



AMELIORATION DU TAUX DE FECONDATION EQUINE EN PRESENCE DE CELLULES D'OVIDUCTE PORCIN STIMULEES OU NON PAR DES HORMONES (ESTRADIOL OU LH)

Par :

- Mugnier S, Kervella M, Douet C, Yvon J-M, Venturi E, Duchamp G, Magistrini M, Goudet G
- INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements ; INRA, UEPAO ; CNRS ; Haras Nationaux ; F-37380 Nouzilly, France ; Université de Tours, F-37041 Tours, France
- Sylvie.Mugnier@tours.inra.fr

Résumé

Chez les mammifères, les sécrétions des cellules d'oviducte, régulées par l'estradiol et la LH, facilitent l'interaction entre les spermatozoïdes et les ovocytes. Dans l'espèce équine, le rôle de l'oviducte dans la fécondation est mal connu. Notre 1^{er} objectif était de vérifier si la présence de cellules d'oviducte porcine, lors de la co-incubation de gamètes équins, améliorerait la fécondation. Nos résultats ont montré une augmentation du taux de fécondation en présence de cellules d'oviducte (8,7% en présence contre 0% en absence de cellules, $P < 0,05$). Notre 2^{ème} objectif était de vérifier si une stimulation hormonale des cellules d'oviducte porcine en culture améliorerait les taux de fécondation des gamètes équins. Les gamètes équins ont été co-incubés avec des cellules d'oviducte porcine stimulées par les hormones LH ou E2 ou l'association LH + E2. Nos résultats n'ont pas montré d'amélioration du taux de fécondation après stimulation des cellules d'oviducte.

En conclusion, les cellules d'oviducte participent aux mécanismes de la fécondation des gamètes équins, mais leur stimulation hormonale n'améliore pas les taux observés dans nos conditions expérimentales.

Mots-clés : fécondation, oviducte, hormone, équin, porcine

Summary

In mammals during fertilization, the secretions of oviductal cells are stimulated by Estradiol (E2) or LH and are involved in gametes interaction. In equine species, few data are available about the role of the oviduct in mechanism of fertilization.

Our first objective was to verify if, oviductal cells improved the fertilization rates. The equine oocytes and spermatozoa were co-incubated with or without porcine oviductal cells. Our results showed that the fertilization rate was higher in the presence of porcine oviductal cells (8.7% versus 0%, $P < 0.05$).

Our second objective was to evaluate if a hormonal stimulation of oviductal cells improved the fertilization rate. The equine gametes were co-incubated with porcine oviductal cells stimulated or not with E2, LH or both. Our results showed that the fertilization rates were not improved when the oviductal cells were stimulated by hormones.

In conclusion, the oviductal cells are involved in the mechanisms of the equine fertilization, but their hormonal stimulation does not improve the rates in our experimental conditions.

Key-words: fertilization, oviduct, hormone, equine, porcine

Introduction

Dans les systèmes de reproduction sexuée, la fécondation, qui a lieu dans l'oviducte, est le point de départ du développement embryonnaire par la fusion des gamètes mâle et femelle. Dans l'espèce équine, les mécanismes de la fécondation ne sont pas encore élucidés et les études dans ce domaine sont très rares. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait de mieux maîtriser cette étape et aboutirait à une meilleure gestion des reproducteurs. Elle permettrait ainsi de diminuer les problèmes de subfertilité ou d'infertilité qui peuvent être liés à une mauvaise qualité des gamètes équins. Les pertes embryonnaires précoces sont également une cause importante d'infertilité, puisqu'elles peuvent atteindre 9% dans les 15 premiers jours (Ball, 1988). Elles sont dues en partie à des anomalies de fécondation *in vivo* au niveau de l'oviducte (Ball, 1988). La compréhension des mécanismes de la fécondation permettrait de limiter ces pertes. Enfin, les travaux concernant la conservation de la semence montrent qu'il est indispensable de développer un **outil pour évaluer *in vitro* la qualité du sperme**, c'est-à-dire l'aptitude des spermatozoïdes à féconder un ovocyte. Les laboratoires qui tentent de développer cet outil se heurtent au manque de connaissances des mécanismes de la fécondation. L'étude de ces mécanismes est une étape incontournable pour mettre en place des tests *in vitro* de qualité des spermatozoïdes dans le but d'évaluer la fertilité des étalons ou les techniques de conservation de la semence. C'est pourquoi notre étude porte sur la compréhension des mécanismes impliqués dans l'interaction du spermatozoïde avec l'ovocyte chez la jument.

Chez les mammifères, cette interaction implique trois acteurs : l'ovocyte, le spermatozoïde et les cellules d'oviducte. Plusieurs études ont montré que la présence de cellules d'oviducte lors de la co-incubation des gamètes mâles et femelles améliorerait les taux de fécondation chez les humains, les bovins, les porcins et les cervidés (Bongso *et al.*, 1991, Chian et Sirard, 1995, Bureau *et al.*, 2000, Romar *et al.*, 2001, Locatelli *et al.*, 2005,). L'oviducte agirait sur la fécondation grâce aux sécrétions de ses cellules épithéliales comme montré dans les espèces humaine, bovine et porcine (O'Day-Bowman *et al.*, 1996, Martus *et al.*, 1998, Mc Cauley *et al.*, 2003). Ces sécrétions seraient stimulées et régulées par différentes hormones. L'estradiol (E2) augmenterait les sécrétions des cellules d'oviducte en culture dans les espèces porcine et humaine (Xia *et al.*, 1996 ; Briton-Jones *et al.*, 2003). E2 améliorerait le développement embryonnaire précoce en stimulant la sécrétion des cellules d'oviducte porcine (Xia *et al.*, 1996). De plus, des récepteurs à E2 ont été mis en évidence dans l'oviducte porcine (Stanchev *et al.*, 1985). L'hormone LH améliorerait les sécrétions des cellules d'oviductes bovine et humaine (Sun *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1998 ; Briton-Jones *et al.*, 2003 ; Mishra *et al.*, 2003). La LH aurait un effet positif sur le développement embryonnaire bovine en stimulant les cellules d'oviducte bovine (Mishra *et al.*, 2003). Enfin, des récepteurs à la LH ont été mis en évidence dans l'oviducte porcine (Gawronska *et al.*, 1999).

Dans l'espèce équine, des fécondations ont été obtenues de façon répétable en co-incubant les gamètes avec des cellules d'oviductes équines ou porcines (Mugnier *et al.*, 2008). Notre premier objectif était de vérifier si la présence de cellules d'oviducte facilitait la fécondation des gamètes équins. Notre deuxième objectif était d'évaluer l'influence du traitement des cellules d'oviducte par les hormones LH ou E2 ou l'association de ces deux hormones, sur les taux de fécondation dans l'espèce équine.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Préparation des cellules d'oviducte porcine

Les oviductes ont été prélevés sur des truies de race Meishan abattues 6 heures après l'ovulation. Après décontamination dans l'alcool à 70° et élimination des tissus

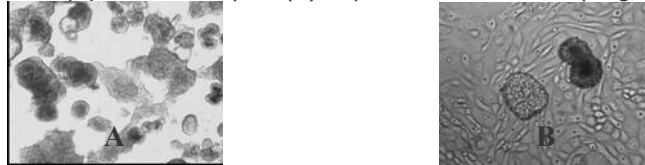
graisseux et conjonctifs, l'oviducte a été rincé trois fois dans un milieu de rinçage (TCM199 Hepes, M7528, Sigma, France) additionné de 80µg/ml de gentamicine (G1227, Sigma). Les amas de cellules d'oviducte porcine, appelés vésicules (Figure IA), ont été extraits par grattage de la jonction utéro-tubaire jusqu'au pavillon à l'aide d'une lame en verre. Les vésicules porcines ont ensuite été lavées quatre fois par décantation dans le milieu de rinçage puis déposées dans du milieu de culture composé de TCM 199 (M4530, Sigma) additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF, F4135, Sigma) et de 80µg/ml de gentamicine (Park et Sirard, 1996, Locatelli *et al.*, 2005).

Une partie des vésicules extraites a été maintenue, pendant 24 heures, dans des gouttes de 25µl de milieu de culture sous huile minérale (M8410, Sigma) dans un incubateur à la température de 38,5°C en présence de 5% de CO₂ dans une atmosphère saturée en humidité.

L'autre partie des vésicules a été mise en culture dans 500µl de milieu de culture, pendant 7 jours dans l'incubateur, afin d'obtenir un tapis. Le tapis est une monocouche de cellules recouvrant le fond de la boîte de culture (Figure IB).

Figure I : Vésicules (A) et tapis (B) de cellules d'oviducte porcine. Observation au microscope au grandissement x50

Figure I: Vesicles (A) and monolayers (B) of porcine oviduct cells (Magnification x50)



1.2. Préparation des ovocytes équins

Les ovaires équins, collectés sur des juments abattues aux abattoirs d'Alençon, Blois et Lusignan, ont été transportés dans du sérum physiologique (0,9g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée et stérile) entre 32 et 37°C jusqu'au laboratoire. Le liquide des follicules a été aspiré avec un système de pompe sous vide. Les ovocytes ont été recherchés dans le liquide folliculaire sous loupe binoculaire, puis rincés dans du PBS (Phosphate Buffered Saline, Dulbecco A, France) additionné de 50µg/ml de gentamicine. Les ovocytes équins ont été mis en culture par groupe de 8 à 25 dans le milieu de maturation composé de TCM 199 additionné de 20% de SVF et de 50ng/ml d'Epidermal Growth Factor (EGF, E4127, Sigma, Goudet *et al.*, 2000). Ils ont été placés dans l'incubateur pendant 26 heures à 38,5°C en présence de 5% de CO₂ dans une atmosphère saturée en humidité. Après la maturation, les ovocytes ont été aspirés et refoulés plusieurs fois à l'aide d'une pipette afin d'éliminer les cellules du cumulus qui les entourent.

1.3. Préparation des spermatozoïdes équins

La semence de 2 étalons de notre troupeau expérimental a été collectée à l'aide d'un vagin artificiel. La semence a été immédiatement filtrée et diluée dans le milieu HHBSA (sels de Hank's supplémentés de 1% d'albumine bovine (BSA, A7966, Sigma) et de 20mM d'Hepes (H3375, Sigma)) puis incubée 30 minutes dans des conditions anaérobies à 37°C. Les spermatozoïdes ont ensuite été traités avec 6µM d'ionophore calcique A23187 (C7522, Sigma) à 37°C pendant 5 minutes (Magistrini et Palmer, 1991). Après centrifugation 3 minutes à 500g, le culot a été remis en suspension dans le milieu HHBSA (25 x 10⁶ spermatozoïdes/ml).

1.4. Co-incubation des gamètes équins avec ou sans cellules d'oviducte porcine

Les ovocytes ont été co-incubés pendant 3 heures en présence ou en absence de vésicules ou de tapis porcins. Les spermatozoïdes (concentration finale de 2×10^6 spermatozoïdes/ml) et les ovocytes ont été co-incubés en présence ou en absence de vésicules ou de tapis porcins, pendant 24 heures, dans l'incubateur à 38,5°C en présence de 5% de CO₂ dans une atmosphère saturée en humidité.

1.5. Co-incubation des gamètes équins avec des cellules d'oviducte porcines traitées ou non par une hormone

Les hormones testées sur les cellules d'oviducte porcine étaient :

- dans une 1^{ère} expérience, l'hormone LH porcine purifiée (Référence L960909, produit par Jean-François Beckers à l'université de Liège, Belgique) à 100ng/ml (Gawronska *et al.*, 1999),
- dans une 2^{ème} expérience, l'E2 (E8875 Sigma, min 98%) à 1µg/ml (Xia *et al.*, 1996)
- et dans une 3^{ème} expérience, les hormones LH à 100ng/ml et E2 à 1µg/ml.

La ou les hormones ont été ajoutées dans le milieu contenant les vésicules ou les tapis 24 heures avant l'addition des gamètes. Ensuite, les ovocytes ont été co-incubés 3 heures avec les cellules stimulées ou non. Les spermatozoïdes (concentration finale de 2×10^6 spermatozoïdes/ml) et les ovocytes ont été co-incubés 24 heures en présence de cellules stimulées ou non, dans un incubateur à 38,5°C en présence de 5% de CO₂ dans une atmosphère saturée en humidité.

1.6. Evaluation du taux de fécondation

Après 24 heures de co-incubation des gamètes, les ovocytes de chaque groupe ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 2% dans le PBS pendant 20 minutes à température ambiante, puis rincés dans du PBS. Ils ont été incubés avec 2µg/ml d'un colorant de l'ADN, le Hoechst 33342 dilué dans le PBS afin d'analyser la présence de pronoyaux, signe de fécondation. Les ovocytes ont été déposés puis séchés sur une lame pour être observés au microscope à fluorescence. Ceux présentant deux ou plusieurs pronoyaux dans le cytoplasme, ont été considérés comme fécondés (Figure II).

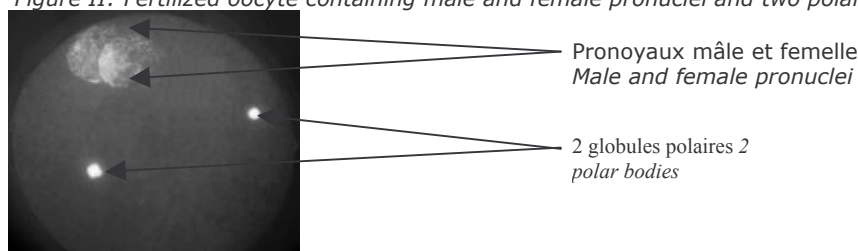
Le taux de fécondation a été calculé selon la formule :

$$\frac{\text{Nombre d'ovocytes fécondés} \times 100}{\text{Nombre d'ovocytes matures après culture } in vitro}$$

Pour chaque type de culture de cellules d'oviducte, les taux de fécondation ont été comparés par le test du Chi².

Figure II : Ovocyte fécondé présentant les pronoyaux mâle et femelle et deux globules polaires (Grandissement x400).

Figure II: Fertilized oocyte containing male and female pronuclei and two polar bodies (Magnification x400)



2. Résultats

2.1. Taux de fécondation avec ou sans vésicules ou tapis

Le taux de fécondation est de 8,7% (soit 4 ovocytes fécondés sur 46 ovocytes matures) après co-incubation des gamètes équins en présence de vésicules et de 0% (0/48) en absence de vésicules. Le taux de fécondation est significativement plus élevé en présence de vésicules qu'en absence de vésicules ($P < 0,05$). En revanche, aucune fécondation n'a été obtenue en présence ou en absence de tapis (0/22 contre 0/26).

2.2. Taux de fécondation avec vésicules ou tapis traités ou non

Le taux de fécondation obtenu en présence de vésicules ou de tapis stimulés par une ou deux hormones (LH ou E2 ou E2+LH) n'est pas significativement différent de celui obtenu en présence de vésicules ou de tapis non stimulés (Tableau 1, $P > 0,05$)

Tableau 1 : Taux de fécondation obtenus après 24 heures de co-incubation des gamètes équins en présence de vésicules ou sur des tapis porcins stimulés ou non par LH ou E2 ou LH + E2 (nombre d'ovocytes fécondés/nombre d'ovocytes matures)

Table 1: Fertilization rates after co-incubation of equine gametes for 24 hours in presence of porcine vesicles or monolayers stimulated by LH or E2 or E2 + LH. (number of fertilized oocytes/number of matured oocytes).

| | Expérience 1 (Experiment 1) | | Expérience 2 (Experiment 2) | | Expérience 3 (Experiment 3) | |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | Sans LH (without LH) | Avec LH (with LH) | Sans E2 (without E2) | Avec E2 (with E2) | Sans (LH + E2) (Without LH+E2) | Avec (LH + E2) (With LH + E2) |
| Vésicules (Vesicles) | 15 % (3/20) | 0 % (0/23) | 4,5 % (1/22) | 4,2 % (1/24) | 4 % (1/25) | 11,5 % (3/26) |
| Tapis (Monolayer) | 4,3 % (1/23) | 0 % (0/25) | 11,8 % (2/17) | 5,6 % (1/18) | 0 % (0/15) | 10,5 % (2/19) |

3. Discussion

Notre 1^{er} objectif était de vérifier si la présence de cellules d'oviducte porcine lors de la co-incubation *in vitro* des gamètes équins améliorerait les taux de fécondation. Nos résultats ont montré que les cellules d'oviducte porcine en culture améliorent les taux de fécondation des gamètes équins. De plus, les taux de fécondation obtenus en présence de cellules d'oviducte porcine sont similaires à ceux obtenus en présence de cellules d'oviducte équine (Mugnier *et al.*, 2008). Les cellules d'oviducte équine ou porcine mises en culture avec les gamètes équins participent aux mécanismes de la fécondation. Nous pouvons supposer que le mécanisme d'action des cellules sur la fécondation est similaire entre ces deux espèces. Dans l'espèce porcine, les cellules d'oviducte sécrètent des molécules qui facilitent la fécondation des gamètes porcins. Certaines de ces molécules ont été identifiées comme l'oviductine (Mc Cauley *et al.*, 2003), l'ostéopontine (Hao *et al.*, 2006) et l'atrial natriuretic peptide (ANP, Zhang *et al.*, 2006). Notre objectif est donc d'identifier les molécules impliquées dans la fécondation et sécrétées par l'oviducte équine. Pour l'instant, nous avons mis en évidence la présence de l'ostéopontine dans les cellules d'oviducte équine par la technique de Western Blot. Nous poursuivons l'identification de nouvelles molécules synthétisées par les cellules d'oviducte équine et nous envisageons d'étudier leur rôle dans la fécondation des gamètes équins.

Notre 2^{ème} objectif était d'évaluer l'influence des cellules d'oviducte porcine stimulées par les hormones LH ou E2 ou LH + E2 sur les taux de fécondation équine. Dans nos conditions de culture, les taux de fécondation restent faibles même après stimulation des cellules d'oviducte porcine par les hormones LH ou/et E2. Dans l'espèce porcine,

E2 stimule les sécrétions des cellules d'oviducte porcin (Xia *et al.*, 1996). Dans l'espèce bovine, LH stimule la sécrétion des cellules d'oviducte bovin (Mishra *et al.*, 2003). Dans notre protocole, nous avons testé la concentration en E2 utilisée par Xia *et al.* (1996), ou en LH utilisée par Gawronska *et al.* (1999) dans l'espèce porcine. Mais, aucun effet n'a été observé sur la fécondation équine. Il est possible que les doses d'hormones aient été inadaptées pour stimuler les sécrétions des oviductes porcins. De plus, la mise en culture *in vitro* des cellules d'oviducte peut altérer leur fonction sécrétrice ou modifier l'expression des récepteurs aux hormones LH ou E2. Il serait donc intéressant de tester d'autres concentrations en hormones, d'autres durées de traitement hormonal des cellules d'oviducte ou d'autres conditions de culture *in vitro*. Cependant, d'autres facteurs sont aussi à prendre en compte pour expliquer ce faible taux de fécondation. Les ovocytes matures *in vitro* sont parfois de moins bonne qualité que les ovocytes collectés dans des follicules préovulatoires. Ces ovocytes préovulatoires sont collectés juste avant ovulation et ont subi une maturation *in vivo* physiologique qui leur assure une bonne compétence à la fécondation. Afin de s'assurer que nos faibles taux de fécondation obtenus en présence de cellules d'oviducte ne soient pas liés à une mauvaise qualité des ovocytes, il serait intéressant d'utiliser des ovocytes préovulatoires. Enfin, dans nos conditions, la compétence des spermatozoïdes à la fécondation n'est peut-être pas optimale. La technique de préparation des spermatozoïdes, décrite par Palmer *et al.* (1991) et utilisée dans notre protocole, pourrait être améliorée. De même, il serait important de tester d'autres techniques de préparation du sperme, par exemple un traitement à l'héparine (Dell Aquila *et al.*, 1996). D'autres étalons pourraient aussi être testés car la compétence à la fécondation varie entre individus.

En conclusion, les cellules d'oviducte participent aux mécanismes de la fécondation chez les équins. Il est important d'étudier les sécrétions de ces cellules et leurs mécanismes d'action sur l'interaction des spermatozoïdes avec les ovocytes. Une meilleure compréhension du rôle de l'oviducte dans la fécondation, permettrait de mieux gérer les problèmes de subfertilité et d'infertilité et de limiter les pertes embryonnaires précoces. **Enfin, une meilleure connaissance des molécules de l'oviducte et de leur rôle dans la fécondation, pourrait permettre la mise au point de nouveaux tests qui évalueraient la qualité du sperme *in vitro*.**

Bibliographie

BALL, BA. Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes, and diagnostic considerations. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 1988, volume 4, p. 263-290.

BONGSO, A., YANG, SC., Fong, CY. et Ratnam, S. Improved fertilization rates of human oocytes in coculture. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 1991, volume 8 (4), p. 216-221.

BRITON-JONES, C., LOK, IH., CHIU, TT., CHEUNG, LP. et HAINES C. Human chorionic gonadotropin and 17-beta estradiol regulation of human oviductin/oviduct specific glycoprotein mRNA expression *in vitro*. *Fertility and sterility*, 2003, volume 80 (2), p. 720-726.

BUREAU, M., BAILEY, JL. et SIRARD, MA. Influence of oviductal cells and conditioned medium on porcine gametes. *Zygote*, 2000, volume 8 (2), p. 139-144.

CHIAN, RC. et SIRARD, MA. Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biology of Reproduction*, 1995, volume 52 (1), p. 156-162.

DELL'AQUILA, ME., FUSCO, S., LACALANDRA, GM. et MARITATO, F. In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology*, 1996, volume 45 (3), p. 547-560.

GAWRONSKA, B., PAUKKU, T., HUHTANIEMI, I., WASOWICZ, G. et ZIECIK A.J. Oestrogen-dependent expression of LH/hCG receptors in pig fallopian tube and their role in relaxation of the oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1999, volume 115 (2), p. 293-301.

GOUDET, G., BELIN, F., MLODOWSKA, W. et BEZARD, J. Influence of Epidermal Growth Factor on in vitro maturation of equine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 2000, volume 15, p. 49-52.

HAO, Y., MATHIALAGAN, N., WALTERS, E., MAO, J., LAI, L., BECKER, D., LI, W., CRITSER, J. et PRATHER, R.S. Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biology of Reproduction*, 2006, volume 75 (5), p. 726-733.

LOCATELLI, Y., COGNIE, Y., VALLET, JC., BARIL, G., VERDIER, M., POULIN, N., LEGENDRE, X. et MERMILLOD, P. Successful use of oviduct epithelial cell coculture for in vitro production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos. *Theriogenology*, 2005, volume 64 (8), p. 1729-1739.

MAGISTRINI, M. et PALMER, E. Motility, triple stain and electron microscopic analysis of spermatozoa treated with ionophore A23187 for in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 1991, volume 44, p. 661-663.

MARTUS, NS., VERHAGE, HG., MAVROGIANIS, PA. et THIBODEAUX, JK.. Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1998, volume 113 (2), p. 323-329.

Mc CAULEY, TC., BUHI, WC., WU, GM., MAO, J., CAAMANO, JN, DIDION, BA., et DAY, BN. Oviduct-Specific Glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, 2003, volume 69 (3), p. 828-834.

MISHRA, S., LEI, ZM. et RAO, CV. A novel role of luteinizing hormone in the embryo development in cocultures. *Biology of Reproduction*, 2003, volume 68 (4), p1455-1462.

MUGNIER S., KERVELLA M., BOITTIN S., DOUET C., YVON JM., MAGISTRINI M. et GOUDET G. Fécondations des gamètes équins en présence de cellules d'oviducte équin ou porcin en culture in vitro. 34^e Journée de la Recherche Equine. 28 février 2008, Paris, France, 31-37.

O'DAY-BOWMAN, MB., MAVROGIANIS, PA., REUTER, LM., JOHNSON, DE., FAZLEABAS, AT. et VERHAGE, HG. Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following in vitro incubation. *Biology of Reproduction*, 1996, volume 54 (1), p. 60-69.

PALMER, E., BEZARD, J., MAGISTRINI, M. et DUCHAMP, G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 1991, volume 44, p. 375-384.

PARK, CK. et SIRARD MA. The effect of preincubation of frozen-thawed spermatozoa with oviductal cells on the *in vitro* penetration of porcine oocytes. *Theriogenology*, 1996, volume 46 (7), p. 1181-1189.

ROMAR, R., COY, P., CAMPOS, I., GADEA, J., MATÁS, C. et RUIZ, S. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on *in vitro* fertilization. *Animal Reproduction Science*, 2001, volume 68 (1-2), p. 85-98.

STANCHEV, P., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., EDQVIST, LE. et ERIKSSON, H. Oestradiol and progesterone receptors in the pig oviduct during the oestrous cycle. *Journal of Steroid Biochemistry*, 1985, volume 22 (1), p.115-120.

SUN, T., LEI, ZM. et RAO, CV. A novel regulation of the oviductal glycoprotein gene expression by luteinizing hormone in bovine tubal epithelial cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1997, volume 131 (1), p. 97- 108.

WANG, P., LEI, ZM. et RAO, CV. Cyclic AMP/protein kinase A signaling in luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin action to increase the oviductal glycoprotein synthesis in bovine tubal epithelial cells. *Biology of Reproduction*, 1998, volume 58, supplement 1114 (abstract 137).

XIA, P., RUTLEDGE, J., WATSON, AJ. et ARMSTRONG, DT. Effect of oestrogen-treated porcine ampulla oviductal epithelial cells on early embryonic development *in vitro* and characterization of their protein synthetic activity. *Animal Reproduction Science*, 1996, volume 45 (3), p. 217-29.

ZHANG, M., HONG, H., ZHOU, B., JIN, S., WANG, C., FU, M., WANG, S. et XIA, G. The expression of atrial natriuretic peptide in the oviduct and its functions in pig spermatozoa. *Journal of endocrinology*, 2006, volume 189 (3), p. 493-507.