

**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**

**XX CICLO**

**Caratterizzazione del fluido oviduttale nella specie  
bufalina (*Bubalus bubalis*) durante il ciclo estrale**

**Tutor:**

**Chiar.mo Prof. Giuseppe Campanile**

**Candidato:**

**Dr. Domenico Vecchio**

**Coordinatore:**

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

**NOVEMBRE 2007**

# Indice

<b>1 Introduzione</b>	<b>pag.6</b>
<b>1.1 Potenzialità IVEP nel bufalo e ovidutto</b>	<b>pag.15</b>
<b>1.2 L'Ovidutto</b>	<b>Pag.18</b>
<b>1.2.1 Sviluppo</b>	<b>Pag.18</b>
<b>1.2.2 Conformazione e dimensioni</b>	<b>Pag.20</b>
<b>1.2.3 Struttura</b>	<b>Pag.24</b>
1.2.3.1 <i>Mucosa</i>	<b>Pag.24</b>
1.2.3.2 <i>Muscolare</i>	<b>Pag.25</b>
1.2.3.3 <i>Sierosa e sottosierosa</i>	<b>Pag.26</b>
<b>1.3 Interazione dei gameti con l'ovidutto</b>	<b>Pag.28</b>
<b>1.3.1 Captazione del complesso oocita-cumulo ooforo (COC)</b>	<b>Pag.28</b>
<b>1.3.2 Trasporto dell'oocita nell'ovidutto</b>	<b>Pag.31</b>
<b>1.3.3 Spermatozoi e ovidutto</b>	<b>Pag.33</b>
<b>1.3.4 Ormoni steroidei motilità dell'ovidutto e trasporto dei gameti</b>	<b>Pag.35</b>
<b>1.4 Fluido oviduttale</b>	<b>Pag.37</b>
<b>1.4.1 Formazione e velocità di secrezione</b>	<b>Pag.38</b>
<b>1.4.2 Ormoni steroidei e volume</b>	<b>Pag.41</b>
<b>1.4.3 Effetto di modulatori non steroidei sulla secrezione del fluido oviduttale</b>	<b>Pag.43</b>
<b>1.4.4 Sostanze purinergiche</b>	<b>Pag.45</b>
<b>1.4.5 Controllo del sistema nervoso autonomo</b>	<b>Pag.48</b>
<b>1.4.6. Prelievo dell'ODF</b>	<b>Pag.49</b>
<b>1.4.7 Composizione</b>	<b>Pag.50</b>
1.4.7.1 <i>Composizione ionica</i>	<b>Pag.51</b>
1.4.7.2 <i>Substrati energetici</i>	<b>Pag.53</b>
1.4.7.3 <i>Lipidi</i>	<b>Pag.56</b>
1.4.7.4 <i>Amminoacidi</i>	<b>Pag.58</b>
1.4.7.5 <i>Proteine</i>	<b>Pag.58</b>

1.4.7.5.1 <i>Glicoproteine specifiche dell'ovidutto</i>	<b>Pag.60</b>
1.4.7.5.2 <i>Glicoproteine ovidutto specifiche associate all'estro</i>	<b>Pag.64</b>
<b>1.4.8 Associazione delle proteine dell'ODF con i gameti</b>	<b>Pag.69</b>
<b>1.4.9 Funzioni dell'ODF</b>	<b>Pag.71</b>
<b>Parte Sperimentale</b>	<b>Pag.73</b>
<b>2 Scopo della tesi</b>	<b>Pag.74</b>
<b>3 Materiali e metodi</b>	<b>Pag.75</b>
<b>3.1 Cannulazione dell'ovidutto</b>	<b>Pag.76</b>
<b>3.1.1 Preparazione del catetere</b>	<b>Pag.76</b>
<b>3.1.2 Apparato di raccolta e stoccaggio del campione</b>	<b>Pag.77</b>
<b>3.1.3 Procedura chirurgica</b>	<b>Pag.79</b>
<b>3.2 Raccolta dei campioni</b>	<b>Pag.83</b>
<b>3.3 Valutazione della ciclicità e induzione del calore</b>	<b>Pag.84</b>
<b>3.4 Preparazione del campione e analisi biochimiche</b>	<b>Pag.86</b>
<b>3.4.1 Misurazione del volume</b>	<b>Pag.86</b>
<b>3.4.2 Ioni</b>	<b>Pag.87</b>
<b>3.4.3 Carboidrati</b>	<b>Pag.87</b>
<b>3.4.4 Fosfolipidi</b>	<b>Pag.89</b>
<b>3.4.5 Proteine</b>	<b>Pag.89</b>
<b>3.5 Analisi statistica</b>	<b>Pag.90</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>Pag.91</b>
<b>4.1 Volume</b>	<b>Pag.92</b>
<b>4.2 Ioni</b>	<b>Pag.95</b>
<b>4.3 Carboidrati</b>	<b>Pag.101</b>
<b>4.4 Fosfolipidi</b>	<b>Pag.105</b>
<b>4.5 Proteine</b>	<b>Pag.107</b>
<b>5 DISCUSSIONE</b>	<b>Pag.113</b>
<b>6 CONCLUSIONI</b>	<b>Pag.124</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>Pag.127</b>

*Alla mia famiglia ,  
ai miei amici,  
e a tutti quelli che  
hanno ancora voglia  
di farsi domande.....*

# **INTRODUZIONE**

# 1 Introduzione

L'allevamento del bufalo rappresenta un elemento fondamentale nell'economia delle zone del DOP "mozzarella di bufala campana" e, particolarmente in Campania dove insiste circa l'80% del patrimonio bufalino nazionale, producendo un indotto di rilevante impatto socio-economico. Nell'azienda bufalina l'ottimizzazione dei costi di produzione e la salvaguardia dei parametri utili ad ottenere una materia prima di qualità elevata, incrementa la redditività. L'intenso lavoro di ricerca e di selezione svolto nel corso degli anni nell'allevamento bufalino, ha prodotto come risultato un incremento della produzione di latte che è stata accompagnata dal miglioramento delle caratteristiche qualitative attribuibili principalmente alla razionalizzazione delle tecniche di allevamento (Amante et al., 2001).

Dal 1977 (anno dell'istituzione del libro genealogico) ad oggi la produzione media nazionale è aumentata di circa 600 kg/lattazione e la percentuale di grasso e proteine è passata da 6,4% e 4,3% rispettivamente a 8,3% e 4,7% (Amante et al., 2001). Il miglioramento quanti-qualitativo in definitiva è avvenuto lavorando sia su fattori ambientali, tra i quali spiccano quelli alimentari, sia sulla migliore conoscenza del potenziale produttivo dei singoli soggetti perseguito con l'istituzione dei controlli funzionali e l'introduzione di tecnologie innovative. Si è giunti così all'adozione di sistemi di allevamento più consoni alle esigenze nutrizionali e manageriali della specie.

La principale pecca di questo processo è rappresentato da un più lento miglioramento genetico della specie bufalina rispetto alle altre di interesse zootecnico. Infatti sebbene negli ultimi quarant'anni la specie bufalina è cresciuta sul nostro pianeta del 86% vs 34% di quella bovina (Gasparri, 2002), il minor impiego delle biotecnologie della riproduzione normalmente utilizzate per la bovina ha portato ad un ritardo nel progresso genetico di questa specie. Per accelerare il miglioramento genetico nel prossimo futuro si dovrà necessariamente utilizzare la selezione per via paterna, attraverso l'uso routinario dell'inseminazione strumentale, e per via materna con l'impiego di tecniche che massimizzino la produzione di vitelli da soggetti ad elevata produzione.

L'importanza fondamentale assunta dal miglioramento genetico, come mezzo per ammortizzare il costante aumento dei costi fissi di produzione, ha indotto molti ricercatori a focalizzare la propria attenzione sulle biotecnologie riproduttive. L'uso delle biotecnologie della riproduzione, ha contribuito in maniera decisiva all'evoluzione dell'allevamento negli ultimi 60 anni (Thibier, 2005), consentendo di porre le basi per una radicale trasformazione della zootecnia e dei sistemi produttivi.

A questo proposito sicuramente fondamentale risulta l'utilizzo di varie tecnologie quali: l'inseminazione strumentale (IS), la superovulazione (SO) e il trasferimento embrionale (ET), il sessaggio embrionale, la produzione embrionale in vitro (IVEP) e la

crioconservazione delle cellule germinali (spermatozoi ed oociti) e degli embrioni; tutte queste tecniche, già utilizzate nella specie bovina, risultano però di difficile applicazione e diffusione nella specie bufalina. In generale, il miglioramento genetico nei grandi mammiferi è ostacolato da numerosi fattori, tra i quali il lungo intervallo generazionale, con la produzione di un solo redo per anno (caratteristiche che rendono necessarie lunghe attese prima di riuscire ad ottenere una reale valutazione dei soggetti) e la ricombinazione genetica che avviene ad ogni fecondazione, fenomeno questo che non rende possibile prevedere il valore genetico del nuovo individuo a meno che non si ricorra alla valutazione delle produzioni delle figlie, mediante prove di progenie, nel caso dei maschi, oppure dei dati di lattazione, nel caso delle femmine. Ciononostante passi in avanti sono stati fatti negli ultimi anni grazie all'utilizzo dell'IS che ha favorito l'introduzione di genotipi desiderati nell'ambito di una popolazione in tempi notevolmente ridotti, contribuendo al miglioramento genetico per via paterna e dando così quella spinta necessaria alla diffusione di tale tecnica, oggi utilizzata in oltre il 70% della popolazione bovina italiana.

Proprio questi successi hanno spinto a credere che l'utilizzo dell'IS nell'ambito dei programmi di miglioramento genetico potesse dare degli ottimi risultati anche nella specie bufalina, in cui fino ad ora tali programmi sono stati concentrati prevalentemente ad ottenere risultati per via materna massimizzando la produzione di vitelli da soggetti ad elevata produzione.



Tutti i tentativi fino ad ora fatti hanno, però, evidenziato le numerose difficoltà che si incontrano quando si cerca di applicare tecniche, che hanno riscontrato notevoli successi in altre specie (Samper, 2001; Drost M. et al., 1999; Leboeuf B. et al., 1998; Singleton W.L., 2001), alla specie bufalina, la quale possiede caratteristiche fisiologiche profondamente diverse da quella bovina.

Innanzitutto va puntualizzata la spiccata tendenza alla stagionalità riproduttiva della bufala (Zicarelli, 1997a), la quale tende, per la sua origine tropicale, a concentrare i parti nei periodi dell'anno a giorno breve (fotoperiodo negativo); questa caratteristica, nel nostro paese, si va a scontrare con quella che è la maggiore richiesta di latte sul mercato che si osserva nei periodi primaverili-estivi, che corrispondono a quelli di maggiore consumo del principale prodotto della filiera bufalina: la mozzarella. La modulazione del calendario dei parti, attuata mediante la tecnica della destagionalizzazione, che consente di soddisfare le specifiche richieste di mercato, può complicare l'applicazione delle biotecnologie della riproduzione, come l'IS, nella specie bufalina come testimoniato dall'elevata incidenza della mortalità embrionale (Campanile et al., 2005). Inoltre, va considerato che nella bufala il raggiungimento della pubertà è ritardato rispetto alla bovina e altre caratteristiche, quali l'ampia variabilità della durata delle manifestazioni estrali, l'alta incidenza di calori silenti, una lunga inattività ovarica post-partum ed il riscontro di doppie manifestazioni estrali, rendono gli interventi di IS difficilmente programmabili, qualora

non si faccia ricorso alla tecnica dell'inseminazione a tempo fisso (Zicarelli, 1997a). Si può quindi evincere quanto la bufala si differenzi dalla bovina e quanto invece sia simile in molti aspetti agli ovi-caprini. Tutto ciò, insieme all'aumento dei costi di produzione, non ha fatto altro che spingere molti ricercatori a sfruttare le biotecnologie in campo riproduttivo per accelerare il miglioramento genetico della specie bufalina, rendendola così competitiva sul mercato.

Tra le varie tecnologie finora citate quelle che meglio si prestano ad ottenere in tempi brevi un rapido miglioramento genetico e ad esaltarne il contributo materno, sono sicuramente la SO e l'ET o MOET (Multiple Ovulations and Embryo Transfer). Per meglio comprendere l'importanza e la diffusione di queste tecnologie, basta pensare che più di mezzo milione di embrioni bovini sono stati trasferiti nel 2003, di cui il 40% sono stati congelati/scongelati e il 18% sono stati prodotti in vitro (Thibier, 2004).

La SO è una tecnica che consente di indurre ovulazioni multiple in animali che generalmente hanno un'unica ovulazione. Diverse esperienze hanno dimostrato, però, che esistono forti limitazioni all'utilizzo dei programmi di MOET nella bufala, specie in cui il recupero medio di embrioni è molto inferiore a quello che si osserva nella specie bovina: meno di 2 embrioni nella bufala (Zicarelli, 2001) e tra 7 e 10 nella bovina a seconda della razza e del trattamento di SO impiegato (Hasler et al., 2003; Baruselli et al., 2006). Da questi valori si può, quindi, chiaramente evidenziare quanto sia bassa nella bufala la

risposta alla SO (Misra, 1997; Zicarelli, 1997b); infatti, mentre nella bovina l'88 % degli animali risponde ai trattamenti, nella bufala questo valore scende al 55 %. Il minore recupero è dovuto alle caratteristiche fisiologiche intrinseche di questa specie quali ad esempio l'esigua popolazione di follicoli primordiali presenti nell'ovaio alla nascita, 20.000 vs 100.000 della vacca (Samad, Nasser, 1979; Danell, 1987; Le Van et al., 1989), alla minore incidenza di oociti di buona qualità nella bufala rispetto alla vacca (Boni et al., 1996) ed una minore adesione delle cellule della granulosa. Ci sono, comunque, molti casi in cui al momento del flushing si osserva un numero di corpi lutei (CL) sulla superficie delle ovaie superovulate nettamente superiore al numero di embrioni recuperati.

La difficoltà di ottenere risultati paragonabili a quelli avuti in altre specie mediante l'utilizzo della MOET, ha evidenziato negli ultimi anni una notevole crescita d'interesse verso l'IVEP.

Un fattore che ha sicuramente contribuito a considerare quest'ultima come una valida alternativa alla produzione embrionale in vivo è l'avvento della metodica dell'Ovum Pick Up (OPU). Questo procedimento consiste nel prelievo in vivo, per via transvaginale ecoguidata, di oociti immaturi da animali donatori noti, consentendo, grazie alla sua ripetibilità, il recupero di una notevole quantità di oociti che vengono poi introdotti nel sistema di IVEP. Quest'ultimo prevede una fase di maturazione degli oociti, una di fecondazione e la successiva messa in coltura dei presunti zigoti fino allo stadio di blastocisti, stadio in cui gli

embrioni possono essere trasferiti (ET) o sottoposti a sessaggio e/o congelamento. Questa tecnica, applicata per la prima volta in campo umano (Lenz et al., 1987), è stata utilizzata nel bufalo da Boni et al. (1993) e da Galli et al. (1998); questi ultimi autori (Galli et al., 1998) hanno, così, ottenuto i primi 3 vitelli bufalini nati dal trasferimento di embrioni prodotti da oociti recuperati con l'OPU, maturati e fecondati in vitro e trasferiti in ovidutto di pecora dopo due giorni dalla fecondazione.

I vantaggi nell'utilizzo della tecnica OPU sono dovuti alle sue maggiori possibilità di impiego, ovvero nei casi in cui la tecnica della SO non è applicabile aumentando quindi il numero delle possibili donatrici includendo soggetti che pur avendo un elevato valore genotipico non sarebbero stati idonei, come ad esempio nei soggetti in non perfette condizioni sanitarie del tratto genitale, gravidi fino al 4° mese, aciclici e prepuberi; in più è una tecnica che non interferisce con lo stato fisiologico della donatrice, in quanto non necessita di una stimolazione ormonale, è facilmente eseguibile, ripetibile, non incide negativamente sulla sfera riproduttiva dell'animale e consente di visualizzare e, quindi, pungere, tutti i follicoli ecograficamente visibili, a partire dal diametro di 2 mm (Janssen-Caspers et al., 1988). Un altro vantaggio è rappresentato dal fatto che ad ogni aspirazione dei follicoli, si ottiene un azzeramento del ciclo, che consente l'avvio di una nuova ondata, evitando così il fenomeno della dominanza di un follicolo sugli altri che comporterebbe l'atresia dei follicoli subordinati. Le ondate follicolari,

perciò, passano da 2-3 per ciclo estrale (21 giorni) a 6 nello stesso periodo di tempo, esitando nella produzione di un maggiore numero di oociti utilizzabili ai fini della produzione embrionale in vitro. Questo fa sì che l'OPU possa essere ripetuto bisettimanalmente ottenendo il massimo recupero di oociti e migliorandone, tra l'altro, anche la qualità. I dati più recenti in termini di percentuali di embrioni prodotti in vitro da oociti prelevati mediante OPU, ripetuto ogni 3-4 giorni, hanno mostrato un notevole miglioramento (Neglia et al., 2003) rispetto ai dati precedenti (Boni et al., 1993). E' stato dimostrato (Neglia et al., 2003) che l'efficienza IVEP migliora quando vengono utilizzati oociti prelevati mediante OPU rispetto a quelli ottenuti da ovaie da macello (29,7 vs. 19,9 % di blastocisti rispettivamente). Questa tecnica risulta competitiva rispetto alla MOET particolarmente nella specie bufalina. Infatti, se da un lato per ogni OPU effettuato si producono in media nella bovina 0.8 e nella bufala 0.2 embrioni da donatrici adulte rispetto ai 4.4 ed 1.7 ottenibili nell'ambito di un programma di MOET (Zicarelli, 2001), dall'altro, quest'ultimo non può essere ripetuto prima che siano trascorsi almeno 75 giorni per la bovina e 100 per la bufala. Ovviamente, non va dimenticato che sebbene l'efficienza di recupero nella bufala sia simile a quella che si riscontra nella bovina, il numero di oociti recuperati risulta nettamente inferiore per la diversa entità della popolazione follicolare che contraddistingue le due specie. Conseguentemente, con l'OPU la produzione media di embrioni prodotti ad esempio nell'arco di sei mesi aumenta significativamente (41 vs. 15

nella bovina e 11 vs. 5 nella bufala, rispettivamente con le tecniche OPU e MOET). Inoltre, se si considera che la bufala è una specie stagionale, è estremamente improbabile che l'animale possa rimanere ciclico per 6 mesi consecutivi e che quindi si possa raggiungere il numero di 5 embrioni prodotti con la MOET, dato che diventa così puramente teorico, avvalorando ancora di più i risultati ottenuti con l'utilizzo della tecnica dell'Ovum Pick Up. In più, va sottolineato che esiste un'elevata variabilità individuale nel reclutamento follicolare e che la ripetibilità di tale parametro consente di poter effettuare una selezione delle migliori donatrici sulla base dei primi 4 prelievi OPU (Gasparrini, 2002), rendendo la tecnica maggiormente competitiva in termini di resa embrionale; la tecnica OPU, quindi, apre nuove prospettive consentendo di incrementare ulteriormente l'efficienza riproduttiva della specie. La possibilità di utilizzare tale tecnica su animali di elevato valore produttivo, si traduce in una notevole riduzione dell'intervallo generazionale e, conseguentemente, in un'ulteriore accelerazione del progresso genetico.

## **1.1 Potenzialità IVEP nel bufalo e ovidutto**

Sebbene con la produzione embrionale in vitro si siano ottenuti embrioni bufalini trasferibili (Boni et al., 1994a; Boni et al., 1999; Chauhan et al., 1997; Gasparrini et al., 2000; Madan et al., 1994a; Madan et al., 1994b; Totey et al., 1992) ed alcuni trasferimenti di embrioni prodotti in vitro siano stati coronati da successo (Chauhan et al., 1997; Madan et al., 1994b; Totey et al., 1996), i risultati in termini di gravidanze portate a termine sono ancora poco soddisfacenti (Madan et al., 1996). Probabilmente, questa minore efficienza è imputabile al fatto che tale sistema è stato sviluppato sulla base di esperienze acquisite in altre specie facendo particolare riferimento alla specie bovina, mentre è verosimile che la fisiologia, il metabolismo e le esigenze di coltura dei gameti e degli embrioni bufalini siano differenti da quelli bovini e richiedano maggiori approfondimenti.

Infatti, sebbene l'efficienza dell'IVEP, in riferimento al numero di blastocisti prodotte sul totale dei complessi cumulo-oocita (COC) recuperati da ovaie da macello, è più alta nel bovino rispetto al bufalo soprattutto in termini di percentuale di divisione (cleavage;  $83.9 \pm 7.6$  vs  $64.8 \pm 9.6$ ), è interessante sottolineare che queste differenze tra le due specie si annullano quando le blastocisti prodotte vengono riferite agli zigoti ( $35.6 \pm 5.5$  vs  $31.3 \pm 7.9$ , rispettivamente nel bovino e nel bufalo). Questa osservazione suggerisce che il sistema di coltura in vitro degli embrioni bufalini è in grado di supportarne lo sviluppo e che,

probabilmente, la minor efficienza della IVEP nella specie bufalina sia riconducibile all'inadeguatezza dei sistemi di maturazione in vitro (IVM) e/o fecondazione in vitro (IVF). Risulta verosimile che una percentuale di oociti non riesce ad essere fecondata perché il sistema IVF è in qualche modo deficitario, essendo questo lo stesso utilizzato per il bovino, non tenendo conto delle differenze di specie. La caratterizzazione del liquido oviduttale del bufalo nelle diverse fasi del ciclo, essendo questo il microambiente in cui in vivo avvengono i processi di fecondazione e di sviluppo degli embrioni in fase di pre-impianto, permetterebbe la formulazione di un sistema IVM/IVF ottimale e di media di coltura in vitro dinamici e stadio dipendenti nonché specie-specifici, rispondenti ai diversi fabbisogni degli embrioni nelle diverse fasi dello sviluppo. Molti studi volti a caratterizzare il fluido tubarico nelle diverse fasi del ciclo estrale in varie specie, hanno fornito le basi per la sintesi di media sintetici per la IVF e la coltura in vitro (IVC) degli embrioni fino allo stadio compatibile con il trasferimento o con la crioconservazione e hanno consentito di individuare molecole specifiche che sembrano svolgere un ruolo attivo nei processi di fecondazione ed embriogenesi precoce. Nella prospettiva di migliorare sempre di più l'IVEP, è indispensabile la formulazione di sistemi definiti di coltura in vitro che mimino l'ambiente tubarico. Affinché questo avvenga è di fondamentale importanza lo studio e la comprensione degli eventi della riproduzione in vivo e del suo ambiente. In vivo, l'ambiente tubarico provvede al trasporto dei gameti maschili e femminili 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. E'opportuno enfatizzare che l'ambiente culturale nel quale si sviluppano gli embrioni condiziona profondamente tutti gli eventi post impianto.

## **1.2 L'Ovidutto**

Nei vertebrati superiori l'apparato genitale femminile, oltre a provvedere all'elaborazione dei gameti e degli ormoni sessuali, rappresenta anche la sede della fecondazione, e inoltre nei mammiferi euteri, ospita il feto in un tratto differenziato, e ne assicura la nutrizione durante la gravidanza.

L'apparato genitale femminile comprende tre grandi sezioni:

- 1) una sezione ghiandolare, costituita dalle ovaie;
- 2) una sezione tubulare, che rappresenta tre distretti molto differenziati sia per funzione che conformazione.

In quest'ultima riscontriamo le tube uterine che captano gli oociti e sono la sede della fecondazione; l'utero che riceve l'embrione dalle tube uterine, ne permette l'impianto e ne assicura la nutrizione fetale per la durata della gravidanza; la vagina impari nei mammiferi euteri, è separata dall'utero ad opera di un potente restringimento (collo uterino) si immette caudalmente in continuità con il seno uro-genitale;

- 3) seno urogenitale, comprendente una parte profonda formante il vestibolo della vagina e una regione dell'orificio che costituisce la vulva.

### **1.2.1 Sviluppo**

La differenziazione dell'apparato genitale femminile nei mammiferi domestici, inizia verso la fine del periodo embrionale e si accelera a partire dall'inizio del periodo fetale.

Le vie genitali della femmina derivano da ciascun lato dal condotto paramesonefrico o dotto di Muller. Questo condotto coesiste da prima con il dotto mesonefrico, nella femmina quest'ultimo regredisce persistendo solo delle vestige esili e variabili. La parte craniale di questi condotti, la prima a comparire, è inizialmente la più larga, ma in seguito si modifica. L'estremità caudale, al contrario all'inizio esile, si unisce nei mammiferi euteri alla sua omologa controlaterale.

La porzione del seno urogenitale subisce a questo livello un rimodellamento, che porta la terminazione dei due condotti a fondersi dorsalmente all'uretra. A partire da questo punto, la fusione procede in senso craniale, di modo che l'insieme dei due condotti disegna ben presto una Y la cui branca mediana costituisce il primordio della vagina. I due condotti paramesonefrici possono restare indipendenti a diversi livelli ed in particolare cranialmente alla vagina e dare luogo all'utero duplice, cranialmente ad un corpo dell'utero molto breve

(utero bipartito), cranialmente ad un corpo dell'utero quasi della stessa lunghezza dei corni (utero bicorni), ed infine, come nei primati possiamo riscontrare un utero semplice in cui il corpo dell'utero riceve direttamente le tube. In ogni caso la parte craniale dei condotti paramesonefrici non si unifica mai e forma da ciascun lato quella che viene definita tuba uterina.

### **1.2.2 Conformazione e dimensioni**

L'ovidutto (o tuba uterina o salpinge o tromba di falloppio) dei mammiferi è rappresentato da una struttura tortuosa e bilaterale che si estende, da ciascun lato, dal polo anteriore dell'ovaio al corrispondente corno uterino. Esso assicura la risalita del gamete maschile verso il luogo di fecondazione e la discesa dell'uovo fecondato in utero. La larghezza e il grado di circonvoluzione dell'ovidutto, che presenta strette relazioni anatomiche con l'ovaio, mostra delle variazioni nelle diverse specie domestiche (Hafez and Hafez, 2004).

Raramente il suo diametro è uniforme: in molte specie, essa è dapprima larga, poi si assottiglia nettamente avvicinandosi all'utero. La giunzione utero-tubarica si effettua con modalità variabili; spesso conservando la propria individualità attraverso la parete uterina. A causa del lungo decorso e delle flessuosità che esso descrive, l'ovidutto raggiunge una lunghezza totale sempre molto superiore alla distanza che separa l'ovaio dall'utero. Nelle specie in cui quasi non descrive tortuosità (donna e carnivori) è tre e perfino quattro volte più lunga dell'ovaio. Quando è notevolmente flessuosa come negli equidi, ruminanti, suidi, il rapporto può elevarsi fino a 5-6: nella scrofa la lunghezza è superiore ai 20 cm e nella cavalla e nella vacca raggiunge i 30 cm (Barone, 1994).

Procedendo dall'ovaio verso l'utero, nella tuba si distinguono tre regioni in base al diametro ed alla struttura interna (Weeth and Herman, 1952): infundibolare, ampollare, tratto slargato che si estende caudalmente

alla infundibulo, ed istmica , stretto segmento ricco di fibre muscolari che si porta fino al corno uterino (Priedkalns, 1982).

Le fimbrie che per Hafez and Hafez (2004) rappresentano un segmento dell'ovidutto, vengono considerate da Priedkalns (1982) come un processo digitiforme dell'infundibulo.

Le fimbrie, più corte e meno estensibili nella bovina rispetto alla cavalla (Sisson, 1986), sono libere, eccetto una, definita fimbria ovarica che rinforzata da un legamento del mesosalpinge si inserisce sul polo superiore dell'ovaio omolaterale assicurando la prossimità dell'ostio tubarico craniale alla superficie dell'ovaio stesso (Hafez and Hafez, 2004).

La regione infundibolare o padiglione, si apre verso l'ovaio con l'estremità slargata ad imbuto mentre con quella più stretta si continua nella porzione ampollare. L'infundibulo presenta numerose cellule secretorie e mantiene contatto con la cavità peritoneale mediante l'ostio dell'ovidutto (Menezo and Guerin, 1997). Si presenta con un diametro superiore rispetto a quello della regione ampollare e di quella istmica ed è incluso nella borsa ovarica (Priedkalns, 1982), quest'ultima nei ruminanti si presenta larga e aperta a differenza di altre specie (ratto e nel topo) in cui si presenta come un sacco chiuso (Hafez and Hafez, 2004).

In uno studio realizzato in bufale pluripare, Luktuke e Rao (1962) hanno messo in evidenza una lunghezza di 6,62 cm e 7,07cm e una larghezza di 3,24 cm e 3,26 cm rispettivamente per l'infundibulo

sinistro e destro. In accordo con El-Sheikh e Abdelhadi (1970), lo spessore dell'infundibulo in bufale varia da 0,5 a 0,6cm. Danell (1987) ha rilevato delle variazioni da 0,25 a 0,90 cm nel diametro dell'infundibulo delle manze bufaline di razza Surti.

Per Menezo e Guerin (1997), l'ampolla é la vera porzione secernente dell'ovidutto. Questa è la regione più sviluppata della tuba corrisponde a circa la metà della lunghezza dell'ovidutto (Hafez and Hafez, 2004) ed in caso di accoppiamento fertile è qui che ha luogo la fecondazione.

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

L'istmo presenta una parete spessa, per un maggiore sviluppo dello strato muscolare (Banks, 1992; Menezo e Guerin, 1997), si presenta tortuoso e con un lume ben definito (Dyce et al., 1996). Secondo Leese (1988), dall'infundibolo verso l'istmo si ha una riduzione del rapporto fra lo strato mucoso e muscolare. Nei ruminanti domestici, la giunzione dell'istmo con il corno uterino non è così netta come nella cavalla (Menezo and Guerin, 1997). Bovini e ovini presentano un flesso nella giunzione utero-tubarica, che è più facilmente evidente durante l'estro (Hafez and Hafez, 2004).

La lunghezza dell'ovidutto delle bovine adulte varia da 11,0 a 33,9 cm (Hunter, 1988; Monteiro, 1998; Oliveira et al., 2004; Perkins et al., 1954; Sisson, 1986), la lunghezza dell'ovidutto di manze di questa specie oscilla tra i 7,2 ed i 22,8 cm (Monteiro, 1998; Oliveira et al.,

2004) (Tabella 1). In bufale adulte, la lunghezza dell'ovidutto varia da 12,5 a 42,8cm (Luktuke and Rao, 1962; Sane et al., 1964, 1965) (Tabella 2 ).

**Tabella 1. Lunghezza e larghezza (cm) di ovidutti della specie bovina riportati da diversi autori.**

Referenze		Monteiro (1998) vacche adulte razza Nelore	Oliveira, Souza e Souza (2004) vacche adulte razza Nelore	Perkins et al. (1954) vacche adulte razza non definita	Monteiro (1998) manze razza Nelore	Oliveira, Souza e Souza (2004) manze razza Nelore
Ovidutto sinistro	Lunghezza	17,7 (13,4-23,0)	18,14 ± 3,50	20,68 ± 2,30	15,2 (11,2-20,4)	17,95 ± 3,76
	Larghezza	-	-	0,26 ± 0,04	-	-
Ovidutto destro	Lunghezza	17,6 (13,0-23,5)	23,78 ± 4,40	20,71 ± 2,40	15,4 (10,5-20,7)	24,01 ± 4,77
	Larghezza	-	-	0,26 ± 0,04	-	-

**Tabella 2. Lunghezza e larghezza (cm) di ovidutti della specie bufalina riportati da diversi autori.**

Referenze		El-Sheikh e Abdelhadi (1970) bufale razza egiziana	Luktuke e Rao (1962) Bufale adulte razza non definita	Sane et al. (1964) bufale adulte razza murra	Sane et al. (1965) bufale adulte razza Jaffri	Vale et al. (1982) bufale razza non definita
Ovidutto Sinistro	Lunghezza	26,3±0,3 (16-34)	21,8 (16,1-31,9)	22,38 ± 0,12 (12,5-42,8)	24,49±0,28 (13,0-36,2)	19,54±5,13 (11,0-29,0)
	Larghezza	(0,2-1,1)	(0,24-1,00)	0,2	0,2	0,22 ± 0,14 (0,2-0,5)
Ovidutto Destro	Lunghezza	26,3±0,3 (17-36)	22,3 (17,6-32,4)	22,56 ± 0,12 (13,0-36,0)	24,41±0,27 (13,0-36,1)	20,30±3,58 (11,0-31,0)
	Larghezza	(0,2-1,1)	(0,25-1,05)	0,2	0,2	0,26 ± 0,12 (0,2-0,5)

### **1.2.3 Struttura**

Istologicamente, l'ovidutto comprende quattro tonache: la mucosa, la muscolare, la sottosierosa e la sierosa (Barone,1994) essendo assenti gli strati della sottomucosa e della muscularis mucosae (Morabad and Jagannath, 1967).

#### *1.2.3.1 Mucosa*

Nel lume dell'ovidutto, la mucosa si presenta sollevata in pliche longitudinali, più accentuate nella regione ampollare (Gaddum-Rosse; Blandau, 1973; Hunter, 1988; Yániz et al., 2000). La mucosa è rivestita da un unico strato di epitelio cilindrico semplice o pseudostratificato cilindrico, rappresentato da cellule secernenti e cellule ciliate (Ellington, 1991; Priedkalns, 1982).

Le cellule ciliate sono più numerose nella porzione craniale dell'ovidutto, all'apice delle pliche della mucosa (Hafez and Hafez, 2004; Priedkalns, 1982), dove collaborano al movimento dell'oocita lungo l'ovidutto (Banks, 1992). Presentano una densità maggiore nelle fimbrie, numerose anche nella regione ampollare, così come le secernenti, e meno numerose nella regione istmica (Hunter, 1988). Le cellule secernenti non sono ciliate ma presentano la superficie apicale ricoperta di microvilli (Hafez and Hafez, 2004). Sono stati descritti altri due tipi di cellule non ciliate, che rappresentano, ciascuno, appena l'1% della popolazione cellulare dell'epitelio e le cui funzioni non sono note (Barone, 1994); si tratta di cellule basali e di cellule allungate, larghe



alla loro base ma che raggiungono la superficie soltanto con un apice stretto. Va sottolineato che l'aspetto delle cellule epiteliali varia durante il ciclo estrale; le cellule divengono più alte e molto più attive nel pro-estro e soprattutto nell'estro e all'inizio del post-estro (Barone, 1994). Sono basse e regrediscono nettamente dopo castrazione, e ripresentano i caratteri della loro attività in seguito a somministrazione di estrogeni. Infine è possibile che alcune cellule possano trasformarsi da un tipo all'altro, perché sembra che la proporzione fra cellule ciliate e non ciliate vari in uno stesso segmento durante il ciclo; le cellule allungate potrebbero rappresentare un tipo di transizione (Barone, 1994).

### *1.2.3.2 Muscolare*

La tunica muscolare risulta costituita da fibre muscolari lisce disposte su due piani. Nello strato profondo le cellule presentano un andamento circolare, disponendosi con l'asse lungo perpendicolarmente all'asse longitudinale dell'organo, nello strato superficiale le cellule muscolari si presentano ad andamento longitudinale (Hafez and Hafez, 2004; Leese, 1988).

Nella tuba uterina lo strato longitudinale è ancora esile, spesso discontinuo e si irradia più o meno nel mesosalpinge; segue le flessuosità solo approssimativamente e i suoi fasci frequentemente passano l'uno nell'altro. Lo strato circolare è al contrario ben sviluppato, ininterrotto e costituisce in un certo qual modo l'impalcatura del condotto (Barone, 1994). Procedendo in direzione

cranio caudale lungo l'ovidutto, è possibile osservare un ispessimento dello strato muscolare (Hafez and Hafez, 2004; Hunter, 1988; Leese, 1988).

Ridotta ad alcuni fasci sparsi nell'infundibolo, la tonaca muscolare è ancora sottile e talora incompleta nella regione dell'ampolla, ma qui presenta già la sua organizzazione caratteristica. Nella regione dell'istmo diventa via via più robusta specie nel suo strato circolare, che risulta ispessito e denso (Barone, 1994). Nelle specie in cui la porzione uterina è molto sviluppata, lo strato circolare si prolunga da solo nella parete uterina: vi si rinforza con fasci provenienti dallo strato profondo del miometrio, in modo da formare con questi una sorta di sfintere (Barone, 1994).

In accordo con Hunter (1988) e Menezo e Guerin (1997), la muscolatura liscia dell'ovidutto presenta un'innervazione simpatica e parasimpatica. La rete di fibre nervose simpatiche deriva dal plesso ovarico e/o ipogastrico, mentre le fibre adrenergiche possono essere riscontrate nello strato longitudinale, con ricca innervazione nell'istmo e scarsa nella ampolla e nell'infundibolo (Hunter, 1988).

### *1.2.3.3 Sierosa e sottosierosa*

La tonaca sierosa è rappresentata dalle due lamine peritoneali che costituiscono il mesosalpinge, tra le quali si colloca il condotto. La sierosa tappezza quindi quest'ultimo sulle sue facce laterale e mediale, senza fornirgli un rivestimento completo. Si unisce senza forme di

transizione alla mucosa sul margine libero delle fimbrie e dell'infundibolo.

La sottosierosa è costituita da un connettivo ricco di fibre collagene e mescolato a cellule muscolari lisce, che si irradiano dalla tunica muscolare del mesosalpinge. Accoglie i principali vasi e nervi.

Lo strato della sierosa è peculiare, con una vascolarizzazione ben differenziata (Banks, 1992; Hafez and Hafez, 2004). Il letto vascolare ha derivazione dall'arterie uterina e ovarica, e nelle vicinanze dell'ovaio, la stretta relazione spaziale a livello del letto venoso e arterioso, permette il trasporto di sostanze per mezzo del meccanismo controcorrente (Hunter, 1988; Leese, 1988; Menezo and Guerin, 1997).

## **1.3 Interazione dei gameti con l'ovidutto**

Vi sono due possibilità interpretative del ruolo dell'ovidutto nei confronti dei gameti e dei processi che avvengono nelle prime fasi dello sviluppo embrionale: esso può essere visto come un semplice contenitore che "passivamente" garantisce l'ambiente migliore per la fecondazione e lo sviluppo dell'embrione garantendo le condizioni ottimali del microambiente, o alternativamente, l'ovidutto viene considerato una fonte attiva di molecole in grado di sostenere e modulare questi processi. 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. Nei mammiferi, la fecondazione dipende dal successo di una serie di fattori, cominciando con l'ovulazione, la captazione e il trasporto dell'ocita da parte dell'ovidutto e il trasporto e la capacitazione degli spermatozoi.

### ***1.3.1 Captazione del Complesso oocita-cumulo ooforo (COC)***

Il complesso oocita-cumulo (COC), risulta costituito dall'ocita, dalla zona pellucida, dalla corona radiata, dalle cellule del cumulo ooforo e dalla matrice extracellulare (Talbot and Di Carlantonio, 1984).

Precedentemente all'ovulazione, si manifestano delle contrazioni della muscolatura liscia dell'ovidutto, che si presentano di moderata intensità e variabili nella proporzione e nel modello di contrattilità. Infatti il modello e l'ampiezza delle contrazioni variano nei differenti tratti dell'ovidutto. Nella porzione ampollare, forti onde peristaltiche si muovono in modo segmentato in direzione cranio caudale. Nell'istmo, onde di contrazione peristaltica e antiperistaltica sono segmentate, vigorose e quasi continue. Sono le contrazioni muscolari, ritmiche e intermittenti, che assicurano la posizione delle fimbrie in relazione alla superficie dell'ovaio (Hafez and Hafez, 2004).

Durante l'ovulazione le contrazioni dell'ovidutto divengono più vigorose e le fimbrie si contraggono sincronamente "spazzolando" delicatamente la superficie dell'ovaio (Hafez and Hafez, 2004; Priedkalns, 1982). In questa fase le fimbrie si presentano estremamente capillarizzate e stabiliscono un contatto con la superficie ovarica grazie all'azione muscolare del mesovario, della muscolatura liscia del mesosalpinge e del legamento tubo-ovarico (Hafez and Hafez, 2004).

L'attività contrattile delle fimbrie, dell'ovidutto e dei legamenti sono coordinate attraverso un meccanismo ormonale influenzato dal rapporto estrogeno-progesterone (Hafez and Hafez, 2004). In accordo con Banks (1992) e Hunter (1988), la ciliogenesi si verifica in risposta alle concentrazioni circolanti di estrogeni. Hafez e Hafez (2004) affermano che l'ovidutto si ipertrofizza e crea nuove ciglia durante il proestro e l'estro. I granuli secretori sono accumulati nelle cellule

epiteliali durante la fase follicolare del ciclo e dopo l'ovulazione, vengono liberati dentro il lume oviduttale, causando una riduzione nell'altezza dell'epitelio (Hafez and Hafez, 2004; Hunter, 1988).

Dopo la rottura del follicolo nel processo ovulatorio una massa viscosa, formata da glicoproteine secrete dalla cellule del cumulo ooforo e denominata matrice extracellulare (Talbot and Di Carlantonio, 1984), si spande aderendo alla superficie dell'ovaio facilitando la captazione da parte delle fimbrie del COC (Hafez and Hafez, 2004). Allo stesso tempo, il movimento delle ciglia delle cellule epiteliali dell'infundibulo, che presentano attività massima al momento dell'ovulazione e subito dopo questa, è direzionato e sincronizzato indirizzando i flussi verso l'ostio oviduttale, dove sembrano instaurarsi correnti di fluidi che probabilmente aspirano il COC all'interno dell'oviutto (Hafez and Hafez, 2004; Priedkalns, 1982; Talbot et al., 2003).

Il processo di captazione e trasporto del COC implica l'adesione transitoria delle ciglia epiteliali alla matrice extracellulare (Lam et al., 2000; Talbot et al., 1999). Per mezzo della microscopia elettronica a trasmissione, Lam et al. (2000), hanno verificato che l'adesione si determina specificamente tra la punta delle ciglia e i granuli e i filamentei della matrice extracellulare, i quali sono composti rispettivamente di proteine e acido ialuronico. L'alterazione nell'adesione tra matrice extracellulare e ciglia può pregiudicare la captazione e il trasporto del COC e generare casi di gravidanza ectopica (Talbot et al. 2003).

### **1.3.2 Trasporto dell'oocita nell'ovidutto**

L'oocita interagisce con l'ovidutto, durante il trasporto dall'ovaio al sito della fertilizzazione e, da qui, fino alla giunzione utero-tubarica. La velocità di trasporto del COC è maggiore nel tratto che dall'infundibulo arriva alla giunzione ampollare-istmica che attraverso il solo tratto istmico (Hafez and Hafez, 2004; Hunter, 1988). La velocità di trasporto dell'oocita 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'oocita attraverso la regione ampollare non è stato ancora del tutto chiarito (Ellington, 1991).

Nel bovino El-Banna e Hafez (1970) hanno osservato che l'oocita impiega circa 8-10 ore per raggiungere la giunzione istmica-ampollare dell'ovidutto. A questo punto il trasporto dell'oocita si arresta temporaneamente permettendo alla fertilizzazione di aver luogo (Hafez and Hafez, 2004). L'attività delle cellule ciliate dell'ovidutto sembra essere importante a questo riguardo perché, 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). Mano a mano che il COC è trasportato attraverso l'ovidutto la matrice extracellulare si va perdendo (Lam et al., 2000). Nell'ampolla gli oociti sono mantenuti in costante rotazione mediante lievi contrazioni muscolari peristaltiche e dal battito ciliare (Hafez and Hafez, 2004; Priedkalns, 1982).

Il tempo di trasporto dell'oocita e/o dell'embrione attraverso ovidutto varia in accordo con la specie, e indipendentemente dalla lunghezza dell'istmo e dalla durata della gestazione (Priedkalns, 1982). Nel bovino, l'oocita permane per 90 ore nell'ovidutto (Hafez and Hafez, 2004). Nel bufalo, il tempo di trasporto varia dalle 74 alle 100 ore (Karaivanov et al., 1987). In accordo con Anwar e Ullah (1998), l'oocita del bufalo permane per 108 ore nell'ovidutto. Nella cavalla, gli oociti non fertilizzati sono trattenuti nell'ovidutto per mesi (Hafez and Hafez, 2004). Questo meccanismo può essere controllato mediante la densa innervazione adrenergica dell'istmo che, in accordo con Hunter (1988), può permettere che questa regione dell'ovidutto funzioni come uno sfintere fisiologico.



### **1.3.3 Spermatozoi e ovidutto**

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). Gli spermatozoi sostano nella porzione terminale dell'istmo per 18-20 ore nel bovino (Hunter and Wilmut, 1984), 17-18 ore negli ovini (Hunter and Nichol, 1983), 36 ore nel maiale (Hunter, 1984), e più di 126 ore nel furetto (Chang, 1965). Durante questo periodo possono essere riscontrati in profondità nelle pliche epiteliali dell'ovidutto (Hunter, 1988). Si pensa che la capacitazione avvenga a questo livello mentre gli spermatozoi sono in stretto contatto con le cellule dell'epitelio tubarico (Parrish et al., 1989). Molti spermatozoi aderiscono alla mucosa del basso istmo (Smith and Yanagimachi, 1990). È probabile che una lectina sulla superficie dello spermatozoo si legghi all'epitelio e, durante la capacitazione, la stessa si modifichi, o venga 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 ciclasi con produzione di AMPc, dall'altro, l'attivazione della fosfolipasi C (PLC). A questo punto segue il rilascio di

Ca<sup>++</sup> acrosomiale, che attiva i SOCC (store operated calcium channels) e comporta l'entrata di calcio per riempire le riserve endocellulari. L'innalzamento del Ca<sup>++</sup>-intracellulare porta all'esocitosi della vescicola acrosomiale e alla fusione dei due gameti.

### **1.3.4 Ormoni steroidei, motilità dell'ovidutto e trasporto dei gameti**

Nell'ovidutto, l'ocita è trasportato in direzione cranio caudale, mentre gli spermatozoi in direzione caudo craniale (Hunter, 1988). Questi eventi sono sotto il controllo degli steroidi ovarici, per cui qualsiasi alterazione nella concentrazione di estrogeni e o progesterone potrebbe interferire nel trasporto dei gameti (Hunter, 1988; Mwanza et al.; 2002). Alte concentrazioni di estradiolo possono paradossalmente rallentare il trasporto degli oociti, così come alte concentrazioni di progesterone possono accelerare questo processo (Crisman et al., 1980). Secondo Wijayagunawardane et al. (1998), il progesterone, l'estradiolo, l'ossitocina, le prostaglandine E<sub>2</sub> e F<sub>2α</sub> e l'endotelina-1 possono controllare sinergicamente le contrazioni dell'ovidutto affinché si realizzi correttamente il trasporto dei gameti e dell'embrione.

Il progesterone, l'estradiolo e la PGF<sub>2α</sub> sono ormoni responsabili della contrazione dell'istmo (Mwanza et al., 2002). In accordo con Hunter (1988), le prostaglandine della serie F, unitamente con l'estradiolo, si legano ai recettori α-adrenergici delle cellule della muscolatura liscia,

promuovendo la contrazione della miosalpinge e in modo particolare della componente circolare dello strato muscolare, riducendo il lume del condotto. Differentemente, i recettori  $\beta$ -adrenergici funzionano in sinergia con le prostaglandine della serie E, che in presenza di progesterone, inducono un graduale rilasciamento dello strato muscolare.

## 1.4 Fluido Oviduttale

Studi sullo sviluppo embrionale sia in vivo che in vitro hanno messo in rilievo i due aspetti della fisiologia tubarica che hanno relazione diretta con le prime fasi dello sviluppo. Da un lato, l'effetto dell'ambiente tubarico in senso lato: temperatura, pH, tensione di ossigeno, pressione osmotica, sostanze nutritive, chelanti dei radicali liberi etc; dall'altro, le componenti attive prodotte dall'ovidutto stesso: molecole in grado di stimolare o regolare il processo di maturazione finale dei gameti, fecondazione e le prime fasi del differenziamento.

In diverse specie è stato evidenziato che un buon sviluppo in vitro degli embrioni può essere ottenuto mediante un'attenta formulazione del medium di coltura (Walker et al., 1992) oppure coltivando gli embrioni stessi su monostrati di cellule somatiche, meglio se queste cellule sono di ovidutto (Gandolfi et al., 1992). Appare evidente che le componenti del fluido oviduttale (ODF) influenzano le fasi di maturazione finale dei gameti nonché i processi di sviluppo embrionale.

Il liquido tubarico è un medium complesso formato dalla combinazione di trasudato di derivazione ematica e prodotti di secrezione delle cellule epiteliali (Leese, 1988, Malayer et al., 1988).

### **1.4.1 Formazione e velocità di secrezione**

Lo spostamento del fluido attraverso l'epitelio oviduttale è secondario allo spostamento dei soluti, in modo particolare degli ioni. Nell'epitelio secernente, il movimento del cloro in forma ionica dal polo basale a quello apicale delle cellule, gioca un ruolo importante nel realizzare il trasporto dell'acqua (Quinton, 1990). La bassa concentrazione intracellulare di  $\text{Na}^+$  è mantenuta dalla  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , con l'assorbimento del  $\text{Cl}^-$  mediante il  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter dalla membrana basolaterale. La superficie apicale delle cellule epiteliali diventa permeabile al  $\text{Cl}^-$ , tale permeabilità permette all'anione di ridurre il gradiente elettrochimico nel lume dell'ovidutto.

Il movimento degli ioni genera una potenziale elettrico che guida il  $\text{Na}^+$  attraverso le tight junctions tra le cellule (Leese et al., 2001) nel lume oviduttale. In altri epitelii secernenti, sono stati localizzati accumuli di ioni negli spazi intercellulari, ciò si pensa possa creare delle aree con elevata pressione osmotica. L'acqua segue il movimento di questi ioni per ripristinare l'equilibrio osmotico e in questo modo si accumula nel lume (Diamond, 1971; Quinton, 1990). Meccanismi simili operano nell'ovidutto.

Le cellule epiteliali aumentano in altezza nella fase estrale (Murray, 1995), quando la produzione di fluido oviduttale è massima. Questo aumento in altezza potrebbe aumentare l'area dello spazio intercellulare disponibile per localizzare un accumulo di ioni.

L'aumento di viscosità del fluido tubarico, sarebbe dovuto alla secrezione delle glicoproteine associate all'estro, e potrebbe prevenire la rapida diffusione dei soluti, favorendo l'accumulo di ioni nel microambiente con alta osmolarità (Hunter, 1994).

Nell'ovidutto, questo meccanismo è probabilmente localizzato nelle cellule non ciliate in contrapposizione a quelle ciliate (Comer et al., 1998).

Affinché le loro proprietà di trasporto possano essere esaminate, le cellule epiteliali devono essere mantenute in uno stato funzionale. Brunton and Brinster (1971) usarono il metodo di Ussing e Zerahn (1951), in origine messo appunto per la pelle di rana, e inserirono l'intero segmento di ovidutto di coniglio, fra due identiche soluzioni a contatto rispettivamente con la faccia apicale e basale. Il tessuto ha mantenuto la differenza di potenziale trasmurale e si è visto che gli ioni cloro si spostavano preferenzialmente dalla porzione basale a quella apicale dell'epitelio, quindi vi era un passaggio netto in senso secretivo. Un approfondimento della ricerca è stato operato da Gott et al. (1988) usando una perfusione vascolare sull'ovidutto di coniglio. Gott et al. (1988) riscontrarono inoltre che la secrezione ionica potrebbe essere bloccata dall'inibizione dei carrier dello ione cloro. Sebbene fosse verosimile che i dati ottenuti usando la preparazione Ussing e la perfusione vascolare riflettessero l'attività secretiva delle cellule epiteliali, l'interpretazione dei risultati è stata complicata dalla presenza del sottostante stroma e del tessuto muscolare. Questo problema

potrebbe essere superato usando una preparazione per il mantenimento delle cellule nello stato di strato confluyente polarizzato nella coltura primaria (Dickens et al., 1993, 1996). Il grande vantaggio di questa tecnica è che le cellule epiteliali sono mantenute in uno stato di corretta disposizione spaziale, con il medium basale (che è equivalente al fluido extracellulare in vivo), separato dal medium apicale (che è equivalente al lume dell'ovidutto).

Il cambiamento nel flusso ionico potrebbe essere rilevato monitorando la differenza di potenziale transepiteliale, che rappresenta la differenza nella concentrazione degli ioni attraverso l'epitelio, e il breve circuito di corrente (I<sub>sc</sub>; la corrente richiesta per portare la differenza di potenziale transepiteliale a 0 mV) che rappresenta la rete attiva del trasporto ionico transepiteliale. Trattamenti di colture cellulari epiteliali con bloccanti dei canali del cloro, o incubazioni in medium privi di cloro riducono la differenza di potenziale e l'I<sub>sc</sub> sensibilmente, confermando che il flusso di ioni cloro è importante per la generazione della differenza di potenziale e la secrezione di fluido in questo tessuto (Downing et al., 1997; Reischl et al., 2000).

La stessa metodica è stata utilizzata per esaminare il trasporto di non-elettroliti nel lume dell'ovidutto di coniglio. In questo modo, Edwards and Leese (1993) hanno mostrato che il glucosio è trasportato preferenzialmente in direzione baso-apicale mediante diffusione facilitata. Il lattato che in parte si forma come risultato del metabolismo del glucosio, si presenta predominante nel medium basale,



confermando ulteriormente la polarità della preparazione. Lo stesso fenomeno viene riscontrato nelle cellule epiteliali dell'ovidutto umano (Dickens et al., 1996). Nel coniglio la caduta dei livelli di glucosio e di lattato in rispondenza del polo apicale delle cellule epiteliali si manifesta dopo tre giorni dall'accoppiamento, coincidendo con il tempo in cui in vivo l'embrione passa dall'ovidutto all'utero. Questo decremento del glucosio e del lattato apparentemente potrebbe essere dovuto ad una riduzione della concentrazione di estrogeni o ad un aumento della concentrazione di progesterone che fa seguito all'ovulazione o ad entrambi i fenomeni (Leese et al., 2001).

#### ***1.4.2 Ormoni steroidei e volume***

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).

Gli ormoni steroidei influenzano quali-quantitativamente il fluido tubarico, sia attraverso un'azione diretta sulle cellule epiteliali, sia mediante un'azione indiretta agendo sul letto vascolare (Jansen, 1984). Comunemente, il volume di fluido prodotto dalla tuba, aumenta durante la fase estrale, si riduce durante la fase diestrare e la gravidanza. Infatti, nel coniglio, la produzione di fluido oviduttale è

massima all'estro e decresce durante la pseudogravidanza (Bishop, 1956; Richardson and Oliphant, 1981; Gott et al., 1988). Nella scimmia è stato osservato un aumento della produzione di liquido tubarico in rispondenza dell'ovulazione (Perkins, 1974). Nel bovino, il liquido oviduttale è prodotto in quantità di 0,2 ml al giorno nella fase diestrile e di 2,0 ml al giorno nella fase estrale (Roberts et al., 1975).

Le cellule della porzione ampollare producono nel coniglio un maggior volume di fluido di quelle presenti nella regione istimica, rispecchiando la maggiore area di superficie delle cellule secernenti della regione ampollare (Leese, 1983). Negli ovini, i trattamenti a base di estrogeni aumentano la secrezione di fluido oviduttale, mentre il progesterone riduce la secrezione dello stesso e antagonizza l'effetto degli estrogeni (Mastroianni et al., 1961, McDonald and Bellvé, 1969). In conigli e pecore ovariectomizzate, la velocità di secrezione si mantiene ad un livello costante poco più basso di quello osservato nella fase luteinica del ciclo (Perkins, 1974). Il trattamento di femmine ovariectomizzate con dosaggi bassi e costanti di estradiolo esita in un marcato aumento della secrezione oviduttale (Leese, 2001).

Il meccanismo con cui gli steroidi ovarici modulano la secrezione del fluido oviduttale non è ancora completamente chiarito. Le cellule secernenti dell'epitelio oviduttale, sia ciliate che non ciliate, sono sensibili alle variazioni delle concentrazioni di steroidi in circolo (Murray, 1995). Gli estrogeni inducono ipertrofia, maturazione e aumento dell'altezza delle cellule epiteliali secernenti non ciliate e

possono in parte ripristinare il fenotipo ciliato in vitro (Comer et al., 1998), mentre il progesterone causa atrofia e diminuzione dell'attività secretoria. Tali cambiamenti nella morfologia cellulare indicano cambiamenti nell'attività di sintesi che contribuisce alle variazioni nella produzione di fluido oviduttale.

Gli ormoni steroidei possono influenzare la velocità di formazione del fluido secreto modulando il movimento degli ioni attraverso l'epitelio oviduttale. In colture di cellule tracheali, gli ormoni steroidei regolano il bilancio del assorbimento del  $\text{Na}^+$  e della secrezione del  $\text{Cl}^-$  (Zeitlin et al., 1989) e, nei tubuli renali, gli estrogeni aumentano il trasporto di  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (Verlander et al., 1998). Quindi, è verosimile che gli ormoni steroidei abbiano un'azione simile anche sull'ovidutto (Leese et al., 2001).

#### ***1.4.3 Effetto di modulatori non steroidei sulla secrezione del fluido oviduttale***

Nell'intestino, l'istamina, il fattore di attivazione piastrinico (platelet-activating factor o PAF), le prostaglandine e l'ATP aumentano la differenza di potenziale, l' $I_{\text{sc}}$  e il flusso di  $\text{Cl}^-$ , attivando i processi secretivi (Hardcastle and Hardcastle, 1987; Hanglow et al., 1989). Brunton e Brinster (1971) applicando la preparazione Ussing all'ovidutto di coniglio trovarono che la differenza di potenziale e l' $I_{\text{sc}}$  venivano aumentati rapidamente dall'adrenalina, dalla noradrenalina, dall'isoproterenolo e dalla fenileprina quando venivano inserite nel mezzo a contatto con il versante basale dell'epitelio. Questa risposta

veniva completamente bloccata dal propanolo, indicando la presenza di recettori  $\beta$ -adrenergici e confermato la loro azione come mediatori del segnale.

Prendendo spunto dalla capacità di queste sostanze di incrementare la concentrazione di AMPc e individuando in questo il mediatore del segnale, Leese e Gray (1985) e Gott et al. (1988) hanno testato l'effetto dell'aggiunta di AMPc al medium di perfusione di ovidutti di coniglio isolati in vitro dimostrando che AMPc e sostanze che mimavano i suoi effetti, (tossina del colera, forskolin e la teofillina) sopprimono la comparsa di fluido oviduttale e inibiscono la secrezione di cloro; ciò è in contrasto con quanto osservato in altri epitelio cloro secernenti in cui l'AMPc stimola il trasporto di Cloro e acqua. Tuttavia, una conferma di questi dati è stata riscontrata da Dickens e Leese (1994) e da Tay et al. (1997), che usarono una perfusione di tipo vascolare dell'ovidutto di coniglio e di donna rispettivamente. Nell'ovidutto della specie umana, Tay et al. (1997) hanno mostrato che l'isoproterenolo incrementa la formazione di fluido oviduttale in modo brusco. Similmente, l'adrenalina, addizionata al medium che bagna la superficie basale dell'epitelio tubarico del coniglio, aumenta il flusso di cloro dalla porzione basale verso il lume, così come ci si aspetta da un agonista che stimola la secrezione (Leese et al., 2001). Contrariamente, la supplementazione di AMPc, il presunto mediatore dell'azione dell'adrenalina, nel medium a contatto con la superficie basale dell'epitelio, induce un aumento del flusso di cloro dalla superficie

apicale verso quella basale dell'epitelio, questo si traduce in un aumento del flusso di assorbimento piuttosto che di secrezione nel lume dell'ovidotto (Leese et al., 2001).

In questo tessuto, si è giunti alla conclusione che, sostanze che incrementano l'AMPc non riescono ad alterare il flusso di cloro perché il regolatore apicale di conduttanza tissutale-membranario (CFTR) è già completamente aperto alla concentrazione basale dell'AMPc.

Se i canali per il cloro sono sostanzialmente aperti alle concentrazioni basali di AMPc, l'attivazione dei canali per il potassio Ca-dipendenti, determinando un'iperpolarizzazione della membrana apicale, può determinare una forza che determina il conseguente flusso di cloro attraverso i canali CFTR già aperti (Yamaya et al., 1993). In altre parole, è possibile che, nell'ovidotto, l'aumento del flusso di cloro si determina per meccanismi calcio dipendenti piuttosto che per l'azione dell'AMPc, fornendo una spiegazione per l'azione paradossale dell'AMPc nella diminuzione della produzione del fluido oviduttale.

#### ***1.4.4 Sostanze Purinergiche***

La risposta biologica all'ATP extracellulare è stata documentata praticamente nella grande maggioranza di organi e tessuti studiati (Dubyak and El-Moatassim, 1993). Anche se presente in concentrazioni millimolari nel citosol di tutti i tipi cellulari, concentrazioni extracellulari estremamente basse del nucleotide sono mantenute ad opera dell'attività dell'ATPasi, delle fosfatasi e dalla bassa permeabilità

del ATP attraverso il bilayer lipidico di membrana. Quindi, apprezzabili concentrazioni extracellulari di ATP si presentano solo transitoriamente e in risposta a stimoli o condizioni fisiologiche o patologiche. Tali meccanismi includono l'esocitosi di ATP concentrato in granuli secretori, rilascio di ATP citosolico attraverso canali di membrana o pori, o in seguito ad improvvisa rottura di cellule integre così come in un trauma o nella morte cellulare. L'effetto dell'ATP è mediato attraverso specifici recettori definiti recettori P<sub>2</sub>-purinergici . Ci sono almeno 4 classi maggiori di recettori P<sub>2</sub>-purinergici per l'ATP: recettori P<sub>2x-</sub>, P<sub>2y-</sub>, P<sub>2u-</sub> e P<sub>2z</sub>. I recettori P<sub>2y</sub> funzionano come recettori G protein-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilizing ATP, i recettori del tipo P<sub>2x</sub> agiscono come ligand-gated dei canali ionici e i recettori P<sub>2z</sub> sono associati con la formazione di pori per ATP. In aggiunta, esiste un altro tipo di recettore G protein-coupled Ca<sup>2+</sup>-mobilizing nucleotide, il recettore di tipo P<sub>2u</sub>. Questo recettore è funzionalmete simile, ma farmacologicamente distinto, dal recettore P<sub>2y</sub>. Infatti per il recettore P<sub>2u</sub>, l'UTP rappresenta un agonista più potente dell'ATP. Il recettore di tipo P<sub>2u</sub> si presenta con maggiore frequenza sull'epitelio oviduttale; infatti, questo recettore potrebbe essere uno dei più ampiamente espressi fra i diversi tipi di recettori per l'ATP (Leese et al., 2001). L'attivazione del recettore P<sub>2u</sub> viene associata con un incremento del calcio intracellulare ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Cox e Leese (1995) hanno mostrato che l'ATP induce un transitorio aumento della differenza di potenziale transepiteliale e della [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> nell'epitelio oviduttale del bovino, dato confermato da Squires et al. (1995). La comparazione degli

effetti dell'ATP, UTP e dell'ADP, mostra che i recettori coinvolti appartengono effettivamente alla classe  $P_{2u}$ . Effetti simili dell'ATP sono stati riportati (Dickens et al., 1996; Downing et al., 1997) a carico dell'epitelio tubarico del coniglio e dell'uomo. Downing et al. (1997) e Reischl et al. (1999) hanno mostrato che gli effetti dell'ATP sono, in parte, influenzati dagli ioni Cloro, visto che l'aumento di differenza di potenziale transepiteliale in risposta all'ATP viene ridotto o abolito dal pretrattamento delle cellule con sostanze bloccanti i canali del cloro. L'aumento della secrezione del cloro risulta dipendente da un aumento della concentrazione di  $[Ca^{2+}]_i$  determinata o da un rilascio dalle scorte intracellulari o dall'ingresso di calcio extracellulare (Leese et al., 2001). L'aumento del flusso transepiteliale degli ioni cloro darebbe luogo ad un aumento della secrezione del fluido oviduttale. L'importanza funzionale dell'azione dell'ATP non è ben conosciuta ma potrebbe rappresentare un sistema attraverso il quale gli spermatozoi e l'embrione, nelle prime fasi, dialogano con il tratto materno (Leese et al., 2001). Questa ipotesi ha come base che gli spermatozoi e l'embrione, nei primi stadi di sviluppo, liberino ATP. L'interazione tra epitelio oviduttale e spermatozoi (Baillie et al., 1997; Suarez, 1998) include l'osservazione che la frequenza del battito ciliare delle cellule ciliate dell'epitelio oviduttale aumenta sensibilmente dopo che gli spermatozoi vengono aggiunti al monolayer cellulare (Morales et al., 1996). Note sono anche interazioni tra l'ovidutto e l'embrione; nel hamster (Ortiz et al., 1986) e nella cavalla (Weber et al., 1991), l'embrione infatti viene trasportato con una velocità

maggiore rispetto agli oociti non fertilizzati attraverso l'ovidutto. Prostaglandine e PAF rilasciati dall'embrione sono ritenuti fattori di segnale. Fattori secreti dall'embrione stimolano anche la frequenza del battito ciliare delle cellule ciliate dell'epitelio oviduttale (Hermoso and Villalon, 1995). L'ATP aumenta anche la frequenza del battito ciliare della componente ciliata dell'epitelio oviduttale nell'uomo (Villalon et al., 1989), un effetto associato con il transitorio incremento della concentrazione di calcio intracellulare, indicando che L'ATP è uno dei fattori di segnale secreti dagli spermatozoi e dall'embrione attivi sull'epitelio oviduttale (Leese et al., 2001) .

#### ***1.4.5 Controllo del sistema nervoso autonomo***

Il ruolo del sistema nervoso autonomo sulle funzioni dell'ovidutto è stato chiarito solo in parte. I neurotrasmettitori del sistema simpatico indubbiamente regolano le contrazioni della muscolatura liscia dell'ovidutto, la quale a sua volta può influenzare il trasporto nell'ovidutto dei gameti e degli embrioni. L'innervazione dell'ovidutto può anche influenzare la produzione di liquido oviduttale e la secrezione indirettamente mediante un effetto sul flusso ematico visto che questo è implicato nella produzione e nel mantenimento del fluido oviduttale. Questi fattori controllando il tono dei vasi sanguigni influenzerebbero l'ovidutto determinandone delle variazioni nell'ambiente luminale (Leese et al., 2001). La densa innervazione simpatico-adrenergica esercita un controllo sulla vasocostrizione tonica e quindi sulla vascolarizzazione



dell'ovidutto (Garcia-Pascual et al., 1996). Scarsa è l'innervazione colinergica dell'ovidutto, nonostante ciò l'acetilcolina presenta un'azione vasodilatatrice, una possibile azione sui recettori endoteliali, stimolando il rilascio di ossido nitrico, che dilata le arteriole oviduttali. Un'alta densità del neuropeptide Y- e un peptide vasointestinale contenuto nelle fibre nervose, è stato osservato in relazione ai vasi sanguigni dell'ovidutto, ma il suo ruolo resta da stabilire (Leese et al., 2001).

In futuro sarà necessario determinare l'estensione del controllo del sistema nervoso sull'attività secretoria dell'ovidutto e innalzare il livello di conoscenza del sistema integrato di controllo delle funzioni oviduttali così come avviene per gli epitelii degli altri tessuti (Cooke, 1994).

#### ***1.4.6 Prelievo dell'ODF***

La raccolta dell'ODF a scopo sperimentale può essere eseguita secondo diverse metodiche. Tra queste 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).

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).

#### **1.4.7 Composizione**

Come già sottolineato, 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). La composizione del liquido oviduttale è ben documentata nelle diverse specie domestiche (Miller and Schultz, 1987; Hunter, 1988; Leese, 1988; Nichol et al., 1992; Dickens et al., 1995; Boatman, 1997; Tay et al., 1997).

Componenti del fluido tubarico come ioni (Brunton and Brinster, 1971; Brunton, 1972), albumina (Glass, 1969), immunoglobuline (Parr and

Parr, 1986), glucosio e piruvato (Leese and Gray, 1985) sono considerate derivate dal circolo ematico mentre è noto che un certo numero di proteine tubariche sono prodotte dalle cellule epiteliali (Gandolfi et al., 1993). 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.

#### *1.4.7.2 Composizione ionica*

La composizione ionica dell'ODF potrebbe essere importante per gli eventi che si susseguono durante la fertilizzazione. La concentrazione degli ioni nel liquido tubarico tende ad essere simile a quella del siero in quasi tutte le specie studiate, con alcune eccezioni. Nel liquido oviduttale umano, le concentrazioni di potassio e di cloro risultano consistentemente più alte di quelle sieriche (Lippes et al., 1972; David et al., 1973; Borland et al., 1980). Similmente, i livelli di potassio nel bovino si presentano notevolmente più alti nel fluido tubarico che nel plasma essendo massimi all'estro o in prossimità dell'estro (Olds and VanDenmark, 1957a). L'alta concentrazione di potassio nel fluido tubarico rappresenta una costante trasversale nelle diverse specie e rappresenta un fattore importante da tenere in considerazione nella formulazione di medium di fertilizzazione. Nel topo, nel sistema di fertilizzazione in vitro, sono state ottenute più gravidanze utilizzando un medium formulato sulla composizione del fluido oviduttale umano (HOF) che con il medium Tyrode, il quale

contiene una bassa concentrazione di potassio. Diminuendo il potassio dalla concentrazione presente nel fluido tubarico umano sino ai livelli del medium Tyrode si riduce il numero degli embrioni topo competenti per lo sviluppo (Quinn et al., 1985). Le concentrazioni di calcio a livello istimico nell'ODF bovino si presentano significativamente maggiori che nella regione ampollare in modo particolare in prossimità dell'estro e dell'ovulazione, e aumentano oltre i livelli plasmatici all'ovulazione (Grippe et al., 1992). Per contro, nell'ODF umano il calcio tende a essere più basso che nel siero (Borland et al., 1980). Nel bovino, la concentrazione di magnesio varia in modo significativo in funzione della fase del ciclo estrale ma non in funzione della regione dell'ovidutto presa in esame, e si presenta più bassa di quella sierica (Grippe et al., 1992). Sorprendentemente, la concentrazione di magnesio nel fluido oviduttale della cavalla raggiunge livelli da 2 a 5 volte superiori rispetto ai livelli medi registrati nel plasma (Campbell et al., 1979) e risulta essere apparentemente più alta che nelle altre specie.

Le concentrazioni di Calcio e Magnesio riscontrate nel fluido oviduttale durante la fase non luteinica del ciclo estrale, sono rispettivamente maggiori e minori a quelle riscontrate durante la fase luteinica (Grippe 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 necessaria *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).

#### 1.4.7.2 *Substrati energetici*

La concentrazione di nutrienti nel liquido tubarico è generalmente inferiore rispetto a quella presente nel plasma (Leese and Barton, 1984), questo suggerisce che il totale trasporto di questi attraverso l'epitelio tubarico avvenga mediante diffusione (Leese and Gray, 1985). Inoltre la concentrazione delle sostanze nutritive varia in risposta allo status endocrino del soggetto. Ad esempio la concentrazione di glucosio nell'ovidutto suino decresce di ben dieci volte dopo l'ovulazione (Nichol et al., 1992, 1998) e di sei volte nell'ovidutto di donna nell'intervallo compreso tra la fase follicolare e la metà del ciclo (Gardner et al., 1996). Glucosio, piruvato e lattato sono stati riscontrati nel fluido oviduttale di tutte le specie che sono state esaminate (Nichol et al., 1992). La funzione del glucosio, del piruvato, del lattato e del saccarosio è quella di nutrire l'oocita, gli spermatozoi e l'embrione nelle prime fasi di sviluppo, per la durata del loro viaggio attraverso l'ovidutto (Leese and Gray, 1985).

I principali substrati energetici nel liquido tubarico sono rappresentati dal glucosio (Brewis et al., 1992) e dal piruvato di derivazione ematica sebbene anche il saccarosio e il lattato siano presenti. Nell'ovidutto di coniglio il 25% del lattato è filtrato dal circolo ematico e il 75% risulta prodotto dalle cellule epiteliali a partire dal glucosio ematico (Leese and

Gray, 1985). Anche, il piruvato può essere sintetizzato dall'epitelio tubarico partendo dal glucosio o dal lattato (Nichol et al., 1992). Piruvato, lattato, glucosio e saccarosio sono trasportati nel lume oviduttale in quantità differenti (Leese and Gray, 1985). Il glucosio muove attraverso l'epitelio mediante diffusione facilitata (Leese and Jeffries, 1977).

Tutti i segmenti dell'ovidutto mostrano avere delle differenze percentuali nella composizione del fluido (Nichol et al., 1992). Il livello di glucosio, piruvato e lattato è circa 1,8 volte più alto nella regione ampollare rispetto a quella istmica in conseguenza della maggiore area di superficie dell'ampolla (Leese, 1983).

La giunzione istmico-ampollare si pensa rappresenti il sito di fertilizzazione. Gli oociti ovulati o gli embrioni in fase iniziale trascorrono la maggior parte della loro permanenza nell'ovidutto a questo livello (Nichol et al., 1992). La grande emissione di glucosio nella regione ampollare è quindi sufficiente a sostenere l'embrione fino al momento in cui giunge in utero. I livelli di lattato e di glucosio nel fluido oviduttale dell'uomo variano anche in funzione della fase del ciclo estrale (Gardner et al., 1996). I livelli di glucosio nel fluido tubarico del suino decrescono bruscamente in seguito all'ovulazione (Nichol et al., 1992, 1998). Inoltre si è osservato che la presenza di embrioni non ha effetto sulla concentrazione dei substrati energetici nella regione ampollare e nella giunzione istmo-ampollare di suini sottoposti a ovariectomia unilaterale (Nichol et al., 1998). Conseguentemente, nel

suino la caduta della concentrazione di glucosio in seguito all'ovulazione, non può essere imputata ad un consumo di questo ad opera degli oociti e degli embrioni. I livelli dei substrati energetici nel fluido tubarico di suino sarebbero regolati da meccanismi sistemici (Nichol et al.,1998). Contrariamente, il profilo del pH dell'ovidutto sembra essere controllato da entrambi i meccanismi sia sistemici che locale così come dalla presenza di fattori embrionali (Nichol et al., 1997). In accordo con quanto osservato nel suino, un decremento della concentrazione di glucosio nel liquido oviduttale del coniglio si verifica tre giorni dopo l'accoppiamento e coincide con l'ingresso in utero dell'embrione. Quindi, l'intervallo in cui il glucosio risulta necessario all'interno dell'ovidutto non è molto ampio (Edwards and Leese, 1993). La tabella 3 mostra le concentrazioni di glucosio piruvato e lattato del fluido tubarico di alcune specie.

**Tabella 3 Concentrazione dei substrati energetici nell'ovidutto di alcune specie (mM/l) da Aguilar and Reyley, 2005 modificato**

	Scrofa						
	Topo	Pecora	Ampolla	Istmo	Donna	Bovina	Cavalla
glucosio	3,4	1,57-1,76	0,25-0,97	0,17-1,65	0,53	0,02-0,04	2,84-5,92
lattato	4,7	1,67-2,51	3,86-6,83	4,93-6,48	8,58		
piruvato	0,37	0,15	0,17-0,22	0,17-0,22	0,17		
Referenze	Gardner & Leese, 1990	Hammer, 1973	Nichol et al., 1992		Dickens et al.,1995	Carlson et al., 1970	Campbell et al., 1979

### 1.4.7.3 Lipidi

Il Colesterolo e i fosfolipidi presenti nel fluido oviduttale probabilmente influenzano la capacitazione spermatica, la fertilizzazione e lo sviluppo embrionale precoce. La loro attività si esplicherebbe attraverso la nota azione che questi componenti hanno sulla stabilità delle membrane cellulari; i suddetti eventi riproduttivi sono, infatti, il risultato di fusioni di membrane, riarrangiamenti e cambiamenti di composizione. La componente lipidica oviduttale potrebbe, quindi, avere un ruolo chiave nel successo del processo riproduttivo (Henault and Killian, 1993). Rispetto alla fase luteinica, durante la fase non luteinica del ciclo, l'ambiente oviduttale presenta delle modificazioni. La quantità di colesterolo diventa più bassa e quella dei fosfolipidi s'innalza (Grippe 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 prodotto nella 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 e 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 (Grippo 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).

#### 1.4.7.4 *Amminoacidi*

Gli amminoacidi presenti in grandi concentrazioni sono l'arginina, l'alanina e il glutammato nell'uomo (Tay et al., 1997) e la glicina, il glutammato e l'alanina nel fluido oviduttale del coniglio (Miller and Schultz, 1987). Glicina, alanina, leucina e fenilalanina sono trasportate in grande misura dal compartimento vascolare nel lume della tuba del coniglio (Leese and Gray, 1985). La glicina protegge l'embrione del topo nella fase di preimpianto dall'effetto dannoso degli ioni inorganici (Van Winkle et al., 1990), probabilmente questo è dovuto alla sua capacità di agire come un osmolite organico. (Dawson et al., 1998). Taurina e ipotaurina sono tra i maggiori costituenti del fluido oviduttale e giocano un ruolo importante nella vitalità dei gameti e dell'embrione nella fase di preimpianto (Boatman, 1997).

#### 1.4.7.5 *Proteine*

Quella proteica è una delle principali componenti del ODF. 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). Killian et al, (1989) hanno evidenziato che mentre la concentrazione proteica del ODF non subisce delle

variazioni durante il ciclo estrale, la quantità totale delle proteine rilevate giornalmente a livello dell'ODF risulta maggiore nella fase non luteinica rispetto a quella luteinica in funzione del significativo aumento del volume di ODF. Lippes et al. (1981) riportano che in umana, il volume e la concentrazione proteica dell'ODF sono inversamente proporzionali durante il ciclo mestruale. Come in tutti gli organi cavi, anche a livello del lume tubarico, la tonaca mucosa seleziona le molecole che l'attraversano mediante meccanismi di esocitosi ed endocitosi (Oliphant et al., 1978). Oliphant et al. (1978) hanno dimostrato che il passaggio delle proteine sieriche nell'ODF è inversamente proporzionale al loro peso molecolare.

L'*Albumina sierica bovina* (BSA), 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 della Western blot, Staros e Killian (1998) 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'TVF. Il

seme di ariete può essere, inoltre, capacitato *in vitro* anche in assenza di BSA ma la velocità di capacitazione, 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). Negli ultimi anni studi condotti sulle secrezioni dell'ovidutto hanno portato all'identificazione di proteine specifiche di questo tratto che sono capaci di legarsi 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.

#### *1.4.7.5.1 Glicoproteine specifiche dell'ovidutto (OGP)*

Negli ultimi anni studi condotti sulle ODF, hanno portato all'identificazione e caratterizzazione di proteine specifiche dell'ovidutto in diverse specie: nel topo (Kapur and Johnson, 1985; 1986), nel hamster (Leveille et al., 1987; Oikawa et al., 1988; Abe et al., 1992), nel ratto (Abe and Abe, 1993), nel maiale (Buhi et al., 1989), nella pecora (Sutton et al., 1984), nel bovino (Roberts et al., 1975; Gerena and Killian, 1990), nella capra (Gandolfi et al., 1993), nel coniglio (Barr and Oliphant, 1981), nel babbuino (Fazleabas and Verhage, 1986) e nell'uomo (Lippes et al., 1981; Verhage et al., 1988). 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. Queste proteine, infatti, sono capaci di legare con il gamete femminile, con gli embrioni nelle prime fasi di sviluppo (Brown and Cheng 1986; Hedrick et al., 1987; Kapur and Johnson, 1988; Kan et al., 1988; 1989; Gandolfi et al., 1989; 1991, Abe and Oikawa, 1990; Boice et al., 1990a; 1992; Wegner and Killian, 1991; Abe et al., 1995a; Staros and Killian, 1998) e con il gamete maschile (Sutton et al., 1984a; Lippes and Wagh, 1989; McNutt et al., 1992; King and Killian, 1994; King et al., 1994; Abe et al., 1995b).

La quantità delle glicoproteine oviduttali è massima durante la fase preovulatoria e decresce in seguito. Così, la sintesi e la secrezione delle glicoproteine specifiche dell'ovidutto, si realizza in risposta alla stimolazione degli estrogeni (Abe et al., 1998), mentre il progesterone sembra avere scarsa influenza. Tuttavia, Sun et al. (1998) hanno suggerito che l'LH piuttosto che gli estrogeni rappresenti lo stimolo alla sintesi e alla secrezione delle glicoproteine specifiche dell'ovidutto. Le glicoproteine specifiche dell'ovidutto si legano alla zona pellucida degli oociti e degli embrioni, indicando un ruolo nelle fasi di sviluppo precoce (Verhage et al., 1997, Staros and Killian, 1998).

Tra le proteine d'interesse che sono state recentemente identificate nel fluido oviduttale bovino ricordiamo una proteina di 40 kDa (bOP-40) non 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.

Un'altra glicoproteina identificata è la *Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS)*, enzima che catalizza l'isomerizzazione della  $PGH_2$  in  $PGD_2$ . 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  $PGD_2$ , una correlazione positiva è stata comunque dimostrata tra le concentrazioni di PGDS e  $PGD_2$  (Tanaka et al., 1997). Oltre che nel plasma seminale, la L-PGDS è

presente anche nel fluido oviduttale bovino. Staros e Killian (1998) ha identificato la L-PGDS, attraverso l'uso dell'SDS-PAGE e della 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. La terza proteina dell'ODF che ricordiamo è l'Osteopontina (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  $\alpha v \beta 3$ , sono stati recentemente identificati altri recettori e sequenze di legame capaci di legare l'OPN. Tra questi ricordiamo le integrine  $\alpha v \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha 8 \beta 1$  (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 e Heingard, 1985; Prince e Buttler, 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).

#### *1.4.7.5.2 Glicoproteine ovidutto specifiche associate all'estro*

Tra le proteine maggiormente presenti nell'ODF al momento dell'ovulazione ci sono le glicoproteine associate all'estro (OSGP). Queste o altre proteine correlate sono state trovate in tutte le specie di mammiferi studiate. Esse sono di particolare interesse in quanto è stato dimostrato che sono in grado di legarsi ai gameti e all'embrione precoce. Le OSGP di differenti specie mostrano una stretta omologia di sequenza, indicando una conservazione della sequenza amminoacidica e della struttura tra le specie. Le OSGP presentano sequenze simili alla chitinasi, un enzima che catalizza la chitina (Sendai Y. et al., 1994; Arias E.B. et al., 1994). La chitina è una glicoproteina trovata nell'esoscheletro degli invertebrati. Sebbene le OSPG non abbiano attività chitinasica perché mancano di alcuni amminoacidi chiave nelle loro sequenze, è stato ipotizzato che il sito attivo simile alla chitinasi delle OSPG potrebbe avere la proprietà di legare gli zuccheri; ciò



risulterebbe importante per il legame delle OSPG ai gameti o all'embrione.

Le OSPG mostrano anche molte proprietà simili alla superfamiglia delle mucine (Malette et al., 1995a; Malette et al., 1995b). Il significato funzionale della similitudine tra le OSPG e le mucine è attualmente ancora oggetto di studio, ma le ipotesi sono che esse potrebbero ricoprire i gameti e gli embrioni o l'epitelio creando una barriera protettiva carica negativamente in grado di resistere alla digestione da parte delle proteasi o di altri fattori.

Le analisi dei carboidrati delle OSPG hanno mostrato la presenza di entrambi i siti di glicosilazione legati all'ossigeno (-O) e all'azoto (-N) e per molte specie la presenza di numerose isoforme delle OSPG con differenti gradi di glicosilazione.

Il galattosio, il mannosio, N-acetilglucosammina, N-acetilgalattosammina, l'acido N-acetilneuramminico e il fucosio sono tra gli altri zuccheri terminali rilevati (Vieira E.G. et al., 2000; Satoh et al., 1995). Il significato funzionale degli zuccheri terminali associati con le OSPG deve ancora essere dimostrato, ma l'importanza dei carboidrati e della glicosilazione nel creare superfici molecolari che giocano un ruolo nel riconoscimento e nel segnale (signaling) cellula-cellula è ben conosciuto. Per esempio, è noto che i recettori del mannosio sulla superficie degli spermatozoi umani sono stati associati con l'induzione della reazione acrosomiale e che le proteine che legano i carboidrati sulla superficie dello spermatozoo sembrano essere coinvolte nel

collegamento tra lo spermatozoo e i carboidrati terminali sulla zona pellucida dell'oocita (Benoff S., 1997). Inoltre è chiaro che i glicconiugati giocano un ruolo importante nel legare gli spermatozoi all'epitelio dell'ovidutto per formarne una riserva (Suarez S.S., 1998).

Nel hamsters, la porzione carbonilica della glicoproteina può mediare l'aderenza degli spermatozoi all'epitelio della porzione istmica dell'ovidutto (Demott et al., 1995). Il legame delle OSGP può migliorare la fertilizzazione (Martus et al., 1998) in quanto è stato mostrato che sono in grado di migliorare la capacitazione spermatica e il legame con la zona pellucida e facilitano la penetrazione degli spermatozoi (Abe and Hoshi, 1997; Verhage et al., 1997).

Nel hamster le OSGP associate sia con gli oociti che con gli spermatozoi potrebbero migliorare la penetrazione e la fertilizzazione influenzando la fase della secrezione degli enzimi acrosomiali, o di degradazione (Boatman and Magnoni, 1995). Hunter (1994) ha proposto che, incrementando la viscosità del fluido luminale, le glicoproteine oviduttali potrebbero stabilizzare il microambiente nelle immediate vicine dei gameti e dell'embrione, prevenendo la dispersione di nutrienti essenziali e di ioni, in particolare durante il battito ciliare o le contrazioni muscolari. Questo aumento di viscosità proteggerebbe l'embrione dai repentini cambiamenti osmotici e dalle fluttuazioni dei costituenti del fluido luminale, riducendo in prossimità dell'embrione la rapidità delle variazioni del microambiente. L'aumento di viscosità del fluido oviduttale, potrebbe anche ridurre le perdite di fluido oviduttale

nella cavità peritoneale. Sebbene le OSGP siano state esaminate in dettaglio, il loro ruolo fisiologico resta elusivo.

Visto che gli oociti, gli spermatozoi e gli embrioni possono sopravvivere in vitro, è logico postulare una funzione putativa per queste glicoproteine presenti solo in vivo. Un'ipotesi potrebbe essere legata alla necessità di una protezione immunologica che è richiesta in vivo ma non in vitro. Infatti, Oliphant et al. (1984) hanno suggerito che il fluido oviduttale del coniglio conterrebbe un inibitore dell'attività del complemento, che eviterebbe l'immobilizzazione degli spermatozoi, e questa inibizione potrebbe essere attribuita a glicoproteine solforate ovidutto specifiche.

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. Diverse OSPG sono state osservate in numerose specie come: nel coniglio (Urzua et al., 1970), nella scimmia (Mastroianni et al., 1970), nella pecora (Sutton et al., 1984), nel topo (Kapur and Johnson, 1985), nel maiale (Brown and Cheng, 1986; Buhi et al., 1989), nel babbuino (Fazleabas and Verhage, 1986), nell'uomo (Lippes et al., 1981; Verhage et al., 1988), nel bovino (Boice et al., 1990; Gerena and Killian, 1990) e nel cavallo (Willis et al., 1994).

Una correlazione tra la comparsa delle OSPG nel fluido oviduttale e la fase estrale del ciclo è stata descritta in molte specie. Il numero

delle OSPG presenti nell'ovidutto sembra dipendere 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 OSPG. Gandolfi et al. (1989) hanno, infatti, 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 OSPG 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 OSPG, 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 di maiale fino allo stadio di blastocisti è superiore in embrioni messi in coltura con ODF suino non

luteale rispetto a quelli in ODF della fase luteinica. Anche se non è stato dimostrato che l'ODF non luteale conteneva OSPG, è certo che le OSPG sono presenti in alte concentrazioni durante la fase non luteinica e questo porterebbe a pensare che le OSPG possano essere uno dei fattori responsabili dell'aumento della percentuale di produzione embrionale.

#### **1.4.8 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 e Sawyer (1986), nella pecora cinque proteine dell'ODF (140, 95, 78, 66 e 55 KDa) legano il gamete maschile. Lippes e 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 e Killian (1994) hanno dimostrato che la OSPG bovina (90-95 KDa) si lega alla testa e alla porzione centrale dello spermatozoo. Abe et al. (1995) hanno invece osservato che la OSPG 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 OSPG 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 zona pellucida (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 OSPG 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 OSPG 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'OSPG 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.

### **1.4.9 Funzioni dell'ODF.**

Numerosi lavori 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. (1995), 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. (1995) 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.



## **PARTE SPERIMENTALE**

## **2 Scopo della tesi**

L'obbiettivo della presente tesi è stato quello di caratterizzare il fluido oviduttale (porzione ampollare) della bufala attraverso lo studio della dinamica di secrezione in diverse fasi del ciclo estrale e nei soggetti aciclici.

In particolare si è provveduto a caratterizzare la componente energetica (glucosio, piruvato e lattato), ionica (sodio, potassio, cloro, calcio, magnesio, fosfati), lipidica (fosfolipidi totali) e proteica (proteine totali e glicoproteine).

### **3 Materiali e metodi**

Per l' espletamento della presente prova si è provveduto a richiedere l' autorizzazione ministeriale secondo quanto previsto dal D.L. 116/92.

Sono state scelte per la cannulazione dell' ovidutto 10 bufale pluripare, ad una distanza dal parto di circa 15 giorni e in cui sono state verificate, attraverso l' esame ginecologico, le condizioni sanitarie dell' apparato genitale e dell'ovidutto in particolare.

## **3.1 Cannulazione dell'ovidutto**

La cannulazione dell' ovidutto è avvenuta utilizzando la tecnica operatoria descritta da Kavanaugh et al. (1992) e modificata per la specie bufalina in considerazione delle ridotte dimensioni dell' apparato riproduttivo della specie in esame rispetto a quella bovina (Vittoria, 1997).

### ***3.1.1 Preparazione del catetere***

Il catetere a doppia anima utilizzato per la cannulazione consiste in un tubo di polietilene (Intramedic PE-60, Clay Adams) del diametro interno di 0,76 mm ed esterno di 1,22 mm e della lunghezza di 97 cm inserito in un tubo di silastic medical-grade (602-205, Dow Corning), della lunghezza di 87 cm, avente diametro interno di 1,02 mm e esterno di 2,16 mm.

Per permettere l' inserimento del catetere di polietilene all' interno del catetere di silicone, quest' ultimo è stato immerso in xilene per 15 minuti primi, in modo da determinarne la dilatazione. Il catetere di polietilene è stato rapidamente inserito all' interno di quello siliconico e successivamente posto ad asciugare all' aria sotto cappa a flusso laminare per alcuni giorni. Sull' estremità del catetere a doppia anima così costruito, a partire da una distanza di circa 5 mm dall'estremità del catetere, mediante l' utilizzo di una siringa ipodermica munita di un ago

di 21-gauge sono state applicate, intervallate da 1 cm di distanza, tre gocce di una miscela adesiva ottenuta miscelando in parti uguali xilene e silastic medical adhesive silicon type A (Dow Corning), per garantire l' ancoraggio dei punti di fissazione del catetere all' ovidutto (Figura. 1)

**Figura 1 Estremità ampollare del catetere a doppia anima con punti di ancoraggio**

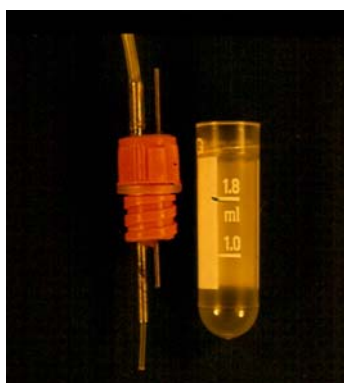


### ***3.1.2 Apparato di raccolta e stoccaggio del campione***

Il sistema di raccolta è costituito da diversi componenti e precisamente (Fig.2):

- a) tappo della cryogenic vial;
- b) due tubicini di acciaio inossidabile;
- c) una vial di raccolta;
- d) un catetere di sfiato con filtro.

**Figura 2 Apparato di raccolta dell'ODF**



I due tubi di acciaio inossidabile, di 15 e 20 gauge rispettivamente, attraversano il tappo e vengono cementati con questo mediante l'uso di silicone II caulking (Dow Corning). Il catetere di sfiato fornito di apposito filtro, viene inserito sul tubo in acciaio di 20 gauge mentre l'estremità libera del catetere a doppia anima viene inserita su quello da 15 gauge avendo cura che la parete di questo si inserisca per tutta la lunghezza della porzione esterna del tubo di acciaio fra il catetere di polietilene e quello di silicone. In questo modo il catetere di polietilene viene a scorrere all'interno di quello di acciaio fino a sboccare all'interno della vial. L'apparato di raccolta viene assicurato all'animale mediante una tasca di raccolta in tessuto traspirante, applicata a livello della fossa del fianco mediante l'utilizzo di tag cement (Tag Cement, NASCO, fort Atkinsons, WI).

I campioni di ODF sono stati raccolti, giornalmente, in cryogenic vials in polietilene del volume di 2 ml (Dow Corning) applicate all'estremità libera del catetere, catalogati e stoccati in azoto liquido fino al momento delle analisi.

### **3.1.3 Procedura chirurgica**

Precedentemente all'intervento, ogni soggetto è stato esaminato mediante palpazione rettale (Figura 3), per sincerarsi che le dimensioni e i rapporti spaziali dell'utero permettessero una corretta manipolazione dell'ovidutto attraverso la successiva breccia operatoria.

Sull'animale in decubito costale sinistro, opportunamente sedato e anestetizzato localmente, mediante l'uso di acepromazina, xilazina al 2% e lidocaina al 5%(Figura 4), anteriormente e parallelamente al tensore della fascia lata è stata effettuata una incisione della cute di circa 20 cm discontinuando i piani sottostanti ed il peritoneo (Figura 5) e si provveduto all'esteriorizzazione dell'apice del corno uterino (Figura 6) destro e della relativa salpinge (Figura 7) . A livello ampollare mediante l'ostio infundibulare dell'ovidutto è stato inserito il catetere (Figura 8) a doppia anima in direzione infundibulo-istmica per circa 3 cm provvedendo al suo ancoraggio mediante tre punti di sutura distanziati di circa 1 cm l'uno dall'altro (Figura 9), avendo cura di verificare la pervietà del catetere stesso mediante l'immissione di soluzione fisiologica all'interno del catetere provvisoriamente ancorato all'ovidutto mediante pinze bull dog. Fissato il catetere, l'utero è stato riposizionato nella sua posizione fisiologica (Figura 10).

L' estremità libera del catetere è stata fatta fuoriuscire a livello della regione del fianco attraverso la breccia operatoria. Infine il catetere è stato collegato al sistema di raccolta precedentemente descritto e la sua parte libera unitamente alla vial di raccolta inserita nella tasca cementata nella regione del fianco.



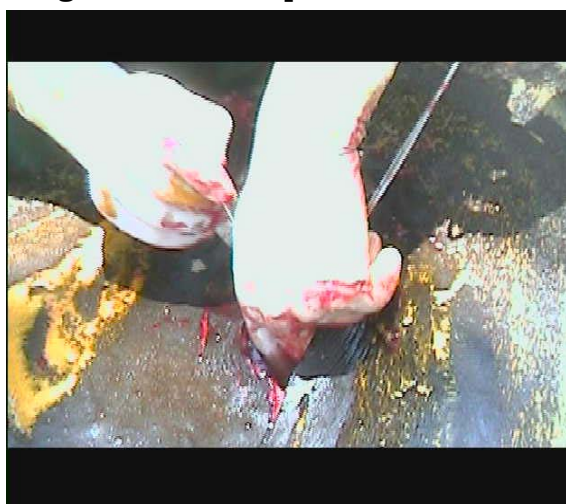
**Figura 3** Palpazione evaluación



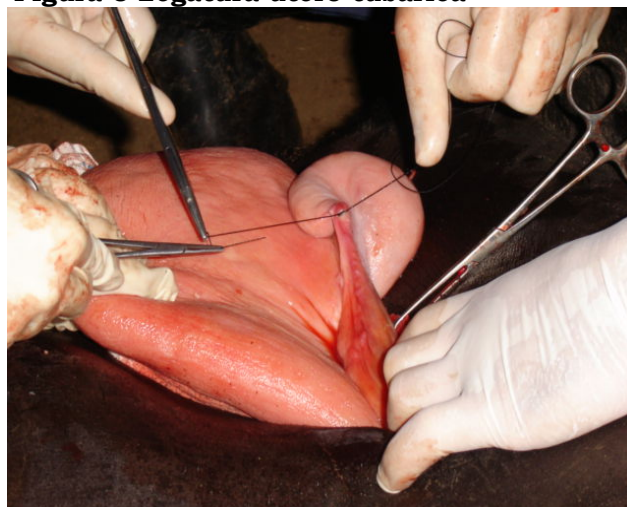
**Figura 4** preparazione del campo operatorio



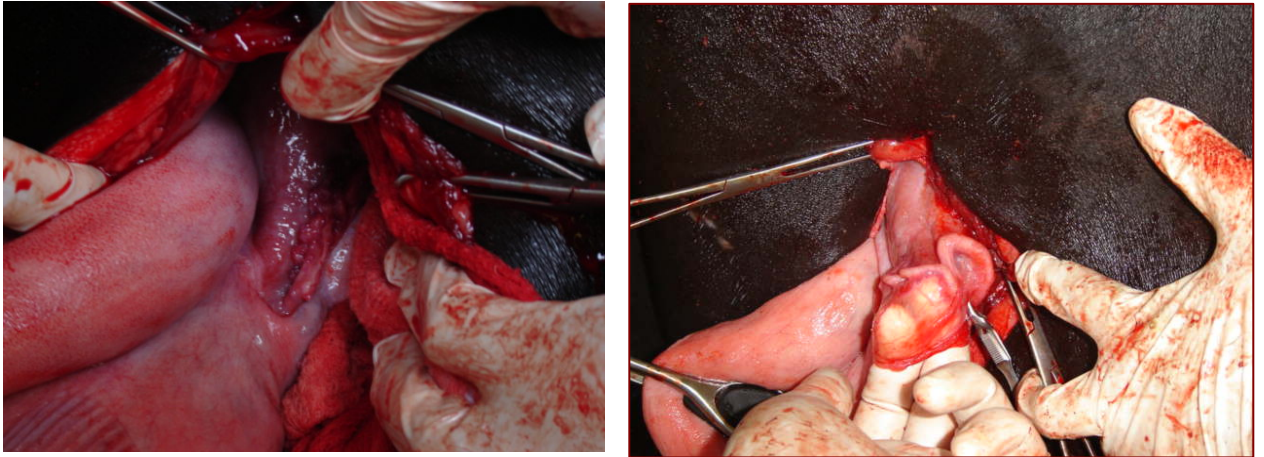
**Figura 5** Breccia operatoria



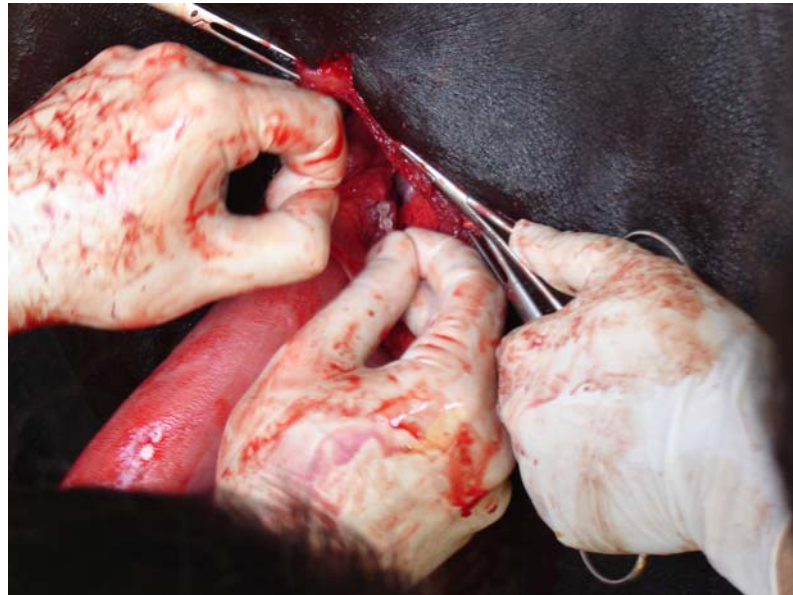
**Figura 6** Legatura utero tubarica



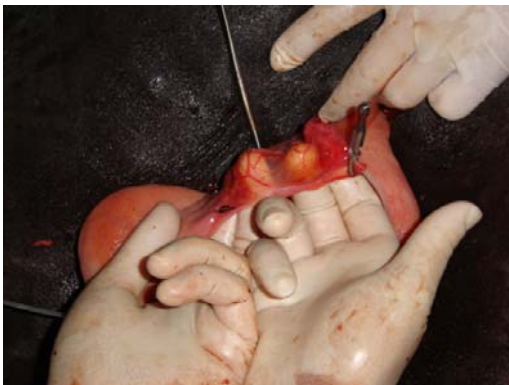
**Figura7 Esteriorizzazione dell' ovidutto e individuazione della porzione ampollare**



**Figura 8 Cannulazione della porzione ampollare**



**Figura 9 Fissazione in situ**



**Figura 10 Sutura degli strati profondi**



### **3.2 Raccolta dei campioni**

Dopo la cannulazione, gli animali sono stati monitorati giornalmente e la vial contenente il fluido oviduttale prodotto nelle 24 ore precedenti rimossa e sostituita con una nuova, previa pulizia del sistema di raccolta mediante l'uso di etanolo al 70% preparato con acqua bidistillata.

Ciascuna vial è stata identificata e catalogata mediante un codice alfanumerico apposto sulla stessa costituito da una lettera identificativa dell'animale e di un numero progressivo e sequenziale indicante il prelievo giornaliero del liquido oviduttale a partire dal giorno dell' intervento. I campioni così raccolti, sono stati immediatamente congelati e stoccati in azoto liquido fino al momento delle analisi.

### **3.3 Valutazione della ciclicità e induzione del calore**

A partire dalla cannulazione, ogni 5 giorni è stato prelevato un campione di sangue dalla vena giugulare mediante l'uso di vacutainer eparinizzati. Sul plasma raccolto, previa centrifugazione, si è effettuato il dosaggio del P<sub>4</sub> con metodica RIA. In funzione dei valori ottenuti è stato possibile valutare lo stato di ciclicità dei soggetti. Concentrazioni ematiche di P<sub>4</sub>>1,5 ng/ml sono state considerate indicative della presenza di un corpo luteo funzionante (Zicarelli et. al., 1997). La sincronizzazione dell'estro, ottenuta con la somministrazione di una dose di prostaglandina (375 µg; Prosolvin®, Intervet) per via intramuscolare, è stata effettuata su 4 bufale che avevano presentato in almeno due prelievi valori di P<sub>4</sub> superiori a 1,5 ng/ml.

Al fine di valutare in maniera indiretta l'evento ovulatorio, in seguito alla somministrazione delle prostaglandine, si è provveduto ad effettuare prelievi di sangue, mediante l'uso di vacutainer eparinizzati, ogni due ore per monitorare le concentrazioni ematiche di LH. In funzione del picco di LH, l'ovulazione è stata stimata a circa 35,5 ore dal picco stesso (Seren et al., 1994; Porto-Filho et al., 1999; Porto-Filho, 2000).

Il ricorso alla valutazione indiretta dell'ovulazione, mediante dosaggio ormonale è risultato indispensabile, in quanto la tecnica dell'

esame ecografico per via trans-rettale, comportava concreti rischi di ablazione del catetere dall'ostio tubarico.

Mediante il protocollo riportato è stato dunque possibile suddividere gli animali in ciclici ed aciclici, e su questi ultimi individuare le diverse fasi del ciclo estrale e in particolare:

- a) fase diestrale ( $P_4 > 1,5 \text{ ng/ml}$ );
- b) fase pre-ovulatoria (dalla caduta del  $P_4 < 1,5 \text{ ng/ml}$  fino all'ovulazione presunta);
- c) fase ovulatoria (ovulazione prevista in funzione del picco di LH);
- d) fase post-ovulatoria (dall'ovulazione alla risalita dei livelli ematici di  $P_4$  al disopra di  $1,5 \text{ ng/ml}$ ).

### **3.4 Preparazione del campione e analisi biochimiche**

I campioni sono stati rimossi dall' azoto e scongelati in ghiaccio a temperatura costante. Previa misurazione, ogni campione, è stato trasferito in un' eppendorf da 2 ml e centrifugato a 1400 rpm per 15 minuti per permettere la sedimentazione di eventuali cellule di sfaldamento dell'epitelio tubarico che altrimenti avrebbero potuto interferire con le determinazioni. Il fluido così trattato è stato recuperato e suddiviso in 2 aliquote. Per ciascun campione, la prima aliquota del volume di 120 $\mu$ l è stata posta in un' eppendorf da 500 $\mu$ l e destinata alla determinazione delle concentrazioni di glucosio, piruvato e lattato, mentre la seconda aliquota, costituita da tutto il liquido oviduttale restante, è stata caricata in eppendorf da 2 ml posta in cryo box e stoccata -80°C fino al momento delle analisi per la determinazione dei valori di sodio, potassio, cloro, calcio, magnesio, fosfati, fosfolipidi e delle componenti proteiche.

#### ***3.4.1 Misurazione del volume***

Dopo scongelamento in ghiaccio, il volume di ogni campione (ml/24h) è stato misurato ad una temperatura di 4°C, mediante l' utilizzo di siringhe ipodermica monouso da 1 ml tipo insulina.

### **3.4.2 Ioni**

Preliminarmente all'utilizzo delle cryogenic vials in polietilene (Dow Corning) si è provveduto a valutare la non interferenza di queste con le concentrazioni ioniche dei liquidi in esse contenuti. A tal fine, soluzione fisiologica sterile e acqua bidistillata, previa registrazione delle concentrazioni ioniche, sono state caricate ognuna in 10 vial, congelate e stoccate in azoto. I campioni scongelati sono stati sottoposti ad analisi confermando l' ininfluenza del sistema sulle concentrazioni ioniche dei liquidi in esse contenuti. Le aliquote di ODF, stoccate a -80°C sono state scongelate in ghiaccio a temperatura costante e sottoposte ad analisi mediante l' utilizzo di Kodak-Ektachem 700XR C series electrolyte analyzer (Kodak Rochester, NY USA) per la determinazione di Sodio , Potassio, Cloro, Calcio, Magnesio, Fosfati.

### **3.4.3 Carboidrati**

Per ogni campione l' aliquota destinata alla determinazione di glucosio, del piruvato e del lattato è stata esposta ad una temperatura di +80°C per 5 minuti primi, al fine di inattivare temporaneamente il pool enzimatico presente nel liquido oviduttale e evitare così interferenze nelle letture. Il campione è stato quindi spinnato per 30 minuti secondi e, riportato a temperatura ambiente, immediatamente sottoposto ad analisi.

Le determinazioni della concentrazione degli zuccheri sono state eseguite mediante saggio enzimatico-colorimetrico, utilizzando uno



spettrofotometro a UV modello Perkin Elmer precisely Lambda 25 UV/VIS SPECTROMETER® e reagenti Sigma-Aldrich®. L'analisi Spettrofotometrica UV, è stata eseguita in modalità Time-Drive per un tempo di 25 minuti primi per ogni singola determinazione ad una lunghezza d'onda di 340 nm. Soluzioni note a concentrazioni differenti di glucosio, piruvato e lattato, sono state preparate utilizzando soluzione fisiologica sterile come solvente al fine di confrontare l'eventuale variazione delle concentrazioni stesse durante le fasi di congelamento e stoccaggio. Le concentrazioni delle soluzioni così ottenute, sono state determinate con la stessa metodica utilizzata per i campioni di ODF. Le soluzioni sono state quindi aliquotate in cryogenic vials in polietilene del volume di 2 ml (Dow Corning) e congelate in azoto nello stesso contenitore utilizzato per lo stoccaggio dei campioni. Dopo un periodo di circa 2 anni le aliquote sono state scongelate e analizzate. Non sono emerse dall'analisi effettuata variazioni rilevanti nelle concentrazioni degli zuccheri esaminati. Pertanto è possibile affermare che la metodica di congelamento, stoccaggio e scongelamento utilizzata non apporta variazioni alle concentrazioni di zuccheri in esame.

Per quanto riguarda il lattato, lo scarso volume di ODF recuperato dagli animali aciclici, non ha permesso la determinazione della concentrazione dello zucchero su un numero di campioni rappresentativo.



### **3.4.4 Fosfolipidi**

La determinazione diretta della concentrazione dei fosfolipidi è stata eseguita mediante saggio enzimatico-colorimetrico, utilizzando uno spettrofotometro a UV modello Perkin Elmer precisely Lambda 25 UV/VIS SPECTROMETER® e il kit Phospholipids ref. 17320 della Sentinel Diagnostics®. L'analisi Spettrofotometrica UV, è stata eseguita a 37°C ad una lunghezza d'onda di 520 nm.

### **3.4.5 Proteine**

L'analisi della componente proteica dell' ODF è stato eseguita mediante il sistema automatizzato Agilent 2100 Bioanalyzer®, utilizzando il kit di reagenti Agilent Protein 230 (n. 5067-1517) della Agilent Technologies® secondo le metodiche indicate dalla casa produttrice. Si è quindi ottenuta la concentrazione proteica del campione, il quantitativo totale di proteine presenti nel campione, la separazione in funzione del peso molecolare delle proteine presenti mediante migrazione elettroforetica, la concentrazione di ogni singola proteina mediante elettroferogramma.

### **3.5 Analisi Statistica**

Le differenze circa il volume, le concentrazioni e le quantità totali della componente energetica, ionica, lipidica e proteica del fluido oviduttale raccolto nelle diverse fasi del ciclo estrale (diestrane, pre-ovulatoria, ovulatoria, post-ovulatoria) e tra i soggetti aciclici e quelli ciclici sono state testate mediante il Test t di Student a due code.

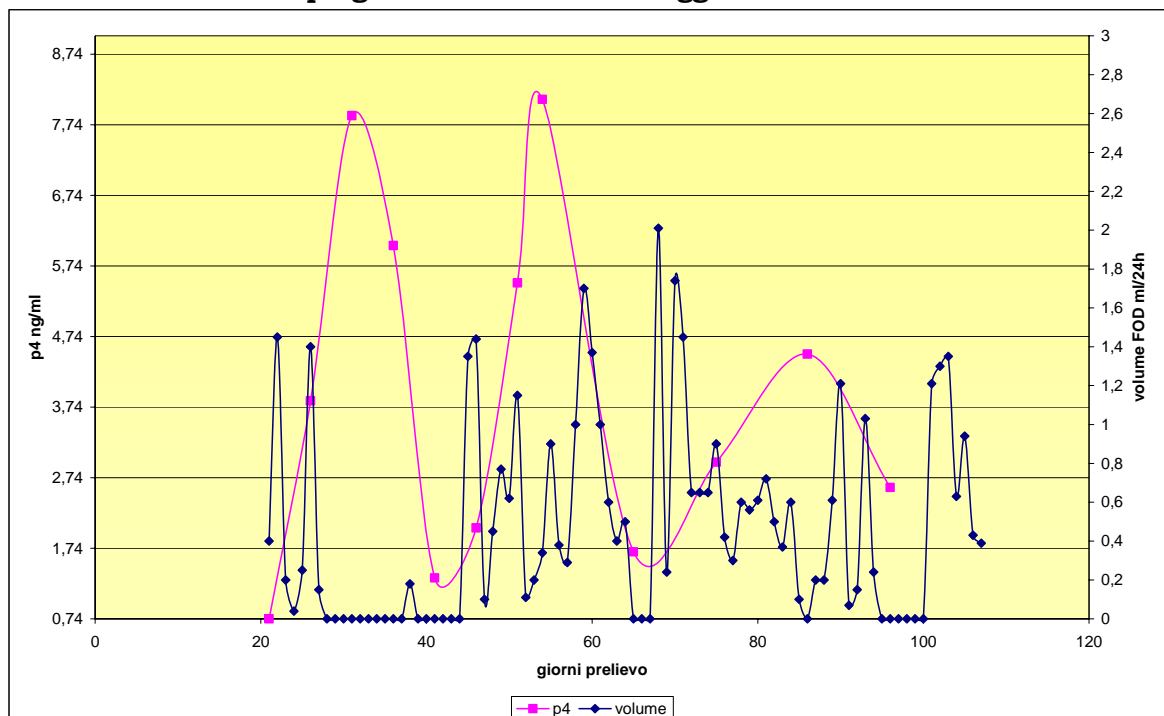
## **Risultati**

## 4.1 Volume

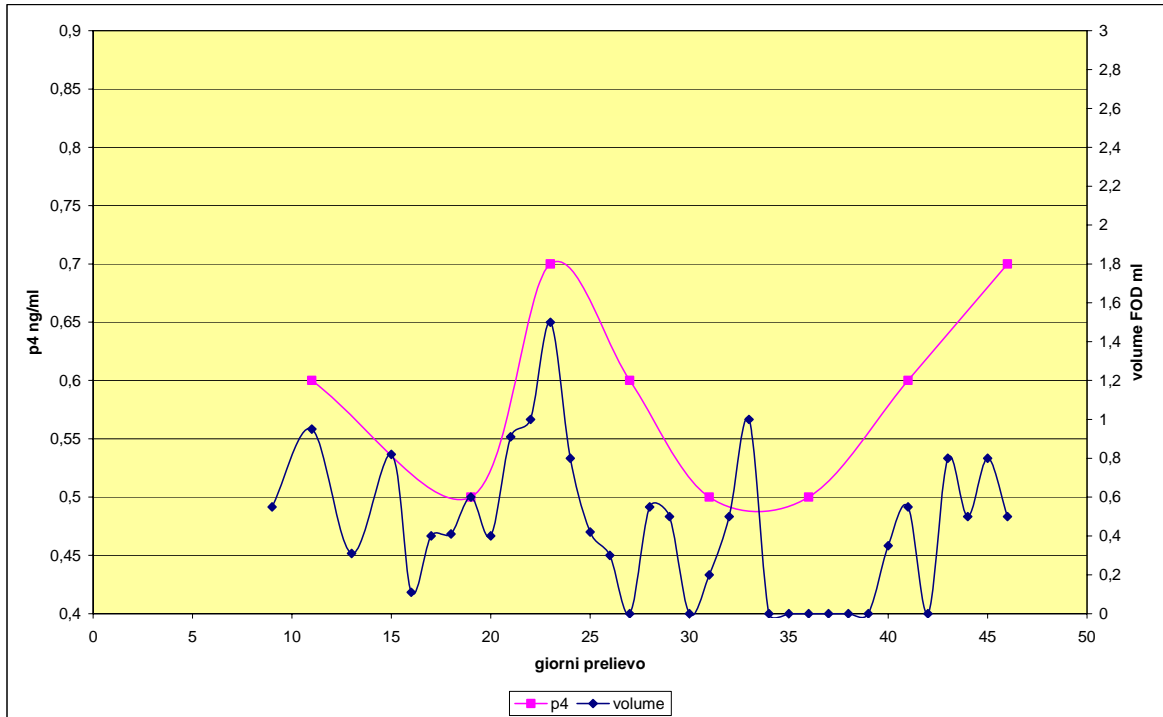
La produzione di ODF, è risultata condizionata dalla fase del ciclo estrale presentando un andamento periodico (Grafico 1).

Il volume (ml/24h) di ODF è risultato significativamente maggiore nei soggetti ciclici rispetto a quelli aciclici ( $0,60 \pm 0,50$  vs  $0,27 \pm 0,36$ ;  $P < 0.001$ ). E' interessante notare che la ciclicità di produzione è stata riscontrata anche nei soggetti aciclici con una periodicità che va dai 4 agli 8 giorni e che risulta indipendente dai livelli di progesterone dosati nel sangue (Grafico 2).

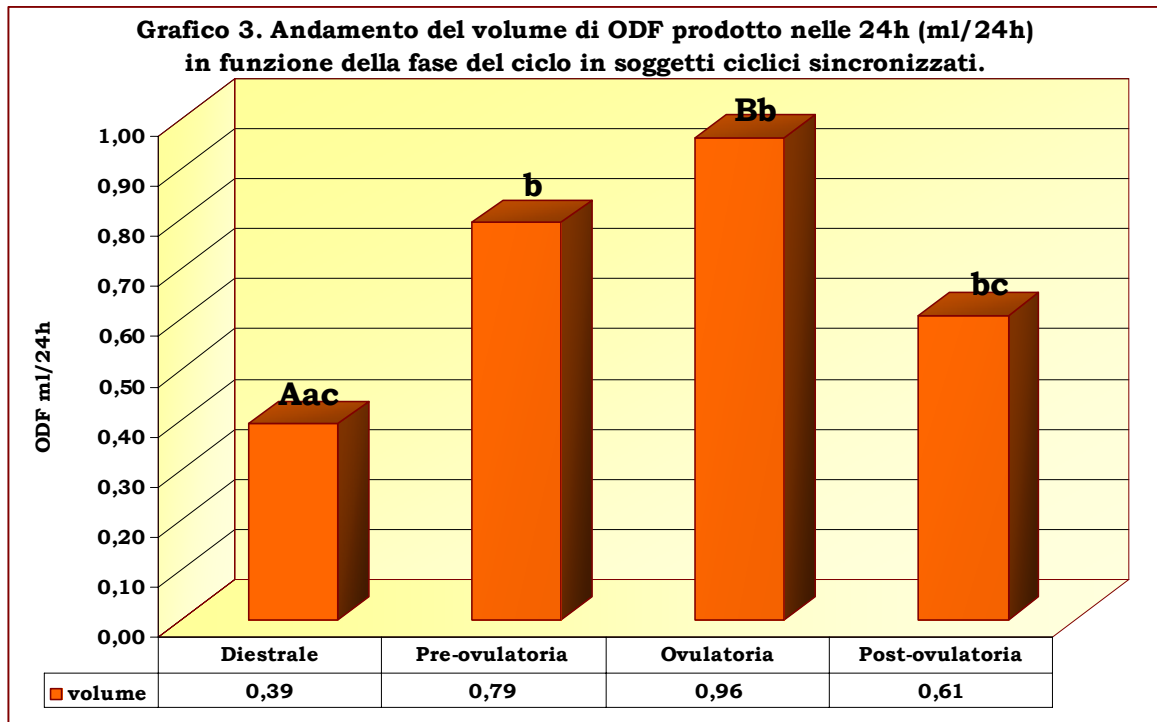
**Grafico 1. Andamento del volume di liquido oviduttale prodotto ml/24h in funzione dei livelli di progesterone ematici in soggetti ciclici.**



**Grafico 2. Andamento del volume di liquido oviduttale prodotto ml/24h in funzione dei livelli di progesterone ematici in soggetti aciclici.**



Analizzando i dati relativi alle diverse fasi prese in esame (diestrane, preovulatoria, ovulatoria e post ovulatoria), nei soggetti in cui sono stati indotti cicli brevi attraverso la somministrazione di prostaglandine, è stato osservato che la produzione di fluido oviduttale aumentava progressivamente fino a presentare valori massimi al momento dell'ovulazione (Grafico 3).



A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

a,b,c valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$

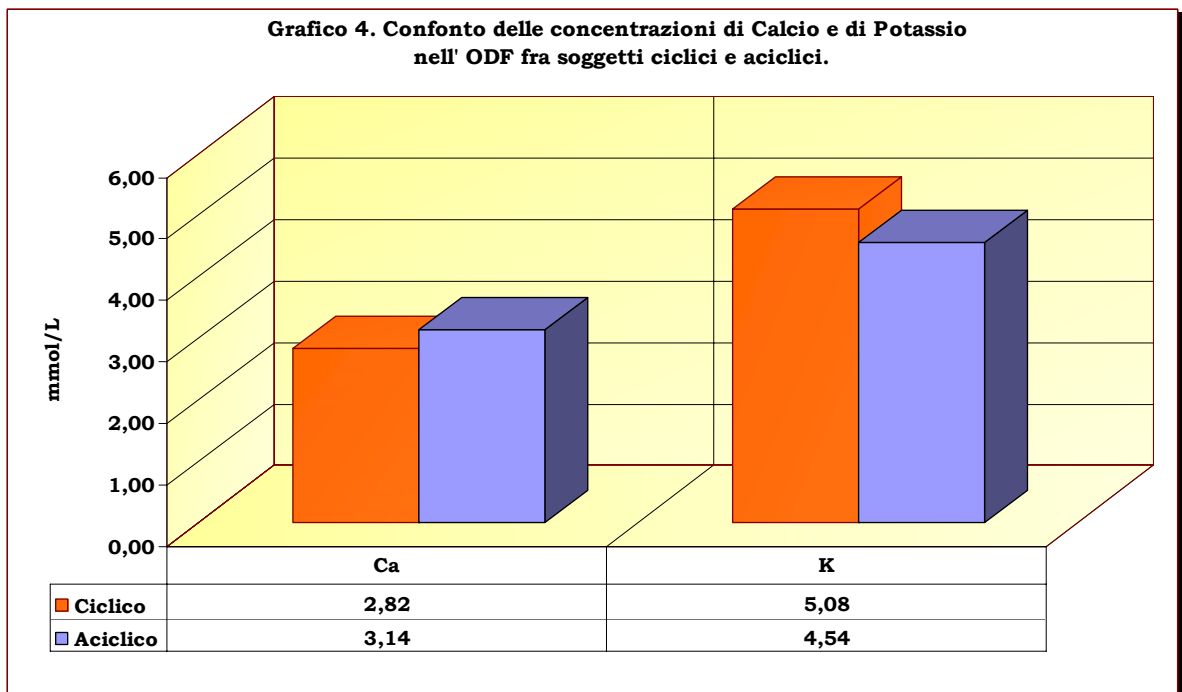
Esiste, comunque, una notevole variabilità del volume nelle diverse fasi considerate. Tale variabilità è risultata particolarmente elevata nelle fasi diestrace e pre-ovulatoria (Tabella 4).

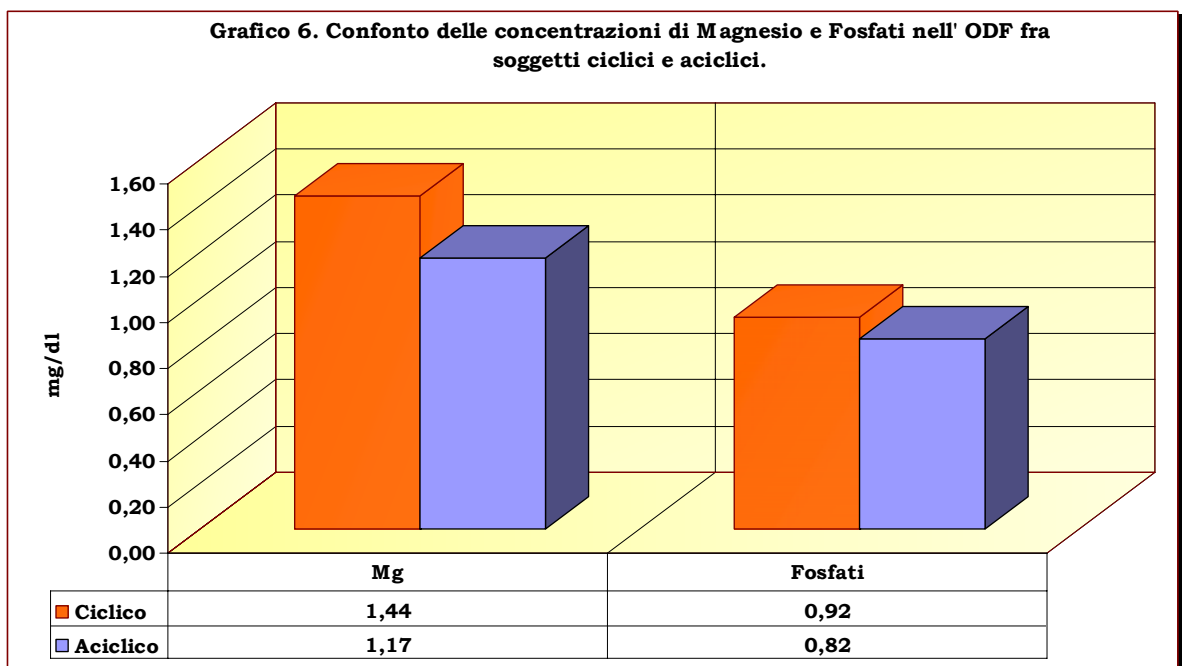
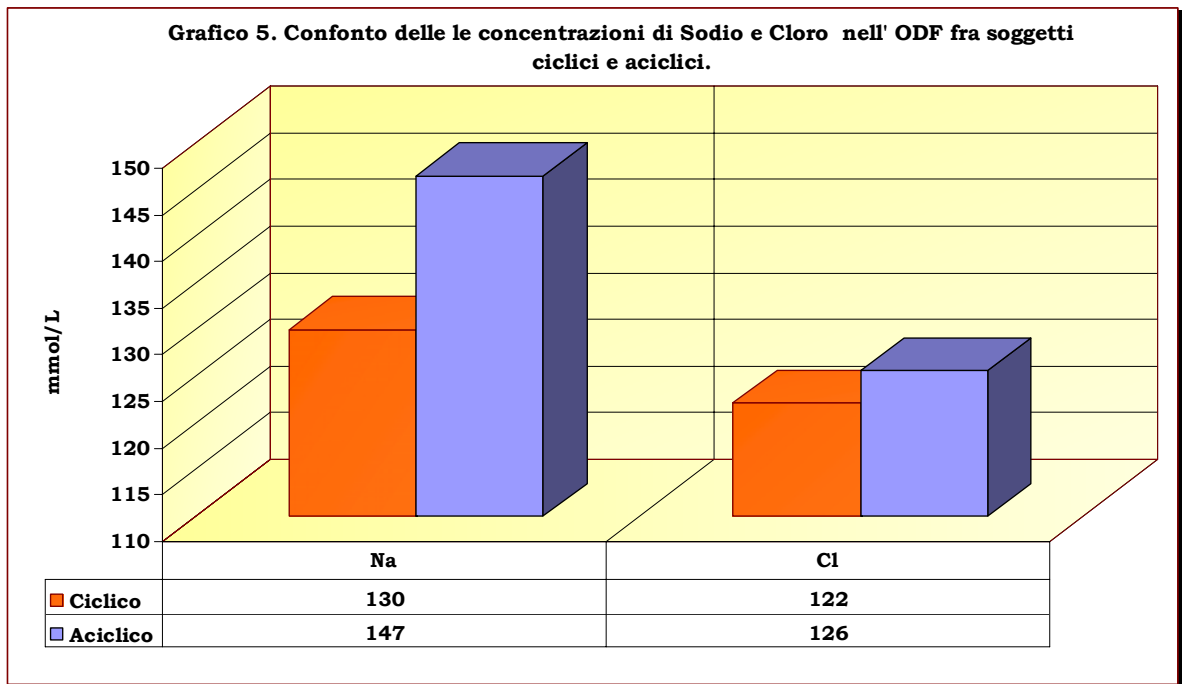
**Tabella 4. Coefficienti di variabilità (%) del volume di ODF raccolto durante le fasi del ciclo esaminate.**

Fase	Volume
Diestrale	108
Pre-Ovulatoria	86
Ovulatoria	58
Post-Ovulatoria	53
Totale	86

## 4.2 Ioni

Le concentrazioni di calcio, potassio, sodio, cloro, magnesio e dei fosfati non hanno presentato differenze significative nel confronto fra animali ciclici ed aciclici. Tuttavia le concentrazioni di K, Mg e fosfati, tendono ad essere maggiori nei soggetti ciclici rispetto agli aciclici (Grafici 4; 5; 6).

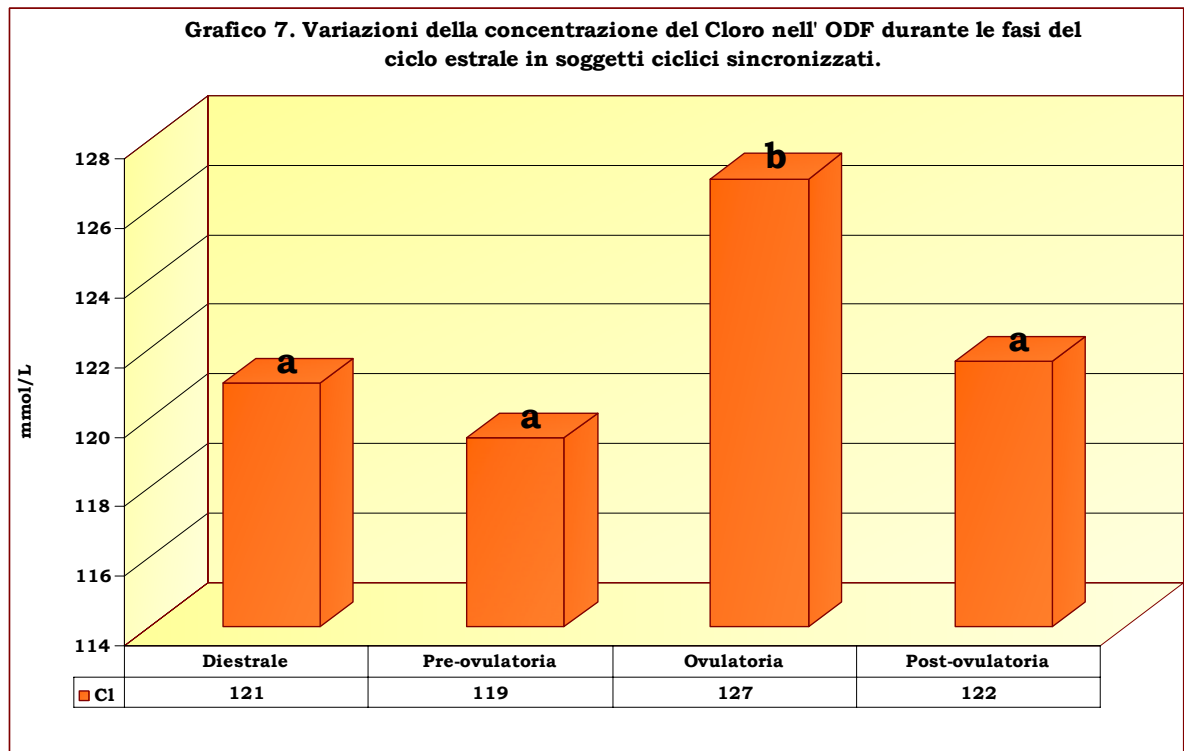




Nei soggetti ciclici, il cloro ha presentato un andamento caratterizzato da una leggera flessione nel passaggio dalla fase diestrale



a quella pre-ovulatoria, per poi aumentare ( $P < 0.05$ ) nella fase ovulatoria e ridursi nuovamente nella fase post-ovulatoria (Grafico 7) (Tabella 5).

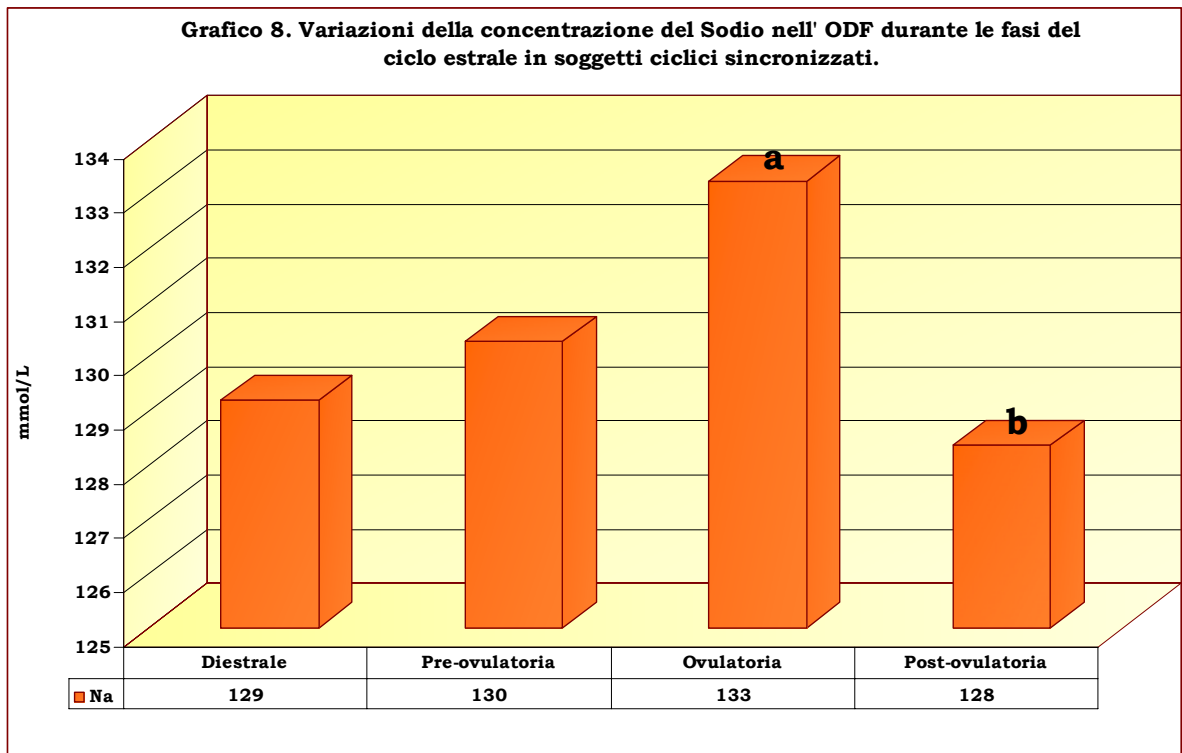


A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

a,b, valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$

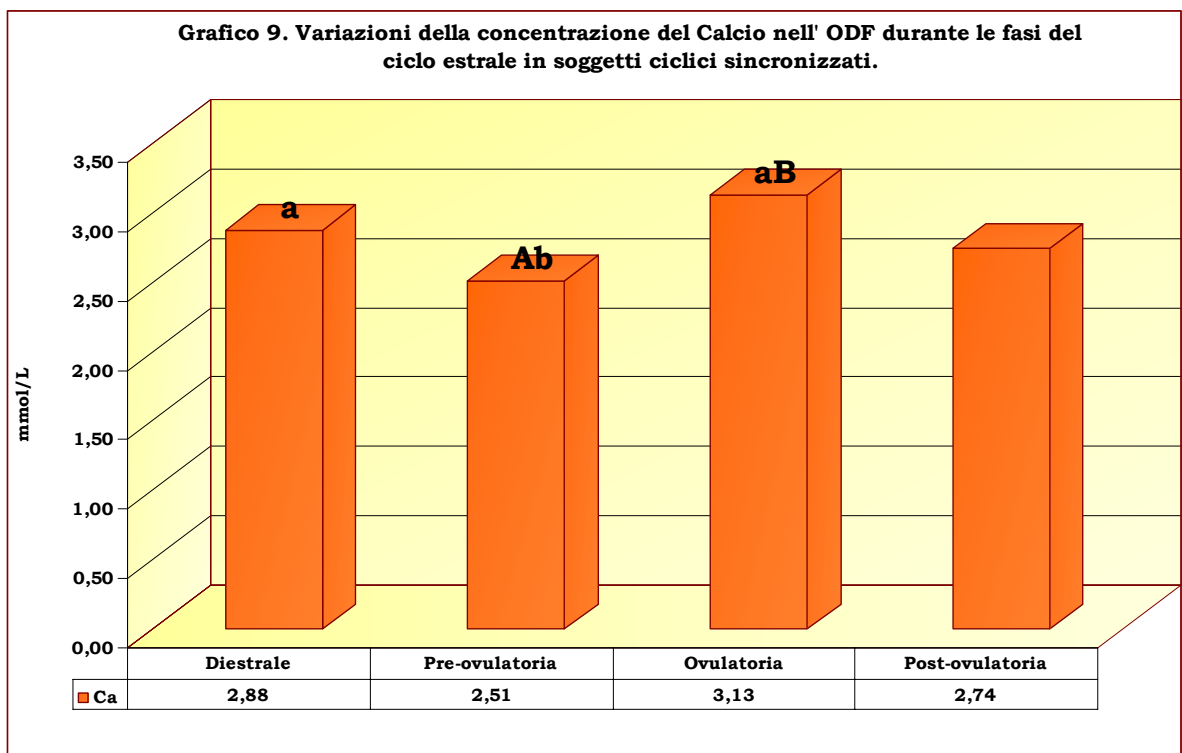
Sodio, calcio e fosfati, hanno presentato un andamento simile (Grafici 8;9;10).

Le concentrazioni sono risultate massime in corrispondenza della fase ovulatoria, laddove potassio e magnesio hanno presentato un punto di flesso (Tabella 5).



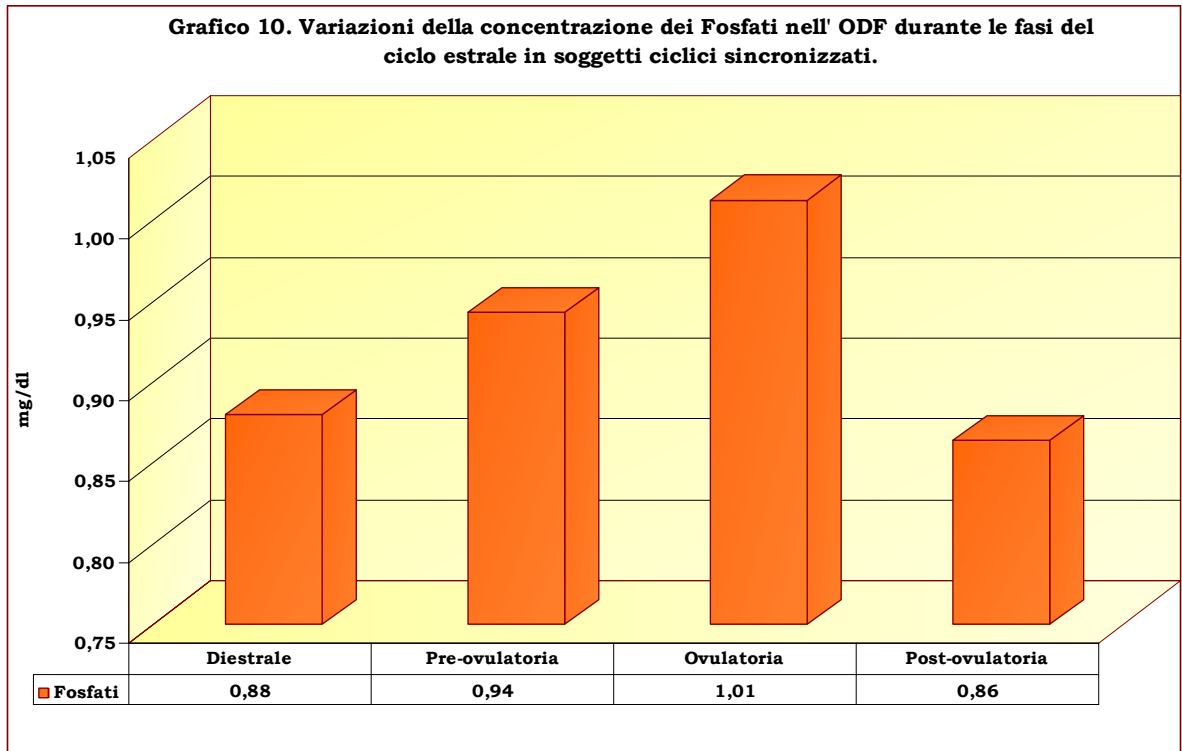
A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

a,b, valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$



A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

a,b, valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$



**Tabella 5. Concentrazione (media  $\pm$  dev.st) degli ioni Sodio, Potassio, Cloro, Calcio, Magnesio, Fosfati e confronto tra le fasi del ciclo esaminate in soggetti ciclici sincronizzati.**

Fase	Na	K	Cl	Ca	Mg	Fosfati
	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mg/dl	mg/dl
<b>Diestrone</b>	129 $\pm$ 5	5.11 $\pm$ 1.78	121 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	2.88 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	1.41 $\pm$ 0.35	0.88 $\pm$ 0.18
<b>Pre-ovulatory</b>	130 $\pm$ 11	5.29 $\pm$ 2.15	119 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	2.51 $\pm$ 0.24 <sup>Ab</sup>	1.45 $\pm$ 0.72	0.94 $\pm$ 0.14
<b>Ovulatory</b>	133 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	4.61 $\pm$ 0.47	127 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	3.13 $\pm$ 0.32 <sup>aB</sup>	1.43 $\pm$ 0.49	1.01 $\pm$ 0.35
<b>Post-ovulatory</b>	128 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	5.27 $\pm$ 1.65	122 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	2.74 $\pm$ 0.92	1.47 $\pm$ 0.73	0.86 $\pm$ 0.27

A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti; P<0.01

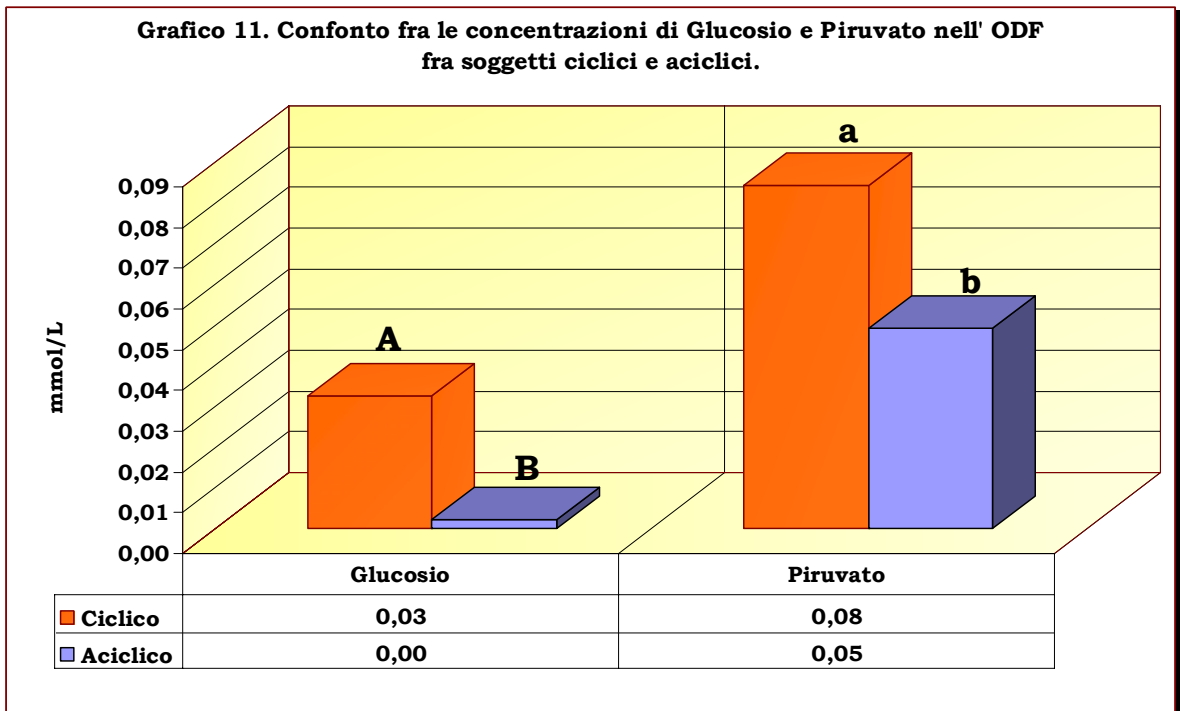
a,b, valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti; P<0.05

Potassio e Magnesio, infatti, hanno presentato una concentrazione massima in corrispondenza della fase pre-ovulatory (Tabella 5). Va

tuttavia ricordato che le differenze interfase di potassio, magnesio e fosfati non raggiungono la significatività.

### 4.3 Carboidrati

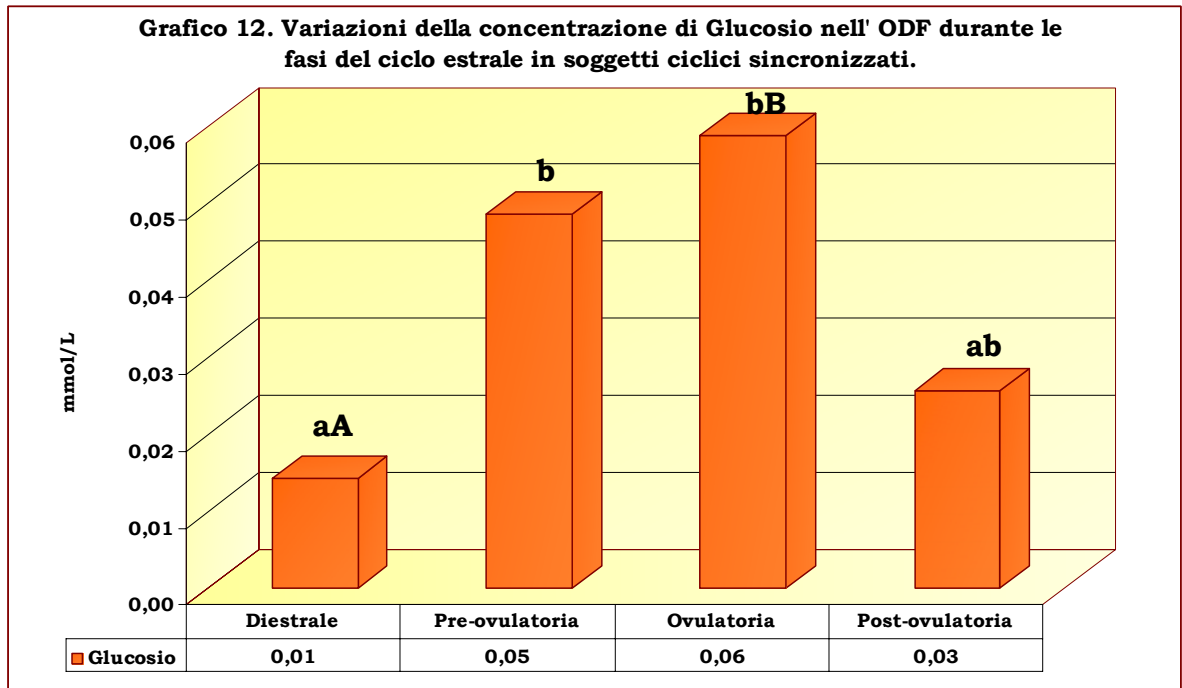
Le concentrazioni del glucosio ( $P < 0.01$ ) e del piruvato ( $P < 0.05$ ) sono risultate significativamente più basse nei soggetti aciclici quando confrontati con quelli ciclici indipendentemente dalla fase estrale considerata (Grafico 11).



<sup>A,B</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

<sup>a,b</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$

Confrontando le concentrazioni di glucosio nei soggetti ciclici, si è osservato un trend crescente nel passaggio dalla fase diestratale a quella pre-ovulatoria e da questa a quella ovulatoria, per poi avere un'inversione dell'andamento con riduzione della concentrazione nella fase post-ovulatoria (Grafico 12).



A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

a,b valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$

Analogo andamento è stato osservato nel quantitativo totale di glucosio presente nell' ODF durante le diverse fasi in esame (Tabella 6).

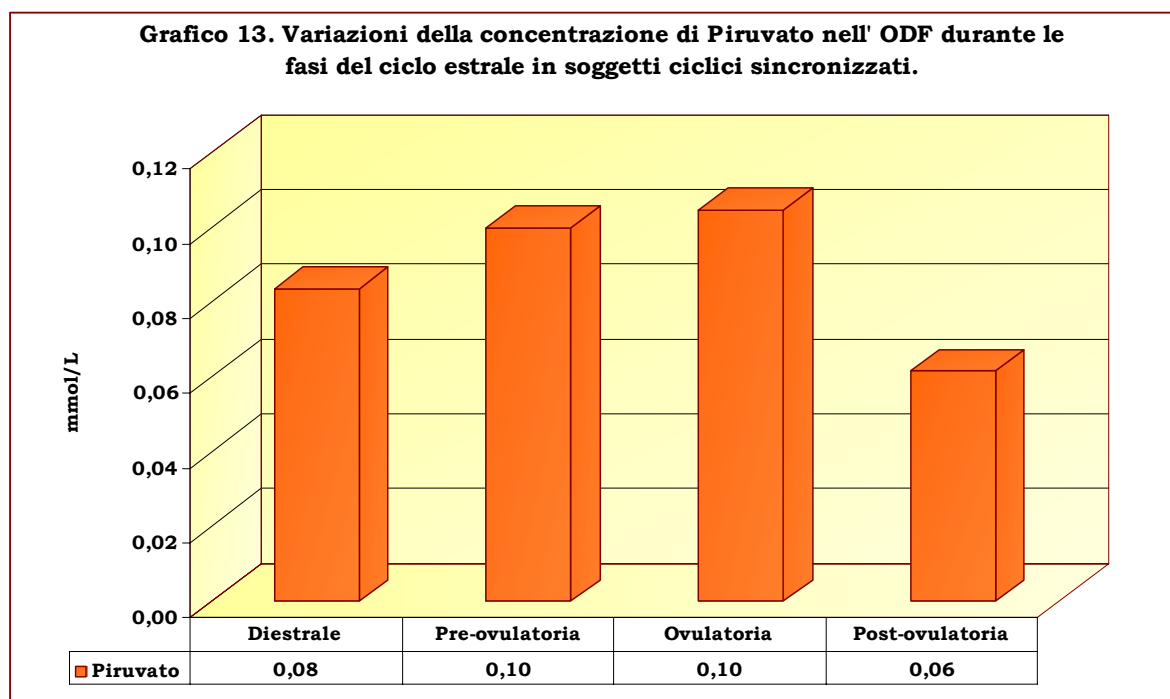
**Tabella 6. Quantitativo totale (media±dev.st) dei substrati energetici presenti nell'ODF di soggetti ciclici sincronizzati**

	<b>Glucosio</b> µmol 24 h	<b>Piruvato</b> µmol 24 h	<b>Lattato</b> µmol 24 h
<b>Fase</b>			
<b>Diestrale</b>	0,01±0,01 <sup>a</sup>	0,04±0,03 <sup>A</sup>	0,56±0,48 <sup>a</sup>
<b>Pre-ovulatoria</b>	0,05±0,07 <sup>b</sup>	0,11±0,10 <sup>BCa</sup>	1,01±0,70 <sup>ab</sup>
<b>Ovulatoria</b>	0,07±0,10 <sup>b</sup>	0,11±0,08 <sup>B</sup>	1,66±1,51 <sup>b</sup>
<b>Post-Ovulatoria</b>	0,02±0,04 <sup>ab</sup>	0,04±0,04 <sup>ACb</sup>	0,52±0,93 <sup>a</sup>

A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

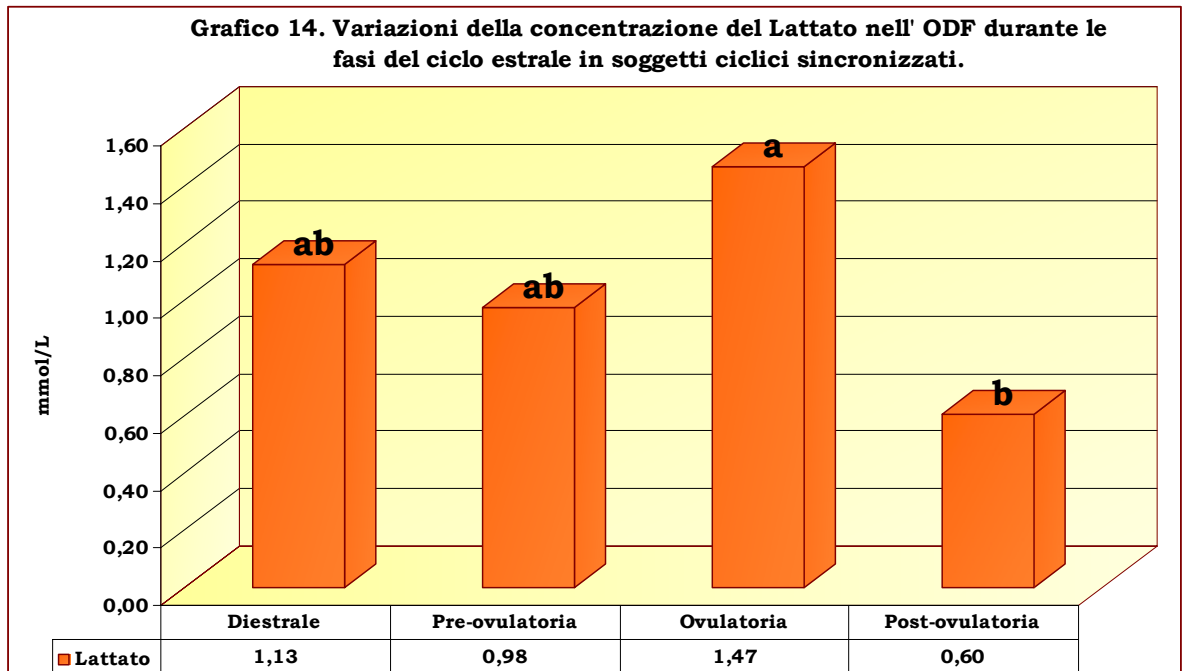
a,b valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$

Nel caso del piruvato, sebbene le differenze di concentrazione non abbiano raggiunto valori significativi tra le fasi (Grafico 13), le quantità totali presenti nell'ODF hanno confermato il trend presentato dal glucosio, esprimendo quantitativi maggiori nelle fasi pre-ovulatoria e ovulatoria rispetto a quella diestrare e post-ovulatoria (Tabella 6).



Nelle bufale cicliche è stato osservato un progressivo aumento della concentrazione di lattato, per altro statisticamente non significativo, dalla fase diestrare a quella ovulatoria e un successivo decremento nella fase post-ovulatoria, che ha raggiunto la significatività statistica ( $P < 0.05$ ) nel confronto con la fase ovulatoria (Grafico 14). La quantità totale di lattato prodotta nella fase ovulatoria è risultata

maggiore ( $P < 0.05$ ) rispetto alle fasi diestrale e post-ovulatoria (Tabella 6).



<sup>A,B</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

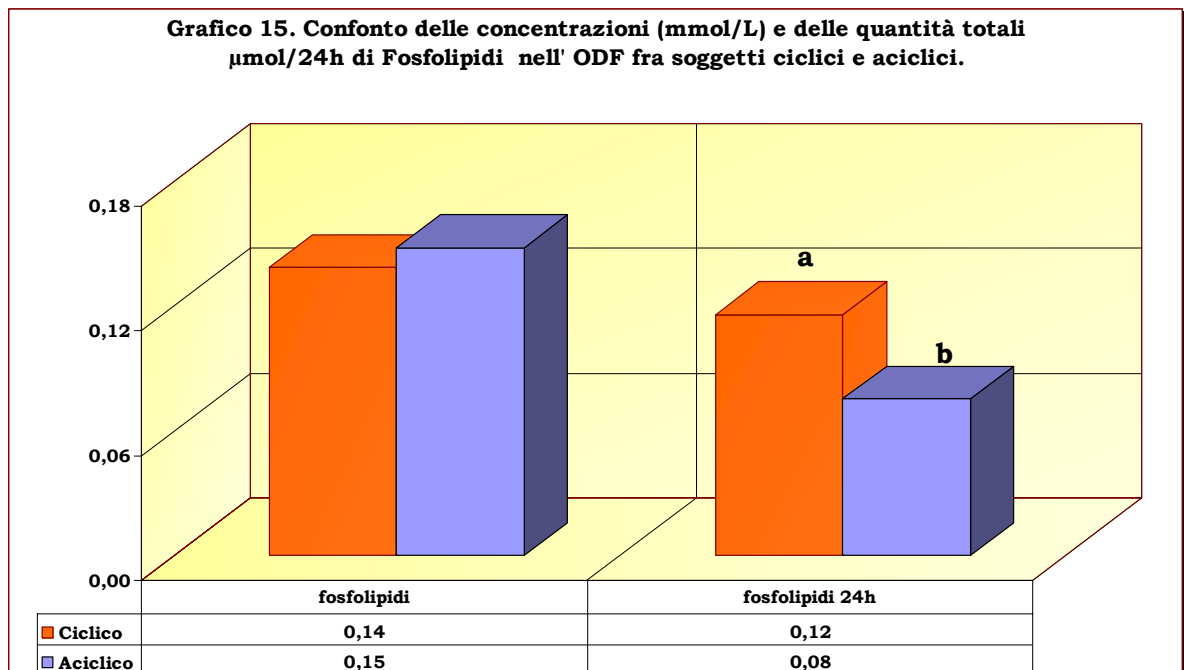
<sup>a,b</sup> valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$



## 4.4 Fosfolipidi

Le bufale acicliche hanno prodotto nelle 24 ore una minore quantità ( $P < 0.05$ ) di fosfolipidi anche se la concentrazione non è risultata differente rispetto a quelle cicliche (Grafico 15).

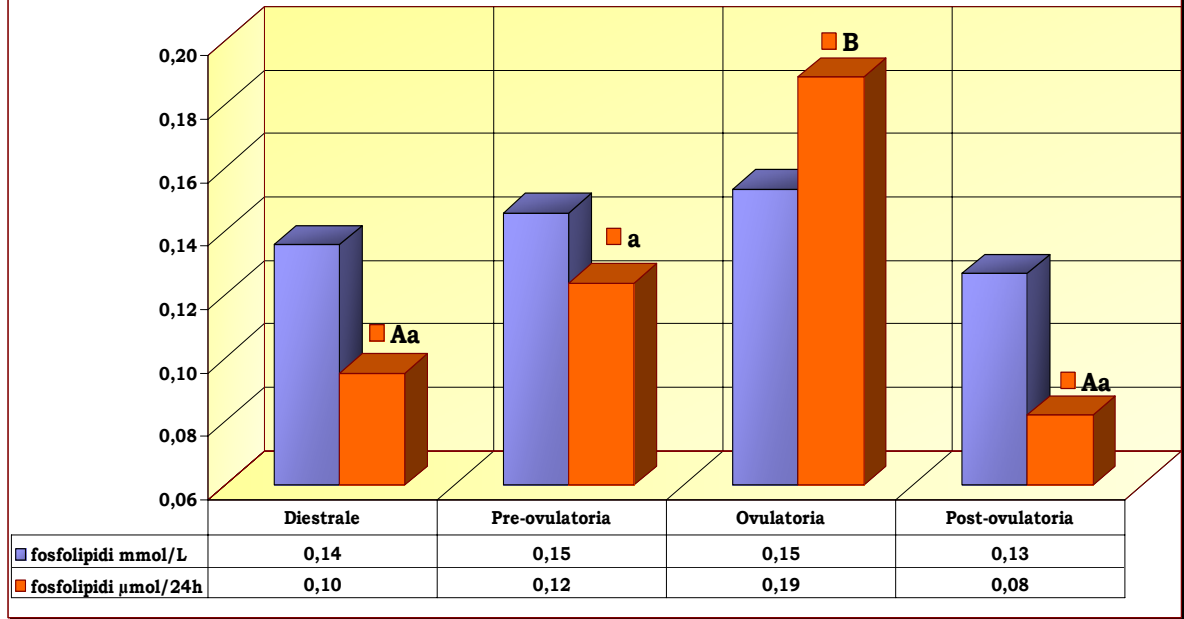
La concentrazione dei fosfolipidi è aumentata, anche se in maniera statisticamente non significativa, dalla fase di estrale fino alla fase ovulatoria per poi riportarsi a livelli di poco inferiori a quelli iniziali nella fase post-ovulatoria, tali differenze hanno raggiunto la significatività statistica allorché è stato considerato il quantitativo prodotto nelle 24 ore (Grafico 16).



A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

a,b, valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$

**Grafico 16. Variazioni delle concentrazioni (mmol/L) e del totale ( $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ ) di Fosfolipidi nell' ODF durante le fasi del ciclo estrale in soggetti ciclici sincronizzati**

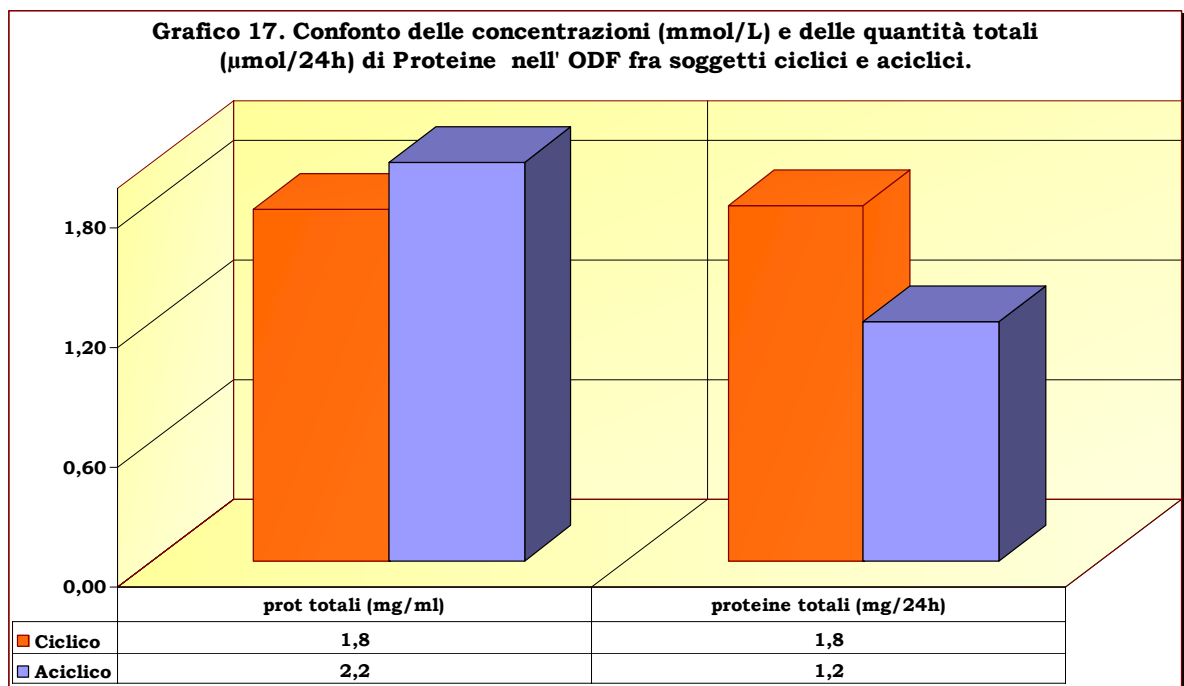


A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.01$

a,b, valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti;  $P < 0.05$

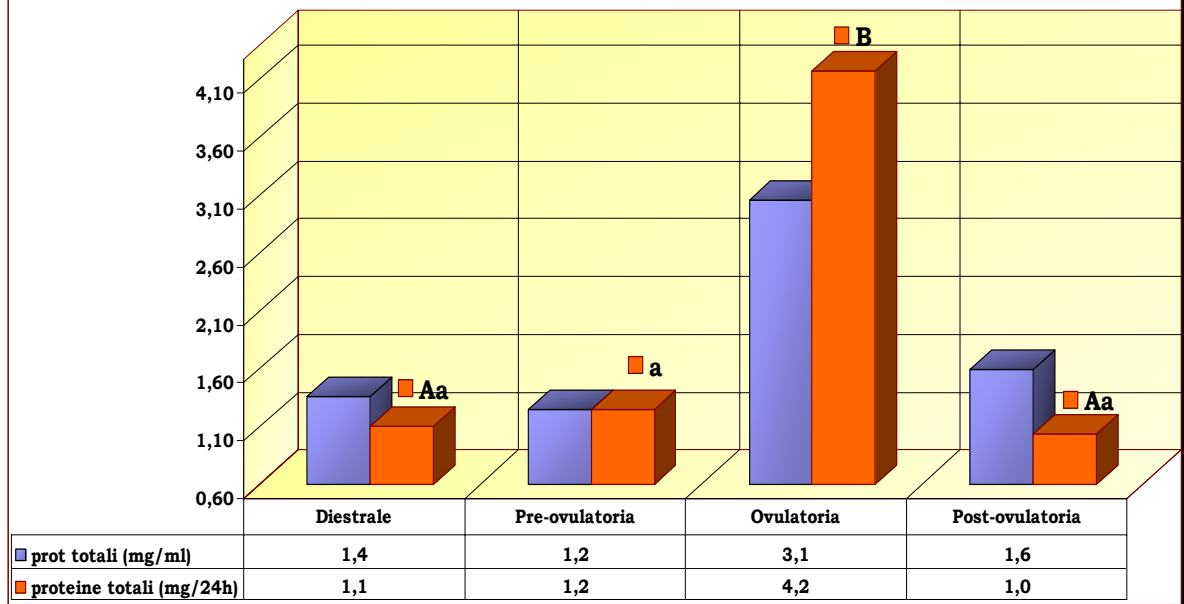
## 4.5 Proteine

Non sono emerse differenze circa la componente proteica sia per la concentrazione che per la quantità prodotta nelle 24 ore tra i soggetti aciclici e i ciclici (Grafico 17).



In questi ultimi soggetti la concentrazione proteica è aumentata esclusivamente nella fase ovulatoria raggiungendo la significatività statistica, tra fase ovulatoria e post-ovulatoria, quando è stata considerata la quantità prodotta nelle 24 ore. In ogni caso, il quantitativo totale di proteine dosate nel campione giornaliero tende ad essere inferiore nella fase diestratale ( $P=0,06$ ) e pre-ovulatoria ( $P=0,07$ ) rispetto a quella ovulatoria (Grafico 18).

**Grafico 18. Variazioni delle concentrazioni (mg/ml) e del totale (mg/24 h) di Proteine nell' ODF durante le fasi del ciclo estrale in soggetti ciclici sincronizzati**

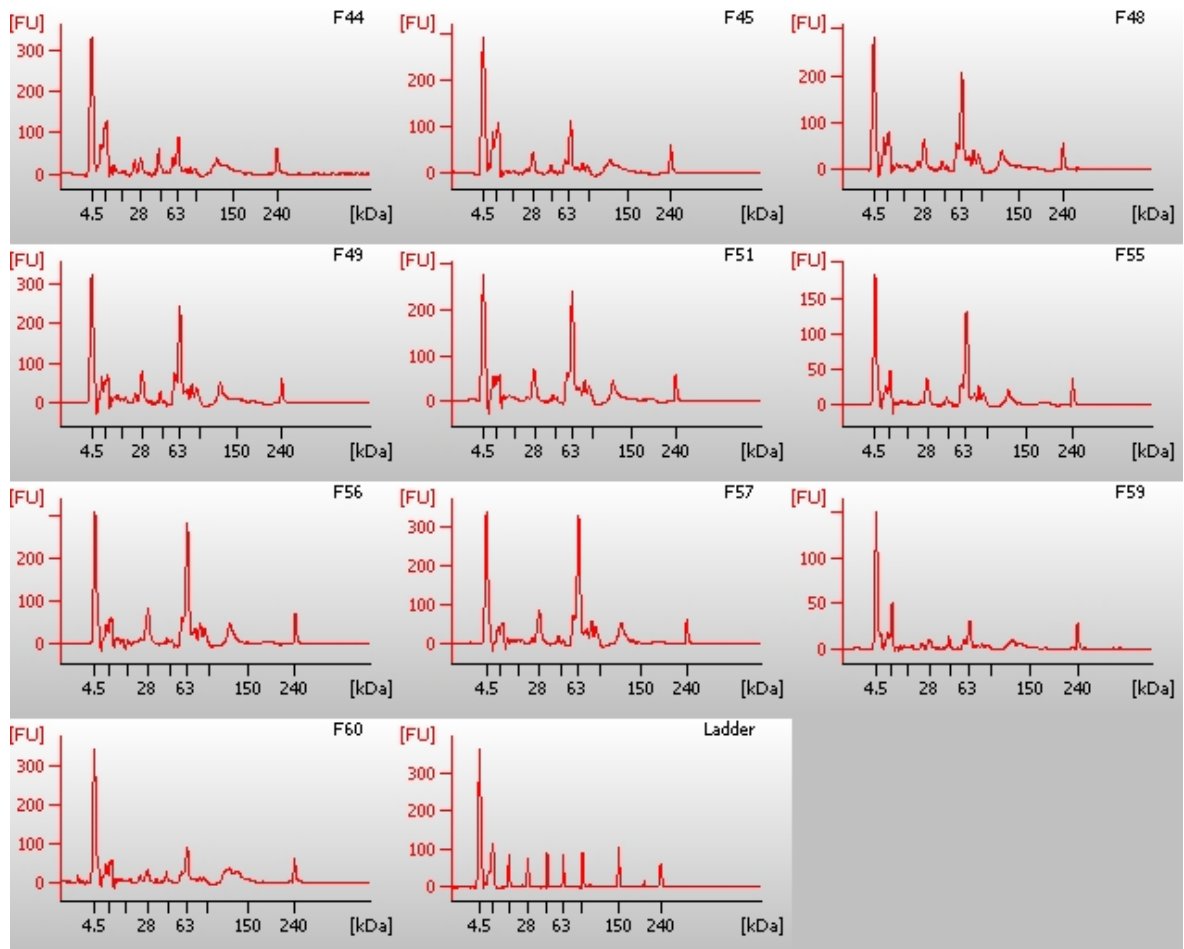


A,B valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti; P<0.01

a,b, valori contraddistinti da lettere diverse sono differenti; P<0.05

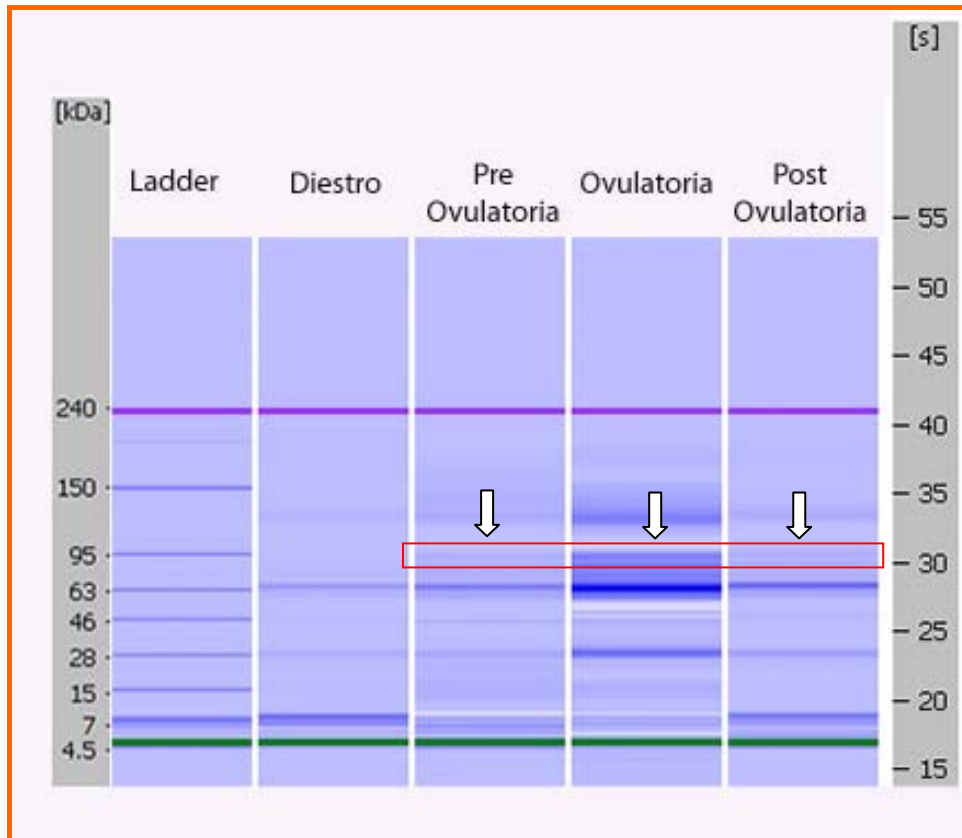
Mediante elettroforesi e elettroferogramma sono state evidenziate, mediamente, 35 classi proteiche e le loro relative concentrazioni (figura 11). In generale è stata osservata una maggiore incidenza dell'albumina rispetto alle altre classi di proteine. La suddetta proteina incide, durante l'intero ciclo estrale, per circa il 39%.

**Figura 11. Elettroferogrammi di campioni ODF bufalino da animali ciclici sincronizzati.**



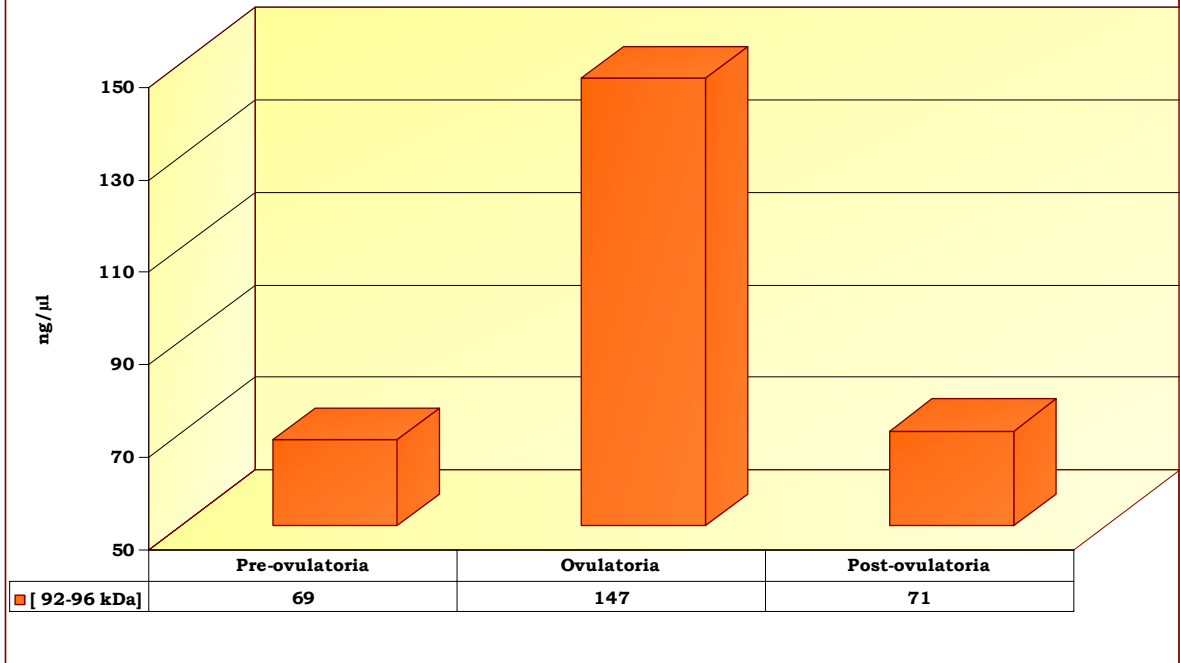
Analizzando l'ODF prelevato nelle diverse fasi del ciclo estrale è stata evidenziata una classe proteica del peso molecolare compreso tra i 92-96 kDa che risulta assente nella fase diestrale (Figura 12).

**Figura 12. Elettroforesi monodimensionale ottenuta con Agilent 2100 Bioanalyzer che evidenzia le differenze tra i campioni di ODF relativi alle differenti fasi del ciclo estrale di soggetti ciclici sincronizzati. Nel riquadro indicate da frecce bianche, le bande relative alle classe di proteine 92-96 KDa assenti nella fase diestrale .**

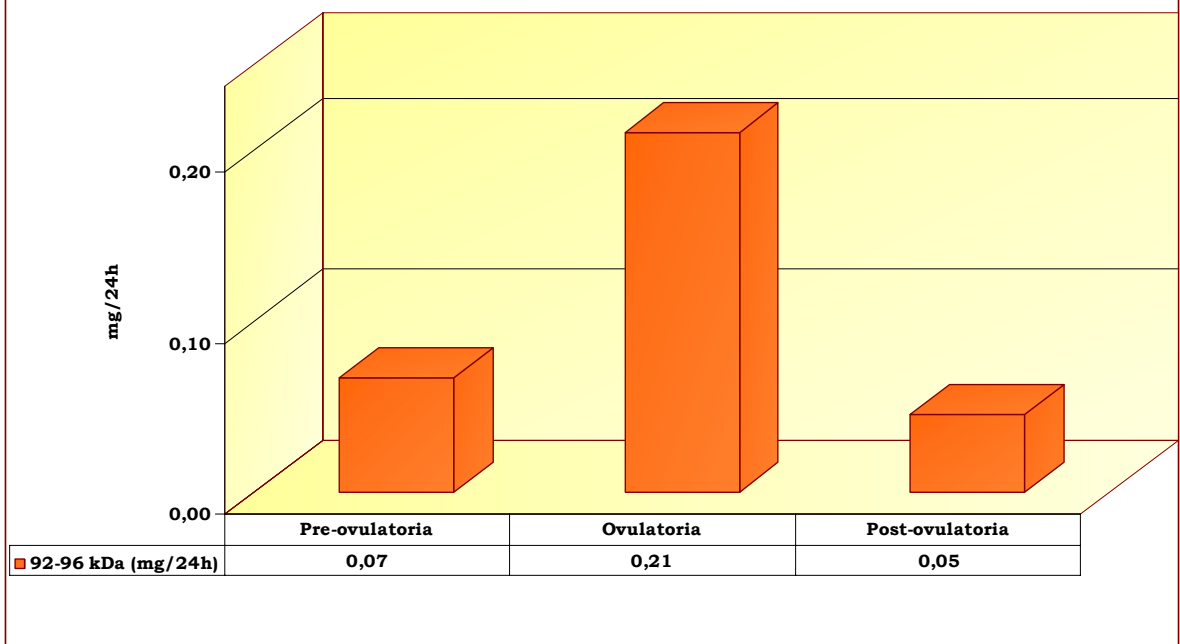


La concentrazione di queste proteine è risultata variabile durante le fasi in esame aumentando dalla fase pre-ovulatoria a quella ovulatoria, per poi decrescere (Grafico 19). Analogo andamento ha presentato la quantità totale della proteina recuperata nelle 24h (Grafico 20).

**Grafico 19. Variazioni della concentrazione della classe di Proteine 92-96 kDa nell' ODF durante le fasi del ciclo estrale in soggetti ciclici sincronizzati.**



**Grafico 20. Variazione della quantità della classe di Proteine 92-96 kDa nell' ODF durante le fasi del ciclo estrale in soggetti ciclici sincronizzati.**



## **DISCUSSIONE**



## 5 DISCUSSIONE

La scelta di indurre cicli brevi negli animali è stata presa in ragione della finalità della prova, ovvero focalizzare l'attenzione sulle fasi in cui nell'ovidutto avvengono i processi di maturazione finale dei gameti, fecondazione e sviluppo embrionale precoce. L' ODF è un fluido complesso e dinamico costituito dalla combinazione di trasudato che dal lume vascolare passa all'interno della tuba (Shapiro et al., 1971; Leese, 1988; Malayer et al., 1988) 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). Risulta, quindi, indispensabile nel complesso sistema oviduttale analizzare i cambiamenti che avvengono nella composizione dell' ODF almeno su duplice scala ovvero quella della permeabilità del comparto e quella delle variazioni secretive dell' epitelio, che a loro volta risultano influenzate da molteplici fattori in maniera diretta o indiretta.

Il nostro studio ha dimostrato come anche nella specie bufalina le caratteristiche quali-quantitative dell' ODF siano influenzate dai cambiamenti ormonali che intervengono durante il ciclo estrale.

Nei soggetti esaminati, l' ODF ha presentato diverse variazioni durante il ciclo estrale e significative differenze sono emerse tra soggetti ciclici e aciclici. L'elevata variabilità riscontrata nella produzione di ODF trova riscontro in quanto verificato da Carlson et al.(1970), Roberts et al. (1975), Killian et al. (1989), Gerena and Killian (1990), secondo i quali,

la quantità totale, nonché alcuni parametri dell'ODF, variano da un bovino all'altro e tra cicli diversi dello stesso bovino.

La quantità di fluido oviduttale prodotto nella bufala è risultata inferiore sia nella fase estrale che luteinica rispetto a quanto riportato da Kavanaugh et al.(1992) e da Olds and Van Denmark (1957) nella bovina e da Wiseman et al. (1992) nel suino. Nella nostra prova, infatti, nei vari cicli analizzati è stata registrata una produzione media di 0,39 ml nella fase diestrare, 0,79 ml nella fase pre-ovulatoria, 0,96ml nella fase ovulatoria e 0,61 ml nella fase post ovulatoria. I succitati autori, invece, hanno riportato nella bovina volumi che oscillano da 1,54 ml (Kavanaugh et al.,1992), 2,0 ml (Roberts et al., 1975) a 4,46 ml (Olds and Van Denmark, 1957) nella fase estrale e da 0,2 ml al giorno (Roberts et al., 1975) e 0,77 ml (Kavanaugh et al.,1992) nella fase diestrare, mentre nella scrofa Wiseman et al. (1992) hanno registrato volumi di 1,19 ml durante l'estro e 0,35 nel diestro.

Il volume dell' ODF è risultato significativamente minore nei soggetti aciclici rispetto ai ciclici, pur mantenendo in questi una certa periodicità che potrebbe essere relazionata alla dinamica follicolare e, quindi, ai valori basali di estradiolo.

Il trend produttivo di ODF registrato nella nostra prova nei soggetti ciclici è risultato sovrapponibile a quelli riscontrati nel coniglio (Bishop, 1956; Richardson and Oliphant, 1981; Gott et al.1988), nella scimmia (Perkins, 1974) e nel bovino (Gerena and Killian, 1990). Gli ormoni steroidei hanno influenzato, anche nella specie bufalina, la produzione

di ODF ed in particolare nella fase follicolare, dove il rapporto estrogeni/progesterone aumenta e prevale la spinta secretiva degli estrogeni, mentre nella fase luteinica, il progesterone tende ad inibire la produzione antagonizzando gli estrogeni così come confermato da Mastroianni et al. (1961), McDonald and Bellvé, (1969). E' ipotizzabile, pertanto, che nel bufalo, così come in altre specie, gli ormoni steroidei potrebbero influenzare la produzione di ODF modulando il movimento degli ioni attraverso l'epitelio oviduttale. La concentrazione di cloro nell'ODF è risultata massima nella fase ovulatoria ( $127 \pm 4 \text{ mmol/l}$ ), evidenziando una concomitanza tra questa e l'aumento del volume di ODF.

Il movimento del cloro dal comparto ematico a quello oviduttale, agirebbe da elemento osmotico all'interno del lume richiamando in questo acqua e facendo variare il volume dell' ODF. Relativamente alla restante componente ionica del liquido ampollare raccolto nel nostro studio è stato riscontrato che i valori di potassio non presentano differenze tra le fasi del ciclo, confermando quanto riscontrato da Grippo et al.(1992). L' alta concentrazione di potassio nel fluido tubarico rappresenta una costante trasversale nelle diverse specie ed è un fattore importante da tenere in considerazione nella formulazione di medium di fertilizzazione. Le concentrazioni di calcio sono risultate massime nella fase pre-ovulatoria in accordo con Grippo et al. (1992). Inoltre sodio, potassio e calcio sono risultati altamente correlati a livelli tipici del circolo ematico della bufala e non dissimili da quanto riportato per la

bovina (Grippe et al., 1992), mentre sono risultati inferiori a quelli rilevati nella pecora da Restall and Wales (Restall and Wales, 1996 III; 1968 V). Il magnesio, così come nella bovina (Grippe et al., 1992), ha presentato livelli inferiori a quelli ematici, ma in contrasto con lo stesso autore, che riscontra una maggiore concentrazione di magnesio nella fase luteinica rispetto a quella non luteinica, nel bufalo la concentrazione di questo ione resta pressoché costante. La maggiore concentrazione dei suddetti ioni a livello dell'ovidotto avvalorerebbe l'ipotesi di un trasporto attivo da parte delle cellule epiteliali.

Il rapporto K:Na nella fase ovulatoria ha presentato un valore medio del tutto sovrapponibile a quanto riportato da Grippe et al. (1992) in merito al rapporto utilizzato per i media di maturazione e fecondazione in vitro nel bovino.

La concentrazione dei carboidrati dosati nell'ODF del bufalo è risultata inferiore rispetto a quella riportata in bibliografia nel plasma, così come suggerito da Leese and Barton (1984), ciò suggerisce che il trasporto totale di questi attraverso l'epitelio tubarico avvenga mediante diffusione facilitata (Leese and Gray, 1985). Inoltre, la concentrazione delle sostanze nutritive varia in risposta allo status endocrino del soggetto.

Le concentrazioni di glucosio e piruvato sono risultate maggiori nei soggetti ciclici rispetto agli aciclici. Durante la fase di ovulazione, sono stati riscontrati valori massimi sia per la concentrazione che per i quantitativi totali di glucosio che per le quantità di piruvato e lattato in

accordo con quanto rilevato da molti autori in diverse specie. Nella fase post-ovulatoria è stata osservata una riduzione della concentrazione di glucosio. Analogo comportamento è stato riportato in diverse specie. Nel suino la concentrazione di glucosio decresce di ben dieci volte dopo l'ovulazione (Nichol et al., 1992, 1998), di sei volte nell'ovidutto di donna nell'intervallo compreso tra la fase follicolare e la metà del ciclo (Gardner et al., 1996) e nel coniglio si verifica tre giorni dopo l'accoppiamento e coincide con l'ingresso in utero dell'embrione. Questo decremento del glucosio e del lattato apparentemente potrebbe essere dovuto ad una riduzione della concentrazione di estrogeni o ad un aumento della concentrazione di progesterone che fa seguito all'ovulazione o ad entrambi i fenomeni (Leese et al., 2001). Questo dato solo apparentemente è in contrasto con le esigenze energetiche dei gameti e degli embrioni nei primi stadi di sviluppo. Infatti, la funzione del glucosio, del piruvato, del lattato è quella di nutrire l'ocita, gli spermatozoi e l'embrione nelle prime fasi di sviluppo, per la durata del loro viaggio attraverso l'ovidutto (Leese and Gray, 1985). Tutti i segmenti dell'ovidutto mostrano di avere delle differenze percentuali nella composizione del fluido (Nichol et al., 1992). Il livello di glucosio, di piruvato e di lattato è circa 1,8 volte più alto nella regione ampollare rispetto a quella istmica in conseguenza della maggiore area di superficie dell'ampolla (Leese, 1983). Tuttavia nel bovino El-Banna e Hafez (1970) hanno osservato che l'ocita impiega circa 8-10 ore per raggiungere la giunzione istmica-ampollare. A questo punto il trasporto

dell' oocita si arresta temporaneamente a livello della giunzione istmico-ampollare che rappresenta il sito di fertilizzazione; quindi gli oociti ovulati o gli embrioni in fase iniziale trascorrono la maggior parte della loro permanenza nell'ovidutto a questo livello (Nichol et al., 1992). La grande emissione di glucosio nella regione ampollare è quindi sufficiente a sostenere l'embrione fino al momento in cui raggiungerà l'utero, pertanto, l'intervallo in cui il glucosio risulta necessario all' interno dell' ovidutto non è molto lungo (Edwards and Leese, 1993).

I livelli medi di glucosio registrati nella fase preovulatoria (0,05 mmol/l) sono risultati alquanto sovrapponibili a quelli rilevati per la bovina (Carlson et al., 1970) e inferiori a quelli della pecora (Hammer, 1973) e della cavalla (Campbell et.,1979). Relativamente ai livelli di lattato e piruvato nella nostra prova le concentrazioni rilevate nel fluido oviduttale sono state, nella fase preovulatoria, rispettivamente di circa 0.98 mmol/l e 0.10 mmol/l, mentre nella pecora tali valori sono risultati più elevati (Hammer, 1973). Tuttavia è interessante sottolineare che il rapporto tra lattato e piruvato è risultato di 10:1 così come nelle altre specie.

Nel bufalo la quantità di fosfolipidi è aumentata passando dalla fase diestrale a quella ovulatoria, confermando quanto riportato da Grippo et al. (1994), ed è diminuita significativamente nella fase post-ovulatoria.

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). Inoltre, nel fluido oviduttale di bovino, prelevato durante i giorni dell' ovulazione, sono state riscontrate più alte concentrazioni di lisofosfatidilcolina (Grippo 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).

In accordo con Killian et al, (1989), sebbene la concentrazione proteica dell'ODF non ha subito delle variazioni durante il ciclo estrale, la quantità totale delle proteine rilevate giornalmente a livello dell'ODF è risultata maggiore ( $P=0.06$ ) nella fase ovulatoria rispetto a quella diestrinale in funzione del significativo aumento del volume di ODF.

Nell'ODF del bufalo sia la concentrazione proteica, sia il quantitativo totale di proteine presenti nelle 24h sono risultati notevolmente inferiori a quanto riportato da Killian et al, (1989) nel bovino in cui sono state riscontrate concentrazioni di  $8,5\pm 1,1$  mg/ml nella fase non luteale e  $9,6\pm 1,4$  nella fase luteinica con un quantitativo totale di  $8,7\pm 2,7$  mg/24 nella fase non luteinica e  $3,8\pm 0,6$  nella fase luteinica.

Nei campioni della fase ovulatoria, in accordo con quanto riportato nell' uomo (Lippes et al., 1981) l'albumina rappresenta il 38% del contenuto proteico totale riscontrato.

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) innescando il processo della capacitazione. Eckert e Niemann (1995), infatti, 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.

Infine l'isolamento della classe di proteine 92-96 kDa associate all'estro, o più correttamente alla fase non diestratale, è un elemento di notevole interesse nella specie bufalina; sebbene analoghe glicoproteine associate all'estro siano state individuate in diverse 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), nella specie bufalina questo rappresenta il primo caso di identificazione. Questa classe di proteine presenta nel bufalo una concentrazione di 69ng/µl, 147ng/µl, 71ng/µl, rispettivamente nelle fasi pre-ovulatoria,



ovulatoria e post-ovulatoria che espresse in percentuale sul totale delle proteine rappresentano il 5% il 4% e il 5% delle presenti.

Una correlazione tra la comparsa dell' OSPG nel fluido oviduttale e la fase estrale del ciclo è stata descritta in molte specie. In generale, la sintesi e la secrezione delle glicoproteine specifiche dell' ovidutto, si realizza in risposta alla stimolazione degli estrogeni (Abe et al., 1998), mentre il progesterone sembra avere scarsa influenza. Tuttavia, Sun et al. (1998) hanno suggerito che l' LH piuttosto che gli estrogeni rappresenti lo stimolo alla sintesi e alla secrezione delle glicoproteine specifiche dell' ovidutto.

Le OSPG sono di particolare interesse in quanto è stato dimostrato che sono in grado di legarsi ai gameti e all'embrione precoce (Verhage et al., 1997, Staros and Killian, 1998). Queste presentano delle similitudini con la famiglia delle chitinasi (Sendai Y. et al., 1994; Arias E.B. et al., 1994), pur non avendo attività chitinasi, è stato ipotizzato che il sito attivo simile alla chitinasi potrebbe avere la proprietà di legare gli zuccheri, ciò consentirebbe il legame delle OSPG ai gameti e agli embrioni risultando di fondamentale importanza. Le OSPG mostrano inoltre molte proprietà simili alla superfamiglia delle mucine (Malette 1995a et 1995b). Il significato funzionale della similitudine tra le OSPG e le mucine è attualmente ancora oggetto di studio, ma le ipotesi sono che esse potrebbero ricoprire i gameti e gli embrioni o l'epitelio creando una barriera protettiva carica negativamente in grado di resistere alla

digestione da parte delle proteasi o di altri fattori. Il legame delle OSGP può migliorare la fertilizzazione (Martus et al., 1998), è stato, infatti, dimostrato che le OSGP migliorano la capacitazione spermatica e il legame con la zona pellucida, facilitando la penetrazione degli spermatozoi (Abe and Hoshi, 1997; Verhage et al., 1997). Inoltre, Hunter (1994) ha proposto che, incrementando la viscosità del fluido luminale, le glicoproteine oviduttali potrebbero stabilizzare il microambiente nelle immediate vicine dei gameti e dell'embrione, prevenendo la dispersione di nutrienti essenziali e di ioni, in particolare durante il battito ciliare o le contrazioni muscolari. Questo aumento di viscosità proteggerebbe l'embrione dai repentini cambiamenti osmotici e dalle fluttuazioni dei costituenti del fluido luminale, riducendo in prossimità dell'embrione la rapidità delle variazioni del microambiente.

## **CONCLUSIONI**

## 6 CONCLUSIONI

I risultati circa la dinamica di produzione e caratterizzazione dell'ODF riportati in questa tesi sono senz'altro da ritenersi preliminari ma, in ogni caso, mettono in evidenza un comportamento diverso della specie bufalina rispetto alle altre almeno per quanto riguarda la minore produzione giornaliera di ODF e di proteine a livello della porzione ampollare dell'ovidutto. Tuttavia, almeno per i parametri analizzati, la composizione dell'ODF è simile a quanto riportato nel bovino e differente dai dati riscontrati per la pecora, la cavalla e la scrofa. Per migliorare la formulazione di media specifici sequenziali e definiti al fine di ottimizzare l'efficienza dell'IVEP nel bufalo, condizione necessaria è approfondire la conoscenza dei meccanismi che regolano la funzionalità dell' ovidutto nelle sue diverse regioni durante il ciclo estrale e durante le stagioni. Inoltre, ampliare le conoscenze sulla sintesi proteica, sulla componente amminoacidica, enzimatica, nonché sui fattori di crescita, con particolare riferimento a quelli prodotti a livello locale rappresentano ulteriori punti focali per ottenere terreni di coltura più efficienti. Infine grande attenzione va posta sulla comunicazione tra gameti ed ovidutto e tra embrione ed ovidutto nel tentativo di tradurre questo linguaggio, che condiziona verosimilmente non solo l'ambiente tubarico in maniera dinamica nelle fasi di maturazione fecondazione

e sviluppo precoce, ma anche le successive fasi di sviluppo e di impianto e quindi l'esito della gravidanza. La comprensione delle modificazioni fisiologiche dell'ambiente tubarico e dell'ODF permetterebbe di aumentare le conoscenze relative alla sfera riproduttiva di questa specie, probabilmente chiarificando almeno in parte alcuni dei problemi che riducono l'efficienza delle Biotecnologie della riproduzione nella specie bufalina.

## **BIBLIOGRAFIA**

## 7 BIBLIOGRAFIA

1. **Abe H, Oikawa T.** 1990. Ultrastructural evidence for an association between an oviductal glycoprotein and the zona pellucida of the golden hamster egg. *J Exp Zool*, 156:210-221.
2. **Abe H, Ookata K, Abe M, Oikawa T.** 1992. Immunological characterization of oviductal glycoproteins associated with the zona pellucida of the golden hamster egg. *J Exp Zool*, 262:209-218.
3. **Abe H, Abe M.** 1993. Immunological detection of an oviductal glycoprotein in the rat. *J Exp Zool*, 266:328-335.
4. **Abe H, Onodera M, Sugawara S.** 1995a. Immunological detection and characterization of an estrus-associated antigen in the goat oviduct. *J Exp Zool*, 272:134-141.
5. **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.
6. **Abe H; Hoshi H** (1997) Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology *Cytotechnology* 23 171-183.
7. **Abe H, Satoh T, Hoshi HJ.** 1998. Primary modulation by oestradiol of the production of an oviduct-specific glycoprotein by the epithelial cells in the oviduct of newborn golden hamsters. *Reprod Fertil*, 112:157-163

8. **Amante L., Campanile G., Ciotola F., Coletta A., De Rosa C., Di Palo R., Peretti V., Zicarelli L.** Studio preliminare sulle caratteristiche morfo-funzionali della bufala mediterranea italiana. Approccio alla valutazione lineare computerizzata. Opuscolo pubblicato nell' ambito del 1° congresso Nazionale sull' allevamento del Bufalo-Eboli(SA) Ottobre 2001.
9. **Anwar, M.; Ullah, N.** Early development and location of embryos in the reproductive tract of Nili Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*): a retrospective analysis. *Theriogenology*, New York, v. 49, p. 1187-1193, 1998.
10. **Archibong, A. E., R. M. Petters, 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.
11. **Arias E.B., Verhage H.G., Jaffe R.C.** 1994. Complementary desossiribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biol. Reprod.* 51:685-694.
12. **Babcock, D. F.; Pfeiffer, D. R..** 1987. Independent elevation of cytosolic  $[Ca^{2+}]$  and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms 71. *J. Biol Chem.* 262:15041-15047.
13. **Baillie HS, Pacey AA, Warren MA, Scudamore IW and Barratt CLR** (1997). Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus



compared with those from the ampulla Human Reproduction  
**12** 1985–1992.

- 14. Banks, W. J.** Sistema reprodutor feminino. In: BANKS, W. J. Histologia veterinária aplicada. 6. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 565-588.
- 15. Barone R.** Anatomia comparata dei mammiferi domestici: Vol. 4 Splanconologia. 1994. Edizioni Ed. agricole 223-266.
- 16. Barr, S. H.; Oliphant, G.** 1981. Sulfate incorporation into macromolecules produced by cultured oviductal epithelium 75. Biol Reprod 24:852-858.
- 17. Baruselli PS, de Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bo GA.** Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. Theriogenology. 2006 Jan 7; 65 (1): 77-88.
- 18. Bavister, B. D.** 1988. Role of Oviductal Secretions in Embryonic Growth-Invivo and Invitro 29. Theriogenology 29:143-154.
- 19. Benoff S., Hurley I.R., Mandel F.S., Cooper G.W., Hershlag A.** 1997. Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose-containing neoglycoprotein ligands. Molec. Hum. Reprod. 3:827:837.
- 20. Bishop DW** (1956) Active secretion in the rabbit oviduct American Journal of Physiology 187 347–352.
- 21. Boatman DE** (1997) Response of gametes to the oviductal environment Human Reproduction 12 (Supplement) 133–149.

22. **Boatman DE; Magnoni GE** (1995) Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster  
*Biology of Reproduction* 52 199–207.
23. **Boice, M. L., R. D. Geisert, R. M. Blair, H. G. Verhage.** 1990. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus *Biol Reprod* 43:457-465.
24. **Boice ML, McCarthy TJ, Mavrogianis PA, Fazleabas AT, Verhage HG.** 1990a. Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboon (*papio anubis*). *Biol Reprod*, 43:340-346.
25. **Boice ML, Mavrogianis PA, Murphy CN, Prather RS, Day BN.** 1992. Immunocytochemical analysis of the association of bovine oviduct-specific glycoproteins with early embryos. *J Exp Zool*, 263:225-229.
26. **Boni R, Wurth YA, Roviello S, Barbieri V, Kruip TH.A.M.** Effetto della distanza tra prelievo e recupero sulle caratteristiche morfologiche e sull'efficienza di produzione embrionale in vitro di oociti prelevati mediante Ovum Pick-up. *Proc. XLVII S.I.S.Vet* 1993. 1: 475–480.
27. **Boni R, Di Palo R, Barbieri V, Zicarelli L.** Ovum pick-up in deep anestrous buffaloes. *Proc IV World Buffalo Congress* 1994a; 3: 480-482.

28. **Boni R, Roviello S and Zicarelli L.** Repeated Ovum Pick-Up in Italian Mediterranean Buffalo cows. *Theriogenology* 1996; 46: 899-906.
29. **Boni R, Roviello S, Gasparrini B, Langella M, Zicarelli L.** In vitro production of buffalo embryos in chemically defined medium. *Buffalo J* 1999;1:115-120.
30. **Borland, R. M., J. D. Biggers, C. P. Lechene, M. L. Taymor.** 1980. Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube. *J. Reprod Fertil.* 58:479-482.
31. **Brewis IA, Winston RM, Leese HJ.** 1992. Energy metabolism of the human fallopian tube. *J Reprod Fertil*, 95:257-262.
32. **Brown, C. R., Cheng, W. K..** 1986. Changes in composition of the porcine zona pellucida during development of the oocyte to the 2- to 4-cell embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 92:183-191.
33. **Brunton WJ; Brinster RL** (1971) Active chloride transport in the isolated rabbit oviduct. *American Journal of Physiology* 221:658-661.
34. **Brunton WJ.** 1972. Beta-adrenergic stimulation of transmembrane potential and short circuit current of isolated oviduct. *Nature New Biol*, 236:12-14.
35. **Buhi, W. C., J. W. Van Wert, I. M. Alvarez, M. M. Dones-Smith, M. A. Bernhisel.** 1989. Synthesis and secretion of proteins by postpartum human oviductal tissue in culture. *Fertil. Steril.* 51:75-80.

- 36. Buhi WC, Alvarez IM, Kouba AJ.** Secreted proteins of the oviduct.  
Cells Tissues Organs. 2000;166(2):165-79. Review.
- 37. Calzada, L., E. L. Salazar, H. Macias.** 1991. Hyperpolarization/depolarization on human spermatozoa 63. Arch. Androl 26:71-78.
- 38. Campanile G., Neglia G., Gasparrini B., Galiero G., Prandi A., Di Palo R., D' Occhio MJ.** Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. Theriogenology 2005 Maggio;63(8):2334-40.
- 39. Campbell DL, Douglas LW, Range JC.** 1979. Cannulation of the equine oviduct and chemical analysis of oviduct fluid. Theriogenology, 12:47-54. Biol Reprod 57:1293-1301.
- 40. Carlson, D., D. L. Black, G. R. Howe.** 1970. Oviduct secretion in the cow J. Reprod Fertil. 22:549-552.
- 41. Chang MC.** 1965. Fertilizing life of ferret sperm in the female tract. J Exp Zool, 158:87-100.
- 42. Chauhan MS, Katiyar PK, Singla SK, Manik RS, Madan ML.** Production of buffalo calves through in vitro fertilization. Ind J Anim Sci 1997; 67: 306-308.
- 43. Clewe, T.H. Mastroianni, L., Jr.** (1960). A method for continuous volumetric collection of oviduct secretions. J. Reprod. Fert. 1, 146-150.

44. **Comer MT, Leese HJ ,Southgate J** (1998) Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium *Human Reproduction* **13** 3114–3120.
45. **Cooke HJ** (1994) Neuroimmune signalling in regulation of intestinal ion transport *American Journal of Physiology* 266 G167–G178.
46. **Cox CI ; Leese HJ** (1995) Effect of purinergic stimulation on intracellular calcium concentration and transepithelial potential difference in cultured bovine oviduct cells *Biology of Reproduction* **52** 1244–1249.
47. **Crisman, R. O.; Mcdonald, L. E.; Thompson, F. N.** Effects of progesterone or estradiol on uterine tubal transport of ova in the cow. *Theriogenology*, v. 13, p. 141-154, 1980.
48. **Cross, N. L.** 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation 72. *Biol Reprod* 59:7-11.
49. **Danell B.** Oestrus Behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. PhD thesis, Sveriges Lantbruksuniversiter, Uppsala, Sweden 1987.
50. **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.

51. **David A, Serr DM, Czernobilsky B.** 1973. Chemical composition of human oviduct fluid. *Fertil Steril*, 24:435-439.
52. **Davis, B. K., R. Byrne, 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.
53. **Dawson KM, Collins JL; Baltz JM** (1998) Osmolarity-dependent glycine accumulation indicates a role for glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos *Biology of Reproduction* **59** 225–232.
54. **Demott RP, Lefebvre R; Suarez SS** (1995) Carbohydrates modulate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium *Biology of Reproduction* 52 1395–1403.
55. **Diamond JM** (1971) Standing-gradient model of fluid transport in epithelia. *Federation Proceedings* 30 6–13.
56. **Dickens CJ, Southgate J; Leese HJ** (1993) Use of primary cultures of rabbit oviduct epithelial cells to study the ionic basis of tubal fluid formation *Journal of Reproduction and Fertility* 98 603–610.
57. **Dickens CJ, Leese HJ.** 1994. The regulation of rabbit oviduct fluid formation. *J Reprod Fertil*, 100:577-581.
58. **Dickens CJ, Maguiness SD, Comer MT, Palmer A, Rutherford AJ and Leese HJ** (1995) Human tubal fluid formation and

composition during vascular perfusion of the Fallopian tube  
Human Reproduction 10 505–508.

59. **Dickens CJ, Comer MT, Southgate J ;Leese HJ** (1996) Human Fallopian tubal epithelial cells in vitro: establishment of polarity and potential role of intracellular calcium and extracellular ATP in fluid secretion Human Reproduction 11 212–217
60. **Downing SJ, Maguiness SD, Watson A; Leese HJ** (1997) Electrophysiological basis of human Fallopian tubal fluid formation Journal of Reproduction and Fertility 111 29–34
61. **Drost M, Ambrose JD, Thatcher MJ, Cantrell CK, Wolfsdorf KE, Hasler JF, Thatcher WW.** Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. Theriogenology. 1999 Nov; 52(7):1161-7.
62. **Dubyak GR; El-Moatassim C** (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides American Journal of Physiology 265 C577–C606
63. **Dyce, K. M.; Sack, W. O.; Wensing, C. J. G.** Textbook of veterinary anatomy. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. 56p.
64. **Eckert, J.; Niemann, H.** 1995. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media Theriogenology 43:1211-1225.

65. **Edwards LJ, Leese HJ.** 1993. Glucose transport and metabolism in rabbit oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil*, 99:585-591.
66. **Eherenwald, E., R. H. Foote, J. E. Parks.** 1990. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol. Reprod Dev.* 25:195-204.
67. **El Banna, A. A.; Hafez. E. S.** 1970. Egg transport in beef cattle *J. Anim Sci.* 30:430-432.
68. **Ellington, J. E.** 1991. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature *Cornell Vet.* 81:313-328.
69. **El-Sheikh, A. S.; Abdelhadi, H. A.** Anatomy and histology of the reproductive tract in the Egyptian buffalo. *Indian Journal of Animal Science*, v. 40, p. 213-222, 1970.
70. **Engle, C. C., Witherspoon, D. M.; Foley. C. W.** 1970. Technique for continuous collection of equine oviduct secretions. *Am. J. Vet. Res.* 31:1889-1896.
71. **Fazleabas, A. T.; Verhage. H. G.** 1986. The Detection of Oviduct-Specific Proteins in the Baboon (*Papio-Anubis*). *Biology of Reproduction* 35:455-462.
72. **Florman, H.M., Corron, M.E., Kim, T.D.; 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.



- 73. Franzen, A.; Heinegard. D.** 1985. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem. J.* 232:715-724.
- 74. Gabler, C., D. A. Chapman, G. J. Killian.** 2003. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle *Reproduction* 126:721-729.
- 75. Gaddum-Rosse, P.; Blandau, R. J.** In vitro studies on ciliary activity within the oviducts of the rabbit and pig. *American Journal of Anatomy*, v. 136, p. 91-104, 1973.
- 76. Gaddum-Rosse, P.; Blandau, R. J.** Comparative observations on ciliary currents in mammalian oviducts. *Biology of Reproduction*, v. 14, p. 605-609, 1976.
- 77. Galli C, Duchi R, Crotti G. Lazzari G.** Embryo production by Ovum Pick-up in Water Buffalo. *Theriogenology* 1998; 50: 259.
- 78. 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.
- 79. Gandolfi F, Modina S, Brevini TAL, Galli C, Moor RM, Lauria A.** 1991. Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur J Basic Appl Histochem*, 35:383-392.

- 80. Gandolfi f., Brevini T.A.I., Modina S., Passoni L.** 1992. Early embryonic signal: embryo maternal interaction before implantation. *Animal. Reprod. Sci.*, 28:269-276.
- 81. Gandolfi F, Passoni L, Modina S, Brevini TAL, Varga Z, Lauria A.** 1993. Similarity of an oviduct-specific glycoprotein between different species. *Reprod Fertil Dev*, 5:433-443.
- 82. Garcia-Pascual A, Labadia A, Triguero D Costa G** (1996) Local regulation of oviductal blood flow *General Pharmacology* **27** 1303–1310.
- 83. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J.** 1996. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*, 65:349-353.
- 84. Gasparrini B, Neglia G, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L.** Effect of cysteamine during in vitro maturation in buffalo embryo development. *Theriogenology* 2000; 54: 1537–1542.
- 85. Gasparrini B.** In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. Proc. Annual Conference International Embryo Transfer Society, Foz do Iguassu, Parana, Brasil. *Theriogenology* 2002; 57: 237-256.
- 86. Gerena RL, Killian GJ.** 1990. Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *J Exp Zool*, 256:113-120.
- 87. Gerena, R. L., D. Irikura, Y. Urade, N. Eguchi, D. A. Chapman, 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.

- 88. Glass LE.** 1969. Immunocytological studies of the mouse oviduct. *In: Hafez ES (Ed.). The mammalian oviduct.* Chicago: University of Chicago Press. pp.54-72.
- 89. Gott AL, Gray SM, James AF and Leese HJ** (1988) The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation *Biology of Reproduction* **39** 758–763.
- 90. Grippo, A. A., M. A. Henault, S. H. Anderson, 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.
- 91. Grippo AA, Anderson SH, Chapman DA, Henault MA, Killian GJ.** 1994. Cholesterol, phospholipid and phospholipase activity of ampullary and isthmic fluid from the bovine oviduct. *J Reprod Fertil*, 102:87-93.
- 92. Grippo 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.
- 93. 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.
- 94. Hafez, E. S. E.; Hafez, B.** *Reprodução Animal.* 7ed. 2004. Sao Paulo: Manole. 513p. .

- 95. Hamner CE. 1973.** Oviductal fluid: composition and physiology. In : Greep RO, Astwood EB. (Eds). Handbook of physiology, endocrinology. Washington: American Physiology Society. Pp. 141-151.
- 96. Handrow, R.R., First, N.L.; Parrish, J.J.** Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool.* 1989 Nov;252(2):174-82.
- 97. Hanglow AC, Bienenstock J and Perdue M** (1989) Effects of plateletactivating factor on ion transport in isolated rat jejunum *American Journal of Physiology* **257** G845–G850
- 98. Hardcastle J ; Hardcastle PT** (1987) The secretory actions of histamine in rat small intestine *Journal of Physiology* **388** 521–532
- 99. 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.
- 100. Hasler, J.F.; Bilby, C.R.; Collier, R.J.; Denham, S.C.; Lucy, M.C.** Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program 2003 May;59(9):1919-28.
- 101. Heap, R. B.** 1962. Some chemical constituents of uterine washings: a method of analysis with results from various species. *J. Endocrinol.* 24:367-378.

- 102. Hedrick JL, Wardrip NJ, Berger T.** 1987. Differences in the macromolecular composition of the zona pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *J Exp Zool*, 241:257-262.
- 103. Henault, M. A.; Killian. G. J.** 1993. Composition and morphology of lipid droplets from oviduct epithelial cells. *Anat. Rec.* 237:466-474.
- 104. Hermoso MA; Villalon MJ** (1995) Embryo secreted factors increase the frequency of ciliary beat of hamster oviduct cells in vitro. *Biology of Reproduction* 52 Supplement **1** 180
- 105. Hill, D. J., Marshall, J. T., 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.*
- 106. Horvat, B., H. Vrcic, 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.
- 107. Hu, D. D., E. C. K. Lin, N. L. Kovach, J. R. Hoyer, 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.
- 108. Hunter RHF, Nichol R.** 1983. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: Preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J Exp Zool*, 228:121-128.

- 109. Hunter, R. H. F.; Wilmot I.** 1983. The Rate of Functional Sperm Transport Into the Oviducts of Mated Cows. *Animal Reproduction Science* 5:167-173.
- 110. Hunter RHF.** 1984. Pre-ovulatory arrest and periovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of pig oviduct. *J Reprod Fertil*, 72:203-211.
- 111. Hunter RHF, Wilmot I.** 1984. Sperm transport in the cow: Peri-ovulatory distribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev*, 24:597-608.
- 112. 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.
- 113. Hunter RHF.** 1988. Transport of gametes. *In: The Fallopian tubes: Their role in fertility and infertility.* Springer-Verlag, New York: pp 53-74.
- 114. Hunter RHF** (1994) Modulation of gamete and embryonic microenvironments by oviduct glycoproteins *Molecular Reproduction and Development* **39** 176-181
- 115. Hynes, R. O.** 1992. Integrins - Versatility, Modulation, and Signaling in Cell-Adhesion. *Cell* 69:11-25.
- 116. Jansen RPS.** 1984. Endocrine response in the fallopian tube. *Endocr Rev*, 5:525-551.
- 117. Janssen-Caspers H.A.B, Wladimiriff J.W, Van Gent I, Alberga A.Th, Leerentveld RA, Zeilmaker GH, Drogendijk AC.**

Ultrasonically guided percutaneous and transvaginal follicle aspiration; a comparative study. *Human reproduction*, 1988; 3: 337-339.

- 118. Johnston, L. A., A. M. Donoghue, S. J. O' brien, 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.
- 119. Kan FWK, St-Jacques S, Bleau G.** 1988. Immunoelectron microscopic localization of an oviductal antigen in hamster zona pellucida by use of a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem*, 36:1441-1447.
- 120. Kane, M. T.** 1979. Fatty acids as energy sources for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. *Biol Reprod* 20:323-332.
- 121. Kapur RP, Johnson LV.** 1985. An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Dev Biol*, 112:89-93.
- 122. Kapur, R. P. Johnson. L. V.** 1986. Selective sequestration of an oviductal fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J. Exp. Zool.* 238:249-260.
- 123. Kapur RP, Johnson LV.** 1988. Ultrastructural evidence that specialized regions of the murine oviduct contribute glycoprotein to the extracellular matrix of mouse oocytes. *Anat Rec*, 221:720-729.
- 124. Karaivanov, C.; Vlahov, K.; Petrov, M.; Kacheva, D.; Stojanova, M.; Alexiev, A.; Polihronov, O.; Danev, A.**

Studies on preimplantation development of buffalo embryos. *Theriogenology*, v. 28, p. 747-753, 1987.

- 125. 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.
- 126. Killian, G. J., D. A. Chapman, J. F. Kavanaugh, D. R. Deaver, 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.
- 127. King, R. S., S. H. Anderson, 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- 43:250.
- 128. King RS, Killian GJ.** 1994. Purification of bovine estrus associated protein and localization of binding on sperm. *Biol Reprod*, 51:34-42.
- 129. Lam, X.; Gieseke, C.; Knoll, M.; Talbot, P.** Assay and importance of adhesive interaction between hamster (*Mesocricetus auratus*) oocyte-cumulus complexes and the oviductal epithelium. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 579-588, 2000.
- 130. Le Van Ty, Chupin D, Draincourt DA.** Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. *Anim. Reprod. Sci.* 1989; 19: 171-178.
- 131. Leboeuf B, Manfredi E, Boue P, Piacère A, Brice G, Baril G, Broqua C, Humblot P.** Artificial insemination of dairy goats



in France. *Livestock Production Science* 1998; 55 (3): 193-203.

- 132. Leese HJ, Jeffries KS.** 1977. Evidence for the facilitated diffusion of glucose into rabbit oviductal fluid. *J Reprod Fertil*, 51:93-97.
- 133. Leese HJ** (1983) Studies on the movement of glucose, pyruvate and lactate into the ampulla and isthmus of the rabbit oviduct *Quarterly Journal of Experimental Physiology* **68** 89–96
- 134. Leese JJ, Barton AM.** 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil*, 72:9-13.
- 135. Leese HJ, Gray SM.** 1985. Vascular perfusion: a novel means of studying oviduct function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 248:624-631.
- 136. Leese, H. J.** 1988. The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod Fertil*. 82:843-856.
- 137. Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ.** 2001. Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction*, 121:339-346.
- 138. Lefebvre R, Lo MC, Suarez SS.** 1997. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biol Reprod*, 56:1198-1204.

- 139. Lenz S, Leeton J, Renou P.** Transvaginal recovery of oocytes for in vitro fertilization using vaginal ultrasound. *Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1987, 4: 51-55.
- 140. Leveille MC, Roberts KD, Chevalier S, Chapdelaine A, Bleau G.** 1987. Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol Reprod*, 36:227-238.
- 141. Lippes J, Enders RG, Pragay DA, Bartholomew WR.** 1972. The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception*, 5:85-95.
- 142. Lippes, J., J. Krasner, L. A. Alfonso, E. D. Dacalos, R. Lucero.** 1981. Human oviductal fluid proteins. *Fertil. Steril.* 36:623-629.
- 143. Lippes J, Wagh PV.** 1989. Human oviductal fluid (hOF) proteins. IV. Evidence for hOF proteins binding to human sperm. *Fertil Steril*, 51:89-94.
- 144. Lorton, S. P.; First. N. L.** 1979. Hyaluronidase does not disperse the cumulus oophorus surrounding bovine ova. *Biol Reprod* 21:301-308.
- 145. Luktuke, S. N.; Rao, A. S. P.** Studies on the biometry of the reproductive tract of the buffalo-cow. *Indian Journal of Veterinary Science*, v. 32, p. 106-111, 1962.
- 146. Madan ML, Chauhan MS, Singla SK, Manik RS.** Pregnancies established from water buffalo (*Bubalus Bubalis*) blastocysts derived from in vitro matured, in vitro fertilized oocytes and

co-cultured with cumulus and oviductal cells. *Theriogenology* 1994a; 42:591-600.

- 147. Madan ML, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS.** In vitro production and transfer of embryos in buffaloes. *Theriogenology* 1994b; 41: 139-143.
- 148. Madan ML, das SK, Palta P.** Application of reproductive technologies to buffaloes. *Anim Reprod Sci* 1996;42:299-306.
- 149. Malayer Jr, Hansen PJ, Buhi WC.** 1988. Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. *J Exp Zool*, 348:345-353.
- 150. Malette B., Pasquette Y., Merlen Y., Bleau G.** 1995 a.Oviductins possess chitinase-mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Molec. Reprod. Develop.*41:384-397.
- 151. Malette B., Pasquette Y., Bleau G.** 1995 b.Size variation in the mucin-type domain of hamster oviductin : identification of the polipeptide precursor and characterization of the biosynthetic maturation. *Biol. Reprod.* 53:1311-1323.
- 152. Martus NS, Verhage HG, Mavrogiannis PA, Thibodeaux JK** (1998) Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein *Journal of Reproduction and Fertility* 113 323-329

- 153. Mastroianni L, Jr., Shah V, Abdul-Karim R.** 1961. Prolonged volumetric collection of oviduct fluid in the rhesus monkey. *Fertil Steril*, 12:417-424.
- 154. Mastroianni, L., Jr., M. Urzua, R. Stambaugh.** 1970. Protein patterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation. *Fertil. Steril.* 21:817-820.
- 155. McDonald MF ; Bellvé AR** (1969) Influence of oestrogen and progesterone on flow of fluid from the Fallopian tube in the ovariectomized ewe *Journal of Reproduction and Fertility* 20 51-61
- 156. McNutt, T. L., Killian, G. J..** 1991. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J. Androl* 12:244-252.
- 157. McNutt, T., L. Rogowski, R. Vasilatos-Younken, G. Killian.** 1992. Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. *Mol. Reprod Dev.* 33:313-323.
- 158. Menezo, Y.; Guerin, P.** The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproduction Biology*, v. 73, p. 99-104, 1997.
- 159. Miller JGO; Schultz GA** (1987) Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract *Biology of Reproduction* 36 125-129

- 160. Misra AK.** Application of biotechnologies in buffalo breeding in India. Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Caserta, Italy, 1997: 141-166.
- 161. Monteiro, C. M. R.** Estudo comparativo das características anatômicas e histológicas do útero e tuba uterina de vacas e novilhas Nelore (*Bos indicus*). 1998. 121 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- 162. Morabad, I. R.; Jagannath, B. A** histological study of the oviduct of the immature, mature and pregnant bovine. Mysore Journal of Agricultural Science, v. 1, p. 152-153, 1967.
- 163. Morales P, Palma V, Salgado M and Villalon M** (1996) Sperm interaction with human oviductal cells in vitro. Human Reproduction 11 1504–1509
- 164. Murray MK** (1995) Epithelial lining of the sheep ampulla oviduct undergoes pregnancy-associated morphological changes in secretory status and cell height Biology of Reproduction 53 653–663
- 165. Murray, S. C.; Smith. T. T.** 1997. Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. Fertil. Steril. 68:351-357.
- 166. Mwanza, M.; Razdan, P.; Hultén, F.; Einarsson, S.** Transport of fertilised and unfertilized ova in sows. Animal Reproduction Science, Amsterdam, v. 74, p. 69-74, 2002.

- 167. 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.
- 168. Nancarrow, C. D.; Hill. J. L.** 1994. Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. *Cell Biol Int* 18:1105-1114.
- 169. Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R, Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L.** Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 2003 Mar; 59(5-6): 1123-30.
- 170. Nichol R, Hunter RH, Gardner DK, Leese HJ, Cooke GM.** 1992. Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil*, 96:699-707.
- 171. Nichol R, Hunter RH, Cooke GM.** 1997. Oviduct fluid pH in intact and unilaterally ovariectomized pigs. *Can J Physiol Pharmacol*, 75:1069-1074.
- 172. Nichol R, Hunter RH, Gardner DK, Partridge R, Leese HJ, Cooke GM.** 1998. Concentrations of energy substrates in oviduct fluid in unilaterally ovariectomised pigs. *Res Vet Sci*, 65:263-264.

- 173. Oikawa T, Sendai Y, Kurata S, Yanagimachi R.** 1988. A glycoprotein of oviductal origin alters biochemical properties of the zona pellucida of hamster egg. *Gamete Res*, 19:113-122.
- 174. Oldberg, A., A. Franzen, 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.
- 175. Olds, D.; Vandemark, N. L..** 1957. Composition of luminal fluids in bovine female genitalia. *Fertil. Steril.* 8:345-354.
- 176. Oliphant G, Bowling A, Eng LA, Keen S, Randall PA.** 1978. The permeability of rabbit oviduct to proteins present in the serum. *Biol Reprod*, 18:516-520.
- 177. Oliphant G, Cabot C, Ross P and Marta J** (1984) Control of the humoral immune system within the rabbit oviduct *Biology of Reproduction* 31 205–212
- 178. Oliveira, D. J.; Souza, W. M.; Souza, N. T. M.** Biometria da tuba uterina e útero de fêmeas de bovinos da raça Nelore. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, n. 4, p. 221-225, 2004.
- 179. Ortiz ME, Bedregal P, Carvajal MI; Croxatto HB** (1986) Fertilized and unfertilized ova are transported at different rates by the hamster oviduct *Biology of Reproduction* **34** 777–781

- 180. Parr EL, Parr MB.** 1986. Uptake of immunoglobulins and other proteins from serum into epithelial cells of the mouse uterus and oviduct. *J Reprod Immunol*, 9:330-354.
- 181. 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.
- 182. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL.** 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biology of Reproduction*, 40:1020-1025.
- 183. Patarca, R., R. A. Saavedra, 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.
- 184. Perkins, J. R.; Olds, D.; Seath, D. M.** A study of 1,000 bovine genitalia. *Journal of Dairy Science*, v. 37, n. 1, p. 1058-1063, 1954.
- 185. Perkins, J. L., L. Goode, W. A. Wilder, Jr., D. B. Henson.** 1965. Collection of secretions from the oviduct and uterus of the ewe. *J. Anim Sci.* 24:383-387.
- 186. Perkins JL.** 1974. Fluid flow of the oviduct. *In:* Johnson AD, Foley C W (Eds.). *The oviduct and its functions*. New York: Academic Press. pp.119-132.
- 187. Pollard, J. W., C. Plante, W. A. King, P. J. Hansen, K. J. Betteridge, S. S. Suarez.** 1991. Fertilizing capacity of bovine



sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. Biol Reprod 44:102-107.

- 188. Porto-Filho, R.M.; Baruselli, P.S.; Madureira, E.H.; Mucciolo, R.G.** Detecção de cio em búfalas através do sistema de radiotelemetria. Rev. Bras. Reprod. Anim. V. 23, p. 356-358, 1999.
- 189. Porto-Filho, R.M.** Emprego da radiotelemetria na detecção do estro em fêmeas bubalinas: luteólise durante duas fases do ciclo estral, ultra-sonografia da ovulação e perfis hormonais. São Paulo, 2000, 112p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 190. Pratt, H. P. M. 1980.** Phospholipid-Synthesis in the Pre-Implantation Mouse Embryo. Journal of Reproduction and Fertility 58:237-248.
- 191. Pratt, H. P. M. 1982.** Pre-Implantation Mouse Embryos Synthesize Membrane Sterols. Developmental Biology 89:101-110.
- 192. Priedkalns, J.** Female reproductive system. In: Dellmann, H. D.; Brown, E. M. Histologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 255-278.
- 193. Prince, C. W.; Butler W. T. 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.

- 194. Quinn, P.; D. G. Whittingham.** 1982. Effect of Fatty-Acids on Fertilization and Development of Mouse Embryos In vitro. *Journal of Andrology* 3:440-444.
- 195. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM.** 1985. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*, 44:493-498.
- 196. Quinton PM** (1990) Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport *FASEB*
- 197. Reischl J, Downing SJ; Leese HJ** (1999) Electrophysiological studies on bovine oviduct epithelial cells in primary culture *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series* **23** Abstract 52
- 198. Reischl J, Downing SJ and Leese HJ** (2000) Ion transport in bovine oviduct epithelial cells *Theriogenology* **53** 47
- 199. Restall, B. J. 1966.** The fallopian tube of the sheep. I. Cannulation of the fallopian tube. *Aust J. Biol Sci.* 19:181-186.
- 200. Restall B. J., Wales R.G.** 1966. The fallopian tube of the sheep.III. The chemical composition of the fluid from the fallopian tube. *Aust. J. Biol Sci.*, 19:687-698.
- 201. Restall B. J., Wales R. G.** 1968. The fallopian tube of the sheep. V. Secretion from the ampulla and isthmus. *Aust. J. Biol Sci.* 21:491-498.

- 202. Richardson LL; Oliphant G** (1981) Steroid concentrations in rabbit oviducal fluid during oestrus and pseudopregnancy  
Journal of Reproduction and Fertility 62 427–431
- 203. Roberts GP, Parker JM, Symonds HW.** 1975. Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. *J Reprod Fertil*, 45:301-313.
- 204. Rodriguez, C.; Killian. G.** 1998. Identification of ampullary and isthmic oviductal fluid proteins that associate with the bovine sperm membrane. *Anim Reprod Sci.* 54:1-12.
- 205. Samad HA, Nasser AA.** A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. Compendium 13, FAO Int. Course on Animal Reproduction, Sweden, 1979.
- 206. Samper JC.** Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Anim Reprod Sci.* 2001 Dec 3; 68(3-4): 219-28.
- 207. Sane, C. R.; Kaikini, A. S.; Seshpande, B. R.; Koranne, G. S.; Desai, V. G.** Study of biometry of genitalia of the Murrah buffalo-cows (*Bos bubalis*). *Indian Veterinary Journal*, v. 41, p. 653-661, 1964.
- 208. Sane, C. R.; Kaikini, A. S.; Seshpande, B. R.; Koranne, G. S.; Desai, V. G.** Study of biometry of genitalia of the Jaffri buffalo-cows (*Bos bubalis*). *Indian Veterinary Journal*, v. 42, p. 591-596, 1965.
- 209. Satoh T., Abe H., Sendai Y., Iwata H., Hoshi H.** 1995. Biochemical characterization of a *Biochimica Biophysica Acta.* 1266:117-123.

- 210. Sendai Y., Abe H., Kikuchi M., Sattot T., Hoshi H.** 1994. purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biol. Reprod.* 50:927-934.
- 211. Seren E., Parmeggiani A., Mongiorgi S., Zicarelli L., Montemurro N., Pacelli C., Campanile G., Esposito E., Di Palo R., Borghese A., Barile V.L., Terzano G.M., Annichiarico G., Allegrini S.** Modificazioni endocrine durante il ciclo estrale nella bufala. *Agricoltura e ricerca*, XVI, 153, gennaio/marzo, 25-40, 17-24, 1994.
- 212. Shapiro, S. S., J. P. Jentsch, A. S. Yard.** 1971. Protein composition of rabbit oviducal fluid. *J. Reprod Fertil.* 24:403-408.
- 213. Shouffani, A.; Kanner. B. I.** 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.
- 214. Singleton WL.** State of the art in artificial insemination of pigs in the United States. *Theriogenology*. 2001 Nov 1; 56(8): 1305-10.
- 215. Sisson, S.** Aparelho urogenital do ruminante. In: GETTY, R. Sisson-Grossman: anatomia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986 v.1 cap. 31, p. 879-895.
- 216. Smith, T T.; Yanagimachi R.** 1989. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J. Reprod Fertil.* 86:255-261.

- 217. Smith, T T.; Yanagimachi R.** 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.
- 218. Squires PE, Hill CJ, Pacey AA, Li TC, Cooke ID, Warren MA and Dunne MJ** (1995) Purinergic receptor-mediated increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> in single isolated epithelial cells of the human uterine tube *Journal of Physiology London* 482P P45
- 219. Staros AL; Killian GJ** (1998) In vitro association of six oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida *Journal of Reproduction and Fertility* 112 131-137
- 220. Stone, S. L.; Hamner. C. D.** 1975. Biochemistry and physiology of oviductal secretions. *Gynecol. Invest* 6:234-252.
- 221. Suarez SS** (1998) The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation *Biology of Reproduction* 58 1105-1107
- 222. Sun T, Lei ZM; Rao CV** (1998) A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells *Molecular and Cellular Endocrinology* 131 97-108
- 223. Sutton, R., C. D. Nancarrow, A. L. Wallace, N. W. Rigby.** 1984. Identification of an oestrus-associated glycoprotein in oviductal fluid of the sheep. *J. Reprod Fertil.* 72:415-422.

- 224. Sutton R, Wallace ALC, Engel H, Nancarrow CD.** 1984a. Binding of sheep oviductal fluid proteins to spermatozoa. *In: Lindsay DR, Pearce DT (Ed.). Reproduction in sheep.* Canberra: Australian Academy of Science. pp.140-143.
- 225. Suzuki, F.; Yanagimachi. R.** 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.
- 226. Talbot, P.; Di Carlantonio, G.** The oocyte-cumulus complex: ultrastructure of the extracellular components in hamsters and mice. *Gamete Research*, v. 10, p. 127-142, 1984.
- 227. Talbot, P.; Geiske, C.; Knoll, M.** Oocyte pickup by the mammalian oviduct. *Molecular Biology of the Cell*, v. 10, p. 5-8, 1999.
- 228. Talbot, P.; Shur, B. D.; Myles, D. G.** Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1-9, 2003.
- 229. Tanaka, T., Y. Urade, H. Kimura, N. Eguchi, A. Nishikawa, 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.
- 230. Tay JI, Rutherford AJ, Killick SR, Maguiness SD, Partridge RJ; Leese HJ** (1997) Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents *Human Reproduction* 12 2451-2456

- 231. Thibier M.** Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. Data Retrieval Committee Annual Report. IETS Newslett 2004; 22(4): 12-9.
- 232. Thibier M.** The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.* 2005; 45: 235-242.
- 233. Topper, E. K., G. J. Killian, A. Way, B. Engel, 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.
- 234. Totey SM, Singh G, Taneja M, Pawshe CH, Talwar GP.** In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus Bubalis*). *J Reprod Fertil* 1992; 95: 597-607.
- 235. Totey SM, Daliri M, Appa Rao KB, Pawshe CH, Taneja M, Chillar RS.** Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell numbers and sex ratios in buffalo embryos generated in vitro. *Theriogenology*. 1996 Jan 15; 45(2): 521-33.
- 236. 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.

- 237. Urzua, M. A., R. Stambaugh, G. Flickinger, L. Mastroianni, Jr.** 1970. Uterine and oviduct fluid protein patterns in the rabbit before and after ovulation. *Fertil. Steril.* 21:860-865.
- 238. Ussing H; Zerahn K** (1951) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin *Acta Physiologica Scandinavica* **23** 110–127
- 239. Uto, N.; Yamahama Y.** 1996. The motility and fertility of golden hamster sperm cultured in BSA-free medium. *Biol Cell* 88:23-28.
- 240. Van Winkle LJ, Haghghat N; Campion AL** (1990) Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect of the inorganic ions in oviductal fluid *Journal of Experimental Zoology* 253 215–219
- 241. Vandemark, N. L.; Hays R. L.. 1954.** Rapid sperm transport in the cow. *Fertil. Steril.* 5:131-137.
- 242. Verhage, H. G., A. T. Fazleabas, K. Donnelly.** 1988. The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology* 122:1639-1645.
- 243. Verhage HG, Fazleabas AT, Mavrogiannis PA, O'Day-Bowman MB, Donnelly KM, Arias EB and Jaffe RC** (1997) The baboon oviduct: characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein *Human Reproduction Update* **3** 541–552
- 244. Verlander JW, Tran TM, Zhang L, Kaplan MR and Hebert SC** (1998) Estradiol enhances thiazide-sensitive NaCl



cotransporter density in the apical plasma membrane of the distal convoluted tubule in ovariectomized rats *Journal of Clinical Investigation* 101 1661–1669

- 245. Vieira E.G., Chapman D.A., Killian G.J.** 2000. Terminal carbohydrate characterization of multiple forms of estrus-associated protein in bovine oviductal fluid using lectin probes. *Biol. Reprod. Suppl.1.* 62:262.
- 246. Villalon M, Hinds TR; Verdugo P** (1989) Stimulus–response coupling in mammalian ciliated cells. Demonstration of two mechanisms for control of cytosolic calcium *Biophysical Journal* 56 1255–1258
- 247. Vittoria A.** Anatomy of the female genital tract in the buffalo. Third Course on Biotechnology of Reproduction in buffaloes, Caserta, Italy 1997:15-20.
- 248. Voglmayr, J. K.; 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.
- 249. Walker S.K., Herd T.M., Seamark R.F.,** 1992. In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspective. *Theriogenology*, 37:111-126.
- 250. Way, A. L., A. M. Schuler, 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.
- 251. Way, A. L., H. L. Hoffman, N. R. Shope, M. R. Miller, 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.

- 252. Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK; Woods GL** (1991) Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos *Biology of Reproduction* 45 544–546
- 253. Weber, G. F., S. Ashkar, M. J. Glimcher, H. Cantor.** 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271:509-512.
- 254. Weeth HJ; Herman HA** (1952) A histological and histochemical study of the bovine oviducts, uterus and placenta *Research Bulletin # 501 University of Missouri Columbia, MO.*
- 255. Wegner CC, Killian GJ.** 1991. In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Molec Reprod Dev*, 29:77-84.
- 256. Wijayagunawardane, M. P. B.; Miyamoto, A.; Cerbito, W. A.; Acosta, T. J.; Takagi, M.; Sato, K.** Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. *Theriogenology*, v. 49, p. 607-618, 1998.
- 257. Willis, P., K. N. Sekhar, P. Brooks, R. A. Fayrer-Hosken.** 1994. Electrophoretic characterization of equine oviductal fluid. *J. Exp. Zool.* 268:477-485.
- 258. Wiseman D.L., Henricks D.M., Eberhardt D.M., Bridges W.C.** 1992. Identification and content of insulin-like growth factors in porcine oviductal fluid. *Biol Reprod*, 47:126-132.

- 259. Wrana, J. L., Q. Zhang, J. Sodek.** 1989. Full Length Cdna Sequence of Porcine Secreted Phosphoprotein-I (Spp-I, Osteopontin). *Nucleic Acids Research* 17:10119.
- 260. Yamaya M, Ohru T, Finkbeiner WE and Widdicombe JH** (1993) Calciumdependent chloride secretion across cultures of human tracheal surface epithelium and glands *American Journal of Physiology* 265 L170–L177
- 261. Yániz, J. L.; Lopez-Gatius, F.; Santolaria, P.; Mullins, K. J.** Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *The Anatomical Record*, v. 260, p. 268-278, 2000.
- 262. Zeitlin PL, Wagner M, Markakis D, Loughlin GM and Guggino WB.**1989. Steroid hormones: modulators of Na<sup>+</sup> absorption and Cl<sup>-</sup> secretion in cultured tracheal epithelia *Proceedings National Academy of Sciences USA* 86 2502–2505
- 263. Zicarelli L.** Reproductive seasonality in buffalo. *Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Caserta, Italy, 1997a: 29-52.*
- 264. Zicarelli L.** Superovulatory response in buffaloes bred in Italy. *Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Caserta, Italy, 1997b: 167-188.*
- 265. Zicarelli L. Esposito L., Campanile G., Di Palo R., Armstrong D.T.** (1997) Effect of using vasectomized bulls in A.I. practice on the reproductive efficiency of italian buffalo cows. *Anim. Repr. Sci.*, 47, 171-180.

**266. Zicarelli L.** Biotecnologie riproduttive nell' allevamento bufalino.  
Atti 1° Congresso Nazionale sull' Allevamento del Bufalo, 3-5  
ottobre 2001, Eboli (SA), Italy: 163-179.