

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**Dottorato di Ricerca in**

**“Clinica e Terapia d’Urgenza Veterinaria”**

**Ciclo XXI**

**Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: VET/10**

**CRIOCONSERVAZIONE DI GAMETI ED EMBRIONI NEL GATTO  
E IL LORO IMPIEGO NELL’EMBRYO TRANSFER**

**Presentata da: Dott.ssa Regazzini Michela**

**Coordinatore Dottorato**

**Chiar.mo Prof  
Lorenzo Masetti**

**Relatore**

**Chiar.mo Prof  
Daniele Zambelli**

**Esame finale anno 2008**

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
<b>PARTE COMPILATIVA</b>	<b>5</b>
<b>CRIOCONSERVAZIONE DEI GAMETI ED EMBRIONI E TRASFERIMENTO EMBRIONALE NEL GATTO</b>	<b>6</b>
<b>CAPITOLO 1</b>	<b>7</b>
<b>RACCOLTA DEGLI OOCITI</b>	<b>7</b>
1.1 Stimolazione ovarica con gonadotropine	9
<b>CAPITOLO 2</b>	<b>10</b>
<b>RACCOLTA DEL MATERIALE SEMINALE</b>	<b>10</b>
2.1 Valutazione del materiale seminale	12
<b>CAPITOLO 3</b>	<b>15</b>
<b>METODI DI CONSERVAZIONE DEI GAMETI</b>	<b>15</b>
3.1 Conservazione degli oociti	16
3.1.1 Refrigerazione	17
3.1.2 Congelamento lento	17
3.1.3 Vittrificazione	19
3.1.4 Criocconservazione di oociti intrafollicolari	21
3.2 Conservazione materiale seminale	21
<b>CAPITOLO 4</b>	<b>24</b>
<b>PRODUZIONE DI EMBRIONI IN VITRO</b>	<b>24</b>
4.1 Selezione degli oociti e IVM	25
4.1.1 Effetti della stagionalità sulla produzione di embrioni in vitro	30
4.2 Fertilizzazione in vitro	31
4.2.1 Tecniche di fertilizzazione assistita: iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI)	32
4.2.2 Trasferimento Nucleare (NT) o clonazione	33
4.3 Coltura in vitro	33
<b>CAPITOLO 5</b>	<b>36</b>
<b>CRIOCONSERVAZIONE EMBRIONI</b>	<b>36</b>
5.1 Congelamento lento	36
5.2 Vittrificazione	37
<b>CAPITOLO 6</b>	<b>39</b>
<b>TRASFERIMENTO EMBRIONALE</b>	<b>39</b>
5.1 Raccolta degli embrioni e sincronizzazione	39
5.2 Trasferimento embrionale	41

5.2.1	Trasferimento degli embrioni per via chirurgica	41
5.2.2	Trasferimento degli embrioni per via non chirurgica	43
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>		<b>45</b>
<b>1. VITRIFICAZIONE DI OOCITI DI GATTO IN CRYOLOOP</b>		<b>46</b>
<b>2. SVILUPPO DI EMBRIONI DI GATTO PRODOTTI IN VITRO DOPO VITRIFICAZIONE E TRASFERIMENTO EMBRIONALE NON CHIRURGICO: RISULTATI PRELIMINARI</b>		<b>52</b>
<b>3. CONFRONTO DI DUE TECNICHE DI CATETERIZZAZIONE TRANSCERVICALE NELLA GATTA</b>		<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>		<b>65</b>

## INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si sta espandendo sempre di più l'applicazione delle tecniche di riproduzione assistita (ART) nei felini. Quest'aumentato interesse è attribuibile a diversi fattori, tra cui il principale è la consapevolezza che molte specie di felini selvatici sono in pericolo d'estinzione, pertanto lo stoccaggio di gameti ed embrioni per intervalli di tempo prolungati sono importanti al fine di preservare la variabilità genetica. Per questo motivo il gatto è considerato un buon modello sperimentale negli studi comparativi per la ricerca nella riproduzione assistita degli altri felini selvatici. Le priorità immediate della ricerca sono quelle di migliorare l'applicabilità dell'ART per la migliore gestione della popolazione, e includono nuove indagini dei protocolli di stimolazione ovarica, metodi di crioconservazione del materiale seminale e degli embrioni, sistemi di coltura embrionale e vitalità fetale e neonatale dopo le tecniche di riproduzione assistita.

L'attività di ricerca nel triennio del Dottorato è stata principalmente finalizzata al recupero di gameti maschili e femminili nella specie felina ed alla loro crioconservazione, allo scopo di produrre embrioni per effettuare il trasferimento embrionale non chirurgico. La tecnica impiegata per il congelamento del seme era già stata validata nel nostro laboratorio, mentre per la crioconservazione degli oociti è stata impiegata la vitrificazione in cryoloop, utilizzando protocolli appositamente messi a punto per la specie felina.

Per quanto riguarda l'embryo transfer non chirurgico nel gatto, sono stati testati due modelli di cateteri per il trasferimento transcervicale ed infine sono stati eseguiti due trapianti embrionali di blastocisti prodotte in vitro fresche o vitrificate in paillette. Per i due trasferimenti, sono state utilizzate due riceventi in estro naturale, in cui l'ovulazione è stata indotta mediante la somministrazione di hCG. Il trasferimento embrionale è stato

effettuato utilizzando il catetere ideato nel nostro laboratorio per l'inseminazione transcervicale nella gatta. Il proseguimento della gravidanza è stato monitorato quindi mediante esame ecografico.

## **PARTE COMPILATIVA**

## **CRIOCONSERVAZIONE DEI GAMETI ED EMBRIONI E TRASFERIMENTO EMBRIONALE NEL GATTO**

I gameti e gli embrioni possono essere utilizzati freschi oppure essere sottoposti a metodiche di conservazione e utilizzati successivamente. La crioconservazione dei gameti ed embrioni è un importante mezzo per migliorare l'efficienza delle tecniche di riproduzione assistita programmata. Per l'impiego di gameti crioconservati occorre verificare che le metodiche di conservazione non abbiano danneggiato le varie strutture che li compongono, in modo che sia possibile procedere con le fasi successive: maturazione in vitro (IVM), fecondazione in vitro (IVF) e coltura in vitro (IVC).

Nel corso degli anni, oltre alle tecniche convenzionali di produzione embrionale in vitro, sono state sviluppate anche altre tecniche di riproduzione assistita, tra cui alcune più invasive, come ad esempio l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI). Inoltre è possibile anche rimuovere il nucleo dell'ovocita ricevente e trasferirvi il nucleo di un'altra cellula embrionale (trasferimento nucleare, NT), in modo da ottenere un incremento del miglioramento genetico.

Gli embrioni prodotti in vitro possono quindi essere impiegati freschi oppure si può procedere alla conservazione (congelamento o vitrificazione) per un impiego successivo. Per il trasferimento embrionale è possibile impiegare la via chirurgica laparoscopica o laparotomica o quella non chirurgica, mediante il trasferimento intrauterino per via transcervicale. Dopo il trasferimento la gravidanza può essere quindi monitorata ecograficamente, permettendo di osservare lo sviluppo embrionale.

L'applicazione delle diverse tecniche di riproduzione assistita ha importanti implicazioni, sia per il miglioramento della riproduzione di particolari razze di gatti, sia per la conservazione della biodiversità nei felini in via d'estinzione.

## CAPITOLO 1

### RACCOLTA DEGLI OOCITI

Nella specie felina il recupero degli oociti può essere eseguito dopo rimozione chirurgica delle gonadi femminili (ovariectomia), associata o meno all'asportazione dell'utero (ovaioisterectomia), (Franzosi et al., 2003) oppure dall'animale in "vivo".

Quando le ovaie vengono recuperate dopo ovariectomia/ovaioisterectomia, si applica una tecnica chiamata slicing delle ovaie, che consiste nel sezionare longitudinalmente le ovaie utilizzando un bisturi, e con l'aiuto di uno stereomicroscopio è rimossa la porzione connettivale a carico della midollare che contiene abbondanti vasi sanguigni, in seguito le ovaie sono finemente sminuzzate e la ricerca degli oociti avviene nel liquido di lavaggio (Evecen et al., 2009).

Il recupero degli oociti nell'animale in "vivo" può essere effettuato per via laparoscopica (Goodrowe et al., 1988a; Pope et al., 2006) o laparatomica (Pope et al., 1993) e in entrambe i casi si può eseguire l'aspirazione follicolare (Franzosi et al., 2003) o ovum pick up oppure il flushing delle salpingi 24-26 ore dopo la somministrazione di hCG alle donatrici (Pope, 2000). La tecnica laparoscopica è un metodo meno invasivo che permette di visualizzare lo stato riproduttivo dell'animale (Bush et al., 1978), e può consentire le varie metodiche di recupero degli oociti. Attraverso la laparoscopia è possibile eseguire l'aspirazione follicolare o ovum pick up mediante l'impiego di un ago da 22 G lungo 4 cm innestato ad un tubicino di plastica del diametro interno di 0,86 mm, un tubo di silicone ed una pompetta da aspirazione. Si procede inserendo l'ago attraverso la parete addominale a livello ventromediale rispetto alla posizione di ogni

ovaio. I follicoli con un diametro  $> 2$  mm (Pope et al., 1998) vengono punti con l'ago mentre viene applicata una leggera pressione negativa con la pompetta, durante l'aspirazione l'ago viene fatto ruotare delicatamente all'interno di ogni follicolo per assicurare il completo recupero del contenuto (Ding et al., 2008). Si procede poi con lo stesso procedimento sull'ovaio controlaterale (Goodrowe et al., 1988) dopo aver lavato sia i tubi di raccolta sia l'ago. In alternativa all'aspirazione follicolare è possibile effettuare il flushing delle salpingi, prima dell'inizio della raccolta ogni soggetto è trattato con iniezioni intramuscolari di eCG/hCG rispettivamente 150 UI e 200 UI. Il primo è somministrato al fine di stimolare la crescita e la maturazione follicolare, il secondo per indurre l'ovulazione. Il recupero dei gameti può quindi essere eseguito dopo circa 30 ore dalla somministrazione di hCG, in alternativa è possibile indurre l'ovulazione tramite l'accoppiamento con maschi vasectomizzati. Quando s'intende eseguire il flushing di ambedue gli ovidotti, si consiglia di accedere alle ovaie a livello della linea alba, in caso contrario è preferibile accedervi dal fianco. Questa tecnica prevede l'inserimento nell'ampolla, attraverso la fimbria, di una cannula di vetro da 2-3 mm di diametro e lunga 8-10 cm. Un ago ipodermico da 26G, connesso ad una siringa da 1 o 2 ml con all'interno il liquido di maturazione, è introdotto nel lume dell'ovidotto in prossimità della giunzione utero-tubale, l'estremità libera della cannula è direzionata verso una provetta da 2 ml. Passati pochi minuti per effetto della gravità gli oociti si troveranno sul fondo della provetta da dove potranno essere facilmente recuperati (Hossein et al, 2008).

Nella laparatomia l'accesso è a livello di linea mediana, ed è possibile eseguire le stesse procedure per il recupero degli oociti (Pope et al, 1993). Gli oociti recuperati vengono solitamente conservati in appositi terreni di coltura, quali ad esempio TL Hepes, addizionato con eparina (Pope et al, 2006), oppure mKRB e conservati in aria al 5% CO<sub>2</sub> a 37° C ((Pope et al, 2006; Pope et al 1998). Al medium sono inoltre aggiunti

antibiotici (100 IU/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomicina) e antimicotici al fine di prevenire la crescita di microrganismi (Pope et al, 2006, Pope et al, 1993, Ciani et al, 2008).

### **1.1 Stimolazione ovarica con gonadotropine**

I gatti sono generalmente animali poliestrali stagionali con attività sessuale aumentata durante i mesi con le giornate più lunghe, e con un'attività che tende a diminuire fino a fermarsi nei mesi con giornate più corte. L'ovulazione nel gatto è indotta e generalmente avviene 24-48 ore dopo la liberazione di LH post-coitale. Gli oociti ovulati sono oociti secondari in metafase II. Lo sviluppo in vitro degli oociti è influenzato dalla qualità degli oociti e dal tipo di ormoni somministrati per favorire la maturazione (Farstad, 2000). Anche se i felini sono fotoperiodici ed hanno un'ovulazione indotta, si è dimostrata valida anche la stimolazione con gonadotropine, quali FSH o eCG e LH (Fayer, 7). Il protocollo più comune prevede la somministrazione di dosi quotidiane (spesso decrescenti) di FSH (3-5 UI) per via sottocutanea per 4 giorni seguite il 5° giorno dalla somministrazione i.m. di 3UI di LH (Pope et al,2006). Il primo è somministrato al fine di stimolare la crescita e la maturazione follicolare, il secondo per indurre l'ovulazione.

L'altro protocollo utilizza l'eCG e l'hCG sono somministrati 150 UI di eCG per via intramuscolare il giorno 0 per stimolare la maturazione follicolare, e dopo 3-4 giorni sono state somministrate 100 UI di hCG sempre per via intramuscolare al fine d'indurre l'ovulazione (Donoghue et al, 1992 )

## CAPITOLO 2

### RACCOLTA DEL MATERIALE SEMINALE

Il materiale seminale di gatto può essere raccolto utilizzando varie metodiche: vagina artificiale (Sojka et al, 1970, Gomez et al, 2003), flushing della vagina dopo accoppiamento con la femmina, flushing dei dotti deferenti e degli epididimi di gatti sottoposti ad orchietomia (Zambelli e Belluzzi 2004), elettroeiaculazione (Platz e Seager 1978; Pineda e Dooley 1984; Howard et al, 1990; Goodrowe et al, 1988a; Merlo et al, 2008; Donoghue et al, 1990; Pope et al, 2006), ed infine la cateterizzazione (Zambelli et al, 2008). Il materiale seminale ottenuto utilizzando la vagina artificiale e l'elettroeiaculazione è completo ed è costituito sia dalla parte cellulare (spermatozoi) che dal plasma seminale (Zambelli e Belluzzi 1998), mentre con il flushing della vagina dopo accoppiamento con la femmina, non è possibile eseguire un esame completo sul materiale ottenuto. Il flushing dei deferenti e degli epididimi è utilizzato solo a scopo di ricerca, in quanto non è una metodica ripetibile, dal momento che il maschio viene castrato, ma permette di ottenere spermatozoi vivi (Axner e Linde-Forsberg, 2002). Gli epididimi sono tritati finemente con una lama da bisturi per liberare gli spermatozoi, in seguito sono lavati con PBS, il liquido di lavaggio viene centrifugato, poi viene rimosso il surnatante e viene utilizzata la restante parte di sperma (Zambelli et al, 1998, Ciani et al, 2008 ).

Il metodo della vagina artificiale può essere usato solo su alcuni soggetti, a causa del temperamento degli animali. Tra i vantaggi di questo metodo è incluso però il basso costo, inoltre non vi sono limitazioni fisiche e chimiche ed è necessario un solo operatore per compiere la raccolta (Sojka et al, 1970). Utilizzando l'elettroeiaculazione,

invece, non sono necessari l'addestramento del maschio e la presenza di una femmina in calore, ma è sempre necessaria l'anestesia totale, in questo modo è possibile prelevare da tutti i soggetti, ma si abbassa la frequenza delle raccolte (Zambelli e Belluzzi 1998; Zambelli e Cunto 2006).

Il metodo dell'elettroeiaculazione si esegue mediante uno stimolatore elettrico collegato ad una sonda rettale in teflon provvista di tre elettrodi longitudinali per la stimolazione (Axner e Linde-Forsberg, 2002). Gli animali sono anestetizzati prima della procedura di elettroeiaculazione, esistono diversi protocolli anestetici, tra i quali il più utilizzato è quello che prevede l'impiego di ketamina HCL associata alla medetomidina, oppure la sola ketamina HCL. Il dosaggio è 25-33 mg/kg IM oppure 5 mg/kg in associazione con medetomidina 80 µg/Kg SC (Plaz e Seager, 1978; Johnstone 1984; Howard et al., 1990; Axner e Linde-Forsberg, 2002). Questo tipo d'anestesia ha una durata abbastanza lunga che permette il completamento della raccolta del materiale seminale, anche nel caso in cui sia necessario ripetere la procedura dopo 5-10 minuti. Alla fine delle operazioni di raccolta del materiale seminale è utilizzato l'atipamezolo per antagonizzare gli effetti della medetomidina (Axner e Linde-Forsberg, 2002). Recentemente, è stato descritto solo l'uso della medetomidina (100-150 µg/kg SC) con buoni risultati (Zambelli et al., 2004). Una volta che l'animale ha raggiunto lo stato d'anestesia adeguata, è inserita la sonda preventivamente lubrificata per 7-8 cm nel retto (Plaz e Seager, 1978), previa svuotamento del retto dalle feci. Una debole corrente elettrica stimola i nervi che giungono agli organi riproduttivi, le stimolazioni elettriche sono applicate in maniera intermittente e sono di bassa frequenza. Vi sono vari protocolli di stimolazione, ma quello più utilizzato è quello proposto da Howard et al (Howard et al 1990) che consiste in un totale di 80 stimoli elettrici da 2 a 5 volt applicati in tre serie. La prima serie consiste in 10 stimoli da 2 volt poi 10 stimoli da 3 volt e dopo 10 stimoli da 4 volt. Si compie una pausa di 2-3 minuti e poi si procede con la 2° serie costituita da 10 stimoli

da 3 volt, 10 stimoli da 4 volt e 10 stimoli da 5 volt, altra pausa di 2-3 minuti ed infine 10 stimoli da 4 volt e 10 stimoli da 5 volt. Ad ogni stimolazione il gatto deve rispondere con una distensione rigida degli arti, se questo non accade significa che gli elettrodi nel retto non sono nella posizione giusta, oppure vi è l'interferenza delle feci (Axner e Linde-Forsberg, 2002; Silva et al, 2004). La raccolta dello sperma avviene applicando un'epENDORF sul pene, mentre con l'altra mano si esercita una leggera pressione alla sua base (Axner e Linde-Forsberg, 2002).

Ultimo metodo che si può praticare per la raccolta del materiale seminale, è quello della cateterizzazione, anche con questa metodica l'animale è anestetizzato con medetomidina e lo sperma si raccoglie all'ottenimento dell'effetto del farmaco. Si procede rimuovendo con un bisturi la parte terminale di un catetere urinario da gatto 3F di 11 cm (parte con le aperture laterali, approssimativamente 1 cm), per ottenere un catetere più corto con apertura finale. Dopo aver accorciato il catetere si procede al suo completo inserimento nell'uretra ed immediatamente si procede alla sua rimozione per raccogliere il materiale seminale che è risalito per capillarità lungo il catetere. Questa operazione è effettuata 1-2 volte sullo stesso gatto a distanza di una ventina di minuti tra i vari prelievi (Zambelli et al, 2008).

## **2.1 Valutazione del materiale seminale**

Il materiale seminale raccolto è trasferito in un'epENDORF e conservato chiuso ad una temperatura di 35°-37°C fino al momento della valutazione (Zambelli e Belluzzi, 1998), per poi essere utilizzato fresco o sottoposto alle procedure di congelamento per l'uso nella riproduzione assistita. Lo sperma dovrebbe essere valutato il più rapidamente possibile per evitare modificazioni dei parametri spermatici (Zambelli, 1994). Il volume di sperma ottenuto dal gatto è piuttosto piccolo e questo limita il n° delle valutazioni che si possono compiere, anche se alcuni parametri dovrebbero sempre essere valutati

(Axner e Linde-Forsberg, 2002). I principali parametri macroscopici da considerare sono l'aspetto e il volume, mentre quelli microscopici: la motilità, la concentrazione, la morfologia, e la vitalità (Zambelli e Cunto 2006).

Motilità spermatica-Motilità progressiva: sono i primi parametri da valutare. Si utilizza un microscopio a contrasto di fase con piastra riscaldata a 38°C (Axner e Linde-Forsberg, 2002). La motilità spermatica è misurata in percentuale da 0 a 100 mentre la motilità progressiva utilizzando una scala da 0 a 5 (oppure anche questa in percentuale); la scala va dallo 0= nessun movimento fino a 5= movimenti rapidi regolari e progressivi (Zambelli e Belluzzi 1998; Platz e Seager 1978). I movimenti possono variare anche molto tra le raccolte di uno stesso gatto (Axner et al., 1998; Howard et al., 1986).

Concentrazione: una porzione di sperma è diluita in una soluzione di formalina tamponata ad una concentrazione da 1:40 a 1:100, a seconda della concentrazione dello sperma, e poi valutata al microscopio usando una camera contaglobuli (es. Burcker). Il numero totale di spermatozoi è calcolato dal volume e dalla concentrazione dello sperma (Axner e Linde-Forsberg, 2002; Zambelli e Belluzzi 1998).

Volume-Colore-pH: il volume del materiale seminale nei gatti è piuttosto piccolo, e la quantità dipende anche dal metodo di raccolta. Un volume molto limitato si ottiene con il metodo della vagina artificiale, mentre con l'elettroeiaculazione se ne ottiene una quantità maggiore (Sojka et al., 1970; Platz et al., 1978; Howard et al., 1990), in ogni caso il volume è espresso in  $\mu\text{l}$  e presenta un range di 30-400 (Zambelli et al., 2006, Zambelli e Belluzzi 1998).

Il colore fisiologico dell'eiaculato è bianco latte o avorio secondo la concentrazione; se vi sono altre colorazioni sono patologiche, dovute ad esempio a contaminazioni d'urina, sangue o pus. Il pH di solito è compreso tra 7.0-8.6 (Zambelli e Belluzzi 1998).

Morfologia: sono descritti diversi metodi per fissare e classificare i difetti dello sperma (Axner e Linde-Forsberg, 2002). Questo parametro può essere studiato al microscopio a

contrasto di fase oppure dopo colorazione e poi osservato a 1200 X (Zambelli et al., 1993).

In tutti gli eiaculati normali sono presenti concentrazioni di forme patologiche di solito inferiori al 15%; le più frequenti sono rappresentate dalle gocce citoplasmatiche prossimali, mediali, distali e dalle code ripiegate (Zambelli e Belluzzi 1998). Le più frequenti anomalie della testa sono visualizzate meglio nei vetrini colorati, mentre le gocce citoplasmatiche sono visualizzate meglio sullo striscio fresco (Sekoni et al., 1981).

Plasma seminale: per uno studio più approfondito del materiale seminale può essere eseguita l'analisi del plasma seminale ottenuto dopo centrifugazione dell'eiaculato. Il plasma seminale è per la maggior parte composto dalla secrezione delle ghiandole bulbouretrali, mentre la secrezione prostatica è molto ridotta (Zambelli e Belluzzi 1998). La fosfatasi alcalina presente nel plasma seminale, come per il cane, ha origine epididimale, per tanto se vi è una concentrazione alta di fosfatasi alcalina l'eiaculato è completo e include i fluidi epididimali, mentre una bassa concentrazione di fosfatasi alcalina indica un'eiaculazione incompleta o un'ostruzione bilaterale dell'epididimo o dei vasi deferenti (Zambelli e Belluzzi 1998; Axner e Linde-Forsberg, 2002).

## **CAPITOLO 3**

### **METODI DI CONSERVAZIONE DEI GAMETI**

La crioconservazione dei gameti è un mezzo importante nei programmi di riproduzione assistita, infatti la conservazione a lungo termine di oociti o spermatozoi è necessaria quando l'IVF o l'IA devono essere effettuate in un momento futuro (Merlo et al., 2008). Quando esiste una distanza geografica o temporale tra i donatori, la conservazione è l'unica soluzione in quanto questo metodo consente di avere a disposizione sia il maschio sia la femmina anche se non contemporaneamente (Luvoni, 2006).

Tutte queste procedure opportunamente studiate si basano, per la maggior parte, sull'ottimizzazione delle percentuali di raffreddamento per rimuovere l'acqua dalle cellule, per prevenire i danni da freddo dovuti alla formazione di cristalli di ghiaccio, minimizzando così lo stress chimico da tossicità/osmotica per l'esposizione ad alte concentrazioni di sali. La procedura convenzionale di crioconservazione si basa sul principio della disidratazione, poi esiste un'altra tecnica utilizzata per gli oociti/embrioni, la vitrificazione, che richiede soluzioni ad alta viscosità, percentuali rapide di raffreddamento, piccoli volumi ed un uso di alte concentrazioni di crioprotettori per ottenere uno stato fisico simile al vetro (Campos-Chillon et al., 2006).

### **3.1 Conservazione degli oociti**

Gli oociti sono disponibili solo in quantità limitata rispetto agli spermatozoi, perciò bisogna attuare dei protocolli di crioconservazione che consentano un'alta percentuale di mantenimento e vitalità per poter essere utilizzati nei programmi di riproduzione assistita (Critser et al., 1997). Fattori importanti che influenzano il processo di congelamento sono la superficie e il volume (Critser et al., 1997). Poiché gli oociti sono più grandi degli spermatozoi, richiedono un tempo più lungo per arrivare ad un bilancio osmotico con la soluzione di crioprotettori. Durante il raffreddamento, gli oociti possono subire dei danni cellulari quali disorganizzazione del citoscheletro, anomalie dei cromosomi e del DNA, disintegrazione del fuso, disgregazione della membrana plasmatica. Inoltre gli oociti sono circondati da un rivestimento di proteine (zona pellucida) che presenta una permeabilità molto diversa da quella degli spermatozoi che sono circondati solo da una membrana plasmatica (Luvoni, 2006).

Gli oociti di gatto presentano un elevato contenuto di goccioline lipidiche nell'ooplasma pertanto la permeabilità degli oociti alla soluzione di crioprotettori può essere più bassa (Guraya, 1965), rispetto agli oociti di altre specie (Massip, 2003, Van der Elst, 2003). La presenza di goccioline lipidiche intracellulari può essere responsabile della formazione di cristalli di ghiaccio disuguali che possono avere effetti negativi durante il processo di scongelamento (Luvoni, 2006).

I risultati sulla crioconservazione sono contraddittori e dipendono dai diversi stadi di maturazione (Critser et al., 1997). Negli oociti maturi i cromosomi sono condensati e disposti nella delicata metafase II, il fuso non è protetto dalla membrana nucleare pertanto è più sensibile verso i danni indotti dal freddo. Negli oociti immaturi (stadio di vescicola germinale), la cromatina rimane allo stadio di diplotene della profase I e non è presente nessun fuso, perciò, sono più resistenti verso i danni indotti dal freddo. La

riuscita della crioconservazione degli oociti immaturi dipende, in ogni caso, dal mantenimento della capacità di maturazione in vitro dopo essere stati scongelati (Luvoni, 2006).

### 3.1.1 Refrigerazione

Per quanto riguarda la procedura di raffreddamento, secondo Jewgenow et al (Jewgenow et al., 1997) dopo 12 ore a 4°C, non è stata osservata la degradazione del DNA nelle cellule della granulosa. Un altro studio riporta che la conservazione delle ovaie in PBS a 4°C per 48 ore ha permesso di mantenere la morfologia senza promuovere la degenerazione degli oociti (Wood et al., 1997). Wolfe e Wildt (Wolfe e Wildt 1996) hanno osservato che il potenziale di IVM, IVF ed IVC è mantenuto negli oociti di gatto recuperati da follicoli antrali tenuti a 4°C per più di 24 ore. Secondo questi autori, gli oociti dei follicoli preantrali di piccole dimensioni erano molto più sensibili alla refrigerazione prolungata rispetto a quelli dei follicoli preantrali di grosse dimensioni. In uno studio più recente è stato riportato che l'IVM non è influenzata dalla conservazione delle ovaie a 10°C per 16 o 24 h (Katska et al., 2003). Ne consegue che la resistenza delle ovaie alla conservazione può essere di aiuto per il salvataggio di gameti per l'IVM e l'IVF, e può permettere il trasporto per lunghe distanze (Pope, 2000; Katska 63, Wood et al., 1997).

### 3.1.2 Congelamento lento

Con il metodo del congelamento lento, gli oociti/embrioni sono esposti ai crioprotettori a +20 °C, refrigerati fino a -7 °C, quindi viene effettuato il seeding per indurre il congelamento. Poi gli oociti/embrioni continuano ad essere raffreddati a 0,3-0,5 °C/min fino ad arrivare ad una temperatura che va da -30 °C a -35 °C prima di essere immersi direttamente nell'azoto liquido per lo stoccaggio. Dopo lo scongelamento, il

crioprotettore deve essere rimosso per riportare l'osmolarità a livelli fisiologici, questo procedimento viene effettuato lavando l'embrione/oocita con un medium che contiene una concentrazione di crioprotettori sempre più bassa. Questo permette un allontanamento controllato del mezzo di crioconservazione attraverso la membrana (Luvoni, 2006). La presenza di un concomitante mezzo di crioconservazione non permeabile come il saccarosio riduce lo shock osmotico (Critser et al., 1997). Per la produzione in vitro di embrioni è necessario isolare oociti che abbiano completato la maturazione, in quanto gli oociti non completamente sviluppati non sono competenti per raggiungere la maturazione fino alla metafase II. L'abilità nel saper crioconservare gli oociti maturi permetterebbe di realizzare una banca di oociti scongelabili al momento del bisogno. I crioprotettori più appropriati sono il DMSO e il glicole etilenico (E.G.; 1,5 ml) rispetto al glicole propilenico (P.G.) per il congelamento sia degli oociti immaturi che di quelli maturi, e alcuni di tali oociti, dopo scongelamento, sono capaci di riprendere la meiosi in vitro (Luvoni et al., 1997). Raffreddando rapidamente (equilibrando prima a + 5°C e poi immergendo direttamente nell'azoto liquido) gli oociti non vi è una ripresa della meiosi in vitro dopo riscaldamento, nonostante il mantenimento della morfologia degli oociti (Luvoni, 2006). Sono state esaminate le migliori condizioni per raffreddare gli oociti di gatto, e il loro effetto sull'esposizione degli oociti immaturi ai diversi crioprotettori per tempi e temperature diverse (Commizzoli et al., 2004). I risultati dimostrano che dopo esposizione degli oociti al glicole propilenico (P.G.) (1,5 M) a 25°C il 60% circa degli oociti sono capaci di riprendere la meiosi alla metafase II mentre il 20% circa è stato in grado di raggiungere lo stadio di blastocisti dopo maturazione in vitro, fertilizzazione e coltura. In ogni caso l'esposizione degli oociti a 0°C a 0 M o 1,5 M di glicole propilenico (P.G.) o glicole etilenico (E.G.) influenza molto l'integrità del fuso suggerendo che il danno è

causato principalmente dalla bassa temperatura piuttosto che dall'esposizione ai crioprotettori (Luvoni, 2006).

E' stato dimostrato che gli oociti di gatto possono essere fertilizzati dopo crioconservazione, con uno sviluppo in vitro maggiore degli oociti maturi (stadio metafase II) utilizzando una procedura di congelamento lento e controllato e come crioprotettore il glicole etilenico (EG) (Luvoni e Pellizzari, 2000). La frequenza di divisione dopo IVF degli oociti maturi dopo crioconservazione era significativamente più alta rispetto alla percentuale ottenuta con gli oociti sottoposti alla maturazione in vitro dopo lo scongelamento (39% contro il 7%) (Luvoni, 2006). Si è visto che la crioconservazione degli oociti maturi produce risultati più promettenti nella fertilizzazione e poi nello sviluppo embrionale in vitro dopo scongelamento rispetto a quelli immaturi.

### 3.1.3 Vittrificazione

La vittrificazione è una procedura utilizzata per la conservazione sia degli embrioni sia degli oociti di mammiferi. La metodica di vittrificazione è fondamentalmente diversa da quella della refrigerazione o dal congelamento lento (Vajta, 2000). La definizione fisica di vittrificazione è la solidificazione di una soluzione a basse temperature senza la formazione di cristalli di ghiaccio (formazione simile al vetro). Il fenomeno può essere considerato come un aumento estremo della viscosità e richiede sia percentuali rapide di raffreddamento (ad una percentuale di raffreddamento approssimativamente di  $107^{\circ}\text{C/s}$  dove anche l'acqua pura vittrifica; Rall, 1987) sia l'uso di soluzioni di crioprotettori che inibiscono la formazione di cristalli di ghiaccio e che fanno aumentare la viscosità a basse temperature. Nella vittrificazione non sono prodotti cristalli di ghiaccio sia nel raffreddamento che nel riscaldamento, avvenimento che può provocare un danno cellulare. In ogni modo la formazione di ghiaccio intracellulare non è l'unico aspetto

nocivo del processo di raffreddamento, ad esempio anche l'utilizzo di alte concentrazioni di crioprotettori può essere tossico e dare luogo a stress osmotico con conseguente danno cellulare (Critser et al., 1997). Negli ultimi 15 anni sono state pubblicate almeno 20 combinazioni diverse di crioprotettori per la vitrificazione degli oociti/embrioni dei mammiferi. Il numero delle variazioni che riguardano le concentrazioni, il tempo d'incubazione e le altre condizioni sono quasi infinite. L'incremento delle percentuali di raffreddamento può diminuire il danno da raffreddamento, come ad esempio il danno alle goccioline lipidiche intracellulari, ai lipidi contenuti nelle membrane e al citoscheletro, passando rapidamente la fascia pericolosa dai +15° ai -5°C (Dobrinsky, 1996, Martino et al., 1996°; Martino et al., 1996b; Isachenko et al., 1998; Zeron et al., 1999). Inoltre, la vitrificazione non richiede refrigeranti costosi o una speciale abilità e può essere compiuta molto rapidamente (Vajta, 2000). La vitrificazione degli oociti maturi di gatto in 40% (v/v) glicole etilenico EG e 0,3 M di saccarosio ha ottenuto nel complesso importanti risultati (Luvoni, 2006). I risultati hanno mostrato che gli oociti di gatto sono piuttosto sensibili all'effetto tossico del saccarosio, e che durante il periodo d'incubazione, la diluizione del crioprotettore influenza negativamente il seguente sviluppo dopo vitrificazione (Luvoni, 2006). Comunque, anche se i vantaggi della vitrificazione (semplicità, vantaggi economici, velocità nelle procedure) sono largamente riconosciuti, il suo uso è stato ristretto principalmente agli studi sperimentali (Vajta, 2000).

#### 3.1.4 Crioconservazione di oociti intrafollicolari

Altro metodo potenzialmente importante per preservare il materiale genetico è la crioconservazione degli oociti intrafollicolari. E' stato visto che alcuni piccoli follicoli preantrali, presenti in numero molto alto nelle ovaie, sono capaci di sopravvivere alla crioconservazione in dimetil solfossido (DMSO) o glicole propilenico (PG); il 19% dei follicoli di piccole dimensioni sono rimasti strutturalmente intatti, come dimostrato dalla loro integrità di membrana e dalla sintesi di DNA in vitro, e approssimativamente il 10% fisiologicamente attivi dopo essere stati scongelati ( Jewgenow et al., 1998).

### 3.2 Conservazione materiale seminale

Una volta prelevato il materiale seminale con le varie metodiche descritte in precedenza, lo sperma viene centrifugato (Tebet et al., 2006; Axner e Linde-Forsberg, 2002; Zambelli et al., 2002) a 700 G per 6 minuti (Axner e Linde-Forsberg, 2002) o per 8 min (Zambelli et al., 2002) per rimuovere il plasma in eccesso ottenuto mediante l'elettroeiaculazione e concentrare così lo sperma (Zambelli et al., 2002). Il pellet di sperma così ottenuto è addizionato con diluenti che contengono tuorlo d'uovo e crioprotettori in una soluzione tamponata, al fine di aumentare il volume e di proteggere gli spermatozoi durante la fase di congelamento (Luvoni, 2006). Per la conservazione dello sperma sono comunemente utilizzati vari diluitori tamponati ai quali viene aggiunto con il 20% di tuorlo d'uovo e il glicerolo (Luvoni, 2006). Per gli spermatozoi di gatto sono usate concentrazioni di di glicerolo pari al 4-5%, in quanto sembrano essere particolarmente sensibili a concentrazioni più alte (Nelson et al., 1999). Per definire la procedura ideale di crioconservazione è stata considerata la sensibilità dello sperma di gatto, valutata sulla base della perdita di motilità, del danno alla membrana cellulare, al cambio di osmolarità e alle diverse percentuali di raffreddamento (Luvoni,

2006). Il normale range di osmolarità dello sperma di gatto va da 290 mOsm/kg a 320 Osm/kg; pertanto per essere ottimali i diluenti dovrebbero essere isotonici (Luvoni, 2006). Si è dimostrato che il danno causato dalle soluzioni ipotoniche, quali rigonfiamento e rottura della membrana degli spermatozoi di gatto è più dannosa rispetto ai danni causati da soluzioni ipertoniche (Pukazhenty et al., 2002). Inoltre, ai cambi di osmolarità sono molto sensibili sia la motilità sia l'integrità della membrana dello sperma, ma la rimozione di crioprotettori a passaggi multipli con soluzioni isotoniche minimizza la perdita di motilità e la disgregazione membranosa (Pukazhenty et al., 2002). Le varie procedure per la crioconservazione degli spermatozoi dei mammiferi generalmente includono gradualmente i raffreddamenti dei campioni a +5°C, equilibramento a +5°C per 20 min circa, il seme viene poi confezionato in paillettes le quali vengono esposte ai vapori di azoto liquido per 10-30 min prima dell'immersione definitiva nell'azoto liquido (Luvoni, 2006). La successiva procedura di scongelamento consiste in un riscaldamento rapido in acqua calda a +35°C, oppure mediante un riscaldamento più veloce (Luvoni, 2006). Una procedura simile è esposta da Tebet et al. (Tebet et al., 2006) dove il materiale seminale è caricato in pilette (0,25 ml) a temperatura ambiente, messo a refrigerare a 5°C per 60 minuti (percentuale di raffreddamento < 0,5°C/min) poi esposto ai vapori di azoto (6 cm dalla superficie libera dell'azoto liquido) per 20 min, in seguito è immerso definitivamente nell'azoto. I campioni sono stati scongelati a 42°C per 15 s e valutati (Tebet et al., 2006). Un metodo di congelamento lento è stato proposto da Zambelli et al (Zambelli et al., 2002) e consiste come primo passaggio nella rimozione del plasma seminale mediante centrifugazione ed eliminazione del ; il pellet di materiale seminale così ottenuto è risospeso nel diluente per il congelamento in due passaggi successivi (Zambelli et al., 2008). Lo sperma è prima diluito 1:1 con un diluente a base di tris-glucosio-citrato contenente il 20% di tuorlo d'uovo (Rota et al., 1997), dopo 15 minuti dalla prima

diluizione si effettua una seconda diluizione (sempre 1:1) con il medesimo diluente supplementato con l'8% di glicerolo e l'1% di Equex STM per ottenere una concentrazione finale di 50 milioni di spermatozoi/ml (Zambelli et al., 2008). Ogni diluizione è eseguita a temperatura ambiente (approssimativamente a 20°C). I campioni di spermatozoi sono poi caricati in paillette (0,25 ml) a temperatura ambiente e in seguito refrigerati a 5°C (percentuale di raffreddamento: 0,2°C/s) (Zambelli et al., 2008). Trascorso un periodo di stabilizzazione di 25 min, le paillette vengono caricate in un cilindro di acciaio inossidabile, 14x 4 cm, precedentemente refrigerato e portato alla temperatura di 5°C. Le paillette contenute nel cilindro vengono quindi congelate sui vapori di azoto liquido, in un contenitore di azoto liquido (Dewar flask) a distanze diverse dai vapori di azoto liquido per realizzare percentuali di temperatura sempre più basse ed infine, quando si raggiunge una temperatura di -40°C, il cilindro è immerso nell'azoto liquido, (Zambelli et al., 2002). Le percentuali di raffreddamento sono state controllate impiegando un termometro digitale la cui sonda era inserita in uno dei fori del cilindro. Le paillette stoccate in azoto liquido sono scongelate a bagno maria a 37°C x 30 s. (Zambelli et al., 2002; Zambelli et al., 2008).

Pukazhenty et al (Pukazhenty et al., 2002) hanno riportato che il congelamento rapido (14°C/min) da 25°C a 0°C è più dannoso per l'integrità morfologica degli spermatozoi di gatto rispetto al congelamento lento (0,5°C/min). Quello che accade è un danno notevole alla membrana acrosomiale senza però un concomitante calo della motilità, dimostrando così che la motilità ha una buona capacità di ripresa, mentre l'integrità dell'acrosoma è molto sensibile allo shock da freddo (Luvoni, 2006). E' stato riportato che un'appropriata percentuale di congelamento per gli spermatozoi di gatto è di -10°C/min, portando gli spermatozoi da una temperatura di +5°C a -80°C prima dell'immersione in azoto liquido (Pope et al., 1991); in ogni caso recentemente è stato dimostrato che una lenta percentuale di congelamento di 3,85°C/min da +5°C a -40°C

prima dell'immersione in azoto liquido determina una più alta motilità e una migliore morfologia rispetto a quelle ottenute utilizzando percentuali di congelamento più rapide ( da 9°C/min a 43°C/min (Zambelli et al., 2002).

## **CAPITOLO 4**

### **PRODUZIONE DI EMBRIONI IN VITRO**

La produzione in vitro degli embrioni (IVP) include le tecniche di recupero degli oociti, la maturazione (IVM), la fecondazione (IVF) e la loro coltura (IVC). Di recente, nella tecnologia dell'IVP è stato introdotto anche il trasferimento nucleare (NT) (Franzosi et al., 2003). Nell'ultima decade è stato fatto un considerevole progresso nella produzione in vitro di embrioni nel gatto e secondo molti autori (Pope, 2000; Howard e Wildt, 1990, Gomez et al., 2003) importanti successi sono stati ottenuti, quando queste tecnologie sono state applicate nei felidi selvatici (Franzosi et al., 2003). Per ottenere embrioni in vitro si possono utilizzare oociti/spermatozoi freschi oppure sottoposti alle varie procedure di crioconservazione e successivo scongelamento.

#### 4.1 Selezione degli oociti e IVM

Gli oociti ovulati di gatto sono nella metafase II della meiosi e sono d'aspetto molto scuro a causa di un'alta concentrazione intracellulare di lipidi (Guraya, 1965). Inoltre la zona pellucida degli oociti di gatto è bistratificata e il suo strato interno sembra funzionare come una parziale barriera alla penetrazione dello sperma influenzando il numero e la qualità dello sperma che entra nell'oocita (Andrews et al., 1992). La presenza di cellule del cumulo espanse è associata alla maturità nucleare dell'oocita, ma in realtà il 20-25% degli oociti preovulatori aspirati dalle ovaie di gatte pretrattate con gonadotropine sono immaturi (Byers et al., 1994; Gelwicks et al., 1990; Gjorret et al., 2000; Pope et al., 1993). Gli oociti prelevati devono essere sottoposti ad una selezione morfologica prima della loro maturazione. Le caratteristiche considerate per questa selezione, che servono per ottenere oociti con maggiori probabilità di maturazione, sono le seguenti: forma sferica, contorni perfettamente visibili delle cellule della granulosa, colore del citoplasma uniformemente scuro, e zona pellucida intatta (senza difetti o rotture) circondata dalla corona radiata e da uno spesso strato (5 o più strati) di cellule compatte (Luvoni, 2000; Wood e Wildt, 1997; Katska et al., 2003; Pope et al., 1997). Secondo Wood e Wildt (Wood e Wildt, 1997) vi sono quattro classi distinte di complesso cumulo-oocita (COC) (I= eccellente; II= buono; III= discreto; IV= scadente) e sono stabilite in base all'aspetto del citoplasma e in base alla presenza delle cellule del cumulo. Questo schema di classificazione si basa principalmente sulle recenti osservazioni istologiche dove l'atresia citoplasmatica dell'oocita è associata a: (1) aggregazione di piccole goccioline lipidiche che forma grandi vacuoli accumulati in posizione centrale; (2) frammentazione citoplasmatica di solito descritta come un modello a mosaico traslucido (Wood et al., 1997). Queste condizioni sono facilmente individuabili dal punto di vista macroscopico (x 40) negli oociti di gatto. Generalmente,

le classi I o II degli oociti sono molto opache, con un evidente citoplasma uniforme e vescicole germinali rotonde. La presenza di grandi aggregazioni costituite da goccioline lipidiche è stata associata ad un mosaico trasparente tipico dei COC della classe III. L'avanzata frammentazione del citoplasma è associata ad un'atresia progressiva degenerativa utilizzata per classificare la IV classe del COC, in altre parole la più bassa. Nel processo di classificazione vengono considerate anche le del cumulo. La classe I del COC ha più strati di cellule del cumulo (cinque o più) rispetto alla classe II dell'oocita (2-4 strati). La classe III del COC è caratterizzata dalla presenza della corona radiata ma da strati parziali delle cellule del cumulo ooforo. La dissociazione parziale o quasi totale delle cellule del cumulo e del citoplasma dell'oocita caratterizzano la classe IV e di solito appare come un'aggregazione non compatta della corona radiata e uno strato rado del cumulo ooforo. In ogni modo, anche oociti parzialmente o completamente denudati vengono inclusi nella classificazione di classe IV. (Wood e Wildt, 1997)

L'importante ruolo delle cellule del cumulo durante la maturazione è stato confermato negli oociti di gatto da diversi autori (Pope et al., 1997; Wood e Wildt, 1997) e si è vista una percentuale più alta di maturazione e fertilizzazione in vitro utilizzando oociti con cellule del cumulo intatte (Luvoni, 2000). Per avere uno sviluppo embrionale gioca un ruolo fondamentale l'ambiente in cui si viene a trovare il complesso COC durante la maturazione meiotica da stadio di vescicola germinale (profase I) all'estrusione del primo corpo polare (metafase II). Questo fenomeno è dimostrato dalla riduzione nella frequenza di divisione e sviluppo della blastocisti negli embrioni di gatto prodotti da oociti maturati in vitro, rispetto a quelli maturati in vivo recuperati da follicoli preovulatori (Gomez et al., 2000). Gli oociti maturati in vitro presentano una diversa competenza di sviluppo, attribuita ad una mancanza di maturazione citoplasmatica (Pope et al., 2006). Bogliolo et al. (Bogliolo et al., 2004) hanno dimostrato che l'attività del fattore promuovente la maturazione (MPF) e della protein-chinasi attivante la meiosi

(MAPK) è più bassa dopo la maturazione in vitro rispetto alla maturazione in vivo degli oociti di gatto (Pope et al., 2006). Questi due fattori, MPF e MAPK, sono implicati nel processo di maturazione degli oociti, ed il loro livello d'attività controlla la progressione meiotica dalla vescicola germinale all'arresto della metafase II (Pope et al., 2006). Dopo IVM ed IVF, gli oociti che sono stati classificati come eccellenti hanno raggiunto il 37,4% di divisione, il 30,9% di morule, 24,4% di blastocisti, 17,1% di blastocisti espanse e il 6,5% di blastocisti sgusciate. Al contrario, gli oociti classificati di qualità bassa hanno raggiunto lo 0,8 di divisione e lo 0,3% di morule, senza giungere a stadi più avanzati (Wood e Wildt, 1997). Secondo Spindler et al. (Spindler et al., 2006) la selezione in base alla morfologia è un metodo inadeguato, anche se continua ad essere il metodo più comunemente usato per l'IVM. Questi autori affermano che metabolismo e maturazione degli oociti sono intrinsecamente correlati (Spindler et al., 2006). Pertanto il metabolismo può essere un parametro più preciso da usare per misurare la qualità e lo stadio di maturazione degli oociti di gatto (Freistedt et al., 2001a).

Per eseguire la maturazione in vitro, dopo aver selezionato gli oociti, vi sono varie metodiche utilizzate dai vari autori, che differiscono fondamentalmente nella scelta del medium di maturazione.

In un primo studio sull'IVM/IVF di gatto (Johnston et al., 1989) la frequenza degli oociti che ha raggiunto la metafase II è stata alta (oltre il 60%) se coltivati per 48 ore in un medium minimo essenziale di coltura (MEM) + FSH/LH + 3 mg/ml d'albumina sierica bovina (BSA) + 1 siero bovino fetale (FBS). A 24, 30 e 40 ore le percentuali di oociti che avevano raggiunto la metafase II erano, rispettivamente, del 10, 40 e 50% (Franzosi et al., 2003).

Secondo Luvoni et al. aggiungendo al medium di coltura la cisteina (Luvoni et al., 1995) non è influenzata la percentuale di maturazione e degenerazione degli oociti, valutata in base alla morfologia (Franzosi et al., 2003). In ogni caso anche se

quest'aggiunta non riguarda la morfologia, in altri studi si è visto che la cisteina, come antiossidante, può migliorare il metabolismo dell'oocita (Luvoni et al., 2001), portando le percentuali di maturazione fino al 70% (Luvoni, 2000).

In studi seguenti, si è visto che aggiungendo le gonadotropine al medium di coltura, queste avevano un effetto positivo, ma il siero bovino (Johnston et al., 1993; Wood et al., 1995) e il siero estrale felino (Goodrowe et al., 1991) avevano un effetto negativo sulla maturazione rispetto all'albumina sierica bovina (BSA) (Luvoni, 2000).

Hoffert et al. nel medium essenziale di coltura unirono sali di Hank e 25 mM di HEPES tamponato, con l'aggiunta di 2,0 mM di L-glutamina, 0,4% d'albumina sierica bovina (BSA), 100 IU/ml di penicillina, 0,1 mg/ml di streptomina e 0,2 mg/ml di neomicina (Hoffert et al., 1997).

Altra sostanza che dà beneficio per completare la maturazione in vitro degli oociti è l'aggiunta al medium di coltura del fattore di crescita epidermico (EGF) e del fattore di crescita insulino-simile (IGF-I); questi sono stati studiati molto negli altri animali ed esiste ancora poca letteratura sui gatti (Pope et al., 2006). Merlo et al. Hanno valutato gli effetti delle varie concentrazioni di EGF (0, 10, 25 o 50 ng/ml) durante l'IVM sulla competenza dello sviluppo in vitro degli oociti. La percentuale di divisione e quella di sviluppo fino allo stadio di blastocisti sono state maggiori ( $P < 0,01$ ) nei gruppi addizionati con 25 ng/ml e 50 ng/ml d'EGF rispetto al gruppo di controllo (0 ng/ml) e conclusero che aggiungendo l'EGF al medium di maturazione quest'ultimo migliora la maturazione citoplasmatica (Merlo et al., 2005).

L'unico studio che esamina l'effetto dell'aggiunta del fattore di crescita insulino-simile (IGF-I) al medium di maturazione è di Kitiyanant et al. (Kitiyanant et al., 2003). In tale studio è stata valutata la percentuale di oociti di buona qualità in grado di completare la maturazione nucleare a telofase I e metafase II ed è stato osservato che la percentuale di maturazione era maggiore con l'aggiunta di 100 ng/ml d'IGF-I (70-86% versus 52-

66%). L'effetto benefico dell'IGF-I non è stato evidente negli oociti di bassa qualità con presenza parziale o nulla degli strati delle cellule del cumulo. Gli oociti di buona qualità maturati con IGF-I sono stati poi usati con successo per esperimenti di trasferimento nucleare e da questi è stato possibile ottenere il 3-8% di blastocisti (Kitiyanant et al., 2003).

La maturazione degli oociti felini avviene solitamente a 38-38,5°C in incubatori umidificati in aria al 5% di CO<sub>2</sub> (Hoffert et al., 1997; Ciani et al., 2008; Gomez et al., 2003; Yin et al., 2005; Gomez et al., 2004).

Vi sono differenze nella capacità di maturazione in vitro degli oociti e nella divisione embrionale a diverse età, fatto che suggerisce una variazione stagionale (Spindler e Wildt, 1999). D'altra parte il ciclo riproduttivo del donatore non sembra interferire con la percentuale di maturazione (Karja et al., 2002). Rispettando questo, negli altri studi le modifiche di parti del medium di coltura, principalmente zuccheri, amminoacidi e gonadotropine, o lo status riproduttivo delle donatrici d'oociti, non hanno alterato la percentuale di maturazione, ma hanno invece influenzato quella di fertilizzazione e di sviluppo embrionale (Pope, 2000; Karja et al., 2002; Muratami et al., 2002; Herrick e Swanson, 2003; Gomez et al., 2000).

#### 4.1.1 Effetti della stagionalità sulla produzione di embrioni in vitro

La produzione di embrioni prodotti in vitro di gatto con uno sviluppo competente dipende dal successo nel coordinare i vari eventi in condizioni attentamente controllate. In alcuni studi recenti, è difficile compensare completamente gli effetti potenzialmente dannosi sullo sviluppo, osservati dopo il recupero degli oociti dalle ovaie ai vari stadi del ciclo riproduttivo, soprattutto durante la stagione non-riproduttiva. Dieci anni dopo il primo studio sull'IVM/IVF nei gatti (Johnstone et al., 1989) e molte pubblicazioni (Johnstone et al., 1993; Spindler e Wildt, 1999), uno studio ha riportato un notevole cambiamento della qualità e della competenza di sviluppo in vitro degli oociti di gatto secondo la stagione (Spindler e Wildt, 1999). Le ovaie quiescenti ottenute durante la stagione non-riproduttiva produssero oociti di qualità peggiore. Il loro potenziale sviluppo in vitro era notevolmente ridotto se comparato agli oociti recuperati durante la stagione riproduttiva. In particolare, gli oociti recuperati da settembre ad ottobre, avevano basse percentuali di divisione e dopo l'IVF e non si sono sviluppati oltre lo stadio di 4-cellule, come invece è accaduto per quelli raccolti da settembre a novembre. Questa differenza stagionale nella capacità di sviluppo in vitro degli oociti di gatto non è stata confermata da altri laboratori, anche se altri autori hanno descritto un minore effetto stagionale (Freistedt et al., 2001a).

In uno studio recente (Comizzoli et al., 2003), aumentando i livelli di FSH durante l'IVM a  $\geq 10$  mg/ml la percentuale di maturazione meiotica e la fertilizzazione degli oociti recuperati durante la stagione non-riproduttiva è stata notevolmente migliorata rispetto ad un valore di  $\leq 5$  mg/ml di FSH. Anche se l'aggiunta degli antiossidanti, acido ascorbico o cisteina, al medium di IVM non ha migliorato l'incidenza della fertilizzazione, la loro presenza ha migliorato però lo sviluppo in vitro allo stadio di blastocisti (Comizzoli et al., 2003), come aveva riportato in precedenza Pope et al. per

la cisteina (Pope et al., 1999). L'aggiunta al medium di IVM dei due antiossidanti è considerato un buon metodo per migliorare lo sviluppo in vitro ottenuto durante la stagione non-riproduttiva (Comizzoli et al., 2003).

#### **4.2 Fertilizzazione in vitro**

Le condizioni colturali per lo sviluppo in vitro degli embrioni di gatto non sono ancora completamente definite, ma i risultati sono incoraggianti, anche se sono minori rispetto a quelli ottenuti in altre specie come ad es. i bovini (Luvoni, 2000). Di recente, i miglioramenti apportati alle metodiche in vitro, incluso l'adattamento dei protocolli usati nelle altre specie, sta generando costanti miglioramenti nella produzione di embrioni in vitro di gatto (Freistedt et al., 2001b; Pope, 2004). Molta preoccupazione si è mostrata per un blocco in vitro dello sviluppo che avviene in un'alta percentuale di embrioni di gatto nella fase di transizione da morula a blastocisti (Roth et al., 1994), questa situazione è resistente alle modifiche nell'ambiente di coltura (Johnston et al., 1991; Swanson et al., 1996). Questo blocco è piuttosto tardivo rispetto ad altri mammiferi (Donoghue et al., 1990; Johnston et al., 1991; Roth et al., 1994; Swanson et al., 1996; Hoffert et al., 1997). Si è evidenziata una differenza nel metabolismo (glicolisi) tra gli oociti maturati in vivo e in vitro nel gatto, che può parzialmente spiegare perché gli oociti maturati in vitro possono avere difficoltà nello sviluppo dopo l'IVF se comparati a quelli maturati in vivo (Spindler e Wildt 1999).

Nella fertilizzazione in vitro gli spermatozoi ( $\sim 1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) sono incubati con gli oociti in un incubatore al 5% di  $\text{CO}_2$  in aria a 38 °C in diversi terreni per la fertilizzazione tra cui, ad esempio, la soluzione di Tyrode che contiene 6 mg/ml di BSA, 15 mM di  $\text{NaHCO}_3$ , 0.36 mM di piruvato, 2.2 mM calcio lattato, 1.0 mM di glutamina e 50  $\mu\text{g/ml}$  di gentamicina (medium di IVF [Pope, 2004]). Dopo 5–6 ore d'inseminazione o

16-18 ore, a seconda dei terreni impiegati, gli oociti vengono lavati e coltivati in vitro in terreni appositi per lo sviluppo embrionale.

#### 4.2.1 Tecniche di fertilizzazione assistita: iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI)

Una tecnica di fertilizzazione assistita utilizzata anche nel gatto è quella di fertilizzazione micro-assistita (ICSI), questa tecnica è stata impiegata in due studi sugli oociti del gatto viverrino in quanto lo sperma raccolto dal maschio non era di qualità appropriata per poter essere utilizzato con la fertilizzazione in vitro tradizionale. La microiniezione viene eseguita utilizzando un micromanipolatore e le pipette per l'ICSI sono costituite da un capillari di vetro. La microiniezione viene compiuta a 38 °C su una piastra riscaldata al microscopio invertito. Per l'ICSI viene selezionato uno spermatozoo motile e immobilizzato mediante sfregamento della coda prima dell'aspirazione nella pipetta da iniezione. Usando la pipetta holding, gli oociti nella metafase II sono mantenuti fermi mediante pressione negativa con il globulo polare in posizione ad ore 6 o 12. La pipetta da iniezione è spinta attraverso la zona pellucida nel citoplasma dell'ocita ad ore 3. Dopo che una piccola quantità di citoplasma è stata aspirata nella pipetta da iniezione, per assicurare la rottura del plasmalemma, lo spermatozoo immobilizzato è depositato nell'ocita. Dopo l'iniezione, gli oociti vengono coltivati (Pope et al., 2006).

#### 4.2.2 Trasferimento Nucleare (NT) o clonazione

Per la produzione degli embrioni in vitro è stata introdotta anche una nuova tecnica che è il trasferimento nucleare (NT) o clonazione. Cinque anni fa è stato ottenuto il primo clone di gatto mediante NT (Shin et al., 2002). Altri studi (Fahrudin et al., 2001; Skrzyszowska et al., 2002; Kitianant et al., 2003) hanno dimostrato lo sviluppo di embrioni mediante NT da oociti maturati in vitro. Nonostante ciò sono ancora limitati gli studi sul NT nel gatto per poter ottenere delle conclusioni adeguate. In ogni caso, il primo clone di gatto ha accresciuto l'aspettativa per quanto riguarda la possibilità di conservazione dei felini selvatici. Nonostante le sue limitazioni, la clonazione può essere particolarmente utile in termini di variabilità genetica; questo è un metodo nuovo per la conservazione di specie in via d'estinzione. Lo sviluppo del NT potrebbe permettere di utilizzare nuclei somatici di altri felini e inserirli negli oociti di gatto, e questi embrioni ricostituiti potrebbero essere trasferiti poi in riceventi per portare a termine la gravidanza (Kitianant et al., 2003). Oociti di gatto che hanno ricevuto nuclei di cellule somatiche di tigri (*Panthera tigris altaica*) hanno sviluppato morule e blastocisti in vitro (Hwang et al., 2001). È opportuno ricordare che le nascite tra specie diverse sono già state ottenute nei felini (Pope et al., 1993, Pope et al., 2000).

#### 4.3 Coltura in vitro

Dopo aver fertilizzato in vitro gli oociti si procede alla loro coltura. Le indicazioni che riguardano le metodologie e i medium di coltura per l'IVC sono controverse (Franzosi et al., 2003). La percentuale di sviluppo degli embrioni in vitro dopo l'uso di FSH o eCG era più alto in TCM 199 che nel medium HAM F10 (Takaya, 1989). Secondo l'autore citato, l'aggiunta al medium di siero bovino o di gatto non altera lo sviluppo dell'embrione. Lo sviluppo in vitro con Earle modificato completato con il 10% di siero

umano era più alto che in questo stesso medium completato con BSA o TCM 199 + SFB (Kanda et al., 1998).

La limitazione dell'IVC è riferita com'è noto al blocco in vitro dello sviluppo embrionale. E' noto che la cronologia embriologica è simile sia in vitro sia in vivo fino allo stadio di morula (Roth et al., 1994). Si è osservato che anche quando sono ottenute percentuali alte di fertilizzazione, si assiste ad un rallentamento e/o un blocco dello sviluppo dell'embrione in vitro ( Luvoni et al., 2000; Pope, 2000; Goodrowe et al., 1988a; Pope et al., 1993; Wood e Wildt, 1997; Pope et al., 1997; Roth et al., 1994; Hoffert et al., 1997) con una media solo del 20%-30% di blastocisti originate da IVM/IVF, nonostante vi sono studi in cui si sono osservati buoni risultati (Luvoni, 2000; Pope et al., 1999; Pope et al., 1998). Generalmente gli embrioni prodotti in vivo mostrano uno sviluppo migliore in vitro rispetto agli embrioni prodotti interamente in vitro. Recenti studi (Karja et al., 2002; Murakami et al., 2002; Kanda et al., 1998; Pope et al., 1998; Spindler e Wildt, 2002) hanno ottenuto risultati più incoraggianti, anche se non completamente soddisfacenti.

In alcuni studi, la percentuale di embrioni che ha raggiunto lo stadio di blastocisti, variano dal 40% a > 60% (Freistedt et al., 2001b; Karja et al., 2002; Gomez et al., 2003). Questi risultati sono stati ottenuti da embrioni di gatto messi in coltura con tre medium diversi: SOF (synthetic oviductal fluid) con amminoacidi e siero bovino (Freistedt et al., 2001b), mEBSS (modified Earle's balanced salt solution) con l'aggiunta di amminoacidi e siero bovino fetale (FBS) ([Karja et al., 2002]) ed un sistema a due passaggi che usa soluzione di Tyrode con amminoacidi e albumina sierica bovina (BSA; fino al giorno-2) o FBS (dal giorno-2 al giorno-7) (Gomez et al., 2003). I tre medium sono diversi, ma presentano molte somiglianze, inclusa la presenza di amminoacidi essenziali, non essenziali e siero, o in tutta la coltura (Freistedt et al., 2001b, Karja et al., 2002) o durante l'ultima fase (Gomez et al., 2000). Poiché si

conoscono le proprietà embriotropiche del siero, questo viene da molti usato nei terreni di coltura embrionale. Vi sono però degli svantaggi nell'impiego del siero, tra cui gli effetti inibitori durante la prima divisione, l'alterazione della cinetica di sviluppo, e l'alterata crescita fetale. Kanda et al. (Kanda et al., 1998) ha ottenuto più del 95% di oociti fertilizzati usando un medium con il 10% di siero umano.

Inizialmente per la coltura degli embrioni di gatto veniva utilizzato un sistema ad un singolo passaggio impiegando la soluzione di Tyrode contenente il 10% di FBS subito dopo la fertilizzazione fino al 7 giorno. In studi successivi, è stato impiegato un sistema a due passaggi: a 18-19 ore post-inseminazione, gli oociti vengono coltivati in soluzione di Tyrode con l'1% di aminoacidi non essenziali e lo 0,3% di BSA fino giorno 2 (IVC-1), poi dal giorno 2 o 3 in soluzione IVC-1 con il 2% di aminoacidi essenziali e 10% di FBS invece della BSA (IVC-2) (Gomez et al., 2003). Recentemente il sistema a due passaggi è stato modificato con l'aggiunta di un ulteriore fase: coltura in IVC-1 fino al giorno 2, poi coltura in IVC-1 con l'1% di aminoacidi essenziali fino al giorno 5 (IVC-1A) seguita da coltura in IVC-2 (Pope et al., 2006). In una comparazione diretta dei sistemi a due e tre passaggi per la coltura in vitro degli embrioni di gatto a partire da oociti maturati in vitro, la percentuale di blastocisti è stata più alta ( $P < 0.05$ ) nel sistema a tre passaggi (101/219, 46%) rispetto a quello in due passaggi II (85/241, 35%) ( $P < 0.05$ ) ed il numero medio di cellule per blastocisti era rispettivamente, 157 ( $\pm 12$ ) contro 145 ( $\pm 10$ ) ( $P > 0.05$ ) (Pope et al., 2006).

## CAPITOLO 5

### CRIOCONSERVAZIONE EMBRIONI

Ottimizzare le tecniche per la conservazione in vitro del materiale genetico nei felini è necessario per migliorare le tecniche di mantenimento a lungo termine sia dei gameti sia degli embrioni (Luvoni, 2000). Per rispettare questo, gli embrioni devono essere di buona qualità devono essere prodotti da oociti di buona qualità (Franzosi et al., 2003). Nonostante l'importanza della crioconservazione degli embrioni prodotti in vitro per conservare il materiale genetico, la vitalità degli embrioni congelati è più bassa rispetto a quelli prodotti in vivo oppure originati da oociti maturati in vivo (Gomez et al., 2003). Per la crioconservazione degli embrioni vi sono due procedure, una è il congelamento lento e l'altra è la vitrificazione.

#### **5.1 Congelamento lento**

Il primo successo di crioconservazione di embrioni prodotti in vitro è stato ottenuto quando gli embrioni allo stato di due o quattro cellule sono stati congelati mediante congelamento lento fino a  $-30^{\circ}\text{C}$  in 1.4 M di propandiolo e 0.125 M di saccarosio (Pope et al., 1994)

Gomez et al (Gomez et al., 2003) per la procedura di congelamento hanno utilizzato una soluzione costituita da glicole propilenico 1.4 M (PG), saccarosio 0.125 M (S), 10% destrano 70 e 10% FBS in Hapes-Tyrode (CPS). Il giorno 2 di IVC (4 – 8 cellule), giorno 4 (morule precoci) e giorno 5 (morule) gli embrioni sono stati esposti a CPS a  $22^{\circ}\text{C}$  per 10-15 minuti in vari passaggi per equilibrarli. Durante questi 10–15 min di equilibramento in CPS, gli embrioni sono stati caricati in paillette da 0.25 ml e dopo

averle sigillate alle estremità, le paillette sono state congelate in un congelatore programmabile. Gli embrioni sono stati raffreddati da 20°C fino a -6.0 °C ad una velocità di 2.0°C/min. Durante una pausa di 10 min a -6.0 °C per ogni paillette è stato effettuato il seeding. Il congelamento è stato poi ripreso fino a -30 °C con una velocità di 0,3°C/min e dopo 10 min a -30°C gli embrioni sono stati immersi in azoto liquido per la conservazione (Gomez et al., 2003).

In studio di altro studio (Pope et al., 1997), la maggior parte degli embrioni prodotti in vitro (~80%) e crioconservati allo stadio di due-cellule o di morula mantennero lo sviluppo in vitro, anche se la percentuale di blastocisti è risultata inferiore (15%) rispetto quelli non-congelati (30%). È stato osservato un migliore sviluppo in vitro degli embrioni da due a otto cellule congelati in glicole etilenico rispetto a quelli congelati in propandiolo o glicerolo (Swanson et al., 1999).

## **5.2 Vittrificazione**

La vittrificazione è la solidificazione di una soluzione (formazione simile al vetro) a basse temperature senza la formazione di cristalli di ghiaccio. E' un aumento estremo della viscosità e per questo occorrono velocità molto rapide di raffreddamento (Rall, 1987), pertanto occorrono crioprotettori che inibiscono la formazione di cristalli di ghiaccio e fanno aumentare la viscosità a basse temperature. Alte velocità di raffreddamento nelle comuni procedure di vittrificazione sono state raggiunte immergendo una paillette da 0.25 ml direttamente in azoto liquido, approssimativamente a 2500°C/min (Palasz e Mapletoft, 1996). Dall'altro lato, però queste velocità di raffreddamento e scongelamento non possono essere utilizzate, per evitare la frattura della zona pellucida degli embrioni nelle paillette (Rall e Meyer, 1989; Kasai, 1997; al di et di Kasai., 1996). Per poter impiegare tali percentuali di discesa della temperatura, è richiesto l'uso di altre concentrazioni di crioprotettori (circa 5-7 M),

che sono molto più alte rispetto quelle necessarie per il congelamento tradizionale (circa 1 -2 M) (Rall, 1987; Massip., 1989).

La tecnica della vitrificazione consente di eliminare totalmente la formazione di cristalli di ghiaccio. La vitrificazione non richiede refrigeranti costosi o una speciale abilità nel compiere la procedura. Vi è ancora un numero limitato di lavori riguardanti la vitrificazione degli embrioni di gatto. Recentemente, è stato riportato che il 61% delle blastocisti di gatto al giorno 7 di coltura sono sopravvissute al congelamento e allo scongelamento (Karja et al 2006). Ma solo in uno studio è stata eseguita la vitrificazione di blastocisti feline impiegando le cryotop (Tsuijoka et al, 2008). L'apparecchiatura per la vitrificazione mediante Cryotop è stata sviluppata originalmente per la vitrificazione di oociti ed embrioni umani (Kuwayama e Kato 2000) e più tardi è stata utilizzata sugli oociti/embrioni di diverse specie animali (Tsuijoka et al, 2008).

La procedura di vitrificazione è stata compiuta seguendo la procedura riportata da Hochi et al (2004). Le blastocisti al giorno 6 o 7 sono state prima messe in una soluzione contenente il 7.5% di glicole etilenico, il 7.5% di DMSO e il 20% di FCS in TCM-199 per 3 min a temperatura ambiente , e poi trasferiti in una soluzione di vitrificazione contenente il 15% di EG, il 15% di DMSO, 0.5 M di saccarosio e il 20% di FCS in TCM-199 per 1 min a temperatura ambiente. In questo arco di tempo (1 minuto), 5 blastocisti sono state messe sulla superficie di ogni Cryotop in un piccolo volume di soluzione da vitrificazione (< 1 µl) e poi la Cryotop è stata immersa in azoto liquido. Con tale protocollo è stato possibile per la prima volta conservare blastocisti di gatto.

La maggior parte delle pubblicazioni che comparano il congelamento tradizionale e la vitrificazione degli embrioni trasferibili, riportano percentuali di sopravvivenza in vitro o in vivo uguali o migliorati dopo vitrificazione (Vajta, 2000).

## CAPITOLO 6

### TRASFERIMENTO EMBRIONALE

La procedura dell'embryo transfer è considerata il passaggio finale della fecondazione in vitro (Abou-Setta, 2006). La percentuale di gravidanza dopo il trasferimento embrionale dipende da molti fattori: la qualità embrionale, la recettività endometriale e la tecnica di trasferimento embrionale (Mansour e Aboulghar, 2002).

Si ritiene che i trasferimenti che avvengono facilmente hanno una migliore capacità di riuscita se comparati a quelli effettuati con maggior difficoltà (Mansour et al., 1990). Inoltre, il fallimento dell'impianto può essere attribuito a tecniche non ottimali di trasferimento embrionale (Urman et al., 2005a; Urman et al., 2005b). Gli embrioni trasferiti sono utilizzati sia freschi che crioconservati. Esistono varie tecniche di trasferimento embrionale, ma si differenziano sostanzialmente in due gruppi: tecniche chirurgiche e tecniche non chirurgiche. Al gruppo delle tecniche chirurgiche, cioè quelle meno invasive, appartiene il trasferimento embrionale mediante cateterismo transcervicale.

#### **5.1 Raccolta degli embrioni e sincronizzazione**

Il primo passo per l'embryo transfer è quello di sincronizzare donatrice e ricevente per poi compiere il trasferimento degli embrioni. Vi sono varie procedure che i diversi autori applicano al fine di raggiungere l'ottenimento della gravidanza e la nascita di gattini vitali. Fin dalla nascita del primo gattino ottenuto da embrioni prodotti in vitro

(Goodrowe et al., 1988a), altri laboratori hanno ottenuto nascite e/o gravidanze di gatti dopo IVP/ET (Pope et al., 1993; Gomez et al., 2003; Kanda et al., 1998; Tsutsui et al., 1989; Orosz et al., 1992; Swanson et al., 1998). Nella maggior parte di questi studi, gli embrioni trasferiti erano embrioni freschi derivati dall'IVP che originavano da oociti maturati in vivo. In ogni caso, i gattini furono ottenuti anche dopo l'ET di embrioni da IVP dopo IVM/IVF (Gomez et al., 2003; Pope et al., 1997), incluso NT (Shin et al., 2002). Quando è applicato l'embrio transfer, le femmine donatrici e le riceventi possono essere in estro naturale oppure indotto. Recuperare gli oociti dopo l'uso di gonadotropine in donatrici e riceventi è importanti (Pope, 2000) per migliorare la sincronia dell'intervallo di tempo tra l'aspirazione degli oociti e il trasferimento degli embrioni. Questa sincronia tra l'endometrio e l'embrione è essenziale per il mantenimento della gravidanza e la nascita, soprattutto negli animali da reddito e nell'uomo (Barne, 2000). Così vengono evitate molte complicazioni, come il fallimento dell'impianto dell'embrione, la mortalità embrionale e un alterato sviluppo (rapido o lento). Le gonadotropine possono poi produrre degli altri effetti negativi, infatti, gli oociti presi da donatori trattate con 100 IU di hCG presentano una percentuale di degenerazione più bassa e una più alta percentuale di IVM e IVF rispetto agli oociti prelevati da gatte trattate con 200 IU (Goodrowe et al., 1988a). Così, com'è stato osservato nelle altre specie, gli oociti e gli embrioni possono essere influenzati negativamente da anomalie indotte dalle gonadotropine (Pope, 2000, Goodrowe et al., 1988a). Inoltre, le gonadotropine provocano una formazione supplementare di corpi lutei e follicoli subordinati che possono provocare una modificazione dell'ambiente uterino, cambiando la contrazione ritmica dell'utero e degli ovidotti, danneggiando la fertilizzazione e il conseguente sviluppo dell'embrione (Pope, 2000; Goodrowe et al., 1986; Verstegen et al., 1993). Negli animali da reddito, l'influenza dannosa di alte concentrazioni di progesterone porta ad un'azione diretta sull'endometrio, provocando

una liberazione più alta di fattori di crescita e/o un passaggio più alto di questi fattori nel sangue fetale. Questi possono promuovere lo sviluppo di un metabolismo anormale in maniera irreversibile. Secondo Roth et al (Roth et al., 1997) sembra che la funzione del corpo luteo non sia compromessa nelle femmine trattate con eCG/hCG. Ci sono però, concentrazioni alte di estradiolo nelle feci delle gatte trattate con eCG, e questa concentrazione rimane alta anche dopo l'induzione dell'ovulazione con hCG (Graham et al., 2000). In somma, vi è una correlazione negativa tra la percentuale di embrioni raccolti nell'utero e un'alta concentrazione d'estradiolo (-0.91) e la presenza di follicoli persistenti (-0.87).

Riguardo al momento del trasferimento, alcuni ricercatori preferiscono trasferire gli embrioni nell'ovidotto ad uno stadio precoce (Goodrowe et al., 1988a; Tsutsui et al., 1989) mentre altri scelgono di trasferirli allo stadio di morula o di blastocisti nell'utero (Pope et al., 1993; Gomez et al., 2003; Kanda et al., 1998; Kanda et al., 1995; Aguiar et al., 2002). Vi è solamente uno studio in cui l' ET non-chirurgico è stato eseguito per via transcervicale (Swanson e Godke, 1994).

In generale, l'ET ha successo nei gatti. In ogni caso, quando vengono impiegate le gonadotropine nelle procedure di ET vi sono molti inconvenienti, principalmente nell'ambiente uterino, e pertanto limitano l'uso di questa tecnica. Un'altra importante limitazione è il metodo di trasferimento chirurgico. Si cerca perciò di migliorare la stimolazione con gonadotropine e sviluppare tecniche meno invasive per il trasferimento e ottenere un ET più efficiente, principalmente nei felini selvatici, anche se lo sviluppo di tali tecniche non è importante solo per i felini selvatici (Franzosi et al., 2003).

## **5.2 Trasferimento embrionale**

### **5.2.1 Trasferimento degli embrioni per via chirurgica**

Il trasferimento degli embrioni per via chirurgica può avvenire ad uno stadio embrionale precoce nell'ovidutto (Goodrowe et al., 1988a; Tsutsui et al., 1989), oppure ad uno stadio più avanzato (morula/blastocisti) nell'utero (Kanda et al., 1998; Pope et al., 1993).

Gomez et al. (Gomez et al., 2003) hanno trasferito embrioni prodotti tramite ICSI per via chirurgica. Sono state trasferite 43 morule (al giorno 5 di IVC) in quattro femmine trattate con gonadotropine alle quali sono stati aspirati i follicoli cinque giorni prima. Ogni corno uterino è stato esterorizzato separatamente e punto a 0.5–1 cm dalla porzione distale dell'apice usando un ago da 18-G (o 16 G) (Gomez et al., 2003), con punta leggermente smussata (Pope et al., 1988). Circa la metà degli embrioni è stata aspirata in 10–20 µl di medium in un catetere sterile (11.5 cm) connesso ad una siringa da 1 ml. La punta del catetere è stata inserita dolcemente attraverso il foro dell'ago per 3–4 cm nel lume del corno uterino dove gli embrioni sono stati depositati. Trascorsi 25–30 giorni ogni ricevente è stata sottoposta ad ecografia transaddominale per determinare l'avvenuto impianto e successiva gravidanza (Pope et al., 1998).

Altro metodo utilizzato per il trasferimento chirurgico (Gomez et al., 2004) è quello laparoscopico, che permette di depositare gli embrioni nell'ovidutto, visualizzando la cavità addominale mediante un endoscopio inserito appena sopra l'ombelico, con una cannula d'acciaio inossidabile 16G x 6.35 cm, inserita attraverso la parete addominale vicina alla linea mediana circa 5 cm sotto l'ombelico. Un catetere di 14.5 cm (3.5 French) è stato quindi inserito nella cannula da 16G e diretto attraverso l'infundibulo che ricopre l'ovaia e all'interno della porzione superiore dell'ampolla dell'ovidutto. Un tubicino di polietilene sterile lungo 50 cm contenente gli embrioni vicino alla punta, è stato fatto retrocedere attraverso il catetere e gli embrioni sono stati depositati nell'ovidutto esercitando una pressione positiva mediante una siringa da 1-mL (Gomez et al., 2004).

### 5.2.2 Trasferimento degli embrioni per via non chirurgica

Per il trasferimento embrionale eseguito mediante cateterismo transcervicale e il seguente deposito degli embrioni in utero, occorre una conoscenza completa dell'anatomia del tratto genitale femminile. Studi anatomici sul tratto genitale della gatta mostrarono la presenza del seno urogenitale (vestibolo). Questo vestibolo è lungo circa 1–2 cm e conduce ad una porzione stretta e non distendibile della vagina craniale (Watson e Glover, 1993) e, ulteriormente compresso da una piega prominente dorsale mediana; ventrolateralmente all'apertura cervicale esterna, vi è il fornice (Swanson e Godke, 1994). La distanza tra la vulva e la cervice è tra i 45 e i 60 mm (Chatdarong et al., 2002). Il canale cervicale è orientato obliquamente tra il corpo dell'utero e la vagina. Durante il ciclo estrale ci sono dei cambiamenti sia della vagina sia della cervice (Zambelli e Cunto, 2005a). Le modifiche anatomiche sono principalmente riferite ad aumento della lunghezza del fornice, diminuzione dell'altezza della vagina rispetto al livello della cervice, diminuzione dell'ampiezza dell'angolo tra l'asse cervicale e la vagina durante la fase follicolare. Questi cambiamenti, relativi all'aumento volumetrico della piega media dorsale, potrebbero spiegare la difficoltà nell'effettuare la cateterizzazione transcervicale durante questo periodo (Zambelli et al., 2004).

Il primo studio che riporta una tecnica di cateterizzazione cervicale, è stato riportato da Hurlbut et al (Hurlbut et al., 1988). Vi sono stati molti tentativi di cateterizzare le gatte, ma la difficoltà è associata alla presenza della piega media dorsale che impedisce al catetere di entrare attraverso la cervice (Zambelli e Cunto, 2005b).

Vari autori svilupparono diversi cateteri e tecniche per il cateterismo transcervicale. Il catetere disegnato da Hurlbut et al (Hurlbut et al., 1988) era un catetere 18 G lungo 9.4 cm con la punta arrotondata in acciaio inossidabile. Uno speculum di vetro di 2 mm x 8 mm fu poi progettato per aiutare l'introduzione del catetere.

Come riportato da Swanson et al (Swanson e Godke, 1994), la tecnica proposta Hurlbut et al (Hurlbut et al., 1988) non era efficiente, in quanto, non poteva essere assicurata la penetrazione attraverso la cervice. Swanson e Godke (Swanson e Godke, 1994) e Chatdarong et al (Chatdarong et al., 2001) utilizzarono un catetere urinario in polipropilene modificato (2.7–2.8 mm in diametro) come speculum ed un catetere da gatto 3.5 Fr per entrare nella cervice.

Zambelli et al (Zambelli e Castagnetti, 2001) riuscirono ad ottenere solo in alcuni casi la cateterizzazione con i metodi proposti Swanson et al (Swanson e Godke, 1994) e Chatdarong et al (Chatdarong et al., 2001), a causa di una misura troppo grande dello speculum (diametro esterno di 2.7 o 2.8 mm).

Il catetere proposto da Zambelli et al (Zambelli e Castagnetti, 2001; Zambelli et al., 2004) è costituito da un catetere da gatto 3 Fr tagliato in punta, nella cui estremità è inserito un ago con la punta arrotondata, le dimensioni sono di 0,65 mm di diametro e 30 mm di lunghezza. Il catetere è inserito attraverso il vestibolo nella vagina craniale e l'inserimento è facilitato con l'inserimento di un dito nel retto che guida il catetere fino al superamento della cervice e successivo inserimento nell'utero. Questo nuovo catetere è contemporaneamente rigido e flessibile. La porzione d'acciaio serve per l'introduzione nella cervice, mentre la porzione di plastica serve a dare flessibilità e minimizza la possibilità di provocare traumi (Chatdarong et al., 2001; Hurlbut et al., 1988). Inoltre, la palpazione di transrettale facilita la cateterizzazione (l'operatore sente il passaggio di catetere) diminuendo ulteriormente i rischi di perforazione. Non sempre è stato necessario sedare l'animale, ma con la sedazione si ha una migliore manipolazione del catetere (Zambelli e Cunto, 2005b).

## **PARTE SPERIMENTALE**

## 1. VITRIFICAZIONE DI OOCITI DI GATTO IN CRYOLOOP

### *Introduzione*

La crioconservazione dei gameti è un mezzo importante nei programmi di riproduzione assistita, infatti la conservazione a lungo termine di oociti o spermatozoi è necessaria quando l'IVF o l'IA devono essere effettuate in un momento futuro. Quando le distanze geografiche o temporali tra i donatori comportano una asincronia della disponibilità di gameti maschili e femminili, la crioconservazione è l'unica opzione (Luvoni, 2006).

Le procedure di crioconservazione sono state stabilite sulla base delle caratteristiche fisiche cellulari al fine di mantenere la vitalità e limitare i danni di membrana che possono avvenire durante l'esposizione a tali condizioni non fisiologiche, come temperature al di sotto dello zero, la formazione di ghiaccio e alte concentrazioni di soluti (Parks, 1997).

Gli oociti di gatto hanno particolari caratteristiche fisiche che aumentano la difficoltà di sviluppo di metodi efficienti di crioconservazione rispetto ad altre specie, infatti l'oocita di gatto ha un elevato numero di gocce lipidiche nell'ooplasma (Guraya, 1965) per cui la permeabilità ai crioprotettori può essere inferiore rispetto a quella di oociti di altre specie dove sono stati ottenuti dei nati dopo trasferimento di embrioni derivanti da oociti congelati (Massip, 2003; Van der Elst, 2003). Proprio per tali difficoltà, nel gatto sono riportati solo due studi sulla crioconservazione degli oociti. Nel primo (Luvoni e Pellizzari, 2000), oociti maturi e immaturi sono stati crioconservati mediante congelamento lento. Dopo scongelamento gli oociti sono stati fertilizzati *in vitro* con spermatozoi epididimali, ma non è stato possibile ottenere blastocisti. Nel secondo studio (Murakami et al., 2004), oociti maturi di gatto sono stati vitrificati in paillette e, dopo IVF con spermatozoi epididimali congelati, sono state ottenute le prime due blastocisti.

Lo scopo di questo studio è stato quello di mettere a punto un protocollo efficace per la vitrificazione in cryoloop di oociti di gatto.

### *Materiali e metodi*

Tutti i reagenti sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) se non specificato.

#### *Maturazione in vitro degli oociti*

Ovaie di gatta, nei diversi stadi del ciclo estrale, sono state prelevate dopo ovariectomia nel periodo compreso tra ottobre e la prima settimana di febbraio. Le ovaie sono state mantenute in DPBS addizionato con 63 µg/ml di penicillina G sodica e 70 µg/ml di streptomina solfato a temperatura ambiente, fino al momento della raccolta degli oociti. Le ovaie sono state quindi sminuzzate finemente con una lama da bisturi in una capsula petri da 35 mm e gli oociti sono stati recuperati entro 1-4 h dall'ovariectomia. Per questo studio sono stati impiegati oociti di I e II grado (Wood e Wildt, 1997).

Il terreno base per la maturazione è stato il SOFaa addizionato con 5 mg/ml di BSA, 0.1 UI di FSH-LH suino (Pluset, Laboratorios Calier, Barcelona, Spain), 25 µl/ml di ITS e L-cisteina 1.2 mM. Gli oociti sono stati lavati 3 volte in HSOF e coltivati nel terreno di maturazione in un incubatore al 5% di CO<sub>2</sub> a 38.5°C per 24 h.

#### *Vitrificazione e riscaldamento degli oociti*

Dopo la maturazione gli oociti sono stati lavati 2 volte in HSOF, quindi sono stati vitrificati secondo diversi protocolli.

##### Protocollo 1

Vitrificazione: esposizione degli oociti alla prima soluzione di vitrificazione contenente il 20% di EG in HSOF per 2 min, esposizione alla seconda soluzione contenete il 40% di EG e saccarosio 0, 3M in HSOF per 1 min, posizionamento sulla loop ed immersione in azoto liquido.

Riscaldamento: immersione della loop in HSOF 0.25 M di saccarosio a 37°C per 30 sec, passaggio in HSOF 0.188 M di saccarosio per 30 sec, passaggio in HSOF 0.125M di saccarosio per 30 sec.

##### Protocollo 2

Vitrificazione: esposizione degli oociti alla prima soluzione di vitrificazione contenente il 5% di DMSO e il 5% di EG in HSOF al 10% di FBS per 30 sec, esposizione alla seconda soluzione contenete il 10% di DMSO e il 10% di EG in HSOF al 10% di FBS per 30 sec, esposizione alla terza soluzione contenete il 20% di DMSO, il 20% di EG, e

saccarosio 0.65 M in HSOF al 10% di FBS per 20 sec, posizionamento sulla loop ed immersione in azoto liquido.

Riscaldamento: immersione della loop in HSOF 0.25 M di saccarosio a 37°C per 30 sec, passaggio in HSOF 0.188 M di saccarosio per 30 sec, passaggio in HSOF 0.125M di saccarosio per 30 sec.

### Protocollo 3

Vitrificazione: esposizione degli oociti alla prima soluzione di vitrificazione contenente il 5% di DMSO e il 5% di EG in HSOF al 10% di FBS per 30 sec, esposizione alla seconda soluzione contenete il 10% di DMSO e il 10% di EG in HSOF al 10% di FBS per 30 sec, esposizione alla terza soluzione contenete il 20% di DMSO, il 40% di EG, 10 mg/ml di Ficoll e saccarosio 0,3 M in HSOF al 10% di FBS per 20 sec, posizionamento sulla loop ed immersione in azoto liquido.

Riscaldamento: immersione della loop in HSOF 0.25 M di saccarosio a 37°C per 30 sec, passaggio in HSOF 0.188 M di saccarosio per 30 sec, passaggio in HSOF 0.125M di saccarosio per 30 sec.

### Protocollo 4

Vitrificazione: esposizione degli oociti alla prima soluzione di vitrificazione contenente il 10% di EG in HSOF per 1 min, esposizione alla seconda soluzione contenete il 20% di EG in HSOF per 1 min, esposizione alla terza soluzione contenete il 40% di EG, 10mg/ml di Ficoll e saccarosio 0.3 M in HSOF per circa 20 sec, posizionamento sulla loop ed immersione in azoto liquido.

Riscaldamento: immersione della loop in HSOF 0.5 M di saccarosio a 37°C per 30 sec.

Tutti gli oociti dopo il riscaldamento sono stati lavati 3 volte in HSOF e messi nuovamente nel terreno da IVM ed essere incubati per 2 h nelle stesse condizioni della maturazione. Trascorso tale periodo, gli oociti sono stati valutati per una prima eliminazione di quelli in cui il citoplasma appariva chiaramente degenerato.

### *Fertilizzazione in vitro*

Gli oociti sono stati fertilizzati *in vitro* con spermatozoi elettroeiaculati e congelati. Il seme è stato ottenuto e congelato come descritto in precedenza (Zambelli et al., 2002) e il diluente per il congelamento è stato addizionato con l'1% di Equex STM paste (Nova Chemical Sales Inc., Scituate, Ma, USA). Lo scongelamento del materiale seminale è stato fatto in acqua a 37°C per 30 sec e lavato in SOFaa, contenente 6 mg/ml di BSA,

mediante centrifugazione a 300 g per 5 min. Il pellet è stato risospeso in terreno pulito, è stata valutata la motilità ed il volume della sospensione è stato aggiustato in modo da ottenere una concentrazione finale di  $1 \times 10^6$  spermatozoi motili/ml. La sospensione così ottenuta è stata addizionata con 20  $\mu\text{L}/\text{ml}$  di PHE e 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di eparina. Per l'inseminazione gli oociti sono stati trasferiti in 4-well contenenti 500  $\mu\text{l}$  della sospensione per IVF e co-coltivati per 18 h a  $38.5^\circ\text{C}$  in atmosfera modificata al 5% di  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  e 90%  $\text{N}_2$ .

#### *Valutazione della divisione*

Dopo 18 h di co-coltura con gli spermatozoi, le cellule del cumulo sono state rimosse in una soluzione di tripsina allo 0.25% per 60 sec. Gli oociti sono quindi stati lavati una volta in HSOF con FCS al 10% per inattivare la tripsina e due volte in HSOF e valutati per l'eliminazione di quelli degenerati (non scartati dopo l'IVM perché la presenza del cumulo non ne aveva permesso l'identificazione) prima di essere messi in SOFaa contenente 16mg/ml BSA per la coltura a  $38.5^\circ\text{C}$  in atmosfera modificata al 5% di  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  e 90%  $\text{N}_2$ . A 30 h dall'IVF è stata valutata la percentuale di divisione e gli embrioni sono stati coltivati nelle medesime condizioni di IVC con l'aggiunta di FBS al 10% fino al giorno 8.

#### *Disegno sperimentale ed analisi statistica*

In totale sono stati vitrificati 920 oociti (protocollo 1 n=225, protocollo 2 n=222, protocollo 3 n=170, protocollo 4 n=303) e sono stati impiegati 264 oociti di controllo. La percentuale di oociti degenerati dopo vitrificazione è stata definita come il numero di oociti scartati dopo 2 ore di IVM post-scongelo e di quelli scartati dopo l'IVF ed eliminazione delle cellule del cumulo rispetto al numero totale di oociti coltivati. La percentuale di degenerati per gli oociti di controllo è stata calcolata seguendo il medesimo criterio. Le percentuali di divisione e di morule-blastocisti al giorno 6 sono state calcolate sul numero totale di oociti messi in IVC (ossia oociti totali - oociti degenerati), sia per quelli vitrificati che per quelli di controllo. I dati sono stati confrontati mediante test del Chi Quadrato (Statistica for Windows - Stat Soft Inc Tusla USA). La significatività è stata considerata per  $P < 0.05$ .

#### ***Risultati***

Le percentuali di oociti degenerati, quella di divisione e la percentuale di morule-blastocisti al giorno 6 sono state significativamente inferiori ( $P < 0.01$ ) nel gruppo degli oociti vitrificati rispetto al controllo. All'interno dei diversi protocolli di vitrificazione la percentuale di oociti degenerati nel protocollo 3 è significativamente superiore rispetto agli altri protocolli di vitrificazione ( $P < 0.05$ ). Per quanto riguarda invece la percentuale di divisione, i protocolli 3 e 4 hanno raggiunto percentuali non statisticamente differenti tra loro ( $P < 0.05$ ) ma superiori rispetto ai protocolli 1 e 2 ( $P < 0.01$ ). Solo col protocollo 4 è stato possibile ottenere morule/blastocisti al giorno 6, mentre nessun oocita vitrificato con gli altri 3 protocolli ha raggiunto tale stadio di sviluppo ( $P < 0.01$ ). Tutti i dati sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Sviluppo embrionale *in vitro* di oociti felini vitrificati con 4 protocolli e non vitrificati

Gruppo	N. oociti	Deg (%)	Divisi (%)	Mor-bl g 6 (%)
Protocollo 1	225	120 (53.3) <sup>b</sup>	6 (5.7) <sup>c</sup>	0 (0.0) <sup>c</sup>
Protocollo 2	222	128 (57.7) <sup>b</sup>	0 (0.0) <sup>d</sup>	0 (0.0) <sup>c</sup>
Protocollo 3	170	146 (85.9) <sup>a</sup>	5 (20.8) <sup>b</sup>	0 (0.0) <sup>c</sup>
Protocollo 4	303	151 (49.8) <sup>b</sup>	49 (32.2) <sup>b</sup>	24 (15.8) <sup>b</sup>
Controllo	264	45 (17.0) <sup>c</sup>	112 (51.1) <sup>a</sup>	92 (42.0) <sup>a</sup>

(a,b)  $P < 0.01$

### ***Discussioni***

In questo studio la vitrificazione di oociti di gatto in cryoloop secondo diversi protocolli ha permesso di definire quale fosse quello più idoneo per ottenere oociti competenti in grado di svilupparsi *in vitro* sino a stadi pre-impianto. È infatti risultato evidente che il protocollo 4 è quello più efficiente, essendo stato l'unico che ha permesso di ottenere embrioni allo stadio di morula/blastocisti a partire da oociti vitrificati.

La percentuale di sopravvivenza ottenuta nel presente studio (50.2%, protocollo 4) dopo vitrificazione in cryoloop di oociti maturati *in vitro* e quella di divisione (32.2%, protocollo 4), sono simili a quelle ottenute da Murakami et al. (2004) dopo vitrificazione in paillette (50.8% e 29.7% rispettivamente), ma inferiori a quelle raggiunte da Luvoni e Pellizzari (2000) dopo congelamento lento con EG (84.1% e 38.7% rispettivamente), anche se in tale studio l'IVF è stata effettuata con spermatozoi

epididimali freschi e non con materiale seminale congelato. Nonostante ciò, la percentuale di embrioni da noi ottenuti al giorno 6 (15.8%, protocollo 4) è stata inferiore rispetto al controllo (42.0%), ma comunque incoraggiante rispetto ai risultati ottenuti con gli altri protocolli testati ed anche rispetto a quelli sino ad ora ottenuti da oociti crioconservati.

Il protocollo 3 è stato quello in cui è stata riscontrata la maggior percentuale di oociti degenerati, anche se la successiva divisione embrionale è stata migliore rispetto ai protocolli 1 e 2, e non significativamente diversa rispetto al protocollo 4. Questo mette in evidenza come la degenerazione sia il segno macroscopico degli effetti negativi del processo di vitrificazione, ma che gli oociti subiscano anche altri danni, non visibili morfologicamente, che comportano una ridotta competenza e capacità di sviluppo.

In conclusione, i risultati ottenuti in questo studio mostrano che è possibile ottenere, a partire da gameti femminili e maschili crioconservati, embrioni felini con capacità di sviluppo sufficienti a garantire la normale progressione sino allo stadio pre-impianto, con percentuali di sopravvivenza, fertilizzazione e sviluppo embrionale non ancora ottimali ma abbastanza soddisfacenti. Inoltre, essendo il gatto un buon modello per gli altri felidi, questi risultati incoraggiano la crioconservazione di oociti anche per i programmi di conservazione delle specie feline esotiche in via di estinzione.

## **2. SVILUPPO DI EMBRIONI DI GATTO PRODOTTI IN VITRO DOPO VITRIFICAZIONE E TRASFERIMENTO EMBRIONALE NON CHIRURGICO: RISULTATI PRELIMINARI**

### ***Introduzione***

Non esistono studi che riportino la vitrificazione di embrioni di gatto a partire da oociti maturati in vitro e il loro trasferimento utilizzando una tecnica non chirurgica. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto della vitrificazione sulla capacità di sviluppo in vitro e in vivo di blastocisti di gatto prodotte in vitro

### ***Materiali e metodi***

#### ***Recupero degli oociti e IVP***

Le ovaie ottenute dopo ovariectomia sono state sminuzzate finemente con una lama da bisturi e gli oociti sono stati recuperati entro 1-4 h dall'ovariectomia. Per questo studio sono stati impiegati oociti di I e II grado (Wood e Wildt, 1997). Il terreno base per la maturazione è stato il SOFaa addizionato con 5 mg/ml di BSA, 0.1 UI di FSH-LH suino (Pluset, Laboratorios Calier, Barcelona, Spain), 25 µl/ml di ITS e L-cisteina 1.2 mM. Gli oociti sono stati lavati 3 volte in HSOF e coltivati nel terreno di maturazione in un incubatore al 5% di CO<sub>2</sub> a 38.5°C per 24 h.

Gli oociti sono stati fertilizzati *in vitro* con spermatozoi elettroeiaculati e congelati come descritto in precedenza (Zambelli et al., 2002) e il diluente per il congelamento è stato addizionato con l'1% di Equex STM paste (Nova Chemical Sales Inc., Scituate, Ma, USA). Lo scongelamento del materiale seminale è stato fatto in acqua a 37°C per 30 sec e lavato in SOFaa, contenente 6 mg/ml di BSA, mediante centrifugazione a 300 g per 5 min. Il pellet è stato risospeso in modo da ottenere una concentrazione finale di 1 x 10<sup>6</sup> spermatozoi motili/ml. La sospensione così ottenuta è stata addizionata con 20 µL/ml di PHE e 10 µg/ml di eparina. Per l'inseminazione gli oociti sono stati trasferiti in 4-well contenenti 500 µl della sospensione per IVF e co-coltivati per 18 h a 38.5°C in atmosfera modificata al 5% di CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>. Trascorso tale periodo, le cellule del cumulo sono state rimosse meccanicamente impiegando una pipetta pasteur. Gli

oociti sono quindi stati messi in SOFaa contenente 16mg/ml BSA per la coltura a 38.5 °C in atmosfera modificata al 5% di CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>. A 30 h dall'IVF è stata valutata la percentuale di divisione e gli embrioni sono stati coltivati nelle medesime condizioni di IVC con l'aggiunta di FBS al 10% fino al giorno 7.

#### *Vitrificazione e riscaldamento*

Al giorno 7 di coltura, sono state selezionate le blastocisti e sono state vitrificate in paillette (Cristal ET 0.25 ml 133 mm, IMV-Technologies). Per la vitrificazione (protocollo modificato da Campos-Chillòn L.F. et al., 2006), gli embrioni sono stati trasferiti in 1 ml of V1 (EG 3.5 M in HSOF) per 3 min, poi in 10 µl di V2 (EG 7 M, galattosio 0.5 M, Ficoll 70 18% in HSOF) per 20 sec. Infine, gli embrioni sono stati caricati in una paillette precaricata con 190 µl soluzione di diluizione (D: galattosio 0.5M in HSOF) col metodo convenzionale: 7 cm di D - bolla d'aria – 10 µl di V2 contenente gli embrioni – bolla d'aria – 1 cm di D. Le paillette sono state sigillate e immediatamente immerse in azoto liquido. Dopo almeno una settimana di conservazione, gli embrioni vitrificati sono stati riscaldati in aria per 10 sec, poi in bagno maria a 37°C per 30 sec.

#### *Valutazione dello sviluppo embrionale in vitro*

27 embrioni vitrificati sono stati riscaldati e valutati immediatamente, quindi messi in terreno di coltura per 48 ore e controllato ogni 24 ore. Al termine della coltura, gli embrioni vitali sono stati sottoposti a colorazione a fluorescenza per valutare il numero di cellule vive e morte . Le blastocisti sono state incubate per 15 min a 38.5°C in PBS contenente 10 µg/ml di propidio iodato (PI), sono state poi fissate in etanolo al 70% per 5 min e quindi trasferite in etanolo assoluto contenete 10 µg/ml di Hoechst 33342 per 5 min a temperatura ambiente. Gli embrioni sono stati quindi trasferiti in una goccia di

glicerolo su un vetrino, coperti con un copri oggetti ed analizzati al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse E 400, Japan). I nuclei rossi (morti) e quelli blu (vivi) sono stati contati.

#### *Valutazione della capacità di sviluppo in vivo*

Il trasferimento embrionale non chirurgico di 8 embrioni freschi (ricevente 1) e di 6 embrioni vitrificati (ricevente 2) è stato eseguito su due gatte in estro naturale. Il ciclo delle gatte è stato monitorato mediante strisci vaginale ed esame della citologia. Una volta confermato l'estro, l'ovulazione è stata indotta mediante somministrazione i.m. di 200 UI di hCG (giorno 0). L'avvenuta ovulazione è stata confermata il giorno 5 mediante dosaggio del progesterone plasmatico, quindi, il giorno 8 è stato eseguito il trasferimento embrionale utilizzando il catetere per l'inseminazione artificiale transcervicale proposto da Zambelli et al. (2001). Il catetere è stato raccordato ad una siringa da 1 ml ed è stato caricato con gli embrioni secondo la metodica usata anche per il caricamento delle paillettes. La gatta, in anestesia generale, è stata disposta in decubito sternale ed il catetere è stato inserito in vagina e guidato per via transrettale all'interno dell'utero, dove sono stati depositati gli embrioni. Per verificare lo stato della gravidanza, le gatte sono state sottoposte ad ecografia trans-addominale nei giorni 13, 25, e 40.

#### ***Risultati***

##### *In vitro*

Dei 27 embrioni riscaldati e immediatamente valutati, 25 si sono riespansi, 2 no, inoltre 1 embrione dei riespansi aveva la zona pellucida danneggiata. Dopo 24 ore di coltura solo 4 blastocisti erano ancora espanse e a 48 ore di coltura tutti gli embrioni erano degenerati o coartati. Non è stato quindi possibile effettuare la colorazione a fluorescenza per la determinazione del numero di cellule vive e morte.

### *In vivo*

Al giorno 13 è stata osservata in entrambe le riceventi una vescicola embrionale, anche se quella della ricevente 2 (embrioni vitrificati) presentava un diametro leggermente inferiore. Al giorno 25 è stato individuato un feto vitale solo nella ricevente 1. Al giorno 40 la camera gestazionale era ancora presente ma il feto non aveva segni vitali (Fig. 1-4).



Fig. 1 Ecografia giorno 13 ricevente 1.



Fig. 2 Ecografia giorno 25 ricevente 1.



Fig. 3 Ecografia giorno 40 ricevente 1.

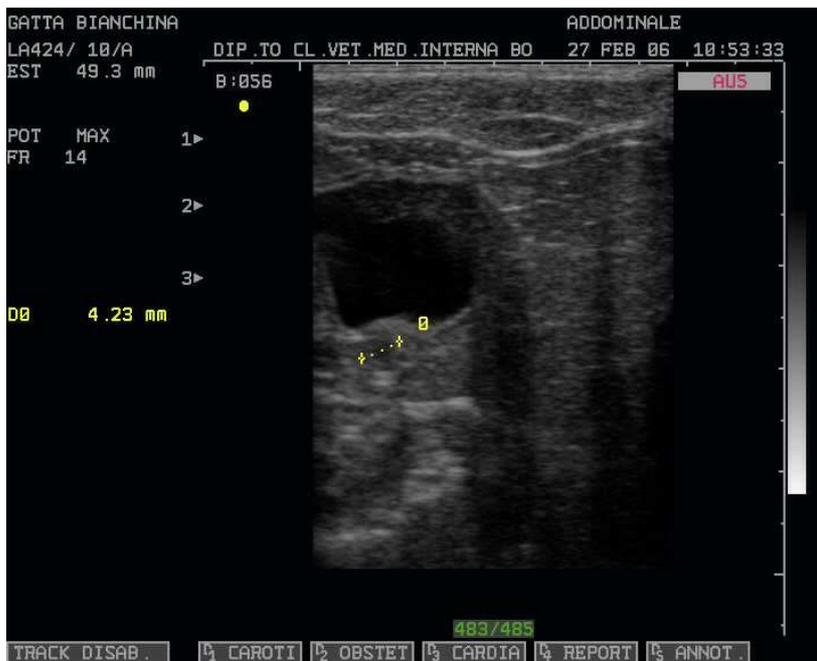


Fig. 4 Ecografia giorno 13 ricevente 2.

### ***Conclusioni***

Ulteriori studi sono necessari per migliorare l'incidenza di gravidanza, trasferendo un maggior numero di embrioni per ricevente, e la percentuale di sopravvivenza embrionale dopo vitrificazione, impiegando tecniche alternative a quella in paillette, che prevedono l'impiego di volumi minimi.

Nonostante ciò, i risultati preliminari ottenuti utilizzando per il trasferimento non chirurgico un catetere per l'inseminazione artificiale sono incoraggianti, e il miglioramento della tecnica potrebbe renderla applicabile anche nel gatto.

### 3. CONFRONTO DI DUE TECNICHE DI CATETERIZZAZIONE TRANSCERVICALE NELLA GATTA

#### *Introduzione*

In letteratura non sono riportati alcuni cateteri utilizzati per la cateterizzazione transcervicale nelle gatte. Il primo catetere fu ideato da Hurlbut et al (Hurlbut et al., 1988) ma, come successivamente riportato da Swanson et al (Swanson e Godke, 1994), questo catetere non era efficiente. Swanson e Godke (Swanson e Godke, 1994) proposero un altro modello di catetere transcervicale, modificato e utilizzato in seguito anche da Chatdarong et al (Chatdarong et al., 2001) e da Axner et al. (Axner e Lindforsberg, 2002). Per il cateterismo transcervicale secondo tale metodica, si utilizzano due cateteri, uno esterno che funge da guida e uno interno per oltrepassare la cervice. Il catetere esterno impiegato è un catetere urinario in polipropilene (2.8 mm di diametro) chiuso al suo apice con il calore e sui cui è poi stata eseguita una nuova apertura a 8 mm dalla punta. Il catetere interno utilizzato è un catetere 3.5 Fr da gatto, lungo 140 mm e di 1 mm di diametro. La nuova apertura nel catetere esterno è stata modellata in modo tale che il catetere interno sia diretto verso l'apertura cervicale.

Un altro tipo di catetere per la cateterizzazione transcervicale è stato proposto da Zambelli et al (Zambelli e Castagnetti, 2001; Zambelli et al., 2004), che hanno impiegato un catetere da gatto 3 Fr tagliato in punta, alla cui estremità è stato inserito un ago con la punta arrotondata, le cui dimensioni sono di 0,65 mm di diametro e 30 mm di lunghezza. Il catetere viene inserito attraverso il vestibolo nella vagina craniale e il suo avanzamento facilitato mediante palpazione transrettale della cervice e della punta del catetere. Questo catetere presenta contemporaneamente caratteristiche di rigidità e flessibilità, la porzione d'acciaio serve per l'introduzione nella cervice, mentre la

porzione di plastica serve a dare flessibilità e minimizzare la possibilità di provocare traumi. Inoltre, la palpazione transrettale facilita la cateterizzazione (l'operatore sente il passaggio del catetere) diminuendo ulteriormente i rischi di perforazione.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare i cateteri proposti da: Chatdarong et al (Chatdarong et al., 2001) e Zambelli et al (Zambelli e Castagnetti, 2001; Zambelli et al., 2004) al fine di verificare quale dei due potesse essere di più idoneo per la cateterizzazione transcervicale di gatte nullipare candidate all'embryo transfer e quindi in fase diestrale.

### ***Materiali e metodi***

Per questo esperimento sono state utilizzate 28 gatte femmine di razza europea di età compresa tra i 7 e i 24 mesi di età, con un peso variabile da 2,6 a 3,8 kg, portate presso il Dipartimento clinico Veterinario per essere sottoposte ad ovariectomia. Tutte i soggetti inseriti nell'esperimento erano gatte giovani, puberi e nullipare, in fase di fine diestro o anestro, e le prove di cateterizzazione sono state effettuate nel periodo compreso tra inverno e primavera. La fase del ciclo estrale (FD fine diestro; A anestro) è stata determinata in base ai dati anamnestici e confermata dalle caratteristiche delle ovaie e dell'utero valutate dopo la laparotomia eseguita per effettuare l'ovariectomia. Tutte le femmine sono state anestetizzate con 8 mg/kg di ketamina (Ketavet 50; Farmaceutici Gellini, Aprilia - LT, Italia) e 100 µg/capo di medetomidina (Domitor, Pfizer Italia); una volta raggiunta la fase di anestesia le gatte sono state posizionate in decubito sternale per procedere alla cateterizzazione.

Si è proceduto poi alla cateterizzazione delle gatte con i due diversi cateteri. 14 gatte sono state cateterizzate con il metodo utilizzato da Chatdarong et al. (Chatdarong et al., 2001) (catetre C), costituito da un catetere da 1,5 mm di diametro, sul quale è poi stata

effettuata una nuova apertura a 8 mm dalla punta; al suo interno è stato inserito un catetere urinario da gatto da 1mm di diametro e 140 mm di lunghezza. Il catetere guida è stato posizionato in vagina, quindi il catetere interno è stato spinto in utero attraverso la cervice.

Le altre 14 gatte sono state cateterizzate con il catetere proposto da Zambelli et al (Zambelli e Castagnetti, 2001; Zambelli et al., 2004) (catetere Z) costituito da un catetere da gatto 3 Fr tagliato in punta, alla cui estremità è stato inserito un ago con la punta arrotondata, le dimensioni sono di 0,65 mm di diametro e 30 mm di lunghezza. Il catetere è stato inserito attraverso il vestibolo nella vagina craniale e il suo avanzamento facilitato mediante palpazione transrettale della cervice e della punta del catetere per guidarlo fino al superamento della cervice e il successivo inserimento nell'utero.

Per verificare l'avvenuta cateterizzazione i cateteri sono stati lasciati in posizione e poi si è iniziata l'ovariectomia come di routine. Una volta exteriorizzato l'utero è stata introdotta della soluzione fisiologica sterile attraverso il catetere e, se questa raggiungeva le corna uterine, si aveva la conferma dell'avvenuta cateterizzazione. Il catetere è stato quindi sfilato ed è stata eseguita l'ovariectomia.

### ***Analisi statistica***

L'omogeneità dei due gruppi è stata testata valutando il peso e l'età mediante Test t di Student o Mann-Whitney U Test a seconda della distribuzione dei dati, e l'omogeneità delle due fasi del ciclo (FD o A) mediante Test del Chi Quadrato. Il tempo impiegato per la cateterizzazione utilizzando i due diversi cateteri è stato confrontato eseguendo il Mann-Whitney U Test. La percentuale di successo è stata confrontata mediante Test del Chi Quadrato (Statistica for Windows - Stat Soft Inc Tusla USA). La significatività è stata considerata per  $P < 0.05$ .

## ***Risultati***

I dati raccolti sono schematizzati in Tabella 1.

Il peso medio delle gatte impiegate nel gruppo C e Z ( $3,1 \pm 0,3$  Kg e  $3,1 \pm 0,2$  Kg rispettivamente), l'età media ( $14,9 \pm 7,5$  mesi e  $17,1 \pm 5,7$  mesi rispettivamente) e la proporzione tra le due diverse fasi del ciclo esaminate nel presente studio (FD/A: 2/12 e 3/11 rispettivamente) sono risultati simili ( $P > 0,05$ ), confermando l'omogeneità dei diversi animali assegnati in maniera random ai due gruppi.

Impiegando il catetere C la cateterizzazione è riuscita con successo in 5/14 (35,7%) gatte, mentre in 9/14 (64,3%) non è stato possibile oltrepassare la cervice; al contrario, usando il catetere Z è stato possibile cateterizzare con successo 9/14 (64,3%) gatte, mentre in 5/14 (35,7%) gatte la cateterizzazione non è stata possibile.

Il tempo impiegato per eseguire la cateterizzazione è stato in media di  $1,0 \pm 0,0$  minuti con il catetere C e  $6,0 \pm 2,0$  col catetere Z.

La differenza nella percentuale di successo del catetere Z (64,3%) e quella del catetere C (35,7%) non è risultata statisticamente significativa ( $P > 0,05$ ), mentre il tempo impiegato per la cateterizzazione C è risultato significativamente inferiore ( $P > 0,01$ ) rispetto a quello impiegato per l'impiego del catetere Z.

Tab. 1 Dati raccolti dal cateterismo transcervicale di gatte utilizzando due tecniche.

Peso (kg)	Età (mesi)	Fase del ciclo	Catetere	Esito	Tempo (min)
2,8	12	FD	C	sì	1
3	14	FD	C	sì	1
2,6	16	A	C	no	-
3,2	24	A	C	sì	1
3,2	24	A	C	no	-
3,6	24	A	C	no	-
3,0	24	A	C	no	-
3,0	24	A	C	no	-
2,8	8	A	C	no	-
3,0	8	A	C	sì	1
3,6	8	A	C	no	-
3,8	8	A	C	no	-
3,0	8	A	C	sì	1
3,2	7	A	C	no	-
3,5	12	A	Z	sì	5
3,0	12	A	Z	sì	10
2,8	12	A	Z	no	-
3,2	12	A	Z	sì	8
3,0	18	A	Z	sì	4
3,2	24	A	Z	sì	5
3,1	24	A	Z	sì	8
2,9	12	A	Z	no	-
3,5	12	FD	Z	no	-
3,2	24	A	Z	si	5
3,1	18	FD	Z	no	-
2,9	24	FD	Z	si	6
3,1	24	A	Z	si	8
2,9	12	A	Z	no	-

A = anestro; FD = fine diestro

C = catetere Chatdarong; Z= catetere Zambelli

sì = cateterizzazione riuscita; no = cateterizzazione non riuscita

## *Conclusioni*

In questo studio si è preferito utilizzare gatte che fossero in fase di diestro e anestro invece che nella fase di estro perché in tali momenti del ciclo estrale le gatte presentano una condizione dell'apparato genitale (Zambelli e Cunto, 2005a) simile a quella che si riscontra in gatte riceventi sincronizzate per un protocollo di trasferimento non chirurgico di embrioni.

In tale prospettiva sono anche state selezionate e utilizzate solo gatte giovani e nullipare perché questa tipologia di animali presenta una conformazione anatomica particolare dell'apparato genitale, infatti le gatte nullipare hanno tutte vagine molto piccole e strette, pertanto è stata valutata l'efficacia della cateterizzazione transcervicale con i due modelli di cateteri su questa tipologia di animali.

Il metodo Chatdarong è stato utilizzato con successo in femmine multipare (Axner e Linde-Forsberg, 2002) che quindi presentavano apparato genitale più sviluppato rispetto a quelle nullipare, usate da noi in questo studio. Dati da noi non pubblicati mostrano che in animali più anziani e che hanno già partorito la cateterizzazione risulta essere più facile ed eseguibile in tempi rapidi con maggiori probabilità di riuscita.

Utilizzando il metodo Zambelli, nel presente studio, è stato possibile cateterizzare con successo il 64,3% di nullipare, anche se in questo caso il tempo richiesto per la manualità si è protratto maggiormente. Per utilizzare tale metodo è necessaria esperienza e competenza di chi effettua la cateterizzazione. Con il metodo Chatdarong è stato possibile cateterizzare il 35,7% degli animali in un tempo inferiore rispetto alla tecnica di Zambelli, ma in due animali sono state riscontrate tracce di sangue al momento dell'estrazione del catetere, facendo presupporre che la tecnica sia lievemente più traumatizzante rispetto al metodo Zambelli. Dalla tabella si evidenzia una chiara differenza nelle diverse percentuali di successo tra i due metodi, anche se questo non è

statisticamente significativo, e sarebbe quindi opportuno aumentare la casistica per dimostrare una eventuale significatività.

In conclusione, confrontando le due tecniche, sicuramente il metodo Chatdarong risulta più pratico e di più veloce esecuzione, pertanto sarebbe da preferire come prima scelta.

Nelle gatte dove però questo metodo non si riesce ad utilizzare a causa delle ridotte dimensioni della vagina che determinano l'impossibilità di far progredire il catetere, è consigliabile utilizzare il metodo Zambelli.

## BIBLIOGRAFIA

Abou-Setta A.: Firm embryo transfer catheters for assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis using direct and adjusted indirect comparisons. *Reprod Biomed Online* 2006 Feb;12(2):191-8. Review

Aguiar L., Madeira VLH., Silva Junior FX., Silva FMO., Monteiro CLB., Silva DLM. Et al.: Transferencia de embriões em gata doméstica (*Felis catus*). *Rev Bras Reprod Anim Supl* 2002;5:152-154

Andrews J.C., Howard J.G., Bavister B.D., Wildt D.E.: Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona pellucida penetration assay. *Mol. Reprod. Dev.* 31 (1992) 200-207

Axnér E., Ström Holst B., Linde-Forsberg C.: Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 1998; 50:973-979

Axnér E. and Linde-Forsberg C.: Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. *International Veterinary Information Service* 5-Jul-2002

Axner E.: Functional evaluation of spermatozoa. Part III. Course of reproduction in companion, exotic and laboratory animals. In: *Recent advances in reproduction*. Milan;2004. p 48-56

Barne FL.: The effect of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology* 2000;53:644-658

Bogliolo L., Leoni G., Ledda S., Naitana S., Zedda M., Monelli P., et al.: M-phase promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinases (MAPK) activities of domestic cat oocytes matured in vitro and in vivo. *Cloning Stem Cells* 2004;6:15-23

Bush M., Wildt DE., Kennedy S., Seager SW., 1978. Laparoscopy in zoological medicine. *JAVMA* 173, 1081-1087

Byers AP., Donoghue AM., Roth TL., Wildt DE.: Oocyte nuclear maturation at the time of oocyte aspiration is independent of in vitro fertilization potential in the domestic cat. *J. Exp. Zool.* 1994;270:399-404

Campos-Chillon LF, Walzer DJ, De la Torre-Sanchez JF, Seidel Jr GE. : In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology* 2006;65:1200-14

Chatdarong K., Lohachit C., Ponglowhapan S., Linde-Forsberg C.: Transcervical catheterization and cervical patency during the oestrus cycle in the domestic cat. *J. Reprod. Fertil* 2001; Suppl. 57:353-356

Chatdarong K., Kampa N., Axner E., Linde-forsberg C.. Investigation of cervical patency and uterine appearance in domestic cats by fluoroscopy and scintigraphy. *Reprod Dom Anim* 2002;37:1-8

Ciani F., Cocchia N., Rizzo M., Ponzio P., Tortora G., Avallone L., Lorizio R.: Sex determining of cat embryo and some feline species. *Zigote* 16 (May),2008pp 169-177

Commizzoli P., Wildt DE., Pukazhenthil BS.: Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. *Reproduction* 2003;126:809-16

- Commizzoli P., Wildt DE., Pukazhenti BS.: Effect of 1,2-propanediol versus 1,2-ethanediol on subsequent oocyte maturation, spindle integrity, fertilization and embryo development in vitro in the domestic cat. *Biol Reprod* 2004;71:598-604
- Critser JK, Agca Y, Gunasena KT.: The cryobiology of mammalian oocytes. In: Karow AM, Critser JK, editors. *Reproductive tissue banking. Scientific principles*. San Diego, CA: Academic Press; 1997. p. 329-57
- Ding LJ., Tian HB., Wang JJ., Chen J., Sha HY., Chen JQ., Cheng GX.: Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 2008 Dec; 75(12):1710-5
- Dobrinsky JR.: Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45, 17-26 (1996)
- Donoghue AM., Johnston LA., Seal US., Armstrong DL., Tilson RL., Wolf P., Petrini K., Simmons LG., Gross T., Wildt DE.: In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biology of reproduction* 43, 733-744 (1990)
- Donoghue AM., Johnston LA., Munson L., Brown JL., Wildt DE.: Influence of gonadotropin treatment interval on follicular maturation, in vitro fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat. *Biology of reproduction* 46, 972-980 (1992)
- Dooley MP., Pineda MH.: Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. *Am. J. Vet. Res.* 1986;47:286-92
- Dooley MP., Pineda MH., Hopper JG., Hsu WH.: Retrograde flow of spermatozoa into urinary bladder of cat during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. *Am. J. Vet. Res.* 1991;52:687-91
- Evecen M., Cirit U., Demir K., Karaman E., Hamzaoglu AI., Bakirer G.: Developmental competence of domestic cat oocytes from ovaries stored at various durations at 4° C temperature. *Animal Reproduction Science* (2009) Article in press.
- Fahrudin M., Otoi T., Murakami M., Karja NWK., Ooka A., Suzuki T.: The effect of culture medium on in vitro development of domestic cat embryos reconstructed by nuclear transplantation. *Theriogenology* 2001,55:268
- Farstad W.: Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Animal Reproduction Science* 60-61 (2000) 375-387
- Fayrer-Hosken R.: Embryo transfer in the dog and cat. *Theriogenology* 68 (2007) 382-385
- Franzosi Mattos MR, Simones-Mattos L, Machado de Silva LD; Embryo technology in the domestic cat (*Felis catus*). *Vet Mex.*, 34 (4) 2003
- Freistedt P., Stojkovic P., Wolf E., Stojkovic M.: Energy status of nonmatured and in vitro- matured domestic cat oocytes and of different stages of in vitro- produced embryos: Enzymatic removal of the zona pellucida increases adenosine triphosphate content and total cell number of blastocysts. *Biol. Reprod.* 2001a;65:793-798
- Freistedt P., Stojkovic M., Wolf E.: Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid: effects of season and ovarian status. *Biol. Reprod.* 2001b;65:9-13
- Gelwicks CE., Pope CE., Turner JL., Keller GL., Dresser BL.: An evaluation of meiotic stages and polyspermy in uncleaved oocytes following in vitro fertilization in domestic cat. *Theriogenology* 1990;33:228 abst.
- Gjorret JO., Crichton EG., Armstrong DL., Loskutoff NM., Hyttel P.: Oocyte maturation, fertilization and early embryonic development in vitro in the Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Theriogenology* 2000;53:334 abst
- Gómez MC., Pope CE., Harris RF., Davis A., Mikota S., Dresser BL.: Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 2000;12:423-33

- Gómez MC., Pope E., Harris R., Mikota S., Dresser BL.: Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology* 60 (2003) 239-251
- Gómez MC., Pope E., Giraldo A., Lyons LA., Harris R., King AL., Cole A., Godke RA., Dresser BL.: Birth of african wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning and stem cells*, Volume 6, Number 3 2004, 247-258
- Goodrowe KL., Howard JG., Wildt DE.: Embryo recovery and quality in the domestic cat: natural versus induced oestrus. *Theriogenology* 1986;25:156
- Goodrowe KL., Wall RJ., O'brien SJ., Schmidt PM., Wildt DE.: Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in vitro. *Biology of reproduction* 39, 355-372 (1988a)
- Goodrowe KL., Hay M., King WA.: Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro. *Biol. Reprod.* 1991;45:466-470
- Graham LH., Swanson WF., Brown JL.: Chorionic gonadotropin administration in domestic cat causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. *Theriogenology* 2000;54:1117-1131
- Gruffydd-Jones TJ., David JSE.: Embryo collection and transfer in cats. *Proceeding of 2<sup>nd</sup> International Congress Embryo Transfer in Mammals*, September 11 and 12, 1981. Annecy, Francia. Seager, S.W.J. (Editor), Foundation Marcel Merieux, Lyon (Editora), 1982;93
- Guraya SS.: A histochemical analysis of lipid yolk depositino in the oocytes of cat and dog. *J Exp Zool* 1965;160:123-36
- Herrick JR., Swanson WF.: Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. *Theriogenology* 2003;59:1503-1513
- Hoffert Kara A., Anderson Gary B., Wildt David E., Roth Terri L.: Transition From Maternal to Embryonic Control of development in IVM/IVF Domestic Cat Embryos. *Molecular Reproduction and Development* 48:208-215 (1997)
- Hossein SM., Jeong YW., Kim S., Kim JJ., Park SW., Jeong CS., Hyun SH., and Hwang WS.: Protocol for the recovery of in vivo matured canine oocytes based on once daily measurement of serum progesterone. *Cloning and Stem Cells* Volume 10, Number 3, 2008
- Howard JG., Bush M., Wildt DE.: Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In: Morrow DA (ed.), *Current Therapy in Theriogenology* 2. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA, 1986, pp. 1047-1053
- Howard J., Wildt DE.: Ejaculate-hormonal traits in the leopard cat (*Felis bengalensis*) and sperm function as measured by in vitro penetration of zona-free hamster ova and zona-intact domestic cat oocytes. *Mol Reprod Dev* 1990;26:163-174
- Hurlbut SL., Bowen MJ., Kraemer DC.: The feasibility of transcervicale catheterization and nonsurgical embryo collection in the domestic cat. *Theriogenology* 1988;29:264
- Hwang W., Kim K., Kim G., Jin Y, Kim Y, chung H, Yoon T., Han C.: Interspecies somatic cell nuclear transfer for the production of endangered Korean tiger (*Panthera tigris sltsica*). *Theriogenology* 2001;55:271
- Isachenko V., Soler C., Isachenko E., Perez-Sanchez F., Grishchenko V.: Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36, 250-253 (1998)
- Jewgenow K., Wood TC., Wildt DE.: DNA degradation in mural granulosa cells of non-and slightly atretic follicles of fresh and cold stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev* 1997;48:350-355

- Jewgenow K., Penfold LM, Meyer HHD, Wildt DE.: Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J Reprod Fertil* 1998;112:39-47
- Jimenez CF.: Effects of Equex STM and equilibration time on the pre-freeze and post thaw motility of equine epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 28(1987)773-782
- Johnstone IP.: Electroejaculation in domestic cat. *Aust Vet J* 1984;61:155-8
- Johnston L.A., O'Brien SJ., Wildt DE.: In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Res* 1989;24:343-56
- Johnstone LA., Donoghue AM., O'Brien SJ., Wildt DE.: Influence of temperature and gas atmosphere on in vitro fertilization and embryo development in domestic cats. *J. Reprod. Fertil.* 1991;92:377-82
- Johnston L.A., Donoghue AM., O'Brien SJ., Wildt DE.: Influence of culture medium and protein supplementation on in vitro oocyte maturation and fertilization in the domestic cat. *Theriogenology* 1993;40:829-839
- Kanda M., Miyazaki T., Kanda M., Nakao H., Tsutsui T.: Development of in vitro fertilized feline embryos in a modified Earle's balanced salt solution: influence of protein supplements and culture dishes on fertilization success and blastocyst formation. *J. Vet. Med. Sci.* 1998;60:423-31
- Kanda M., Oikawa H., Kanda M., Nakao H., Tsutsui T.: Early embryonic development in vitro and embryo transfer in the cat. *J. Vet. Med. Sci.* 1995;57:641-646
- Karja NWK, Otoi T., Murakami M., Fahrudin M., Suzuki T.: In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of reproductive cycle. *Theriogenology* 2002;57:2289-2298
- Karja NW, Otoi T., Wongsrikeao P., Murakami M., Agung B, Fahrudin M., Nagai T.: In vitro development and post-thaw survival of blastocysts derived from delipidated zygotes from domestic cats. *Theriogenology* 65, 415-423 (2006)
- Kasai M.: Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 42,67-75
- Kasai M.: Cryopreservation of mammalian embryos. *Mol. Biotechnol.* 1997, 7, 173-179
- Katska-ksiazkiewicz L., Rynska B., Kania G., Smorag Z., Gajda B., Pienkowski.: Timing of nuclear maturation of non-stored and stored domestic cat oocytes. *Theriogenology* 2003;59:1567-1574
- Kitianant Y., Saikhun J., Pavasuthipaisit K.: Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology* 2003;59:1775-1786
- Kraemer DC., Flow BL., Schriver MD., Kinney GM., Pennycook JW.: Embryo transfer in the nonhuman primate, feline and canine. *Theriogenology* 1979;11:51-62
- Kuwayama M., Kato O.: All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J assist Reprod Genet* 17, 477 (abstract) 2000
- Luvoni GC., Colombo G.: Effect of L-cisteine on in vitro maturation of domestic cat oocytes. In: Enne G., Greppi GF., y Lauria A. editors. *Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy.* Paris: Elsevier, 1995:403-404
- Luvoni GC., Pellizzari P., Batocchio M.: Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis in immature cat oocytes. *J Reprod Fertil* 1997; Suppl. 51:93-8

- Luvoni GC.: Current progress on assisted reproduction in dog and cats: in vitro embryo production. *Reprod. Nutr. Dev.* 40 (2000) 505-512
- Luvoni GC., Pellizzari P.: Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology* 2000;53:1529-40
- Luvoni GC., Pellizzari P., Pareti A., Barbero C.: Il gatto come specie modello per lo studio dei felini selvatici: produzione in vitro di embrioni. *Rassegna di Medicina Felina, Estratto AIVPAFE (associazione Italiana Veterinari Patologia Felina)*. P 5-10, 2000
- Luvoni GC., Testa P., Biondi PA.: Intracellular glutathione content in feline oocytes matured in vitro in presence of L-Cysteine. *Theriogenology* 2001;55:483
- Luvoni GC.: Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 2006;66:101-11
- Mansour R., Aboulghar M., Serour G.: Dummy embryo transfer: a technique that minimizes the problems of embryo transfer and improves the pregnancy rate in human in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 1990;54,678-681
- Mansour R., Aboulghar M.: Optimizing the embryo transfer technique. *Human reproduction* 2002;17,1149-1153
- Martino A., Pollard JA., Leibo SP.: Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 503-512 (1996a)
- Martino A., Songsasen N., Leibo SP.: Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54, 1059-1069 (1996b)
- Massip A., Van Der Zwalmen P., Scheffen B., Ectors F.: some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim. Reprod. Sci.* 1989, 19,117-129
- Massip A.: Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. *Reprod Nutr Dev* 2003;43:325-30
- Mattos MRF., Silva TFP., Pereira BS., Uchoa DC., Cardoso RCS., Silva AR. Et al.: Embryo transfer in the cat: first success in Latin America. *Memorias de II Congresso Internacional de Medicina Felina (on cd-rom);2001 junho 14-17; Rio de Janeiro. Brasil. 2001. Available from: URL:<http://www.ncvonline.com.br>*
- Merlo B., Iacono E., Zambelli D., Prati F., Belluzzi S.: Effect of EGF on in vitro maturation of domestic cat oocytes. *Theriogenology* 2005;63:2032-9
- Merlo B., Iacono E., Ragazzini M., Zambelli D.: Cats blastocysts produced in vitro from oocytes vitrified using the cryloop technique and cryopreserved electroejaculated semen. *Theriogenology* 70 (2008) 126-130
- Murakami MK., Otoi T., Karja NWK., Ooka A., Suzuki T.: Effects of serum-free culture media on in vitro development of domestic cat embryos following in vitro maturation and fertilization. *Reprod. Dom Anim* 2002;37:352-356
- Murakami MK., Otoi T., Karja NWK., Wongsrikeao P., Agung B., Suzuki T.: Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. *Cryobiology* 2004;48:341-8
- Nelson KL., Crichton EG., Doty L., Volenec DE., Morato RG., Pope CE, et al. Heterologous and homologous fertilizing capacity of cryopreserved felid sperm: a model for endangered species. *Theriogenology* 1999;51:290 [abstract].
- Orosz SE., Morris PJ., Doody MC., Niemeyer GP., Cortelyou LEJ., Eaton NL., et al.: Stimulation of folliculogenesis in domestic cats with human FSH and LH. *Theriogenology* 1992;37:993-1004

- Palasz AT., Mapletoft RJ.: Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv.* 1996,14, 127-149
- Park KW, Iga K, Niwa K. Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop to blastocysts in a chemically-defined medium. *Theriogenology* 1997; 48:1127-1135.
- Pineda MH., Dooley MP., Martin PA.: Long term study on the effects of electroejaculation o seminal characteristics of the domestic cat. *Am. J. Vet. Re* 1984;45:1038-40
- Pineda MH., Dooley MP.: (1984) Effects of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. *Am. J. Vet. Res.* 45, 1520-1525
- Platz CC., Seager SWJ.: Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J Anim Vet Med Assoc* 1978; 173:1353-1355
- Pope CE., Turner JL., Quatman SP., Dresser BL.: Semen storage in the domestic felid : a comparison of cryopreservation methods and storage temperature. *Biol Reprod* 1991;44 (Suppl.1):117 [abstract]
- Pope CE., Keller GL., Dresser BL.: In vitro fertilization in domestic and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopreservation and successful intra- and interspecies embryo transfer. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 47 (1993), 189-201
- Pope CE., McRae MA., Plair BL., Dresser BL : Successful in vitro and in vivo development of in vitro fertilized two to four-cell cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology* 1994;42:513-525
- Pope CE., McRae M.A., Plair BL., Keller GL., Dresser BL.: In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *J. Rreprod. Fertil. Suppl.* 1997;51:69-82
- Pope CE., Johnson CA., McRae MA., Keller GL., Dresser BL. : Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Animal Reproduction Science* 53 (1998) 221-236
- Pope CE., Schmid R., Dresser BL. : In vitro development of cat embryos produced by in vitro fertilization is enhanced by addition of cysteine to the maturation medium and a reduced O<sub>2</sub> atmosphere. *Theriogenology* 1999;51:291(abstract).
- Pope CE, Gómez MC, Mikota SK., Dresser BL.: development of in vitro-produced African wildcat (*Felis sylvestris*) embryos after cryopreservation and transfer into domestic cat recipients. *Biol Reprod* 2000;62:321
- Pope C.E.: Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 53:163-174 (2000)
- Pope CE. : In vitro fertilization and embryo transfer in felids. In: Schatten H., editor. *Methods in molecular biology-germ cell protocols*, vol.2. *Molecular embryo analysis, live imaging, transgenesis and cloning.* Totowa, NJ: The Humana Press Inc.; 2004. p. 277-44
- Pope CE, Gómez MC, Dresser BL; In vitro production and transfer of cat embryos in the 21 st century. *Theriogenology* 66 (2006) 59-71
- Pukazhenth B., Spindler R., Wildt DE., Bush LM., Howard Jd.: Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. *Cryobiology* 2002;44:288-300
- Rall WF.: Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24, 387-402 (1987)
- Rall WF., Meyer TK.: Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology* 1989;31:683-692

- Rota A., Ström B., Linde-Forsberg C., Rodriguez-Martinez H.: Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 1997;47:1093-101
- Roth TL., Swanson WF., Wildt DE.: Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro. *Biol. Reprod.* 1994;51:441-51
- Roth TL., Wolfe BA., Long JA., Howard JG., Wildt DE.: Effects of equine chorionic gonadotropin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat. *Biol Reprod* 1997;57:65-71
- Scott P., Cats in Hafez ES, editors.: *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals.* Philadelphia: Lea and Febiger; 1970. p. 205
- Sekoni VO., Gustafsson BK., Mather EC.: Influence of wet fixation, staining techniques, and storage time on bull sperm morphology. *Nord Vet Med* 1981; 33:161-166
- Shin T., Kraemer D., Pryor J., Liu L., Rugila J., Howe L., Buck S., Murphy K., Lyons L., Westhusin M.: A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002;415:859
- Silva AR., Morato RG., Silva LDM.: The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Animal Reproduction Science* 81 (2004) 159-175
- Skrzyszowska M., Katska L., Rynska B., Kania G., Smorag Z., Pienkowski M.: In vitro developmental competence of domestic cat embryos after somatic cloning: a preliminary report. *Theriogenology* 2002;58:1615-1621
- Soika NJ., Jennings LL., Hamner CE.: (1970) Artificial insemination in the cat (*Felis Catus* L). *Lab. Anim. Care* 20, 198-204
- Spindler RE., Wildt DE.: Relationship of substrate metabolism to cat oocyte maturation. *Theriogenology* 1999;51:295(abstr.)
- Spindler RE., Pukazhenthil BS., Wildt DE.: Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 2000;56:163-171
- Spindler RE., Wildt DE.: Quality and age of companion felid embryos modulate enhanced development by group culture. *Biol. Reprod.* 2002;66:167-173
- Swanson WF., Godke RA.: Transcervical embryo transfer in the domestic cat. *Lab. Anim. Sci.* 1994;44:288-291
- Swanson WF., Roth TL., Godke RA.: Persistence of the developmental block of in vitro fertilized domestic cat embryos to temporal variations in culture conditions. *Mol. Reprod. Dev.* 1996;43:298-305
- Swanson WF., Penfold LM., Wildt DE.: Developmental capacity of IVF-derived domestic cat embryos following transfer to naturally-estrous, GnRH-treated recipients. *Theriogenology* 1998;49:267
- Swanson WF., McRae MA., Wildt DE., Rall WF.: Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF-derived domestic cat embryos after embryo transfer. *Theriogenology* 1999;51:174
- Tanaka A., Kuwabara S., Takagi Y., Nakagawa K., Fujimoto Y., Murai M., et al: Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 2000;62:1157-61
- Takaya A.: A study on superovulation and embryo development in the domestic cat. *Jpn J. Vet. Res.* 1989;37:132
- Tebet JM., Martins MIM., Chirinea Vh., Souza FF., Campagnol D., Lopes MD.: Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 66 (2006) 1629-1632
- Tervit HR., Whittingham DG., Rowson LEA.: Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Repro. Fertil* 1972;30:493-7

- Tsutsui T., Sato M., Kuroawa N., Hattori I., Matsunaga H., Murao I, et al.: Embryo transfer in the cat during the non-breeding season. *Jap. J. Vet. Sci.* 1989;51:871-877
- Tsujioka T., Otzdorff C., Braun J., Hochi S.: Effect of post-IVF developmental kinetics on in vitro survival of vitrified-warmed domestic cat blastocysts. *Reprod. Dom. Anim* 43,323-327 (2008)
- Urmar B., Yakin K., Balaban B.: Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. A. General considerations and treatment options that may benefit the couple. *Reprod Biomed Online* 2005a;11,371-381
- Urmar B., Yakin K., Balaban B.: Recurrent implantation failure in assisted reproduction: how to counsel and manage. B. Treatment options that have not been proven to benefit the couple. *Reprod Biomed Online* 2005b;11,382-391
- Van der Elst J.: Oocyte freezing: here to stay? *Hum Reprod Update* 2003;9:943-70
- Verstegen JP., Onclin K., Silva LDM., Donnay I., Mettens P., Ectors F.: Superovulation and embryo in vitro culture following treatment with ultra-pure follicle-stimulating hormone in cats. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1993;47:209-218
- Watson PF., Glover TE.: Vaginal anatomy of the domestic cat (*Felis catus*) in relation to copulation and artificial insemination. *J. Reprod. Fertil* 1993,47,355-359
- Wilmut I., Schnieke AE., Whir J., Kind AJ., Campbell KHS.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813
- Wolfe BA, Wildt DE.: Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. *J Reprod Fertil* 1996;106:135-41
- Wood TC., Byers AP., Jennette BE., Wildt DE.: Influence of protein and hormone supplementation on in vitro maturation and fertilization of domestic cat eggs. *J. Reprod. Fertil.* 1995;104:315-323
- Wood TC., Wildt DE.: Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. *J. Reprod. Fertil* 1997;110.355-360
- Wood TC., Montali RJ., Wildt DE.: Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev* 1997;46:190-200
- Vajta G.: Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science* 60-61 (2000) 357-364
- Yin XJ., EG., Lee HS., Seo YI., Jeon SJ., Choi EG., Cho SJ., Cho SG., Min W., Kang SK., Hwang WS., Kong IK.: cats cloned from fetal and adult somatic cells by nuclear transfer. *Reproduction* (2005) 129 245-249
- Zambelli D., Bergonzoni ML., De Fanti C., Carluccio A.: Tecniche per la valutazione morfologica degli spermatozoi di gatto, cane e coniglio. *Atti XLVII Congresso S.I.S.Vet. Riccione* 279-283 (1993).
- Zambelli D.: Studio della morfologia e della conservabilità del materiale seminale di gatto e dei parametri fisiologici riproduttivi nella femmina per l'applicazione dell'inseminazione artificiale. *Tesi Dottorato di Ricerca (Università degli studi di Perugia)*(1994).
- Zambelli D., Castagnetti C.: Transcervical insemination with fresh or frozen semen in the domestic cat: new technique and preliminary results: In: *Proceedings of the fifth annual conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (EDSAR), 2001.* p.34.
- Zambelli D., Belluzzi S.: Raccolta e valutazione del materiale seminale di gatto. *Praxis vet.* N. 1/1998 pp 20-22
- Zambelli D., Caneppele C., Castagnetti C. and Belluzzi S.: Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Dom Anim* 37, 310-313 (2002)

Zambelli D., Buccioli M., Castagnetti C., Belluzzi S.: Vaginal cervical anatomic modification during the oestrus cycle in relation to transcervical catheterization in the domestic cat. *Reprod. Dom. Anim* 2004;39:76-80

Zambelli D., Cunto M.: Vaginal and cervical modifications during the estrus cycle in the domestic cat. *Theriogenology* 64(2005a)679-684

Zambelli D., Cunto M.: Transcervical artificial insemination in the cat. *Theriogenology* 64(2005b)698-705

Zambelli D., Merlo B., Iacono E., Prati F., and Belluzzi S.: Fertilizing ability of electro-ejaculated cryopreserved semen in the domestic cat. *Reprod Dom Anim* 41, 137-141 (2006)

Zambelli D., Cunto M.: Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology* 66 (2006) 159-165

Zambelli D., Prati F., Cunto M., Iacono E., Merlo B.: Qualità and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidina administration. *Theriogenology* 69 (2008) 485-490

Zeron Y., Pearl M., Borochoy A., Aray A.: Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* 38, 35-42 (1999)