduttale (ODF), ha consentito di svolgere indagini biochimiche dell'ODF prelevato in corrispondenza dei diversi giorni del ciclo. Grazie a tale approccio, negli ultimi anni sono state identificate diverse proteine specifiche dell'ODF, che sono capaci di legarsi

ai gameti e agli embrioni. In diverse specie sono state individuate le c.d. proteine associate all'estro (EAP), che sono presenti a livello del fluido tubarico in concentrazioni elevate nella fase non luteinica del ciclo e, più precisamente, in prossimità del momento ovulatorio (Gerena e Killian, 1990; Sutton et al., 1984a; Gandolfi et al., 1989). E' stato anche dimostrato che queste proteine esplicano un ruolo importante nel processo di capacitazione spermatica, e, quindi, nell'acquisizione della capacità fecondante (King et al., 1994), e migliorano lo sviluppo embrionale (Nancarrow e Hill, 1994). Nel bovino è stata dimostrata l'interazione della EAP sia con il gamete maschile (King e Killian, 1994; Abe et al., 1995), sia con quello femminile (Wegner e Killian, 1991).

Diverse proteine dell'ODF sono state oggi identificate ed è verosimile che più fattori contribuiscano a creare l'ambiente ottimale perché gli eventi riproduttivi si compiano con successo. Alla luce di quanto detto si ritiene di estrema importanza l'individuazione di altre molecole chiave coinvolte attivamente nella regolazione degli eventi precoci della fecondazione e dell'embriogenesi. E' ipotizzabile, infatti, che l'introduzione di questi fattori nei terreni per la coltura in vitro possa tradursi in un miglioramento dello sviluppo embrionale.

Sulla base di queste osservazioni, si è ritenuto interessante rivolgere l'attenzione ad altre proteine dell'ODF, quali la BSA, l'OPN e la L-PGDS, con lo scopo iniziale di verificarne la capacità di interazione con il gamete femminile. Si è ritenuto interessante studiare la BSA innanzitutto perché rappresenta la proteina presente in maggiore concentrazione nell'ODF (Leese, 1988) ed inoltre, perché, data la sua funzione di accettore di colesterolo, è noto esercitare un effetto inducente la capacitazione del seme (Suzuki e Yanagimachi, 1989; Cross, 1998). L'OPN e la L-PGDS sono, invece, due proteine associate alla fertilità maschile, la cui espressione è maggiore nel liquido seminale di tori ad alta fertilità (Gerena et al., 1998; Cancel et al., 1997; Cancel et al., 1999), e sono entrambe presenti nell'ODF del bovino (Staros et al., 1998; Gabler et al., 2003).

I risultati del presente studio hanno dimostrato che le proteine dell'ODF esaminate sono capaci di interagire con gli oociti maturi a livello della ZP. Infatti l'osservazione con la microscopia confocale a fluorescenza ha fornito una chiara immagine della presenza e della uniforme distribuzione delle proteine in questione sulla ZP degli oociti maturati in vitro. Allo scopo di evidenziare se gli oociti maturati in vitro fossero in grado di legare le proteine presenti nell'ODF, gli stessi sono stati incubati in presenza ed assenza di ODF (ampollare e istmico). Le proteine esaminate sono state

trovate uniformemente distribuite a livello della ZP, sia quando gli oociti erano stati incubati solo in medium IVF, sia quando erano stati incubati nel medium IVF con il 50% di ODF, indipendentemente dalla regione anatomica di origine di quest'ultimo.

Un risultato inatteso è stato avere identificato le suddette proteine sulla ZP degli oociti non trattati con l'ODF, la qual cosa suggerisce che le stesse erano presenti a livello della ZP degli oociti prima ancora che questi venissero in contatto con l'ODF e, quindi, presumibilmente quando erano ancora all'interno del follicolo ovarico. Si potrebbe, quindi, ipotizzare che queste proteine siano prodotte dalle cellule follicolari o, comunque, che siano presenti nel fluido follicolare. Una conferma di tale ipotesi è data dal risultato ottenuto nel presente studio sugli oociti immaturi, che pure hanno mostrato un'elevata affinità di legame con le proteine, e da altri studi che hanno dimostrato la presenza dell'OPN a livello ovarico. L'OPN è stata, infatti, identificata nell'ovario di donna (Brown et al. 1992) ed il suo RNAm è stato rinvenuto a livello ovarico nel topo (Craig e Denhardt, 1991). Non esistono informazioni riguardo la localizzazione delle altre due proteine a livello ovarico ma i dati emersi nel corso della presente prova suggeriscono un comportamento simile per le tre proteine. Queste osservazioni lascerebbero supporre un possibile ruolo di queste proteine in una fase

precedente all'ovulazione e, quindi, verosimilmente nel processo di maturazione della cellula uovo.

La mancanza di fluorescenza, osservata negli oociti maturi non denudati e in quelli maturi dezonati, ha evidenziato una specifica affinità di legame recettoriale delle proteine d'interesse per la zona pellucida degli oociti. Le cellule del cumulo non sono state in grado di interagire con queste proteine, nonostante accompagnino l'oocita e circondino la zona pellucida dello stesso dal momento della loro maturazione (nel follicolo ovarico) a quello della fecondazione (nell'ovidutto).

Nel caso però, degli oociti dezonati c'è da dire che la digestione della zona pellucida con protease può aver provocato la perdita anche dei recettori di superficie della membrana plasmatica per queste proteine. Non possiamo, quindi, affermare con certezza che il risultato negativo ottenuto sia sicuramente vero. Comunque, dalle immagini fornite dal microscopio confocale, di sezioni dell'oocita su differenti piani, la membrana plasmatica non è apparsa fluorescente, almeno nel caso della BSA e dell'OPN, mentre la localizzazione della L-PGDS è risultata essere più profonda, interessando sia lo spazio perivitellino sia la membrana vitellina. Di conseguenza possiamo affermare che, se pure a livello della membrana plasmatica fossero presenti dei recettori per la BSA e l'OPN, in condizioni fisiologiche,

fino a quando la ZP degli oociti è in situ, le proteine in questione non arrivano ad oltrepassare la ZP per legarsi ad essa.

Nella seconda parte del lavoro abbiamo voluto approfondire lo studio di una delle proteine esaminate, per valutare un eventuale ruolo in alcuni processi riproduttivi e, delle proteine esaminate, l'OPN ci è sembrata quella più interessante per i seguenti motivi. In primo luogo la presenza dell'OPN è stata dimostrata nei tessuti riproduttivi maschili (Cancel et al., 1999; Siiteri et al., 1995) e femminili (Brown et al. 1992; Craig e Denhardt, 1991), nel liquido seminale di tori bovini (Cancel et al., 1997), nel secreto delle ghiandole accessorie (Moura et al. 2006) e nell' ODF. Questa proteina è stata identificata anche a livello dell'epitelio dell'ampolla, delle vescicole seminali (Cancel et al., 1999), sulle cellule del Sertoli, sull'epitelio dei tubuli seminiferi, sulla membrana plasmatica della coda e della testa dello spermatozoo (Siiteri et al., 1995). Inoltre è stato dimostrato che nella specie suina l'OPN esercita un effetto positivo sulla reazione acrosomiale, riduce la polispermia e incrementa l'efficienza della fertilizzazione (Hao et al., 2006).

Un altro aspetto interessante è dato dall'osservazione che questa proteina risulta maggiormente espressa nel liquido seminale e nel secreto delle ghiandole accessorie di tori ad alta fertilità (Moura et al. 2006) e che un

pretrattamento con il secreto delle ghiandole accessorie di tori iperfertili migliora la capacità fecondante di semi ipofertili (Henault et al., 1995).

L'insieme di queste osservazioni suggerisce che l'OPN potrebbe svolgere un ruolo importante in alcuni eventi riproduttivi, quali la capacitazione, la reazione acrosomiale, la fertilizzazione e lo sviluppo embrionale.

Pertanto si è ritenuto opportuno esaminare, nella seconda parte del presente lavoro, l'effetto di diverse concentrazioni dell'OPN sulla capacitazione e sulla reazione acrosomiale spermatica. La capacitazione è stata valutata indirettamente, osservando la reazione acrosomiale dopo induzione con lisofosfatidilcolina, agente noto per indurre efficacemente la reazione acrosomiale in vitro solo in spermatozoi capacitati. E' stato anche valutato lo stato acrosomiale in un campione di seme appena scongelato, per avere un'idea dell'incidenza della perdita acrosomiale patologica, conseguente, ad esempio, ai danni da congelamento. In nessuno degli spermatozoi sono state trovate anomalie acrosomiali allo scongelamento, suggerendo che le percentuali di spermatozoi con reazione acrosomiale dopo induzione in vitro, qui riportate, esprimano effettivamente le percentuali di spermatozoi capacitati. Anche se il controllo con eparina ha dato i migliori risultati, riconfermando quest'agente come l'agente capacitante per

eccellenza, l' OPN, ad entrambe le concentrazioni testate, ha dato, comunque, delle percentuali di spermatozoi vivi capacitati superiori rispetto al gruppo controllo. E' stato, dunque, dimostrato un ruolo dell'OPN nel processo di capacitazione spermatica.

E' opportuno precisare che nel gruppo di controllo era presente anche la BSA, in quanto necessaria per ridurre la tossicità della lisofosfatidilcolina. Nonostante sia noto che la BSA svolga un'azione inducente la capacitazione, la percentuale di spermatozoi capacitati in questo caso era nettamente inferiore, indicando che la BSA da sola non è in grado di promuovere efficacemente il processo di capacitazione del seme in vitro. D'altra parte nei più comuni terreni utilizzati per la IVF si utilizzano sia la BSA che l'eparina. Sarebbe interessante verificare, in un futuro studio, se esista un'interazione tra l'OPN e l'eparina, ovvero se l'aggiunta di OPN in presenza di eparina possa tradursi in un effetto sinergico sulla capacitazione spermatica.

Nell'Esperimento 2 della seconda parte del lavoro si è voluto verificare se l'OPN, aggiunta al terreno di IVF, possa migliorare la fertilizzazione e lo sviluppo embrionale. I risultati dello studio hanno dimostrato che l'OPN, alla concentrazione di 10 µg/ml, pur non influenzando la fertilizzazione, come indicato dalle percentuali di cleavage

sovrapponibili a quelle del gruppo controllo, effettivamente migliora quantitativamente lo sviluppo embrionale in vitro, come attestato dalle maggiori percentuali sia di embrioni trasferibili in toto (TM + BI) sia di sole BI. Questo effetto promuovente lo sviluppo embrionale, però, scompare già alla concentrazione di 20 µg/ml e a 40 µg/ml si osserva già un decremento significativo delle rese embrionali, ad indicare probabilmente l'inizio di un effetto tossico. A differenza di quanto riportato nel suino (Hao et al., 2006), nel nostro studio la fertilizzazione non è stata migliorata mentre l'effetto positivo è stato osservato sullo sviluppo embrionale successivo; inoltre la concentrazione ottimale da noi individuata nel bovino è stata 10 volte maggiore rispetto a quella utilizzata nel suino.

La qualità degli embrioni prodotti e, quindi, la resistenza alla crioconservazione, però, non sono risultate migliorate, nel presente studio, come si desume dalle percentuali di sopravvivenza osservate a 24 ore di coltura post-riscaldamento degli embrioni vitrificati, che sono state simili in tutti i gruppi. E' pur vero che l'unico vero parametro indicatore di sopravvivenza alla crioconservazione è dato dalla percentuale di gravidanze ottenibile dopo ET in animali riceventi, la qual cosa, purtroppo, non è stata effettuata, per mancanza di tempo. Si ritiene importante, alla luce dei

risultati promettenti ottenuti grazie all'utilizzo di questa proteina durante l'IVF, verificare questo aspetto nel corso di studi futuri.

### **2.2.2.6 Conclusioni**

In conclusione i risultati del presente lavoro hanno dimostrato che alcune proteine dell'ODF ed, in particolare, la BSA, l'OPN e la L-PGDS, sono capaci di interagire con gli oociti sia immaturi che maturi, a livello della ZP. L'evidenziazione delle proteine in questione anche negli oociti preovulatori lascerebbe ipotizzare un ruolo delle stesse in una fase anche antecedente a quella postulata nell'ipotesi di partenza.

E' stato, inoltre, dimostrato che l'OPN svolge un ruolo nell'induzione del processo di capacitazione e, dato ancora più interessante, che promuove lo sviluppo embrionale in vitro. Ne consegue la possibilità di utilizzare questa proteina come supplemento di un sistema di coltura definito per incrementare la resa embrionale. I risultati ottenuti in questo lavoro suggeriscono di approfondire, in studi futuri, le indagini mirate all'individuazione di altre molecole che, ancora oggi, nonostante i tangibili progressi scientifici in questo campo, rendono l'ovidutto un ambiente insostituibile per la coltura embrionale in vitro.

## Riferimenti bibliografici

- Abe, H., Y. Sendai, T. Satoh, and H. Hoshi. 1995.** Secretory products of bovine oviductal epithelial cells support the viability and motility of bovine spermatozoa in culture in vitro 126. *J. Exp. Zool.* 272:54-61.
- Abeydeera, L. R., W. H. Wang, R. S. Prather, and B. N. Day. 1998.** Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: Fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biology of Reproduction* 58:1316-1320.
- Agca, Y., R. L. Monson, D. L. Northey, O. A. Mazni, D. M. Schaefer, and J. J. Rutledge. 1998.** Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths 23. *Theriogenology* 50:147-162.
- Albelda, S. M. and C. A. Buck. 1990.** Integrins and other cell adhesion molecules 108. *FASEB J.* 4:2868-2880.
- Almeida, E. A., A. P. Huovila, A. E. Sutherland, L. E. Stephens, P. G. Calarco, L. M. Shaw, A. M. Mercurio, A. Sonnenberg, P. Primakoff, D. G. Myles, and J. M. White. 1995.** Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor 116. *Cell* 81:1095-1104.
- Anas, M. K. I., M. Shimada, and T. Terada. 1998.** Possible role for phosphatidylinositol 3-kinase in regulating meiotic maturation of bovine oocytes in vitro *Theriogenology* 50:347-356.
- Apparao, K. B., M. J. Illera, S. A. Beyler, G. E. Olson, K. G. Osteen, M. H. Corjay, K. Boggess, and B. A. Lessey. 2003.** Regulated expression of osteopontin in the peri-implantation rabbit uterus . *Biol Reprod* 68:1484-1490.
- Apparao, K. B., M. J. Murray, M. A. Fritz, W. R. Meyer, A. F. Chambers, P. R. Truong, and B. A. Lessey. 2001.** Osteopontin and its receptor alphavbeta(3) integrin are coexpressed in the human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially . *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86:4991-5000.
- Arav, A. 2001.** Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report 24. *Theriogenology* 55:1561-1565.
- Archibong, A. E., R. M. Petters, and B. H. Johnson. 1989.** Development of porcine embryos from one- and two-cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid 128. *Biol Reprod* 41:1076-1083.
- Ashkar, S., G. F. Weber, V. Panoutsakopoulou, M. E. Sanchirico, M. Jansson, S. Zawaideh, S. R. Rittling, D. T. Denhardt, M. J. Glimcher, and H. Cantor. 2000.** Eta-1 (osteopontin): An early component of type-1 (cell-mediated) immunity *Science* 287:860-864.

- Avery, B., V. Madison, and T. Greve. 1991.** Sex and Development in Bovine In vitro Fertilized Embryos *Theriogenology* 35:953-963.
- Babcock, D. F. and D. R. Pfeiffer. 1987.** Independent elevation of cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms 71. *J. Biol Chem.* 262:15041-15047.
- Baldassarre, H., C. C. Furnus, D. G. deMatos, and H. Pessi. 1996.** In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: Alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology* 45:707-717.
- Barr, S. H. and G. Oliphant. 1981.** Sulfate incorporation into macromolecules produced by cultured oviductal epithelium 75. *Biol Reprod* 24:852-858.
- Bautista, D. S., Z. Saad, A. F. Chambers, K. S. Tonkin, F. P. OMalley, H. Singhal, S. Tokmakejian, V. Bramwell, and J. F. Harris. 1996.** Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: Basal levels in pre- and postmenopausal women 96. *Clinical Biochemistry* 29:231-239.
- Bavister, B. D. 1988.** Role of Oviductal Secretions in Embryonic Growth-In vivo and In vitro 29. *Theriogenology* 29:143-154.
- Behboodi, E., G. B. Anderson, R. H. Bondurant, S. L. Cargill, B. R. Kreuzscher, J. F. Medrano, and J. D. Murray. 1995.** Birth of Large Calves That Developed from in Vitro-Derived Bovine Embryos *Theriogenology* 44:227-232.
- Betteridge, K. J. and J. E. Flechon. 1988.** The Anatomy and Physiology of Pre-Attachment Bovine Embryos *Theriogenology* 29:155-187.
- Blondin, P. and M. A. Sirard. 1995.** Oocyte and Follicular Morphology As Determining Characteristics for Developmental Competence in Bovine Oocytes  
1. *Molecular Reproduction and Development* 41:54-62.
- Boice, M. L., R. D. Geisert, R. M. Blair, and H. G. Verhage. 1990.** Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus *Biol Reprod* 43:457-465.
- Bondoc, O. L., C. Smith, and J. P. Gibson. 1989.** A review of breeding strategies for genetic improvement of dairy cattle in developing countries *Animal Breeding Abstract* 57:819-829.
- Boni, R., S. Roviello, and L. Zicarelli. 1996.** Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46:899-909.
- Borland, R. M., J. D. Biggers, C. P. Lechene, and M. L. Taymor. 1980.** Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube 67. *J. Reprod Fertil.* 58:479-482.

**Brackett, B. G., D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans, and M. A. Dressel. 1982.** Normal development following in vitro fertilization in the cow Biol Reprod 27:147-158.

**Brinster, R. L., H. Y. Chen, R. Warren, A. Sarthy, and R. D. Palmiter. 1982.** Regulation of metallothionein--thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs. Nature 296:39-42.

**Brown, C. R. and W. K. Cheng. 1986.** Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo 120. J. Embryol. Exp. Morphol. 92:183-191.

**Brown, L. F., B. Berse, W. L. Van de, A. Papadopoulos-Sergiou, C. A. Perruzzi, E. J. Manseau, H. F. Dvorak, and D. R. Senger. 1992.** Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces 6. Mol. Biol Cell 3:1169-1180.

**Bruck, I., B. Synnestvedt, and T. Greve. 1997.** Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares Theriogenology 47:1157-1167.

**Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ.** Secreted proteins of the oviduct. Cells Tissues Organs. 2000;166(2):165-79. Review.

**Buhi, W. C., J. W. Van Wert, I. M. Alvarez, M. M. Dones-Smith, and M. A. Bernhisel. 1989.** Synthesis and secretion of proteins by postpartum human oviductal tissue in culture 124. Fertil. Steril. 51:75-80.

**Calzada, L., E. L. Salazar, and H. Macias. 1991.** Hyperpolarization/depolarization on human spermatozoa 63. Arch. Androl 26:71-78.

**Campbell, K. H., J. McWhir, W. A. Ritchie, and I. Wilmut. 1996.** Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line Nature 380:64-66.

**Cancel, A. M., D. A. Chapman, and G. J. Killian. 1997.** Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma Biol Reprod 57:1293-1301.

**Cancel, A. M., D. A. Chapman, and G. J. Killian. 1999.** Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract Biol Reprod 60:454-460.

**Carlson, D., D. L. Black, and G. R. Howe. 1970.** Oviduct secretion in the cow J. Reprod Fertil. 22:549-552.

**Carnegie, J. A., R. Durnford, J. Algire, and J. Morgan. 1997.** Evaluation of mitomycin-treated Vero cells as a co-culture system for IVM/IVF-derived bovine embryos Theriogenology 48:377-389.

**Carnero, A. and J. C. Lacal. 1998.** Wortmannin, an inhibitor of phosphatidyl-inositol 3-kinase, induces oocyte maturation through a MPF-MAPK-dependent pathway FEBS Letters 422:155-159.

**Carroll, J., K. T. Jones, and D. G. Whittingham. 1996.** Ca<sup>2+</sup> release and the development of Ca<sup>2+</sup> release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization Rev. Reprod 1:137-143.

**Carvalho, R. V., M. R. DelCampo, A. T. Palasz, Y. Plante, and R. J. Mapletoft. 1996.** Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7 Theriogenology 45:489-498.

**Chastant-Maillard, S., H. Quinton, J. Lauffenburger, N. Cordonnier-Lefort, C. Richard, J. Marchal, P. Mormede, and J. P. Renard. 2003.** Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows Reproduction 125:555-563.

**Chen, J., K. Singh, B. B. Mukherjee, and J. Sodek. 1993.** Developmental expression of osteopontin (OPN) mRNA in rat tissues: evidence for a role for OPN in bone formation and resorption Matrix 13:113-123.

**Chen, J., Q. Zhang, C. A. McCulloch, and J. Sodek. 1991.** Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin) Histochem. J. 23:281-289.

**Conti, M., C. B. Andersen, F. J. Richard, K. Shitsukawa, and A. Tsafiriri. 1998.** Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. Mol. Cell Endocrinol. 145:9-14.

**Craig, A. M. and D. T. Denhardt. 1991.** The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone Gene 100:163-171.

**Cross, N. L. 1998.** Role of cholesterol in sperm capacitation 72. Biol Reprod 59:7-11.

**Daiter, E., A. Omigbodun, S. Wang, D. Walinsky, J. F. Strauss, J. R. Hoyer, and C. Coutifaris. 1996.** Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts Endocrinology 137:1785-1790.

**David, A., B. G. Brackett, C. R. Garcia, and L. Mastroianni, Jr. 1969.** Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the Fallopian tube 32. J. Reprod Fertil. 19:285-289.

- Davis, B. K., R. Byrne, and B. Hungund. 1979.** Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro *Biochim. Biophys. Acta* 558:257-266.
- de Matos, D. G. and C. C. Furnus. 2000.** The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53:761-771.
- Dekel, N. 1996.** Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev. Reprod* 1:82-88.
- deMatos, D. G., C. C. Furnus, and D. F. Moses. 1997.** Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells *Biology of Reproduction* 57:1420-1425.
- deMatos, D. G., C. C. Furnus, D. F. Moses, A. G. Martinez, and M. Matkovic. 1996.** Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability *Molecular Reproduction and Development* 45:451-457.
- Ebert, K. M. and J. E. S. Schindler. 1993.** Transgenic Farm-Animals - Progress Report 6. *Theriogenology* 39:121-135.
- Eckert, J. and H. Niemann. 1995.** In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media *Theriogenology* 43:1211-1225.
- Ehrenwald, E., R. H. Foote, and J. E. Parks. 1990.** Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol. Reprod Dev.* 25:195-204.
- El Banna, A. A. and E. S. Hafez. 1970.** Egg transport in beef cattle *J. Anim Sci.* 30:430-432.
- Ellington, J. E. 1991.** The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature *Cornell Vet.* 81:313-328.
- Engle, C. C., D. M. Witherspoon, and C. W. Foley. 1970.** Technique for continuous collection of equine oviduct secretions. *Am. J. Vet. Res.* 31:1889-1896.
- Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989.** Co-Culture of Early Cattle Embryos to the Blastocyst Stage with Oviductal Tissue Or in Conditioned Medium *Journal of Reproduction and Fertility* 85:715-720.
- Eyestone, W. H., M. L. Leibfriedrutledge, D. L. Northey, B. G. Gilligan, and N. L. First. 1987.** Culture of One-Cell and 2-Cell Bovine Embryos to the Blastocyst Stage in the Ovine Oviduct *Theriogenology* 28:1-7.

- Falkow, S. 1991.** Bacterial entry into eukaryotic cells *Cell* 65:1099-1102.
- Farin, P. W. and C. E. Farin. 1995.** Transfer of Bovine Embryos Produced In-Vivo Or In-Vitro - Survival and Fetal Development. *Biology of Reproduction* 52:676-682.
- Farin, P. W., C. E. Farin, A. E. Crosier, P. Blondin, and J. E. Alexander. 1999.** Effect of in vitro culture and maternal insulin-like growth factor-I on development of bovine conceptuses. *Theriogenology* 51:238.
- Fazleabas, A. T. and H. G. Verhage. 1986.** The Detection of Oviduct-Specific Proteins in the Baboon (*Papio-Anubis*). *Biology of Reproduction* 35:455-462.
- Flores, M. E., M. Norgard, D. Heinegard, F. P. Reinholt, and G. Andersson. 1992.** RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. *Exp. Cell Res.* 201:526-530.
- Florman, H.M., Corron, M.E., Kim, T.D. and Babcock, D.F.** Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis *Dev Biol.* 1992 Aug;152(2):304-14.
- Franzen, A. and D. Heinegard. 1985.** Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem. J.* 232:715-724.
- Fukuda, Y. and N. Enari.** Developmental ability of in vitro matured-in vitro fertilized bovine embryos derived from oocytes with homogeneous or heterogenous ooplasm 4. *Proc.7th World Conf on Anim Prod* 2, 276-277. 1993. Abstract
- Fukui, Y., Fukushima, M. and Ono, H.** Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation in vitro *J Exp Zool.* 1983 Apr;226(1):137-42.
- Fusi, F. M., M. Vignali, M. Busacca, and R. A. Bronson. 1992.** Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Mol. Reprod Dev.* 31:215-222.
- Gabler, C., D. A. Chapman, and G. J. Killian. 2003.** Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle *Reproduction* 126:721-729.
- Galli, C. and G. Lazzari. 1996.** Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* 42:371-379.
- Gandolfi, F. and R. M. Moor. 1987.** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod Fertil.* 81:23-28.

**Gandolfi, F., T. A. Brevini, L. Richardson, C. R. Brown, and R. M. Moor. 1989.** Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function in embryonic development. *Development* 106:303-312.

**Garcia, A. and M. Salaheddine. 1998.** Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50:575-585.

**Gardner, D. K. and M. Lane. 1998.** Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum. Reprod* 13 Suppl 3:148-159.

**Garlow, J. E., H. Ka, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, L. A. Jaeger, and F. W. Bazer. 2002.** Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biol Reprod* 66:718-725.

**Gasparrini, B., G. Neglia, R. Di Palo, G. Campanile, and L. Zicarelli. 2000.** Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology* 54:1537-1542.

**Gerena, R. L. and G. J. Killian. 1990.** Electrophoretic Characterization of Proteins in Oviduct Fluid of Cows During the Estrous-Cycle. *Journal of Experimental Zoology* 256:113-120.

**Gerena, R. L., D. Irikura, Y. Urade, N. Eguchi, D. A. Chapman, and G. J. Killian. 1998.** Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biology of Reproduction* 58:826-833.

**Geshi, M., M. Yonai, M. Sakaguchi, and T. Nagai. 1999.** Improvement of in vitro co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Theriogenology* 51:551-558.

**Geshi, M., N. Takenouchi, N. Yamauchi, and T. Nagai. 2000.** Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biology of Reproduction* 63:1730-1734.

**Goldberg, H. A. and G. K. Hunter. 1995.** The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 760:305-308.

**Gordon, I. 1994.** pp. 170-226 In G. J. Persley [ed.], *Laboratory production of cattle embryos*. CAB International, Wallingford.

**Grippe AA, Way AL, Killian GJ.** Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1995 Sep;105(1):57-64.

**Grippe, A. A., M. A. Henault, S. H. Anderson, and G. J. Killian. 1992.** Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 75:58-65.

**Grippe, A. A., S. H. Anderson, D. A. Chapman, M. A. Henault, and G. J. Killian. 1994.** Cholesterol, phospholipid and phospholipase activity of ampullary and isthmus fluid from the bovine oviduct. *J. Reprod Fertil.* 102:87-93.

**Grisart, B., A. Massip, and F. Dessy. 1994.** Cinematographic Analysis of Bovine Embryo Development in Serum-Free Oviduct-Conditioned Medium. *Journal of Reproduction and Fertility* 101:257-264.

**Hafez, E. S. E. 1987.** Transport and survival of gametes. pp. 181-185 In E. S. E. Hafez [ed.], *Reproduction in farm animals*. Lea & Febiger, Philadelphia.

**Handrow, R.R., First, N.L. and Parrish, J.J.** Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool.* 1989 Nov;252(2):174-82.

Hanenberg, E. H. A. T. and van Wagendonk-de Leeuw A.M. Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocytes effects of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 47, 158. 1995. Abstract

**Hao, Y., N. Mathialagan, E. Walters, J. Mao, L. Lai, D. Becker, W. Li, J. Critser, and R. S. Prather. 2006.** Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod* 75:726-733.

**Harper, M. J. K. 1988.** Gamete and zygote transport. pp. 103-134 In E. Knobil and J. D. Neill [eds.], *The physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.

**Hashimoto, S., K. Saeki, Y. Nagao, N. Minami, M. Yamada, and K. Utsumi. 1998.** Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 49:1451-1463.

**Hasler, J. F. 2000.** In vitro culture of bovine embryos in Menezes's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Animal Reproduction Science* 60:81-91.

**Hasler, J. F., W. B. Henderson, P. J. Hurtgen, Z. Q. Jin, A. D. Mccauley, S. A. Mower, B. Neely, L. S. Shuey, J. E. Stokes, and S. A. Trimmer. 1995.** Production, Freezing and Transfer of Bovine Ivf Embryos and Subsequent Calving Results. *Theriogenology* 43:141-152.

**HEAP, R. B. 1962.** Some chemical constituents of uterine washings: a method of analysis with results from various species. *J. Endocrinol.* 24:367-378.

**Henault, M. A. and G. J. Killian. 1993.** Composition and morphology of lipid droplets from oviduct epithelial cells. *Anat. Rec.* 237:466-474.

**Henault, M. A., G. J. Killian, J. F. Kavanaugh, and L. C. Griel, Jr. 1995.** Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biol Reprod* 52:390-397.

**Hill, D. J., Marshall, J. T., and Nancarrow, C. D. 1992.** The role of an oestrus-associated oviductal glycoprotein on early ovine embryo development. 127, pp. 104. Lawson Research Institute, St Joseph's Health Centre, London, Ontario, Canada. Proceedings of the Australian Society of Reproductive Biology.

**Hinrichs, K. 1998.** Production of embryos by assisted reproduction in the horse 1. *Theriogenology* 49:13-21.

**Holm, P. and H. Callesen. 1998.** In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr. Dev.* 38:579-594.

**Homa, S. T. 1995.** Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Mol. Reprod Dev.* 40:122-134.

**Horvat, B., H. Vrcic, and I. Damjanov. 1992.** Changes related to the oestrous cycle in the expression of endometrial and oviductal proteins of mice. *J. Reprod Fertil.* 95:191-199.

**Hotte, S. J., E. W. Winqvist, L. Stitt, S. M. Wilson, and A. F. Chambers. 2002.** Plasma osteopontin - Associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer* 95:506-512.

**Hsueh, S. Y. and A. J. W. Hsueh. 1997.** Hormonal regulation of apoptosis - An ovarian perspective *Trends in Endocrinology and Metabolism* 8:207-213.

**Hu, D. D., E. C. K. Lin, N. L. Kovach, J. R. Hoyer, and J. W. Smith. 1995.** A Biochemical-Characterization of the Binding of Osteopontin to Integrins Alpha(V)Beta(1) and Alpha(V)Beta(5). *Journal of Biological Chemistry* 270:26232-26238.

**Hunter, R. H. F. 1986.** Peri-Ovulatory Physiology of the Oviduct, with Special Reference to Sperm Transport, Storage and Capacitation. *Development Growth & Differentiation* 28:5-6.

**Hunter, R. H. F. and I. Wilmut. 1983.** The Rate of Functional Sperm Transport Into the Oviducts of Mated Cows. *Animal Reproduction Science* 5:167-173.

**Hunter, R. H., R. A. Lawson, and L. A. Rowson. 1972.** Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. *J. Reprod Fertil.* 30:325-328.

**Hynes, R. O. 1992.** Integrins - Versatility, Modulation, and Signaling in Cell-Adhesion. *Cell* 69:11-25.

**Hyttel, P., H. Callesen, and T. Greve. 1989.** A Comparative Ultrastructural-Study of In vivo Versus In vitro Fertilization of Bovine Oocytes. *Anatomy and Embryology* 179:435-442.

**Isberg, R. R. 1991.** Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science* 252:934-938.

**Isberg, R. R. and J. M. Leong. 1990.** Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60:861-871.

**Johnson, G. A., R. C. Burghardt, F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2003.** Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* 69:1458-1471.

**Johnson, G. A., R. C. Burghardt, T. E. Spencer, G. R. Newton, T. L. Ott, and F. W. Bazer. 1999.** Ovine osteopontin: II. Osteopontin and alpha(v)beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period *Biol Reprod* 61:892-899.

**Johnston, L. A., A. M. Donoghue, S. J. O'Brien, and D. E. Wildt. 1991.** Culture medium and protein supplementation influence in vitro fertilization and embryo development in the domestic cat. *J. Exp. Zool.* 257:350-359.

**Kane, M. T. 1979.** Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. *Biol Reprod* 20:323-332.

**Kapur, R. P. and L. V. Johnson. 1985.** An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev. Biol* 112:89-93.

**Kapur, R. P. and L. V. Johnson. 1986.** Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J. Exp. Zool.* 238:249-260.

**Kavanaugh, J. F., A. A. Grippo, and G. J. Killian. 1992.** Cannulation of the bovine ampullary and isthmic oviduct. *J. Invest Surg.* 5:11-17.

**Keskintepe, L. and B. G. Brackett. 1996.** In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biology of Reproduction* 55:333-339.

- Keskintepe, L., C. L. Burnley, and B. G. Brackett. 1995.** Production of Viable Bovine Blastocysts in Defined In-Vitro Conditions. *Biology of Reproduction* 52:1410-1417.
- Khatir, H., P. Lonergan, J. L. Touze, and P. Mermillod. 1998.** The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non surgical embryo transfer. *Theriogenology* 50:1201-1210.
- Killian, G. J., D. A. Chapman, and L. A. Rogowski. 1993.** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 49:1202-1207.
- Killian, G. J., D. A. Chapman, J. F. Kavanaugh, D. R. Deaver, and H. B. Wiggin. 1989.** Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J. Reprod Fertil.* 86:419-426.
- King, R. S., S. H. Anderson, and G. J. Killian. 1994.** Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J. Androl* 15:468-478.
- King, W. A., B. R. Yadav, K. P. Xu, L. Picard, M. A. Sirard, A. Verini-Supplizi, and K. J. Betteridge. 1991.** The Sex-Ratios of Bovine Embryos Produced In vivo and In vitro. *Theriogenology* 36:779-788.
- Kitiyant, Y., C. Tocharus, M. Areekijseree, and K. Pavasuthipaisit. 1995.** Swamp buffalo oocytes from transvaginal ultrasound-guided aspiration fertilized and co-cultured in vitro with bovine oviductal epithelial cells. *Theriogenology* 43:250.
- Klentzeris, L. D., S. Fishel, H. McDermott, K. Dowell, J. Hall, and S. Green. 1995.** A positive correlation between expression of beta 1-integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Hum. Reprod* 10:728-733.
- Kohri, K., S. Nomura, Y. Kitamura, T. Nagata, K. Yoshioka, M. Iguchi, T. Yamate, T. Umekawa, Y. Suzuki, H. Sinohara, and . 1993.** Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *J. Biol Chem.* 268:15180-15184.
- Kovacs A., Foote R.H.: 1992** Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnic and Histochemistry* 67:119-124.
- Kovacs, A. and R. H. Foote. 1992.** Viability and Acrosome Staining of Bull, Boar and Rabbit Spermatozoa. *Biotechnic & Histochemistry* 67:119-124.
- Kreiss, T. and R. Vale. 1993.** Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins. 1 ed. Oxford University Press, Oxford.
- Kruip, T. A. M. and J. H. G. denDaas. 1997.** In vitro produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47:43-52.

- Kubota, T., Q. Zhang, J. L. Wrana, R. Ber, J. E. Aubin, W. T. Butler, and J. Sodek. 1989.** Multiple forms of SppI (secreted phosphoprotein, osteopontin) synthesized by normal and transformed rat bone cell populations: regulation by TGF-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:1453-1459.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. 2005** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* Sep;11(3):300-8;
- Lazzari, G., G. Crotti, P. Turini, C. Notari, and C. Galli.** Supplementation of essential and non essential aminoacids during IVF improves the quality of bovine embryos fertilised in medium SOF. *Proceeding of the Assoc Eur Trans Embr* , 180. 1999. Abstract
- Leese, H. J. 1988.** The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod Fertil.* 82:843-856.
- Lefebvre, R., M. C. Lo, and S. S. Suarez. 1997.** Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol Reprod* 56:1198-1204.
- Leighton, P. A., J. R. Saam, R. S. Ingram, and S. M. Tilghman. 1996.** Genomic imprinting in mice: Its function and mechanism. *Biology of Reproduction* 54:273-278.
- Lenz, R. W., G. D. Ball, M. L. Leibfried, R. L. Ax, and N. L. First. 1983.** In vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes Are Temperature-Dependent Processes. *Biology of Reproduction* 29:173-179.
- Lessey, B. A., L. Damjanovich, C. Coutifaris, A. Castelbaum, S. M. Albelda, and C. A. Buck. 1992.** Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J. Clin. Invest* 90:188-195.
- Liaw, L., M. Almeida, C. E. Hart, S. M. Schwartz, and C. M. Giachelli. 1994.** Osteopontin Promotes Vascular Cell-Adhesion and Spreading and Is Chemotactic for Smooth-Muscle Cells In-Vitro. *Circulation Research* 74:214-224.
- Lindner, G. M. and R. W. Wright. 1983.** Bovine Embryo Morphology and Evaluation 1. *Theriogenology* 20:407-416.
- Lippes, J. and P. V. Wagh. 1989.** Human oviductal fluid (hOF) proteins. IV. Evidence for hOF proteins binding to human sperm. *Fertil. Steril.* 51:89-94.
- Lippes, J., J. Krasner, L. A. Alfonso, E. D. Dacalos, and R. Lucero. 1981.** Human oviductal fluid proteins. *Fertil. Steril.* 36:623-629.
- Looney, C. R., B. R. Lindsey, C. L. Gonseth, and D. L. Johnson. 1994.** Commercial Aspects of Oocyte Retrieval and In-Vitro Fertilization (Ivf) for Embryo Production in Problem Cows. *Theriogenology* 41:67-72.

- Lorton, S. P. and N. L. First. 1979.** Hyaluronidase does not disperse the cumulus oophorus surrounding bovine ova. *Biol Reprod* 21:301-308.
- Lu, K. H., I. Gordon, M. Gallagher, and H. McGovern. 1987.** Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* 121:259-260.
- Luedtke, C. C., M. D. McKee, D. G. Cyr, M. Gregory, M. T. Kaartinen, J. Mui, and L. Hermo. 2002.** Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. *Biology of Reproduction* 66:1437-1448.
- Madan, M. L., M. S. Chauhan, S. K. Singla, and R. S. Manik. 1994.** Pregnancies Established from Water-Buffalo (*Bubalus-Bubalis*) Blastocysts Derived from In-Vitro Matured, In-Vitro Fertilized Oocytes and Cocultured with Cumulus and Oviductal Cells. *Theriogenology* 42:591-600.
- Majerus, V., R. De Roover, D. Etienne, S. Kaidi, A. Massip, F. Dessy, and I. Donnay. 1999.** Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology* 52:1169-1179.
- Malyankar, U. M., M. Scatena, K. L. Suchland, T. J. Yun, E. A. Clark, and C. M. Giachelli. 2000.** Osteoprotegerin is an alpha(v)beta(3)-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 275:20959-20962.
- Mantovani, R., Rota, A., Penzo, N., and Bittante, G.1999.** Comparison among oocytes recovery methods for bovine embryo production in vitro. pp. 235-237. Istituto di Urologia, IRCSS Ospedale Maggiore, Milano. Proceedings ASPA 13th Congress.
- Mastroianni, L., Jr., M. Urzua, and R. Stambaugh. 1970.** Protein patterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation. *Fertil. Steril.* 21:817-820.
- Mcevoy, T. G., J. J. Robinson, C. Carolan, M. E. Staines, P. J. Broadbent, and K. D. Sinclair. 1999.** Ovine fetal development following embryo culture in synthetic oviductal fluid with added ammonium. *Theriogenology* 51:247.
- Mcevoy, T. G., K. D. Sinclair, P. J. Broadbent, K. L. Goodhand, and J. J. Robinson. 1998.** Post-natal growth and development of Simmental calves derived from in vivo or in vitro embryos. *Reprod Fertil. Dev.* 10:459-464.
- McKee, M. D. and A. Nanci. 1995.** Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein 26. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 760:177-189.

- McMillan, W. H., M. J. Donnison, J. G. Thompson, and S. F. Cox. 1999.** Development during mid to late pregnancy following either in vitro embryo transfer or artificial insemination in cattle. *Theriogenology* 51:228.
- McNutt, T. L. and G. J. Killian. 1991.** Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J. Androl* 12:244-252.
- McNutt, T., L. Rogowski, R. Vasilatos-Younken, and G. Killian. 1992.** Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. *Mol. Reprod Dev.* 33:313-323.
- Mermillod, P., A. Vansteenbrugge, C. Wils, J. L. Mourmeaux, A. Massip, and F. Dessy. 1993.** Characterization of the Embryotrophic Activity of Exogenous Protein-Free Oviduct-Conditioned Medium Used in Culture of Cattle Embryos. *Biology of Reproduction* 49:582-587.
- Merton, J. S., A. P. de Roos, E. Mullaart, L. de Ruigh, L. Kaal, P. L. Vos, and S. J. Dieleman. 2003.** Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59:651-674.
- Miyauchi, A., J. Alvarez, E. M. Greenfield, A. Teti, M. Grano, S. Colucci, A. Zamboninzone, F. P. Ross, S. L. Teitelbaum, D. Cheresch, and K. A. Hruska. 1991.** Recognition of Osteopontin and Related Peptides by An Alpha-V-Beta-3 Integrin Stimulates Immediate Cell Signals in Osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* 266:20369-20374.
- Moore, M. A., Y. Gotoh, K. Rafidi, and L. C. Gerstenfeld. 1991.** Characterization of a cDNA for chicken osteopontin: expression during bone development, osteoblast differentiation, and tissue distribution. *Biochemistry* 30:2501-2508.
- Moura, A. A., D. A. Chapman, and G. J. Killian. 2006.** Proteins of the accessory sex glands associated with the oocyte-penetrating capacity of cauda epididymal sperm from holstein bulls of documented fertility. *Mol. Reprod Dev.* 74:214-222.
- Mukherjee, A. B. 1972.** Normal progeny from fertilization in vitro of mouse oocytes matured in culture and spermatozoa capacitated in vitro. *Nature (London)* 397-398.
- Mukherjee, B. B., M. Nemir, S. Beninati, E. Cordella-Miele, K. Singh, I. Chackalaparampil, V. Shanmugam, M. W. DeVouge, and A. B. Mukherjee. 1995.** Interaction of osteopontin with fibronectin and other extracellular matrix molecules 2. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 760:201-212.
- Murray, S. C. and T. T. Smith. 1997.** Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertil. Steril.* 68:351-357.

**Nagai, T., J. Ding, and R. M. Moor. 1993.** Effect of Follicle Cells and Steroidogenesis on Maturation and Fertilization In vitro of Pig Oocytes. *Journal of Experimental Zoology* 266:146-151.

**Nagano, M., Y. Takahashi, and S. Katagiri. 1999.** In vitro fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 61:531-535.

**Nagashima, H., C. G. Grupen, R. J. Ashman, and M. B. Nottle. 1996.** Developmental competence of in vivo and in vitro matured porcine oocytes after subzonal sperm injection. *Molecular Reproduction and Development* 45:359-363.

**Nagata, A., Y. Suzuki, M. Igarashi, N. Eguchi, H. Toh, Y. Urade, and O. Hayaishi. 1991.** Human Brain Prostaglandin-D Synthase Has Been Evolutionarily Differentiated from Lipophilic-Ligand Carrier Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:4020-4024.

**Nancarrow, C. D. and J. L. Hill. 1994.** Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. *Cell Biol Int* 18:1105-1114.

**Niemann, H. and C. Wrenzycki. 2000.** Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology* 53:21-34.

**Noda, M., R. L. Vogel, A. M. Craig, J. Prah, H. F. DeLuca, and D. T. Denhardt. 1990.** Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:9995-9999.

**Oldberg, A., A. Franzen, and D. Heinegard. 1986.** Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83:8819-8823.

**OLDS, D. and N. L. VANDEMARK. 1957.** Composition of luminal fluids in bovine female genitalia. *Fertil. Steril.* 8:345-354.

**Omigbodun, A., P. Ziolkiewicz, C. Tessler, J. R. Hoyer, and C. Coutifaris. 1997.** Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: A model of paracrine control in the placenta?. *Endocrinology* 138:4308-4315.

**Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. 1986** Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*;25(4):591-600

**Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. 1988** Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*; 38:1171-1180.

**Parrish, J. J., C. I. Kim, and I. H. Bae. 1992.** Current Concepts of Cell-Cycle Regulation and Its Relationship to Oocyte Maturation, Fertilization and Embryo Development. *Theriogenology* 38:277-296.

**Parrish, J. J., J. L. Parrish, and N. L. First. 1984.** Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 112.

**Parrish, J. J., J. L. Suskoparrish, and N. L. First. 1986.** Capacitation of Bovine Sperm by Oviduct Fluid Or Heparin Is Inhibited by Glucose. *Journal of Andrology* 7:22.

**Parrish, J. J., J. Susko-Parrish, M. A. Winer, and N. L. First. 1988.** Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 38:1171-1180.

**Patarca, R., R. A. Saavedra, and H. Cantor. 1993.** Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev. Immunol.* 13:225-246.

**Perkins, J. L., L. Goode, W. A. Wilder, Jr., and D. B. Henson. 1965.** Collection of secretions from the oviduct and uterus of the ewe. *J. Anim Sci.* 24:383-387.

**Plante, L. and W. A. King. 1994.** Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. *J. Assist. Reprod Genet.* 11:515-529.

**Pollard, J. W., C. Plante, W. A. King, P. J. Hansen, K. J. Betteridge, and S. S. Suarez. 1991.** Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod* 44:102-107.

**Pratt, H. P. M. 1980.** Phospholipid-Synthesis in the Pre-Implantation Mouse Embryo. *Journal of Reproduction and Fertility* 58:237-248.

**Pratt, H. P. M. 1982.** Pre-Implantation Mouse Embryos Synthesize Membrane Sterols. *Developmental Biology* 89:101-110.

**Prince, C. W. and W. T. Butler. 1987.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Coll. Relat Res.* 7:305-313.

**Ptak, G., P. Loi, M. Dattena, M. Tischner, and P. Cappai. 1999.** Offspring from one-month-old lambs: Studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biology of Reproduction* 61:1568-1574.

- Quinn, P. and D. G. Whittingham. 1982.** Effect of Fatty-Acids on Fertilization and Development of Mouse Embryos *Invitro*. *Journal of Andrology* 3:440-444.
- Reinholt, F. P., K. Hultenby, A. Oldberg, and D. Heinegard. 1990.** Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:4473-4475.
- Restall, B. J. 1966.** The fallopian tube of the sheep. I. Cannulation of the fallopian tube. *Aust J. Biol Sci.* 19:181-186.
- Rittling, S. R. and K. E. Novick. 1997.** Osteopontin expression in mammary gland development and tumorigenesis. *Cell Growth Differ.* 8:1061-1069.
- Roberts, G. P., J. M. Parker, and H. W. Symonds. 1975.** Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. *J. Reprod Fertil.* 45:301-313.
- Robey, P. G., P. Bianco, and J. D. Termine. 1992.** The cell biology and molecular biochemistry of bone formation. pp. 241-263 In F. L. Coe and M. J. Mavus [eds.], *Disorders of Mineral Metabolism*. Raven Press, New York.
- Rodan, G. A. 1995.** Osteopontin Overview. *Osteopontin: Role in Cell Signalling and Adhesion* 760:1-5.
- Rodriguez, C. and G. Killian. 1998.** Identification of ampullary and isthmic oviductal fluid proteins that associate with the bovine sperm membrane. *Anim Reprod Sci.* 54:1-12.
- Ross, F. P., J. Chappel, J. I. Alvarez, D. Sander, W. T. Butler, M. C. Farach-Carson, K. A. Mintz, P. G. Robey, S. L. Teitelbaum, and D. A. Cheresch. 1993.** Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J. Biol Chem.* 268:9901-9907.
- Ruoslahti, E., N. A. Noble, S. Kagami, and W. A. Border. 1994.** Integrins. *Kidney Int Suppl* 44:S17-S22.
- Saeki, K., M. Hoshi, M. L. Leibfriedrutledge, and N. L. First. 1991.** *Invitro* Fertilization and Development of Bovine Oocytes Matured in Serum-Free Medium *Biology of Reproduction* 44:256-260.
- Safran, J. B., W. T. Butler, and M. C. Farach-Carson. 1998.** Modulation of osteopontin post-translational state by 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D-3 - Dependence on Ca<sup>2+</sup> influx. *Journal of Biological Chemistry* 273:29935-29941.
- Sagata, N. 1997.** What does Mos do in oocytes and somatic cells?. *Bioessays* 19:13-21.
- Scatena, M., M. Almeida, M. L. Chaisson, N. Fausto, R. F. Nicosia, and C. M. Giachelli. 1998.** NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J. Cell Biol* 141:1083-1093.

**Seidel, G. E. and D. L. Garner. 2002.** Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124:733-743.

**Seidel, G. E., C. H. Allen, L. A. Johnson, M. D. Holland, Z. Brink, G. R. Welch, J. K. Graham, and M. B. Cattell. 1997.** Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology* 48:1255-1264.

**Seidel, G. E., J. L. Schenk, L. A. Herickhoff, S. P. Doyle, Z. Brink, R. D. Green, and D. G. Cran. 1999.** Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52:1407-1420.

**Senger, D. R., C. A. Perruzzi, A. Papadopoulos, and D. G. Tenen. 1989.** Purification of A Human-Milk Protein Closely Similar to Tumor-Secreted Phosphoproteins and Osteopontin. *Biochimica et Biophysica Acta* 996:43-48.

**Senger, D. R., C. A. Perruzzi, and A. Papadopoulos. 1989.** Elevated Expression of Secreted Phosphoprotein-I (Osteopontin, 2Ar) As A Consequence of Neoplastic Transformation. *Anticancer Research* 9:1291-1299.

**Shamsuddin, M., B. Larsson, H. Gustafsson, S. Gustari, J. Bartolome, and H. Rodriguez-Martinez.** Comparative morphological evaluation of in vivo and in vitro produced bovine embryos. *12th Int Congr Anim.Reprod* [3], 1333-1335. 1992. Abstract

**Shapiro, S. S., J. P. Jentsch, and A. S. Yard. 1971.** Protein composition of rabbit oviducal fluid. *J. Reprod Fertil.* 24:403-408.

**Shiraga, H., W. Min, W. J. Vandusen, M. D. Clayman, D. Miner, C. H. Terrell, J. R. Sherbotie, J. W. Foreman, C. Przysiecki, E. G. Neilson, and J. R. Hoyer. 1992.** Inhibition of Calcium-Oxalate Crystal-Growth In vitro by Uropontin - Another Member of the Aspartic Acid-Rich Protein Superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:426-430.

**Shouffani, A. and B. I. Kanner. 1990.** Cholesterol is required for the reconstruction of the sodium- and chloride-coupled, gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J. Biol Chem.* 265:6002-6008.

**Siiteri, J. E., K. M. Ensrud, A. Moore, and D. W. Hamilton. 1995.** Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol. Reprod Dev.* 40:16-28.

**Sinclair, K. D., M. Kuran, F. E. Gebbie, R. Webb, and T. G. Mcevoy. 2000.** Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *Journal of Animal Science* 78:2670-2680.

- Sinclair, K. D., P. J. Broadbent, and D. F. Dolman. 1995.** In-Vitro Produced Embryos As A Means of Achieving Pregnancy and Improving Productivity in Beef-Cows. *Animal Science* 60:55-64.
- Sinclair, K. D., T. G. Mcevoy, E. K. Maxfield, C. A. Maltin, L. E. Young, I. Wilmut, P. J. Broadbent, and J. J. Robinson. 1999.** Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes. *Journal of Reproduction and Fertility* 116:177-186.
- Singh, K., J. L. Balligand, T. A. Fischer, T. W. Smith, and R. A. Kelly. 1995.** Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J. Biol Chem.* 270:28471-28478.
- Singh, K., M. W. DeVouge, and B. B. Mukherjee. 1990.** Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells. *J. Biol Chem.* 265:18696-18701.
- Sirard, M. A., J. J. Parrish, C. B. Ware, M. L. Leibfriedrutledge, and N. L. First. 1988.** The Culture of Bovine Oocytes to Obtain Developmentally Competent Embryos. *Biology of Reproduction* 39:546-552.
- Smith, C. 1988.** Applications of Embryo Transfer in Animal Breeding. *Theriogenology* 29:203-212.
- Smith, C. and Ruane J. 1987.** Use of sib testing as a supplement to progeny testing to improve the genetic merit of commercial semen in dairy cattle. *Can. J. anim. Sci.* 67:985-990.
- Smith, T. T. and R. Yanagimachi. 1989.** Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J. Reprod Fertil.* 86:255-261.
- Smith, T. T. and R. Yanagimachi. 1990.** The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod* 42:450-457.
- Sodek, J., J. Chen, S. Kasugai, T. Nagata, Q. Zhang, M. D. McKee, and A. Nanci. 1992.** Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation. pp. 297-306 In H. Slavkin and P. Price [eds.], *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Elsevier, New York.
- Stangl, M., B. Kuhholzer, U. Besenfelder, and G. Brem. 1999.** Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology* 52:709-716.
- Staros, A. L. and G. J. Killian. 1998.** In vitro association of six oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida. *J. Reprod Fertil.* 112:131-137.

- Stephoe, P. C. and R. G. Edwards. 1978.** Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2:366.
- Stone, S. L. and C. D. Hamner. 1975.** Biochemistry and physiology of oviductal secretions. *Gynecol. Invest* 6:234-252.
- Stricker, S. A. 1999.** Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental Biology* 211:157-176.
- Sutton, R., C. D. Nancarrow, A. L. Wallace, and N. W. Rigby. 1984.** Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. *J. Reprod Fertil.* 72:415-422.
- Suzuki, F. and R. Yanagimachi. 1989.** Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa. *Gamete Res.* 23:335-347.
- Taieb, F., C. Thibier, and C. Jesus. 1997.** On cyclins, oocytes, and eggs. *Molecular Reproduction and Development* 48:397-411.
- Tanaka, T., Y. Urade, H. Kimura, N. Eguchi, A. Nishikawa, and O. Hayaishi. 1997.** Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *Journal of Biological Chemistry* 272:15789-15795.
- Teepker, G. and D. S. Keller. 1989.** Selection of sires originating from a nucleus breeding unit for use in a commercial dairy population. *Can. J. anim. Sci.* 69:595-604.
- Tervit H. R., Whittingham D. G., Rowson L.E. 1972** Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*; 30 (3): 493-497;
- Tervit, H. R., D. G. Whittingham, and L. E. Rowson. 1972.** Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod Fertil.* 30:493-497.
- Tervit, H. R., J. F. Smith, L. T. McGowan, and P. A. Pugh.** Birth of lambs from embryos produced in vitro following laparoscopic recovery of follicular oocytes. *Proc Aust Soc Reprod Biol* 27, 68. 1995. Abstract
- Tezuka, K., T. Sato, H. Kamioka, P. J. Nijweide, K. Tanaka, T. Matsuo, M. Ohta, N. Kurihara, Y. Hakeda, and M. Kumegawa. 1992.** Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:911-917.
- Thibier, M. 1999.** The 1998 statistical figures for the worldwide embryo transfer industry: a data retrieval committee report. *Embryo Transfer Newsletter* 17:25-31.
- Thompson, J. G. 2000.** In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Anim Reprod Sci.* 60-61:263-275.

- Thompson, J. G., D. K. Gardner, P. A. Pugh, W. H. McMillan, and H. R. Tervit. 1995.** Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53:1385-1391.
- Thompson, J. G., N. W. Allen, L. T. McGowan, A. C. Bell, M. G. Lambert, and H. R. Tervit. 1998.** Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology* 49:1239-1249.
- Topper, E. K., G. J. Killian, A. Way, B. Engel, and H. Woelders. 1999.** Influence of capacitation and fluids from the male and female genital tract on the zona binding ability of bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 115:175-183.
- Tornell, J., H. Billig, and T. Hillensjo. 1991.** Regulation of Oocyte Maturation by Changes in Ovarian Levels of Cyclic-Nucleotides. *Human Reproduction* 6:411-422.
- Ujihara, M., Y. Urade, N. Eguchi, H. Hayashi, K. Ikai, and O. Hayaishi. 1988.** Prostaglandin-D2 Formation and Characterization of Its Synthetases in Various Tissues of Adult-Rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 260:521-531.
- Urzua, M. A., R. Stambaugh, G. Flickinger, and L. Mastroianni, Jr. 1970.** Uterine and oviduct fluid protein patterns in the rabbit before and after ovulation. *Fertil. Steril.* 21:860-865.
- Uto, N. and Y. Yamahama. 1996.** The motility and fertility of golden hamster sperm cultured in BSA-free medium. *Biol Cell* 88:23-28.
- Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth PJ., Jacobsen H., Greve T. and Callesen H. 1998** Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*; 51: 53-58
- Vajta, G., P. Holm, T. Greve, and H. Callesen. 1996.** Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology* 45:683-689.
- Van Soom, A., V. Van, I, A. R. Mahmoudzadeh, H. Deluyker, and A. de Kruif. 1992.** Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38:905-919.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, B. J. Aerts, and J. H. den Daas. 1998.** Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 49:883-894.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, E. Mullaart, A. P. de Roos, J. S. Merton, J. H. den Daas, B. Kemp, and L. de Ruigh. 2000.** Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53:575-597.

- Vandemark, N. L. and R. L. Hays. 1954.** Rapid sperm transport in the cow. *Fertil. Steril.* 5:131-137.
- Verhage, H. G., A. T. Fazleabas, and K. Donnelly. 1988.** The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology* 122:1639-1645.
- Voglmayr, J. K. and R. F. Sawyer, Jr. 1986.** Surface transformation of ram spermatozoa in uterine, oviduct and cauda epididymal fluids in vitro. *J. Reprod Fertil.* 78:315-325.
- von Wolff, M., T. Strowitzki, V. Becker, C. Zepf, S. Tabibzadeh, and C. J. Thaler. 2001.** Endometrial osteopontin, a ligand of beta3-integrin, is maximally expressed around the time of the "implantation window". *Fertil. Steril.* 76:775-781.
- Vrendenburgh-Wilberg WL, Parrish JJ. 1995** Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev*; 40:490-502
- Walker, S. K., K. M. Hartwich, and R. F. Seamark. 1996.** The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology* 45:111-120.
- Wall, R. J., H. W. Hawk, and N. Nel. 1992.** Making Transgenic Livestock - Genetic-Engineering on A Large-Scale. *Journal of Cellular Biochemistry* 49:113-120.
- Walters EM, Clark SG, Beebe DJ, Wheeler MB.** Mammalian embryo culture in a microfluidic device. *Methods Mol Biol.* 2004;254:375-82.
- Watson, A. J., P. De Sousa, A. Caveney, L. C. Barcroft, D. Natale, J. Urquhart, and M. E. Westhusin. 2000.** Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biology of Reproduction* 62:355-364.
- Watson, A. J., P. H. Watson, D. Warnes, S. K. Walker, D. T. Armstrong, and R. F. Seamark. 1994.** Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. *Biol Reprod* 50:715-724.
- Way, A. L., A. M. Schuler, and G. J. Killian. 1997.** Influence of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on sperm-egg binding and fertilization in vitro. *J. Reprod Fertil.* 109:95-101.
- Way, A. L., H. L. Hoffman, N. R. Shope, M. R. Miller, and G. J. Killian. 1998.** Immunodetection of a 40 kDa haptoglobin-like: Protein in bovine oviductal fluid (ODF) and reproductive tract tissues. *Biology of Reproduction* 58:86.

- Weber, G. F., S. Ashkar, M. J. Glimcher, and H. Cantor. 1996.** Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271:509-512.
- Weeth HJ and Herman HA (1952)** A histological and histochemical study of the bovine oviducts, uterus and placenta Research Bulletin # 501 University of Missouri Columbia, MO.
- Wegner, C. C. and G. J. Killian. 1991.** In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Mol. Reprod Dev.* 29:77-84.
- Weinreb, M., D. Shinar, and G. A. Rodan. 1990.** Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J. Bone Miner. Res.* 5:831-842.
- Whitaker, M. 1996.** Control of meiotic arrest. *Rev. Reprod* 1:127-135.
- Willis, P., K. N. Sekhar, P. Brooks, and R. A. Fayrer-Hosken. 1994.** Electrophoretic characterization of equine oviductal fluid. *J. Exp. Zool.* 268:477-485.
- Winston, N. 2001.** Regulation of early embryo development: functional redundancy between cyclin subtypes. *Reprod Fertil. Dev.* 13:59-67.
- Wrana, J. L., Q. Zhang, and J. Sodek. 1989.** Full Length Cdna Sequence of Porcine Secreted Phosphoprotein-I (Spp-I, Osteopontin). *Nucleic Acids Research* 17:10119.
- Wu, L., G. E. Exley, and C. M. Warner. 1998.** Differential expression of Ped gene candidates in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 59:941-952.
- Wurth, Y. A. and T. A. M. Kruip.** Bovine embryos production in vitro after selection of the follicles and oocytes. *Proc 12th Int Congr Anim Reprod* [1], 387-389. 1992. Abstract
- Xu, K. P., B. R. Yadav, W. A. King, and K. J. Betteridge. 1992.** Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol. Reprod Dev.* 31:249-252.
- Yamauchi, N., H. Sasada, E. Soloy, T. Dominko, K. Kikuchi, and T. Nagai. 1999.** Effects of hormones and osmolarity in the culture medium on germinal vesicle breakdown of porcine oocytes. *Theriogenology* 52:153-162.
- Yanagimachi R. 1988** Mammalian fertilization. In : Knobil E., Neill JD (eds). *The physiology of Reproduction*. New York Raven Press;: 135-185
- Yang, X., C. Kubota, H. Suzuki, M. Taneja, P. E. J. Bols, and G. A. Presicce. 1998.** Control of oocyte maturation in cows - Biological factors. *Theriogenology* 49:471-482.

**Yoon, K., R. Buenaga, and G. A. Rodan. 1987.** Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148:1129-1136.

**Yue, T. L., P. J. McKenna, E. H. Ohlstein, M. C. Farachcarson, W. T. Butler, K. Johanson, P. Mcdevitt, G. Z. Feuerstein, and J. M. Stadel. 1994.** Osteopontin-Stimulated Vascular Smooth-Muscle Cell-Migration Is Mediated by Beta(3) Integrin. *Experimental Cell Research* 214:459-464.