

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dipartimento Clinico Veterinario

Direttore: Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini

Dottorato di Ricerca in

“Clinica e Terapia d’Urgenza Veterinaria”

XIX Ciclo

Settore Scientifico Disciplinare VET 10

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Lorenzo Masetti

**POSSIBILITÀ DI MIGLIORAMENTO
DELLE TECNICHE DI RIPRODUZIONE
ASSISTITA NEGLI ANIMALI DOMESTICI**

**Tesi di Dottorato della
Dott.ssa Barbara Merlo**

**Relatore:
Chiar.mo Prof. Gaetano Mari**

Anno 2007

INDICE

Introduzione	p. 4
---------------------	------

PARTE COMPILATIVA

Tecniche di riproduzione assistita negli animali domestici	p. 7
---	------

Bovino	p. 9
--------	------

Cavallo	p. 14
---------	-------

Gatto	p. 18
-------	-------

Cane	p. 21
------	-------

PARTE SPERIMENTALE

Bovino

1 Maturazione <i>in vitro</i> di oociti in TCM199 o SOF	p. 25
--	-------

2 Effetto dell'aggiunta di P4 ed EGF al terreno di coltura per embrioni allo stadio di 8 cellule prodotti <i>in vitro</i> in assenza di siero	p. 31
--	-------

3 Vittrificazione di blastocisti in paillette o in cryoloop	p. 36
--	-------

Cavallo

4 Produzione <i>in vitro</i> di embrioni a partire da oociti vittrificati prima e dopo IVM e fertilizzati mediante ICSI	p. 43
--	-------

Gatto

5 Effetto dell'EGF sulla maturazione nucleare e citoplasmatica di oociti	p. 49
---	-------

6 Produzione <i>in vitro</i> di blastocisti di sesso predeterminato impiegando seme sessato	p. 57
--	-------

7 Blastocisti prodotte <i>in vitro</i> a partire da oociti vittrificati	p. 66
--	-------

Cane

8 Maturazione <i>in vitro</i> di oociti in SOF addizionato con E2 e P4	p. 72
---	-------

BIBLIOGRAFIA	p. 77
---------------------	-------

ABBREVIAZIONI

aa = amino acidi

BSA = Bovine Serum Albumine (albumina sierica bovina)

DPBS = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (salina con tampone fosfato secondo Dulbecco)

E2 = 17- β estradiolo

EGF = Epidermal Growth Factor (fattore di crescita epidermico)

EGF-R = Epidermal Growth Factor-Receptor (recettore per il fattore di crescita epidermico)

ET = Embryo Transfer

FBS/FCS = Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum (siero fetale bovino)

FISH = Fluorescent *In Situ* Hybridization (ibridazione *in situ* fluorescente)

FSH = Follicle Stimulating Hormone (ormone follicolo stimolante)

GIFT = Gamete Intrafallopian Transfer (trasferimento intratubarico dei gameti)

GV = Germinal Vesicle (vescicola germinale)

GVBD = Germinal Vesicle Break Down (rottura della vescicola germinale)

HSOF = Hapes Synthetic Oviductal Fluid (fluido sintetico di ovidotto tamponato con Hapes)

IA = Inseminazione Artificiale

ITS = Insulina-Transferrina-Selenio

IVC = *in vitro* colture (coltura *in vitro*)

IVEP = *In Vitro* Embryo Production (produzione embrionale *in vitro*)

IVF = *In Vitro* Fertilization (fertilizzazione *in vitro*)

IVM = *In Vitro* Maturation (maturazione *in vitro*)

LH = Luteinizing Hormone (ormone luteinizzante)

MI = Metafase I

MII = Metafase II

MOET = Multiple Ovulation and Embryo Transfer (ovulazione multipla ed embryo transfer)

NT = Nuclear Transfer (trasferimento nucleare)

OPU = Ovum Pick Up (prelievo di oociti)

OT = Oocyte Transfer (trasferimento di oocita)

OPS = Open Pulled Straw

P4 = progesterone

PBS = Phosphate Buffered Saline (salina con tampone fosfato)

PCR = Polymerase Chain Reaction (reazione a catena della polimerasi)

PHE = Penicillamine-Hypotaurine-Epinephrine (penicillamina-ipotaurina-epinefrina)

SO = Superovulazione

SOF = Synthetic Oviductal Fluid (fluido sintetico di ovidotto)

TALP = Tyrode's Albumine Lactate Pyruvate (salina con albumina, lattato e piruvato secondo Tyrode)

TCM199 = Tissue Culture Medium 199 (terreno per coltura tissutale 199)

ZP = Zona Pellucida

INTRODUZIONE

Le tecniche di riproduzione assistita negli animali domestici hanno avuto, negli ultimi decenni, un notevole sviluppo sino ad arrivare alla clonazione, con la quale è possibile duplicare un individuo. Tuttavia, il livello di efficienza di alcune di queste tecnologie non è ancora soddisfacente, con ampie variabilità in relazione anche alla specie animale presa in considerazione.

La ricerca svolta nel triennio di Dottorato, e presentata qui di seguito, ha avuto come obiettivo il miglioramento delle tecniche di riproduzione assistita impiegate nel bovino, cavallo, gatto e cane, cercando di superare alcuni dei punti critici che le diverse tecnologie prese in esame presentano nelle suddette specie.

In particolare, nel bovino, dove la produzione di embrioni *in vitro* riveste notevole importanza dal punto di vista commerciale, l'attenzione è stata focalizzata sull'ottenimento *in vitro* di embrioni di buona qualità impiegando sistemi di coltura privi di siero, e sull'efficienza della vitrificazione per la crioconservazione di blastocisti.

Nel cavallo, dove la possibilità di disporre di oociti maturi è limitata, è stata valutata la possibilità di produrre *in vitro* embrioni a partire da oociti immaturi vitrificati prima e dopo IVM e fertilizzati mediante ICSI.

Nel gatto, che riveste notevole importanza come modello sperimentale per le specie feline in via di estinzione, è stato esaminato l'effetto dell'aggiunta di EGF al terreno da IVM per poter aumentare l'efficienza della maturazione *in vitro*, inoltre è stata valutata la possibilità di produrre embrioni *in vitro* impiegando seme sessato o utilizzando oociti vitrificati.

Nel cane, dove la maturazione *in vitro* rappresenta un grosso limite allo sviluppo di tutte le altre biotecnologie, è stato valutato un protocollo di IVM in presenza di E2 e P4 sia in un sistema standard (per 72 h in un terreno con una concentrazione ormonale fissa), che sequenziale (in un terreno con tre diverse concentrazioni ormonali rinnovato ogni 24 h).

PARTE COMPILATIVA

LA RIPRODUZIONE ASSISTITA NEGLI ANIMALI DOMESTICI

Allo scopo di ottenere una progenie numerosa da animali geneticamente superiori, da soggetti con fertilità ridotta o compromessa o da animali appartenenti a specie a rischio di estinzione, sono state sviluppate e perfezionate varie tecniche di riproduzione assistita, tra le quale le principali sono:

- l’Inseminazione Artificiale,
- la crioconservazione di gameti ed embrioni,
- la superovulazione e l’embryo transfer (produzione di embrioni *in vivo*),
- la maturazione-fertilizzazione-coltura *in vitro* (produzione di embrioni *in vitro*),
- il sessaggio degli spermatozoi e degli embrioni,
- il trasferimento nucleare o clonazione.

L’Inseminazione Artificiale è stata impiegata, per oltre 200 anni, principalmente per motivi sanitari e al fine di ottenere prole da maschi geneticamente superiori. I miglioramenti ottenuti nei metodi di congelamento e stoccaggio del seme hanno permesso la diffusione dell’IA in tutto il mondo.

Parimenti alla crioconservazione del seme, il congelamento embrionale ha favorito la diffusione di animali con alte qualità genetiche; lo sviluppo dell’ET ha consentito di ottenere un maggior numero di nati da femmine geneticamente superiori. A seconda della specie, gli embrioni fertilizzati possono essere recuperati dalle donatrici mediante tecniche chirurgiche o non. Tali embrioni vengono poi trasferiti in riceventi di minore valore genetico. Per aumentare il numero di embrioni recuperabili da animali di valore, la donatrice viene solitamente trattata con un regime ormonale tale da indurre ovulazioni multiple (superovulazione).

In alternativa alla raccolta di embrioni *in vivo* da animali donatori, sono stati recentemente sviluppati dei metodi per produrre embrioni *in vitro*. Oociti immaturi possono essere recuperati dalle ovaie di animali infertili o anziani, da soggettmacellati o deceduti, o dalle normali donatrici di embrioni. Una volta rimossi dall’ovaio, gli oociti vengono maturati, fertilizzati e coltivati *in vitro* fino a quando non raggiungono uno stadio idoneo per il trasferimento o il congelamento.

Al fine di aumentare i vantaggi produttivi nell'allevamento di animali da reddito, sono state anche messe a punto delle metodiche che permettono di effettuare il sessaggio degli spermatozoi o degli embrioni in modo da poter controllare il sesso dei nascituri. Impiegando un colorante specifico che si lega al DNA (Hoechst 33342) e un citofluorimetro, è possibile misurare il contenuto di DNA dei singoli spermatozoi e quindi separare quelli contenenti il cromosoma Y da quelli contenenti il cromosoma X, essendo questi ultimi caratterizzati da un maggior contenuto in DNA. Sebbene il processo di sortaggio degli spermatozoi sia lento (circa 10 milioni di spermatozoi vivi/ora), questa procedura determina il sesso con un'accuratezza pari a circa il 95%.

Infine, sin da metà degli anni 80, è stata sviluppata una tecnologia che permette di trasferire il nucleo da un blastomero (cellula presumibilmente indifferenziata prelevata da embrioni ad uno stadio di sviluppo precoce) o da una cellula somatica (fibroblasti, cellule cutanee, cardiache, nervose o altre cellule corporee) in un oocita enucleato (oocita non fertilizzato a cui è stato rimosso il nucleo). Tale 'trasferimento nucleare' consente la produzione di molte copie di animali identici ad altri (animali transgenici, animali geneticamente superiori, ecc). Attualmente, il trasferimento nucleare di cellule somatiche è stato utilizzato per la clonazione di bovini, pecore, maiali, capre, cavalli, muli, gatti, conigli, ratti, topi e cani.

La tecnica di clonazione comprende la coltura di cellule somatiche da un tessuto appropriato (fibroblasti) dell'animale che deve essere clonato. I nuclei delle cellule somatiche vengono quindi iniettati in un oocita enucleato ottenuto da un altro individuo della stessa specie o di una specie affine. Attraverso un processo che non è ancora del tutto chiarito, il nucleo della cellula somatica viene riprogrammato in modo che l'espressione genica sia adatta per dirigere il normale sviluppo dell'embrione. Dopo coltura e sviluppo *in vitro*, gli embrioni vengono trasferiti in un animale ricevente che porta a termine la gravidanza. La percentuale di successo per la propagazione di animali mediante NT è spesso inferiore al 10% e ciò dipende da molti fattori, tra cui la specie, la fonte di oociti riceventi, il tipo cellulare da cui deriva il nucleo, il trattamento delle cellule donatrici prima del trasferimento nucleare e le tecniche usate per il trasferimento stesso.

Bovino

La IA nel bovino è una pratica oramai diffusa e impiegata di routine. Dopo il perfezionamento delle tecniche di congelamento del seme, è stato possibile stoccare e spedire materiale seminale di tori di elevato valore genetico ovunque fosse richiesto (Polge et al, 1949; Smith e Polge, 1950; Nagase et al., 1964). La IA ha aumentato il progresso genetico in linea maschile con la creazione di tori d'élite, selezionati attraverso i progeny test. Il contributo femminile al progresso genetico è stato invece ottenuto con l'ET non chirurgico (Elsden et al., 1976) e la maturazione *in vitro* (Leibfried e First, 1979), fertilizzazione e coltura degli oociti bovini (Brackett et al., 1982; Brackett, 1983; Eppig e Schroeder, 1986; Kane, 1987; Leibfried-Rutledge et al., 1987; Leibfried-Rutledge et al., 1989).

Nel 1951 è nato il primo vitello da ET chirurgico di un embrione di 5 giorni prelevato alla macellazione (Willet et al., 1951). Successivamente è stata sviluppata la tecnologia attualmente impiegata in ambito commerciale (rivisto da Betteridge, 2003). Le prime tecniche di ET descritte erano non chirurgiche (Rowson e Dowling, 1949), ma lo scarso successo ottenuto ha portato al recupero e trasferimento chirurgico degli embrioni, limitato però dalle difficoltà che una procedura chirurgica impone. Nei primi anni 80 furono perfezionate ed adottate le tecniche di ET non chirurgico (Rowe et al., 1980; Wright, 1981), permettendo così che l'ET fosse praticabile in allevamento.

Per parecchi anni, l'impiego più comune dell'ET nei programmi di riproduzione animale è stato la proliferazione del cosiddetto fenotipo desiderabile. Poi, nel 1987, fu introdotto il concetto di ovulazione multipla ed embryo transfer (Smith, 1988a, 1988b). I programmi di MOET apportarono un aumento della intensità di selezione, riducendo gli intervalli generazionali e incrementando il progresso genetico. Il successo dei programmi di MOET ha portato all'impiego di questa tecnologia per testare geneticamente i tori da IA (Lohuis, 1995). Bovine selezionate vengono superovulate e inseminate con tori altamente selezionati. La progenie maschile è messa in attesa mentre quella femminile entra in produzione, i tori vengono quindi testati dai dati produttivi delle sorelle e non delle figlie (Smith e Ruane, 1987). Con questo approccio è possibile testare geneticamente un toro in tre anni e mezzo, rispetto ai cinque e mezzo usando gli schemi dei tradizionali progeny test. Anche se l'accuratezza può essere stata ridotta, i minori intervalli generazionali apportano un maggiore progresso genetico. Tuttavia, la fisiologia risulta un fattore

limitante, in quanto i risultati superovulatori rendono difficoltoso produrre il numero desiderato di prole per i test genetici (Mapletoft e Hasler, 2005). In media è possibile recuperare da 4 a 6 embrioni trasferibili, ma il risultato del trattamento è molto variabile: un terzo delle donatrici trattate non risponde alla SO, un altro terzo produce una media che va da 1 a 3 embrioni e solo un terzo superovula realmente dando un buon numero di embrioni (Boland et al., 1991).

Il congelamento degli embrioni, come quello del seme, ha consentito la commercializzazione di bovini di alto valore genetico in tutto il mondo (Wilmot e Rowson, 1973; Leibo e Mazur, 1978; Mazur, 1980; Lehn-Jensen, 1984; Leibo, 1984; Callensen et al., 1987; Massip et al., 1987; Leibo, 1988; Niemann, 1991; Rall, 1992; Voelkel e Hu, 1992). Lo sviluppo di metodiche di congelamento efficaci ha reso l'ET una tecnologia più efficiente, che non necessita più della disponibilità immediata di riceventi. La crioconservazione embrionale è oramai una tecnica comune e le percentuali di gravidanza da embrioni congelati sono solo di poco inferiori a quelle ottenute con embrioni freschi (Leibo e Mapletoft, 1998). Il recente impiego di crioprotettori ad alta permeabilità, come il glicole etilenico, ha permesso il trasferimento diretto di embrioni bovini (Voelkel e Hu, 1992; Hasler et al., 1997). Con questo approccio la paillette contenente l'embrione viene scongelata in acqua, come avviene per il seme, e il contenuto viene depositato direttamente nell'utero della ricevente, proprio come avviene nella IA. Non è quindi necessario l'impiego di un microscopio o complicate procedure di diluizione; l'embrione rilascia i crioprotettori prima nella paillette e poi nell'utero, senza subire stress osmotico.

Le procedure di congelamento embrionale tradizionale richiedono tempo e necessitano dell'impiego di congelatori e di un microscopio; tali operazioni potrebbero presto essere rimpiazzate dalla relativamente semplice tecnica di vitrificazione (Rall e Fahy, 1985). Con la vitrificazione vengono utilizzate elevate concentrazioni di crioprotettori e l'embrione nella soluzione di vitrificazione viene immerso direttamente nell'azoto liquido. Come conseguenza delle alte concentrazioni di crioprotettori e del metodo ultrarapido di congelamento, non si formano cristalli di ghiaccio. Essendo la formazione dei cristalli di ghiaccio uno dei fattori più dannosi del processo di congelamento, la vitrificazione ha molto da offrire nella crioconservazione di oociti ed embrioni prodotti *in vitro*; il grosso vantaggio è dato comunque dalla sua semplicità. Attualmente la vitrificazione è ampiamente utilizzata sperimentalmente e i recenti risultati suggeriscono che gli embrioni

bovini possano essere vitrificati in paillette da 0.25 ml per il trasferimento diretto (Wagtendonk-de Leeuw et al., 2000).

Un sistema alternativo al MOET per la produzione di embrioni bovini è quello di utilizzare oociti immaturi recuperati dalle ovaie di donatrici di varie età e stato fisiologico (Galli e Lazzari, 1996). Procedure affidabili consentono la maturazione e la fertilizzazione *in vitro* degli oociti bovini e possono essere impiegati parecchi protocolli di coltura per farli crescere sino allo stadio adatto per il trasferimento o il congelamento. L'IVEP comporta il completamento di 3 step biologici che, nel bovino, sono ben definiti ed efficienti: IVM, IVF e IVC (Ward et al., 2002).

Gli oociti per l'IVM possono essere recuperati da diversi tipi di donatrici e con diversi metodi. Essendo gli oociti molto sensibili allo shock termico, è importante monitorare attentamente la temperatura durante le procedure di raccolta. Le condizioni di maturazione adottate dalla maggior parte dei laboratori implicano l'uso di TCM199 supplementato con il 10% di FCS e gonadotropine (FSH, LH) in aria al 5% di CO₂ a 38.5°C. Dopo 20-24 h di incubazione gli oociti completano la maturazione con l'estrusione del primo globulo polare e sono pronti per essere fertilizzati. In condizioni ottimali oltre il 90% degli oociti raggiungono la MII. Prima della fertilizzazione le cellule del cumulo vengono parzialmente rimosse lasciando solo pochi strati di cellule della corona radiata attorno all'oocita (Galli et al., 2003a).

Per l'IVF viene sempre impiegato seme congelato che, subito dopo scongelamento, viene centrifugato su un gradiente discontinuo per l'isolamento della frazione spermatica motile (Galli e Lazzari, 1996), anche se possono essere utilizzati altri sistemi di separazione (swim-up, semplice centrifugazione). I due terreni generalmente impiegati per l'IVF sono il TALP o il SOF, entrambi con glucosio e concentrazioni variabili di eparina. L'IVF implica 18-20 h di co-coltura tra sperma ed oociti; a questo punto gli oociti vengono completamente denudati e trasferiti nel sistema di coltura embrionale (Galli et al., 2003a).

La coltura va dallo sviluppo dell'oocita fertilizzato sino allo stadio di blastocisti. I protocolli sono numerosi e comprendono vari sistemi tra cui la co-coltura cellulare (Eyestone e First, 1989; Hasler et al., 1995; Carnegie et al., 1997), terreni semi-definiti come il SOF (Tervit et al., 1972; Gardner et al., 1994) o il CR1 (Rosenkrans e First, 1994) o procedure di coltura *in vivo* nell'ovidotto di pecora (Eyestone et al., 1987; Galli e Lazzari, 1996). Solitamente al sesto giorno di coltura gli embrioni raggiungono la

compattazione e al settimo giorno si effettua la selezione di quelli destinati al trasferimento o al congelamento.

La tecnica più flessibile e ripetibile per produrre embrioni da donatrici vive è l'ovum pick up o aspirazione follicolare ecoguidata (Hasler et al., 1995; Bousquet et al., 1999; Galli et al., 2001). Teoricamente può essere considerata una donatrice qualsiasi femmina a partire da pochi mesi di età fino al terzo mese di gravidanza ed anche subito dopo il parto (2-3 settimane) (Hasler et al., 1995). Il protocollo che prevede due sedute di OPU a settimana è quello che ha dato i migliori risultati (Garcia e Salaheddine 1998; Hagemann et al., 1999; Goodhand et al., 1999).

Oltre alla produzione di embrioni da donatrici *in vivo*, l'IVEP permette il salvataggio genetico di animali di valore dopo macellazione per morte improvvisa o per il controllo di malattie infettive (Hasler, 2003). L'IVM è anche impiegata per produrre embrioni a scopi di ricerca (Gordon e Lu, 1990), inclusa la produzione di cellule staminali embrionali.

La maturazione dell'ovocita e le tecniche di coltura embrionale sono inoltre parte integrante delle procedure di clonazione mediante NT di cellule somatiche e di procedure per ottenere di vacche transgeniche che producano latte contenete proteine ad alto valore farmaceutico (Niemann e Kues, 2003).

La fecondazione *in vitro* mediante ICSI, fondamentale nella riproduzione assistita umana, è effettuabile nel bovino, anche con sperma liofilizzato (Keskintepe et al., 2002), ma non è ancora ampiamente applicata.

La determinazione del sesso degli embrioni bovini prima dell'impianto, usando la PCR, è, attualmente, un servizio offerto in maniera limitata (Thibier e Nibart, 1995). La rimozione della biopsia dall'embrione richiede un livello elevato di capacità dell'operatore e la tecnica bioptica risulta invasiva in quanto viene danneggiata la ZP e si riduce la vitalità embrionale. Sia la biopsia embrionale che la PCR richiedono un livello igienico e attenzioni più alte di quanto spesso non sia praticato con l'ET in campo.

La tecnologia di citofluorimetria impiegata per la separazione degli spermatozoi X e Y è stata migliorata durante gli ultimi 10 anni (Johnson et al., 1994; Johnson, 2000). Gli svantaggi che tale tecnica presenta sono la lenta velocità di sortaggio, la diminuita vitalità (percentuali di gravidanza) dello sperma, il costo del seme e la disponibilità di seme da tori specifici (Amann, 1999). È probabile che il seme sessato troverà maggiore impiego nella produzione di embrioni bovini *in vitro*.

Un modo per ottenere vitelli identici è l'impiego dell'embryo splitting, ovvero un embrione può essere diviso in due o più parti prima del trasferimento per produrre gemelli identici. Le percentuali di gravidanza da trasferimento di embrioni splittati sono del 50% o più, portando ad una percentuale di gravidanza netta per l'embrione originale superiore al 100% (Gray et al., 1991). Anche la clonazione può essere usata per produrre prole identica (Bondioli et al., 1990).

Con la capacità di produrre embrioni *in vitro* ed ottenere gravidanze (Lu et al., 1987; Xu et al., 1987; Goto et al., 1988; Fukuda et al., 1990), è stata possibile la manipolazione genetica degli embrioni e del DNA. La prima clonazione embrionale fu riportata da Willadsen nel 1986. La nascita del primo vitello da NT risale al 1987 (Prather et al., 1987). Con la nascita di agnelli clonati da cellule embrionali (Campbell et al., 1996) e della pecora 'Dolly', clonata a partire da cellule somatiche adulte (Wilmut et al., 1997), sono state numerose le ricerche effettuate nel campo della clonazione in diverse specie animali. Nel bovino sono stati prodotti cloni a partire da fibroblasti fetali, cellule del cumulo e dell'ovidotto, cellule della granulosa, fibroblasti cutanei e cellule muscolari (rivisto da Hasler, 2003). Il NT da cellule somatiche adulte è stato anche usato per preservare l'ultimo esemplare di una razza bovina in estinzione (Wells et al., 1999) e fibroblasti prelevati da un toro di 21 anni sono stati utilizzati con successo per produrre un vitello clonato (Hill et al., 2000). Purtroppo la clonazione permette di ottenere percentuali limitate di embrioni, le percentuali di gravidanza sono basse e anche la sopravvivenza dei vitelli è scarsa (Farin et al., 1999; Kruip e den Daas, 1997; Wagtendonk-de Leeuw et al., 2000; Young et al., 1998), quindi l'uso di questa tecnologia per la moltiplicazione su larga scala di bovini d'élite è strettamente correlata al miglioramento della sua efficienza (Gurdon e Colman, 1999; Westhusin et al., 2001; Renard et al., 2002). Un ulteriore limite è rappresentato dal fatto che non è permesso l'utilizzo di materiale seminale proveniente da tori clonati.

L'uso di cellule somatiche coltivate per produrre cloni permette di poter modificare geneticamente tali cellule (Cibelli et al., 1998). La transfezione ha largamente rimpiazzato la tecnica inefficiente di microiniezione pro-nucleare, impiegata nei primi anni di produzione di animali transgenici. Con la transfezione è possibile ottenere cellule transgeniche con sequenze di DNA relativamente corte; ciò nonostante, sequenze più lunghe, che incorporano geni grandi e complessi, sono state incorporate con successo in cromosomi artificiali umani, che sono stati poi introdotti in fibroblasti bovini e, da ultimo,

in cloni bovini (Robl et al., 2003). Le tecnologie transgeniche potrebbero inoltre essere usate per la produzione di linee clonali di embrioni geneticamente modificati (Wall, 1996; Stice et al., 1998; Brink et al., 2000; Niemann e Kues, 2003; Robl et al., 2003) per migliorare l'efficienza produttiva di carne o latte, modificare la composizione del latte, aumentare la resistenza alle malattie.

Cavallo

Sembra che il cavallo sia stato, nel 1322, il primo animale su cui sia stata praticata con successo l'IA (Bowen, 1969). La prima documentazione di raccolta del seme da uno stallone e IA di alcune cavalle risale al 1898 (Heape, 1898); successivamente la fecondazione artificiale nel cavallo si è diffusa su larga scala in tutto il mondo. Attualmente il seme viene raccolto di routine dagli stalloni della maggior parte delle razze (non il Purosangue, dove l'IA è vietata) per l'impiego come seme fresco diluito, refrigerato o congelato. Mentre l'inseminazione con seme fresco o refrigerato sono predominanti, l'impiego di seme congelato ha una minore diffusione.

Il seme fresco diluito viene impiegato il giorno stesso, solitamente quando fattrici e stallone sono nello stesso centro. La dose ottimale di seme per l'IA convenzionale nel corpo dell'utero è costituita da $300-500 \times 10^6$ spermatozoi con una motilità progressiva $>60\%$ in un volume totale di 5-10 ml (Allen, 2005).

Il seme della maggior parte degli stalloni è in grado di sopravvivere alla refrigerazione a 4°C e mantenere un buon livello di fertilità per 48-72 h se mantenuto a tale temperatura (Batallier et al., 2001). La possibilità di impiegare seme refrigerato ha trovato largo impiego in quanto permette di trasportare il seme in luoghi anche molto distanti. Ciò consente di evitare il trasporto delle fattrici e amplia notevolmente il numero di stalloni disponibili.

Una situazione simile si poteva verificare per l'utilizzo di seme equino congelato, ma le inferiori percentuali di successo ne hanno limitato l'impiego. C'è infatti una notevole variabilità nella congelabilità del seme dei singoli stalloni; sembra che queste differenze siano di natura genetica e non correlate con la fertilità dello stallone.

Nel seme del 30-40% degli stalloni dove il congelamento ha successo, si possono ottenere post-scongelo una motilità progressiva e totale rispettivamente di circa il 40-60% e

>70%, con percentuali di concepimento per ciclo del 60-75% in cavalle inseminate con >300 x 10⁶ di spermatozoi motili dopo scongelamento. Ma, nel seme del 30-40% degli stalloni dove il congelamento non ha successo, accade spesso che la percentuale di motilità progressiva post-scongelamento sia inferiore al 10-15% e ciò comporta un imponente riduzione delle percentuali di concepimento per ciclo (<30%) con conseguente non commerciabilità di tale seme (Allen, 2005). L'altro grosso problema dell'impiego di seme congelato è la sua ridotta sopravvivenza nel tratto riproduttivo della fattrice, dovuta molto probabilmente alla prematura induzione della reazione acrosomiale nella maggior parte degli spermatozoi, causata sia dalla necessità di centrifugare il seme per la separazione dal plasma seminale prima dell'aggiunta del diluente per il congelamento (Morris et al., 2003), che al processo di congelamento stesso; questo implica che l'IA debba essere effettuata il più vicino possibile all'ovulazione ed è quindi necessario un monitoraggio più stretto della maturazione follicolare.

L'uso della videoendoscopia ha recentemente permesso un passo avanti nel campo della IA, con importanti implicazioni pratiche. Con tale metodica è possibile inseminare la cavalla utilizzando un volume minimo di seme o di spermatozoi lavati (80-120 µl) depositato direttamente nella papilla uterotubarica all'apice del corno ipsilaterale al follicolo preovulatorio (Morris et al., 2000). Avendo gli spermatozoi accesso diretto all'ovidotto, il loro numero può essere notevolmente ridotto, sino a 1 milione, prima che la percentuale di concepimento per ciclo inizi a scendere al di sotto del 60% (Morris et al., 2000). Tale tecnica, quindi, può essere impiegata quando si vuole minimizzare la dose di seme da utilizzare ma, soprattutto, risulta fondamentale per l'impiego di spermatozoi sessati.

Prove preliminari per il sessaggio di seme equino hanno dato risultati incoraggianti impiegando per l'IA spermatozoi sessati freschi o congelati, con percentuali di concepimento per ciclo variabili dal 20 al 60% e un'accuratezza del 94-96% in termini di selezione del sesso (Lindsey et al., 2001; 2002a; 2002b). Il limite di tale metodo rimane comunque la velocità massima di sortaggio in rapporto al mantenimento di una vitalità e fertilità ragionevoli degli spermatozoi. L'attuale limite sembra essere 20 x 10⁶ spermatozoi/h per un periodo di 2-2.5 h, dando una dose massima di 40-50 x 10⁶ spermatozoi sessati per eiaculato. Tale dose richiede necessariamente una tecnica di

inseminazione a basso dosaggio, che può essere effettuata mediante metodo videoendoscopico o mediante la tecnica manuale profonda (Petersen et al., 2002).

Rispetto al bovino, l'ET nell'equino ha avuto un lento sviluppo negli anni 70 e 80, sia per le restrizioni dei registri di molte razze, sia per le limitazioni incontrate in tale specie nell'induzione della superovulazione, che per le basse percentuali di gravidanza dopo ET (Allen e Rowson, 1975; Squires et al., 1985). Tuttavia, negli anni 90, la tecnica si è diffusa nei cavalli da polo in Argentina (Pashen et al., 1993; Riera e McDonough 1993) e attualmente si è diffusa anche in America ed Europa, soprattutto in seguito alla rimozione di limiti imposti dalle associazioni di allevatori di Quarter Horse (Hudson e McCue, 2004). Unitamente a ciò, anche le percentuali di gravidanza dopo ET non chirurgico sono aumentate parallelamente all'esperienza degli operatori e alla maggiore attenzione nella manipolazione degli embrioni durante il recupero e il trasferimento (Squires, 1999; Jasko, 2002). Di recente, inoltre, è diventato possibile anche duplicare il numero di embrioni recuperabili mediante SO con FSH da estratto ipofisario equino (Alvarenga et al., 2001).

Anche nel cavallo la possibilità di splittare un embrione per produrre due o più puledri identici ha trovato interesse sia in ambito scientifico che pratico, nel primo caso per la produzione di animali da ricerca con la stessa identità genetica (e quindi immunologica), nel secondo caso per poter duplicare la percentuale di recupero embrionale ovviando alla scarsa risposta delle fattrici alla SO. I primi puledri prodotti da embryo splitting risalgono al 1984 (Allen e Pashen, 1984).

La possibilità di mantenere refrigerati a 5°C gli embrioni equini, ha permesso di poter effettuare l'ET in cavalle riceventi situate in stazioni centralizzate lontane dal luogo di prelievo dell'embrione dalla donatrice (Carnevale et al., 1987), senza grosse differenze nelle percentuali di gravidanza tra embrioni freschi e refrigerati (Carney et al., 1991). Per quanto riguarda il congelamento embrionale, invece, i protocolli usati nel bovino e riadattati per il cavallo, hanno portato a percentuali di successo inferiori al 50%. È stato osservato, però, che tali percentuali erano maggiori per embrioni <300 µm di diametro, portando all'ipotesi che embrioni più vecchi o di dimensioni maggiori abbiano difficoltà nel flusso dei crioprotettori attraverso la capsula (Pfaff et al., 1993; Seidel, 1996; Lengrand et al., 2002). Recentemente le tecniche di vitrificazione hanno permesso di fare un significativo passo in avanti nella crioconservazione degli embrioni (Carnevale, 2004; Carnevale et al., 2004) con percentuali di gravidanza del 60-75%.

Nonostante negli anni 80 e 90 la ricerca abbia compiuto grossi sforzi nel tentativo di sviluppare un metodo efficiente per l'IVF convenzionale nel cavallo (McKinnon et al., 1986; Bezard et al., 1989; Del Campo et al., 1990; Palmer et al., 1991; Choi et al., 1993; Alm e Torner, 1994; Brinsko et al., 1995; Grøndal et al., 1995a, 1995b; Hinrichs et al., 1995; Li et al., 1995; Meintjies et al., 1995; Brück et al., 1996; Dell'Aquila et al., 1997), i risultati sono stati scarsi. Fattori limitanti sono stati la percentuale relativamente bassa di recupero di oociti con l'OPU (Brück et al., 1999), la ridotta percentuale di maturazione *in vitro* (Li et al., 2000) e la scarsa penetrazione e fertilizzazione *in vitro* da parte degli spermatozoi (Zhang et al., 1989; 1990; Palmer et al., 1991; Alm et al., 2001). Fortunatamente, il blocco dell'IVF è stato superato con l'ICSI (Squires et al., 1996; Grøndal et al., 1997; Cochran et al., 1998; McKinnon et al., 2000; Li et al., 2001; Galli et al., 2002), con il vantaggio che lo spermatozoo usato per fertilizzare l'oocita può essere stato congelato, sessato ed essere anche completamente immobile o senza coda ma fertilizzare comunque l'oocita e dare inizio allo sviluppo embrionale.

Un'altra tecnica impiegata con successo nel cavallo per aggirare le difficoltà riscontrate nell'IVF tradizionale, è stata il trasferimento chirurgico dell'oocita (OT) o dell'oocita e degli spermatozoi (GIFT) direttamente nell'ovidotto di cavalle riceventi. Oociti recuperati mediante OPU da donatrici di valore possono essere iniettati, dopo IVM, nella fimbria dell'ovidotto ipsilaterale all'ovaio con il follicolo preovulatorio della cavalla ricevente. La ricevente può essere stata inseminata con il seme dello stallone desiderato subito prima del trasferimento intratubarico dell'oocita oppure con un basso numero di spermatozoi lavati depositati nell'ovidotto insieme all'oocita (Carnevale e Ginther 1993; Carnevale et al., 2000; Hinrichs et al., 2000; 2002; Scott et al., 2001). Il metodo trova applicazione soprattutto per cavalle di pregio che presentano anomalie fisiche, come stenosi degli ovidotti o patologie uterine, che non consentono la fertilizzazione *in vivo* e l'instaurarsi della gravidanza.

Anche gli equini sono entrati nel mondo della clonazione con la nascita del primo puledro nel 2003 (Galli et al., 2003b), a partire da una cellula cutanea adulta. Di particolare interesse è stato il fatto che a portare a termine la gravidanza sia stata la cavalla stessa da cui aveva origine il clone, dimostrando che nell'equino non è necessario alcun grado di differenza antigenica tra madre e feto per permettere alla gravidanza di arrivare a termine in maniera sicura (Antczak e Allen, 1984).

Gatto

Nei gatti l'IA può essere necessaria quando l'accoppiamento naturale non ha successo o quando maschio e femmina sono situati in luoghi diversi. La tecnica è inoltre potenzialmente applicabile nei programmi di conservazione delle specie feline minacciate di estinzione (Howard, 1999). Durante il normale accoppiamento, il seme di gatto viene depositato a livello vaginale. Impiegando l'IA è possibile depositare il seme in tre siti: intravaginale, intrauterino e intratubarico. Il numero di spermatozoi necessario per il concepimento può variare a seconda del sito di inseminazione. Gli spermatozoi possono essere utilizzati per l'IA sia dopo il recupero che dopo crioconservazione o dopo conservazione temporanea al di sopra di 0°C, sebbene non sia stato ancora pubblicato nessun lavoro usando seme conservato in tali condizioni. Oltre alle caratteristiche del seme e alla tecnica di IA, i risultati possono dipendere anche dal fatto che l'estro della gatta sia naturale oppure indotto con trattamento ormonale.

Dopo la prima IA nel gatto con seme fresco depositato in vagina (Sojka et al., 1970), sono stati effettuati studi sull'IA con seme fresco e congelato in vagina, utero e tube uterine. La raccolta del seme nel gatto è più complessa di quanto non sia in altre specie animali, ma può essere ottenuta mediante vagina artificiale o elettroeiaculazione. Gli spermatozoi possono essere anche recuperati dagli epididimi sia mediante aspirazione percutanea che per trasmigrazione nel liquido di raccolta dalla coda dell'epididimo dopo incisione.

L'inseminazione intravaginale nel gatto viene effettuata usando un ago sottile, con l'animale anestetizzato (Platz et al., 1978; Tanaka et al., 2000) o non (Sojka et al., 1970). In tutto sono stati effettuati tre studi sull'inseminazione intravaginale, di cui due con spermatozoi freschi (Sojka et al., 1970; Tanaka et al., 2000) e uno congelati (Platz et al., 1978).

L'inseminazione intrauterina è stata effettuata sia per via laparoscopica (Howard et al., 1992) che laparotomica (Tsutsui et al., 1988, 2000a, 2000b). In tre di questi studi è stato usato seme fresco (Howard et al., 1992; Tsutsui et al., 2000a, 2000b) e in uno seme congelato (Tsutsui et al., 1988).

Nell'unico studio sull'inseminazione intratubarica nel gatto (Tsutsui et al., 2001c), il numero di spermatozoi necessario per il concepimento da IA intratubarica è stato circa lo stesso di quello necessario per l'IA intrauterina (Tsutsui et al., 2000a).

Anche se l'IA nel gatto non è ancora sufficientemente valutabile in seguito al numero limitato di studi effettuati, è stato possibile confermare la sua efficienza sia con seme fresco che congelato. Il numero di spermatozoi necessario per la fecondazione è tuttavia elevato e le percentuali di concepimento sono basse. Per poter raggiungere percentuali di concepimento soddisfacenti e aumentare l'applicabilità dell'IA, è importante lo sviluppo di tecniche non chirurgiche per la deposizione degli spermatozoi nell'utero. Le recenti tecniche di inseminazione transcervicale mediante catetere (Chatdarong et al., 2001; Zambelli et al., 2004) sono degli approcci potenzialmente promettenti.

Il recente progresso fatto nello sviluppo delle tecniche di riproduzione assistita per la produzione di embrioni *in vitro* nel gatto è stato notevole, e rende possibile la previsione di un ruolo di supporto nella conservazione delle specie feline in via di estinzione. Le diverse tappe dello sviluppo oocita/embrione che possono essere raggiunte con successo *in vitro* nel gatto sono in continua espansione; ciò nonostante, la probabilità che l'embrione ottenuto produca un feto vitale diminuisce in proporzione alla portata di fasi dello sviluppo che sono avvenute *in vitro* (Pope et al., 2006). L'ambiente che circonda il complesso cumulo-oocita durante la maturazione meiotica dallo stadio di GV (profase I) all'estrusione del primo globulo polare (metafase II) ha un ruolo fondamentale nel successivo sviluppo dell'embrione. Una evidente dimostrazione di questo fenomeno è la riduzione nella percentuale di divisione e sviluppo sino allo stadio di blastocisti di embrioni di gatto prodotti da oociti maturati *in vitro* rispetto agli embrioni derivanti da oociti maturati *in vivo* (Gomez et al., 2000).

Il perfezionamento dei metodi *in vitro* precedentemente stabiliti, includendo il riadattamento di protocolli usati di routine in altre specie, ha permesso di apportare notevoli miglioramenti nella produzione *in vitro* di embrioni di gatto (Friestedt et al., 2001; Karja et al., 2002; Pope, 2004). Le complessità incontrate nella produzione *in vitro* di embrioni di gatto sono fondamentalmente simili a quelle incontrate con l'embriogenesi preimpianto in altri mammiferi *in vitro*. Per esempio, è stata mostrata una notevole preoccupazione per il blocco dello sviluppo che si verifica *in vitro* nel gatto al momento della transizione da morula a blastocisti (Roth et al., 1994), e che si mostrava resistente a modificazioni dell'ambiente di coltura (Johnston et al., 1991; Swanson et al., 1996). Eppure, in studi recenti effettuati in altri laboratori, la proporzione di embrioni che raggiungono lo stadio di blastocisti spesso raggiunge quella riportata per specie studiate

più ampiamente, variando dal 40% al 60% (Friestedt et al., 2001; Karja et al., 2002; Gomez et al., 2003).

Una componente importante del progresso della riproduzione assistita nel gatto è stato l'impiego della micromanipolazione dei gameti per produrre embrioni tramite ICSI. Dopo il primo studio in cui spermatozoi freschi eiaculati sono stati iniettati in oociti maturati *in vivo* (Pope et al., 1998), sono stati condotti numerosi lavori in cui oociti maturati *in vivo* o *in vitro* sono stati iniettati con seme eiaculato o epididimale fresco o congelato (Pushett et al., 2000; Bogliolo et al., 2001; Pendolf et al., 2003).

Per quanto concerne l'ET nel gatto, a parte un solo studio in cui è stato effettuato per via transcervicale (Swanson e Godke, 1994), è praticato attualmente con la tecnica chirurgica. C'è stato un intervallo di circa 10 anni dalla nascita dei primi gatti da ET (Schriver e Kraemer, 1978) a quella dei primi gatti dopo IVF/ET (Goodrowe et al., 1988) e dopo crioconservazione/ET (Dresser et al., 1988). Da allora, le tecniche per la produzione *in vitro* di embrioni felini si sono sviluppate sufficientemente da permettere che una metà degli embrioni prodotti raggiunga lo stadio di blastocisti (Pope et al., 1998; Friestedt et al., 2001) e la nascita di cuccioli dopo ET di embrioni derivanti da diverse tecniche *in vitro* (Gomez et al., 2000; Pope, 2000, 2004), incluso il NT (Shin et al., 2002; Gomez et al., 2004).

Attualmente non esistono pubblicazioni sulla vitrificazione di embrioni di gatto, anche se Vajta et al. (2001) riportano gravidanze da trasferimento di embrioni prodotti *in vitro* dopo vitrificazione in OPS. Nei primi studi di ET di embrioni prodotti *in vitro* e crioconservati (Pope, 1994; Swanson, 1999, 2000) gli oociti di partenza erano maturati *in vivo*. Più recentemente, sono nati gattini dopo ET di embrioni crioconservati derivanti da oociti maturati *in vitro* (Gomez et al., 2003) e anche da ovaie conservate per 24h (Pope et al., 2003).

Le percentuali di gravidanza sub-ottimali e la scarsa sopravvivenza fetale dopo ET di embrioni crioconservati sono probabilmente dovute a fattori multipli interdipendenti (Gomez et al., 2003). Una possibilità per il miglioramento delle percentuali di gravidanza e di sopravvivenza embrionale potrebbe essere il trasferimento nell'ovidotto di embrioni a stadi precoci di sviluppo, al fine di minimizzare l'intervallo di coltura *in vitro*, come è stato effettuato per embrioni di gatto selvatico africano ottenuti da NT (Gomez et al., 2004).

Cane

Considerando che il primo successo dopo IA fu ottenuto nel cane da Spallanzani nel 1780, e che la prima descrizione di un oocita di mammifero fatta da von Baer nel 1827 era riferita ad un oocita di cane, sia la ricerca che la commercializzazione delle biotecnologie riproduttive sono rimaste indietro nei canidi rispetto agli altri animali domestici e all'uomo (Farstad, 2000).

La prima descrizione della fisiologia riproduttiva canina e della ricerca sul trattamento dello sperma per la conservazione a breve termine e sulle tecniche per l'IA apparve nel 1960 (Harrop, 1960). Da allora sono stati sviluppati e ridefiniti i metodi per la conservazione del seme, sia refrigerato che congelato. La prima cucciolata nata da IA con seme congelato fu nel 1969 (Seager, 1969), e da allora la tecnica si è diffusa in tutto il mondo. La crioconservazione del seme di cane è stata ampiamente studiata negli ultimi decenni e sono stati testati numerosi diluitori e protocolli di congelamento e scongelamento (Belluzzi et al., 1988; Bouchard et al., 1990; Dobrinsky et al., 1993; Nöthling et al., 1997, 2005; Pena et al., 1999, 2001; Rota et al., 1999, 2005, 2006; Yildiz et al., 2000; Nizanski et al., 2001; Cardoso et al., 2003; Silva et al., 2003; Okano et al., 2004; Nöthling e Shuttleworth, 2005; da Cassia Soares Cardoso et al., 2006; Hori et al., 2005). Oltre alla possibilità di commercializzare a livello internazionale seme di animali di valore, il congelamento, rispetto alla refrigerazione, offre anche la possibilità di istituire delle banche di materiale genetico di riproduttori di elevato valore. Inoltre, le tecniche di congelamento rivestono notevole importanza per la conservazione dei canidi selvatici a rischio di estinzione (Marks et al., 1994; Goodrowe et al., 1998; Zindl et al., 2006).

Dal momento che l'IA intrauterina con seme congelato comporta, nella maggior parte dei casi, una percentuale di gravidanza superiore a quella ottenibile con l'inseminazione intravaginale, ed essendo il metodo chirurgico non considerato etico in molti paesi europei, sono state messe a punto tecniche alternative per l'inseminazione intrauterina, tra cui l'impiego di un catetere di metallo intrauterino che viene fatto passare attraverso il canale vaginale mentre la cervice viene mantenuta ferma per via transaddominale (Andersen, 1975) oppure di un tubo flessibile di plastica per passare la cervice mediante visualizzazione endoscopica (Wilson, 1993).

L'ET di embrioni derivati *in vivo* è stato effettuato nel cane, ma con scarse percentuali di successo (Kinney et al., 1979; Kraemer et al., 1979; Tsutsui et al., 1989; Tsutsui et al., 2001b). Il trasferimento intratubarico di embrioni a stadi precoci prodotti *in vivo* ha portato a gravidanza (Tsutsui et al., 2001a) e recentemente anche il trasferimento intrauterino di embrioni precoci prodotti *in vivo* ha avuto successo (Tsutsui et al., 2006). Tuttavia l'ET nel cane presenta ancora notevoli ostacoli; la necessità di impiegare tecniche chirurgiche per il recupero ed il trasferimento degli embrioni, le basse percentuali di recupero embrionale dopo lavaggio degli ovidotti o delle corna uterine e i risultati variabili nella sincronizzazione dell'estro tra donatrice e ricevente influenzano notevolmente i risultati.

Per quanto riguarda il trasferimento di embrioni prodotti *in vitro*, nonostante sia stata ottenuta abbastanza recentemente la prima gravidanza (England et al., 2001), questa non è stata portata a termine.

Il congelamento embrionale potrebbe aprire la possibilità di trasferire gli embrioni conservati in riceventi sincronizzate naturalmente, ma questa tecnica è ancora lontana dall'essere efficiente per gli embrioni di cane, come dimostrato dalla mancata produzione di cuccioli negli unici due esperimenti in cui embrioni prodotti *in vivo* e congelati sono stati successivamente trasferiti in riceventi sincronizzate naturalmente (Kim et al., 2000, 2002).

Una maggiore disponibilità di embrioni di cane sarebbe molto utile per sviluppare la ricerca e per applicare le tecniche di riproduzione assistita nel trattamento dell'infertilità e nel miglioramento delle performance riproduttive di canidi di valore, sia domestici che non. La produzione di embrioni mediante fertilizzazione *in vitro* e NT è stata tecnicamente raggiunta nel cane, e il trasferimento di embrioni clonati è risultato nella nascita di 2 cuccioli (Lee et al., 2005), tuttavia, l'efficienza di queste tecnologie è ancora molto limitata. La causa principale di ciò è imputabile alle caratteristiche peculiari degli oociti canini e alla mancanza della loro completa acquisizione della capacità di sviluppo *in vitro*. Infatti, per la nascita dei cuccioli clonati, gli oociti usati per accogliere le cellule somatiche erano maturati *in vivo*. Nonostante sia stato possibile maturare oociti di cane *in vitro*, i risultati non sono ancora soddisfacenti e la produzione di embrioni dopo IVF è ancora limitata (Nickson et al., 1993; Hewitt e England, 1997; Otoi et al., 2000, 2006; Saint-Dizier et al., 2001; Songsasen et al., 2002; Rodrigues et al., 2004) con l'ottenimento di una sola morula (Otoi et al., 2004) e una sola blastocisti *in vitro* (Otoi et al., 2000).

L'ICSI, il cui scopo è la massimizzazione delle possibilità di fertilizzazione, è stata effettuata anche su oociti canini maturati *in vitro* (Fulton et al., 1998). Anche se i risultati hanno mostrato la possibilità di impiegare anche nel cane tale metodica, il limite resta comunque la disponibilità di oociti maturi.

Le bassi percentuali di sviluppo embrionale nel cane testimoniano l'inefficiente competenza degli oociti maturati *in vitro* e giustificano la focalizzazione della ricerca nel cane principalmente sull'IVM (Luvoni et al., 2006).

PARTE SPERIMENTALE

BOVINO

1 – Maturazione *in vitro* di oociti in TCM199 o SOF

Introduzione

Numerosi studi hanno analizzato la capacità degli oociti bovini e degli embrioni di svilupparsi *in vitro* utilizzando un'ampia varietà di terreni di coltura (Rosenkrans e First, 1994; Avery et al., 1995; Liu e Foote, 1995; Keskinetepe e Brackett, 1996). Solitamente si utilizza un terreno di coltura diverso per ciascuna fase dell'IVEP: maturazione, fertilizzazione e coltura. In molti casi il periodo di coltura è diviso in due fasi, ciascuna delle quali necessita di un terreno diverso (Pinyopummintr e Bavister, 1996). In tale situazione un embrione può essere esposto a più di quattro terreni distinti durante lo sviluppo *in vitro*. L'effetto del trasferimento dell'embrione in via di sviluppo nei diversi ambienti di coltura è sconosciuto; dal momento che terreni diversi possono avere concentrazioni variabili di ioni e substrati energetici, l'adattamento cellulare ed il consumo di energia possono variare con il cambio di osmolarità e/o pH. Anche le vie metaboliche dell'embrione possono essere spinte ad adattarsi alla disponibilità dei diversi substrati che variano. Il continuo adattamento dell'embrione ai diversi ambienti di coltura potrebbe comportare un ridotto potenziale di sviluppo.

Il SOF è un terreno comunemente impiegato l'IVC degli embrioni bovini. La formulazione di questo terreno è stata basata in origine sulle analisi biochimiche condotte sul fluido dell'ovidotto ovino (Tervit et al., 1972). Il SOF è stato successivamente modificato con l'aggiunta di aminoacidi (Gardner et al., 1994) o di citrato (Keskinetepe et al., 1995), con la rimozione di glucosio (Takahashi e First, 1992) e con l'aggiunta di EDTA per le prime 72 h di coltura (Gardner et al., 1997).

Un terreno standard per l'IVM degli oociti bovini è il TCM199, con l'aggiunta di siero (Lonergan et al., 1994; Rosenkrans e First, 1994; Avery et al., 1995; Liu e Foote, 1995; Pinyopummintr e Bavister, 1996; Thompson et al., 1998) o senza (Keskinetepe et al., 1995; Keskinetepe e Brackett, 1996).

Il SOF è stato testato per la maturazione di oociti bovini, ma il suo successo è stato inferiore rispetto al TCM199 addizionato con siero (Lonergan et al., 1994). Successivamente, il SOF è stato impiegato con successo come unico terreno di coltura per l'IVM-IVF-IVC di oociti bovini (Gandhi et al., 2000). In tale studio è stata confrontata la produzione embrionale a partire da oociti bovini coltivati in SOF, opportunamente modificato per ogni fase, e oociti coltivati secondo un protocollo standard che prevedeva l'impiego di terreni di coltura diversi per ogni fase, impiegando come controllo per l'IVM il TCM199 addizionato col siero.

Al fine di poter impiegare il SOF come unico terreno in tutte le fasi dell'IVEP, scopo del presente studio è stato quello di valutare la maturazione nucleare e citoplasmatica di oociti bovini maturati in SOF o TCM199, addizionati entrambe con FCS o BSA o BSA più EGF.

Materiali e metodi

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

Recupero degli oociti e maturazione in vitro

Ovaie bovine sono state prelevate al macello e trasportate in soluzione fisiologica a 25°C. I follicoli sono stati aspirati con un ago da 21 gauge impiegando una pompa d'aspirazione (75 mmHg) (Cook modello K-MAR-5100) e, dopo ricerca degli oociti allo stereomicroscopio, sono stati selezionati quelli con almeno tre strati di cellule del cumulo compatte e un citoplasma omogeneo e sono stati lavati tre volte in HSOF. Gli oociti sono stati messi, a gruppi di 35-50, in pozzetti contenenti 1 ml di uno dei sei terreni da maturazione: (A) TCM199 + 10% FCS; (B) TCM199 + 5mg/ml BSA; (C) TCM199 + 5 mg/ml BSA + 50 ng/ml EGF; (D) SOFaa + 10% FCS; (E) SOFaa + 5 mg/ml BSA; (F) SOFaa + 5 mg/ml BSA + 50 ng/ml EGF. Inoltre sono stati aggiunti a tutti i terreni di maturazione 25 µl/ml di ITS, L-cisteina 1.2 mM, 0.1 UI/ml di FSH-LH suino (Pluset, Laboratorios Calier, Barcellona, Spain). Gli oociti sono stati maturati per 24 h a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO₂.

Fertilizzazione in vitro

Dopo la maturazione gli oociti sono stati lavati tre volte in HSOF e trasferiti in pozzetti contenenti 0.5 ml di terreno da fertilizzazione costituito da SOFaa addizionato con 6 mg/ml di BSA, 2 µl/ml di eparina e 20 µl/ml di PHE. La co-coltura col seme è stata effettuata per 18 h a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO₂.

Per l'esperimento è stato impiegato seme congelato proveniente da un unico toro. Una paillette da 0.5 ml di seme è stata scongelata in acqua a 37°C per 30 sec e gli spermatozoi motili sono stati selezionati mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di Percoll (45% e 90%) a 2100 rpm per 40 min. Il pellet ottenuto è stato successivamente lavato in TALP Calcium Free a 1600 rpm per 10 min e risospeso con terreno da IVF in modo da ottenere una concentrazione finale degli spermatozoi coincubati con gli oociti pari a 0.5×10^6 /ml.

Coltura in vitro e determinazione della percentuale di maturazione

Dopo l'IVF le cellule del cumulo sono state rimosse mediante vortex e i presunti zigoti, dopo essere stati lavati in HSOF, sono stati coltivati, a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO₂, in pozzetti contenenti 0.5 ml di SOFaa addizionato con 16 mg/ml di BSA.

La percentuale di divisione è stata valutata dopo 30 h di IVC e gli oociti non divisi sono stati colorati con Hoechst 33258 (10 µl/ml in PBS) ed esaminati al microscopio a fluorescenza per accertare la maturazione nucleare. Solo oociti con un globulo polare e una metafase II evidenti sono stati classificati come maturi.

Disegno sperimentale e analisi statistica

L'esperimento è stato condotto in 3 replicati ed in totale sono stati impiegati 725 oociti. La percentuale di maturazione nucleare, cioè il numero totale di MII, è stata definita come il numero di oociti divisi e di quelli non divisi allo stadio di MII rispetto al numero totale di oociti coltivati. La maturazione citoplasmatica è stata definita come il numero di zigoti in rapporto al numero totale di oociti coltivati. Durante la preparazione degli oociti non divisi per la valutazione al microscopio a fluorescenza, alcuni oociti sono stati danneggiati e non

è stato possibile determinare lo stadio di sviluppo, pertanto il numero totale di oociti su cui è stata calcolata la percentuale di maturazione totale è inferiore a quello degli oociti di partenza.

I dati sono stati confrontati mediante test del Chi Quadrato (Statistica for Windows - Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). La significatività è stata considerata per $P < 0.05$.

Risultati

La percentuale totale di oociti maturi, quella di oociti non divisi che hanno raggiunto lo stadio di MII e la percentuale di divisione dopo 30 h di IVC nei diversi gruppi sono mostrate in Tabella 1. La percentuale di divisione è risultata significativamente minore ($P < 0.05$) nel gruppo E rispetto agli altri gruppi, e nel gruppo C rispetto al D. Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa ($P > 0.05$) nella percentuale di maturazione degli oociti non divisi nei diversi gruppi. La percentuale totale di maturazione è stata significativamente inferiore nel gruppo E ($P < 0.05$).

Tabella 1. Maturazione nucleare e citoplasmatica di oociti bovini coltivati in diversi terreni di maturazione.

IVM	N° oociti	N° divisi (%)	N° MII non divisi (%)	N° tot MII (%)
A	119	73 (61.3) ^{a,b}	18/42 (42.9)	91/115 (79.1) ^a
B	121	74 (61.2) ^{a,b,c}	15/32 (46.9)	89/106 (84.0) ^a
C	121	67 (55.4) ^{b,c}	26/51 (51.0)	93/118 (78.8) ^a
D	121	82 (67.8) ^a	14/31 (45.2)	96/113 (85.0) ^a
E	125	61 (48.8) ^c	19/59 (32.2)	80/120 (66.7) ^b
F	118	71 (60.2) ^{a,b,c}	15/42 (35.7)	86/113 (76.1) ^{a,b}

(a,b) (b,c) $P < 0.05$, (a,c) $P < 0.01$

Discussioni

Quando oociti immaturi di bovino vengono prelevati dai follicoli e coltivati in un terreno di maturazione standard, riprendono la prima divisione meiotica (Ewards, 1965). Sebbene

sembri difficile influenzare gli oociti durante il loro periodo di maturazione per modulare la loro risposta nel successivo periodo di sviluppo, le alterazioni delle condizioni basilari di maturazione possono influenzare significativamente la competenza oocitaria, come rispecchiato dalla produzione di morule e blastocisti dopo IVF (Rose e Bavister, 1992). Durante l'IVM gli oociti vanno incontro a una serie di cambiamenti citoplasmatici prima della ripresa della maturazione nucleare, e ciò comporta una competenza variabile degli embrioni che ne derivano (Moor et al., 1990). Le condizioni di maturazione sono quindi determinanti sul successivo sviluppo embrionale.

I risultati ottenuti in questo studio hanno dimostrato che il SOF può essere impiegato in alternativa al TCM199 per la maturazione di oociti bovini. La presenza di BSA come unico supplemento proteico durante la maturazione in SOF è stata dannosa sia per la maturazione nucleare che per quella citoplasmatica, come evidenziato dalle percentuali di MII totali e dalla percentuale di divisione. Tale effetto negativo è stato contrastato dalla presenza di EGF, che, anche nel bovino, è stato dimostrato aumentare la maturazione nucleare e citoplasmatica (Lorenzo et al., 1994; Kobayashi et al., 1994). Nessun effetto negativo della BSA è stato riscontrato quando aggiunta al TCM199.

Lonergan et al. (1994) hanno osservato che sia il TCM199 che il SOF erano in grado di supportare la maturazione di oociti bovini, ma i risultati migliori erano stati ottenuti col terreno di controllo (TCM199 + pFSH-LH + E2 + 10% FCS). Nella seconda parte dell'esperimento è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di BSA sia al TCM199 che al SOF ed è stato riscontrato che solo nel SOF la BSA aveva ridotto significativamente la produzione di blastocisti. Anche Ali e Sirard (2002a, 2002b) hanno constatato che l'aggiunta di BSA al SOF durante la maturazione *in vitro* comportava una riduzione della produzione di morule e blastocisti e che questo effetto veniva rimosso in presenza di ormoni (r-hFSH e E2). Al contrario, Gandhi et al. (2000) riportano che, in osservazioni preliminari, sebbene l'espansione del cumulo nel SOF con BSA sembrasse ridotta rispetto a quella nel terreno col siero, la percentuale di oociti maturi non era diversa. L'apparente discordanza di risultati può essere spiegata dal fatto che nello studio di Gandhi et al. (2000) sono stati aggiunti 50 ng/ml di EGF al SOF di maturazione, come nel nostro studio. Il meccanismo di inibizione della maturazione ad opera della BSA e la sua interazione con gli ormoni ed i fattori di crescita nel SOF non è ancora chiaro.

In conclusione, è possibile affermare che, al fine di utilizzare lo stesso terreno di coltura in tutte le fasi dell'IVEP, il SOF può essere impiegato con successo in alternativa al TCM199 per la maturazione di oociti bovini e che l'aggiunta di BSA al SOF come unica fonte proteica ha un effetto negativo sulla maturazione, ma tale effetto viene neutralizzato dalla presenza di EGF.

Publicazione: Iacono E, Belluzzi S, Merlo B, Mari G. *In vitro* maturation of bovine oocytes in TCM199 or SOF. Proceedings of 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), Porto Seguro, Brazil, 8-12 August 2004: 439.

2 – Effetto dell'aggiunta di P4 ed EGF al terreno di coltura per embrioni allo stadio di 8 cellule prodotti *in vitro* in assenza di siero

Introduzione

Il ruolo del P4 e dell'EGF nello sviluppo embrionale precoce nel bovino non è ancora chiaro. La produzione e la composizione del fluido nell'ovidotto è influenzata dagli steroidi sistemici, in particolare gli estrogeni hanno azione stimolatoria mentre il progesterone è inibitorio (Perkins, 1974). Il P4 regola la sincronia fra la capacitazione degli spermatozoi e l'arrivo dell'oocita nell'ampolla (Hunter e Nichol, 1986) ed è stato inoltre osservato che il P4 nel tratto genitale femminile agisce come modulatore extra-zonale della fertilizzazione ricoprendo un ruolo fisiologico durante la capacitazione e/o l'interazione spermatozoo-oocita *in vivo* (Margalioth et al., 1988). Nella maggior parte delle specie, le concentrazioni del P4 all'interno dei fluidi del tratto riproduttivo femminile durante il periodo periovulatorio sono sconosciute (Libersky e Boatman, 1995), e non esiste nessuno studio riguardo l'azione diretta del P4 o l'espressione di recettori per il P4 nell'embrione in via di sviluppo. Il P4 è stato aggiunto in coltura in diversi momenti dello sviluppo embrionale ed è stato notato un effetto diretto su embrioni bovini allo stadio di 8 cellule prodotti mediante IVF, anche se è stata riscontrata un'interferenza del veicolo del P4 (Ferguson et al., 2005).

I fattori di crescita e le citochine possono essere considerati come regolatori locali coinvolti nella sottile coordinazione della proliferazione e differenziazione cellulare. L'EGF stimola diverse funzioni cellulari, e ciò suggerisce un possibile effetto sullo sviluppo embrionale precoce nei mammiferi (Teruel et al., 2000). L'EGF è stato aggiunto al terreno di coltura a diverse concentrazioni a partire dallo stadio di presunto zigote, migliorando la percentuale di blastocisti rispetto al terreno di controllo (Mtango et al, 2003; Sirisathien e Brackett, 2003; Sirisathien et al, 2003) e dando risultati simili al terreno addizionato con il 5% o 10% di FCS (Palasz et al, 2000). Nessuno studio è stato condotto su stadi più avanzati dello sviluppo embrionale nel bovino per valutare l'efficacia dell'EGF nel terreno di coltura.

Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare l'effetto dell'aggiunta al terreno di IVC di P4 e di EGF, da soli o in combinazione, su embrioni bovini allo stadio di 8 cellule prodotti *in vitro* in assenza di siero.

Materiali e metodi

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

Recupero degli oociti e maturazione in vitro

Ovaie bovine sono state prelevate al macello e trasportate in soluzione fisiologica a 25°C. I follicoli sono stati aspirati con un ago da 21 gauge impiegando una pompa d'aspirazione (75 mmHg) (Cook modello K-MAR-5100) e, dopo ricerca allo stereomicroscopio, sono stati selezionati gli oociti con almeno tre strati di cellule del cumulo compatte e un citoplasma omogeneo e lavati tre volte in HSOF. Gli oociti sono stati messi, a gruppi di 35-50, in pozzetti contenenti 1 ml di SOFaa addizionato con 5 mg/ml di BSA, 50 ng/ml di EGF, 25 µl/ml di ITS, L-cisteina 1.2 mM, 0.1 UI/ml di FSH-LH suino (Pluset, Laboratorios Calier, Barcellona, Spain). La maturazione è stata effettuata per 24 h a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO₂.

Fertilizzazione in vitro

Dopo la maturazione gli oociti sono stati lavati tre volte in HSOF e trasferiti in pozzetti contenenti 0.5 ml di terreno di fertilizzazione costituito da SOFaa addizionato con 6 mg/ml di BSA, 2 µl/ml di eparina e 20 µl/ml di PHE. La co-coltura col seme è stata effettuata per 18 h a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO₂.

Per l'esperimento è stato impiegato seme congelato proveniente da un unico toro. Una paillette da 0.5 ml di seme è stata scongelata in acqua a 37°C per 30 sec e gli spermatozoi motili sono stati selezionati mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di Percoll (45% e 90%) a 2100 rpm per 40 min. Il pellet ottenuto è stato successivamente lavato in TALP Calcium Free a 1600 rpm per 10 min e risospeso con terreno da IVF in modo da

ottenere una concentrazione finale degli spermatozoi coincubati con gli oociti pari a $0.5 \times 10^6/\text{ml}$.

Coltura in vitro e determinazione della percentuale di maturazione

Dopo l'IVF le cellule del cumulo sono state rimosse mediante vortecizzazione e i presunti zigoti, dopo essere stati lavati in HSOE, sono stati coltivati, a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO_2 , in pozzetti contenenti 0.5 ml di SOFaa addizionato con 16 mg/ml di BSA.

A distanza di 96 h dall'IVF, gli embrioni allo stadio di 8 cellule sono stati suddivisi in maniera casuale nei trattamenti (1) controllo, SOFaa + 16 mg/ml di BSA (n=198); (2) P4, SOFaaBSA + P4 (15 ng/ml in etanolo) (n=198); (3) EGF, SOFaaBSA + EGF (25 ng/ml) (n=200); (4) P4+EGF, SOFaaBSA + P4 (15 ng/ml in etanolo) + EGF (25 ng/ml) (n=201); (5) FBS, SOFaaBSA + FBS (5%) (n=197). Al fine di minimizzare l'effetto tossico dell'etanolo, questo è stato fatto evaporare dalla piastra di coltura prima dell'aggiunta del terreno. Gli embrioni allo stadio di 8 cellule sono stati coltivati a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO_2 . Lo sviluppo embrionale è stato valutato il giorno 6 ed il giorno 8 dopo l'IVF (giorno 0).

Disegno sperimentale e analisi statistica

Un totale di 1192 embrioni bovini allo stadio di 8 cellule sono stati impiegati per la prova. L'esperimento è stato condotto in 4 replicati. Le percentuali di morule al giorno 6 e di blastocisti al giorno 8 sono state calcolate sul numero di embrioni 8 cellule di partenza. I dati sono stati analizzati mediante test del Chi Quadrato (Statistica for Windows - Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA); la significatività è stata considerata per $P < 0.05$.

Risultati

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 1. Non è stata riscontrata alcuna differenza nel numero di morule tra P4 e controllo, tra P4+EGF e FBS e tra P4+EGF e EGF ($P > 0.05$), mentre la combinazione P4+EGF è risultata migliore rispetto al P4 da solo ($P < 0.05$). La percentuale di blastocisti non è stata differente ($P > 0.05$) tra EGF, P4+EGF e FBS. P4 ha

raggiunto una percentuale di blastocisti maggiore ($P < 0.05$) rispetto al controllo ma inferiore ($P < 0.05$) a P4+EGF e FBS.

Tabella 1. Sviluppo di embrioni bovini allo stadio di 8 cellule in SOFaaBSA in presenza di P4, EGF, P4+EGF o FBS.

Terreno IVM	N° embr 8-cell	N° mor g 6 (%)	N° blast g 8 (%)
Controllo	198	73 (36.9) ^d	46 (23.2) ^c
P4	198	88 (44.4) ^{c,d}	71 (35.9) ^b
EGF	200	108 (54.0) ^{b,c}	87 (43.5) ^{a,b}
P4+EGF	201	118 (58.7) ^{a,b}	93 (46.3) ^a
FBS	197	134 (68.0) ^a	97 (49.2) ^a

(a,b,c,d) $P < 0.05$

Discussioni

La possibilità di produrre *in vitro* embrioni bovini di buona qualità senza l'impiego di siero è di notevole importanza, dal momento che il siero contiene ormoni e fattori di crescita in quantità variabili e non è quindi possibile controllare l'effetto esercitato da tali sostanze sullo sviluppo embrionale e le eventuali anomalie di sviluppo fetale riscontrate in embrioni prodotti *in vitro* in presenza di siero (Jacobsen et al., 2000). I risultati ottenuti in questo studio mostrano che è possibile ottenere blastocisti bovine in un sistema di coltura semi-definito in totale assenza di siero mediante l'aggiunta di P4 ed EGF al terreno di coltura a partire dallo stadio embrionale di 8 cellule.

Le prime fasi dello sviluppo embrionale avvengono nell'ovidotto; il fluido dell'ovidotto è una combinazione di secrezioni dell'ovidotto stesso e di una trasudazione elettiva del plasma (Brackett e Mastroianni, 1974). Estrogeni e progesterone sono i principali ormoni regolanti la produzione del fluido dell'ovidotto. Nel coniglio le concentrazioni di progesterone in tale fluido e nel siero non differivano significativamente nel periodo estrale (Richardson e Oliphant, 1981), come atteso, dal momento che il fluido dell'ovidotto è in gran parte un trasudato del plasma. Nel criceto, invece, sono state rilevate concentrazioni più elevate di P4 nel fluido dell'ovidotto rispetto a quelle plasmatiche, probabilmente

correlato al fatto che nel criceto, a differenza del coniglio, è presente una via arterovenosa locale (Libersky e Boatman, 1995). Nonostante non siano stati trovati dati specifici riguardanti le concentrazioni di P4 nel fluido dell'ovidotto bovino, è stato ipotizzato che queste fossero correlate a quelle plasmatiche, e che pertanto il P4 potesse influenzare lo sviluppo embrionale precoce. I risultati ottenuti in questo studio confermano tale ipotesi, anche se ulteriori studi sono necessari non solo per determinare il meccanismo d'azione esercitato dal P4 sull'embrione, ma anche le eventuali concentrazioni ottimali nei diversi stadi di sviluppo.

Per quanto riguarda l'aggiunta di EGF al terreno da IVC per embrioni allo stadio di 8 cellule, i dati dimostrano un effetto positivo sullo sviluppo embrionale, confermando i risultati ottenuti in altri studi nei quali l'aggiunta di EGF allo stadio di presunto zigote aveva migliorato la produzione di blastocisti rispetto al terreno di controllo (Mtango et al, 2003; Sirisathien e Brackett, 2003; Sirisathien et al, 2003) o raggiunto percentuali simili a quelle del terreno addizionato con FCS (Palsz et al., 2000).

In conclusione, il P4 da solo migliora lo sviluppo embrionale a partire dallo stadio di 8 cellule sino a quello di blastocisti in un sistema di coltura in assenza di siero e l'EGF da solo permette di ottenere la stessa percentuale di blastocisti del FBS; inoltre, la combinazione tra P4 ed EGF può essere considerata l'alternativa più adatta al FBS dal momento che sono stati ottenuti risultati simili sia in termini di morule che di blastocisti.

Pubblicazione: Merlo B, Iacono E, Mari G. Effect of P4 and EGF on *in vitro* produced 8-cell bovine embryos in a serum free culture medium. Proceedings of Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Kyoto, Japan, 6-10 January 2007. *Reproduction, Fertility and Development* 2007, 19(1):211.

3 – Vitrificazione di blastocisti in paillette o in cryoloop

Introduzione

Le tecniche di crioconservazione sono state messe a punto per limitare la formazione intracellulare di cristalli di ghiaccio. La prima strategia per ottenere ciò è quella basata sulla disidratazione, e le curve di raffreddamento sono state ottimizzate per rimuovere l'acqua dall'embrione prevenendo i danni creati dalla formazione dei cristalli di ghiaccio, minimizzando contemporaneamente la tossicità chimica e lo stress osmotico derivante dall'esposizione ad alte concentrazioni di sali. La seconda strategia per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio è la vitrificazione, impiegata per la prima volta da Rall e Fahy nel 1985 per la crioconservazione di embrioni di mammifero.

Tale tecnica richiede l'utilizzo di soluzioni ad alta viscosità, curve di raffreddamento rapide, piccoli volumi e l'uso di soluzioni con un'elevata concentrazione di crioprotettori per determinare uno stato fisico simile al ghiaccio. In questo modo non si formano cristalli di ghiaccio e non si ha un aumento della concentrazione dei soluti durante il processo di crioconservazione (Vajta, 2000). Un aspetto che rende interessante della vitrificazione, è che è una procedura rapida e relativamente poco costosa, inoltre è stato dimostrato essere vantaggiosa per gli embrioni che hanno una minore resistenza alla crioconservazione, come quelli prodotti *in vitro* (Agca et al., 1994).

Sono stati effettuati numerosi studi su diverse formulazioni, metodi e contenitori per la vitrificazione di embrioni bovini (Massip et al, 1986; Ishimori et al., 1993; Agca et al., 1994; Kuwayama et al., 1994; Van Wagtendonk-de Leeuw et al., 1997; Sommerfeld e Niemann, 1999; Vajta et al., 1999; Park et al., 1999; Kim et al., 2004). Lane et al. (1999) hanno vitrificato blastocisti espanse di bovino in cryoloop, impiegate originariamente per la vitrificazione di cristalli proteici, al fine di massimizzare la velocità di raffreddamento, minimizzare i volumi e facilitare le manipolazioni durante la crioconservazione ed il recupero degli embrioni. Da tale studio è emerso che la vitrificazione di blastocisti espanse in cryoloop può essere effettuata con successo.

Le cryoloop sono state usate con successo anche per la vitrificazione di blastocisti di topo (Lane et al., 1999), uomo (Lane et al., 1999; Mukaida et al., 2001), scimmia (Yeoman et

al., 2001) e cavallo (Oberstein et al., 2001). Tuttavia, nonostante il primo successo ottenuto con la vitrificazione di blastocisti espanse di bovino in cryoloop (Lane et al., 1999), non è stato effettuato nessuno studio che comparasse tale metodica con le altre usate in questa specie.

Scopo di questo studio è stato quello di confrontare l'efficacia della vitrificazione di embrioni bovini in paillette (metodo tradizionale) e in cryoloop.

Materiali e metodi

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

Recupero degli oociti e maturazione in vitro

Ovaie bovine sono state prelevate al macello e trasportate in soluzione fisiologica a 25°C. I follicoli sono stati aspirati con un ago da 21 gauge impiegando una pompa d'aspirazione (75 mmHg) (Cook modello K-MAR-5100) e, dopo ricerca allo stereomicroscopio, sono stati selezionati gli oociti con almeno tre strati di cellule del cumulo compatte e un citoplasma omogeneo e sono stati lavati tre volte in HSOF prima di essere coltivati in pozzetti contenenti 2 ml terreno da maturazione costituito da TCM199 addizionato con FBS al 10%, 50 ng/ml di EGF, 25 µl/ml di ITS, L-cisteina 1.2 mM, sodio piruvato 1mM, 75 µg/ml di kanamicina e 0.1 UI/ml di FSH-LH suino (Pluset, Laboratorios Calier, Barcellona, Spain). Gli oociti sono stati maturati per 24 h a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO₂.

Fertilizzazione in vitro

Dopo la maturazione gli oociti sono stati lavati tre volte in HSOF e trasferiti in pozzetti contenenti 0.5 ml di terreno di fertilizzazione costituito da SOFaa addizionato con 6 mg/ml di BSA, 2 µl/ml di eparina e 20 µl/ml di PHE. La co-coltura col seme è stata effettuata per 18 h a 38.5°C in atmosfera modificata al 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂.

Per l'esperimento è stato impiegato seme congelato proveniente dallo stesso toro. Una paillette da 0.5 ml di seme è stata scongelata in acqua a 37°C per 30 sec e gli spermatozoi motili sono stati selezionati mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di Percoll (45% e 90%) a 2100 rpm per 40 min. Il pellet ottenuto è stato successivamente lavato in TALP Calcium Free a 1600 rpm per 10 min e risospeso con terreno da IVF in modo da ottenere una concentrazione finale degli spermatozoi coincubati con gli oociti pari a 0.5×10^6 /ml.

Coltura in vitro

Dopo l'IVF le cellule del cumulo sono state rimosse mediante vortecizzazione e i presunti zigoti, dopo essere stati lavati in HSOF, sono stati coltivati, a 38.5°C in atmosfera modificata al 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂, in pozzetti contenenti 0.5 ml di SOFaa addizionato con 16 mg/ml di BSA per 8 giorni. Al giorno 3 di IVC sono stati individuati gli embrioni allo stadio di 8 cellule e sono stati coltivati nelle stesse condizioni in terreno di coltura fresco. Al giorno 6 di coltura sono stati isolati gli embrioni allo stadio di morula e quindi coltivati nelle stesse condizioni in terreno fresco addizionato col 5% di FBS. Gli embrioni non vitrificati ed impiegati come controllo sono stati coltivati sino al giorno 9.

Vitrificazione degli embrioni

Al giorno 7 di IVC gli embrioni allo stadio di blastocisti e blastocisti espansa sono stati tolti dal terreno di coltura, lavati in HSOF e divisi in modo casuale ed equilibrato in due gruppi per la vitrificazione in paillette o in cryoloop. Gli embrioni sono stati tenuti a temperatura ambiente (25-28°C) in 2 ml di HSOF fino al momento della vitrificazione. Le soluzioni di vitrificazione sono state preparate aggiungendo i crioprotettori all'HSOF alle stesse concentrazioni riportate da Campos-Chillon et al. (2006). Blastocisti e blastocisti espanse sono state vitrificate a gruppi di 5 trasferendole, in un volume massimo di 1 µl, in 1 ml della prima soluzione di vitrificazione (EG 3.5 M in HSOF) per 3 min e in 10 µl della seconda soluzione di vitrificazione (EG 7 M, galattosio 0.5 M Ficoll 18% in HSOF) per circa 20 sec e caricate in paillette o in cryoloop (Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA).

Nel primo caso, paillette da 0.25 ml sono state pre-caricate con una colonna di 1 cm di soluzione di diluizione (galattosio 0.5 M in HSOF: D-HSOF), 0.5 cm d'aria, 7 cm di D-HSOF e 0.5 cm d'aria; le gocce contenenti gli embrioni sono state aspirate nella paillette (circa 0.5 cm), quindi sono stati aspirati 0.5 cm di aria seguiti da 1 cm di D-HSOF (in totale 190 µl di D-HSOF). La paillette è stata sigillata mediante calore ed immediatamente immersa verticalmente in 4 cm di azoto liquido in modo che l'azoto coprisse gli embrioni. Il resto della paillette è stato poi immerso lentamente. Per il congelamento in cryoloop, gli embrioni sono stati aspirati nel minor volume possibile, con una pipetta pasteur di vetro tirata alla fiamma, collocati sull'ansa di nylon della cryoloop, immediatamente immersi in azoto liquido e chiusi nelle apposite provette. Gli embrioni sono stati conservati in azoto liquido per almeno una settimana.

Scongelo e coltura in vitro

Gli embrioni vitrificati in paillette sono stati scongelati in aria (25°C) per 10 sec e poi in acqua a 35-37 °C per 30 sec. La paillette è stata quindi agitata, per mescolare la goccia contenente gli embrioni con la colonna di D-HSOF, tagliata ed il contenuto è stato versato in una capsula petri da 35 mm. Non appena riespansi, gli embrioni sono stati recuperati e lavati 3 volte in HSOF prima di essere messi in coltura.

Gli embrioni vitrificati in cryoloop sono stati scongelati immergendo la loop in 2 ml di D-HSOF a 37°C. Gli embrioni sono stati recuperati appena riespansi e lavati 3 volte in HSOF prima di essere posti in coltura.

La coltura degli embrioni scongelati è stata effettuata in SOFaa contenente 16 mg/ml di BSA addizionato con il 5% di FBS a 38.5 °C in atmosfera modificata al 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂.

Colorazione e conteggio delle cellule embrionali

Per l'individuazione delle cellule embrionali vive e morte, è stata impiegata una doppia colorazione (Kaidi et al., 2001) con 1) PI, che è un marker degli acidi nucleici escluso dalle cellule intatte, che può entrare solo nelle cellule con integrità di membrana alterata (colore rosso alla luce UV); e 2) bisbenzimidide (Hoechst 33342) che penetra nelle cellule e si lega

in modo specifico e quantitativo al DNA (colore blu alla luce UV). Nelle cellule con alterazioni di membrana, la fluorescenza dell'Hoechst è mascherata dal PI, che assorbe tale energia ed emette luce rossa.

Le blastocisti sono state incubate per 15 min a 38.5°C in PBS contenente 10 µg/ml di PI. Trascorso tale periodo, gli embrioni sono stati fissati in etanolo al 70% per 5 min e trasferiti in etanolo contenente 10 µg/ml di Hoechst per 5 min a temperatura ambiente. Gli embrioni sono stati poi trasferiti in una goccia di glicerolo su un vetrino, coperti con un coprioggetti ed esaminati al microscopio a fluorescenza.

Disegno sperimentale e analisi statistica

Per l'esperimento sono stati impiegati in totale 301 embrioni allo stadio di blastocisti e blastocisti espansa. Al momento dello scongelamento gli embrioni sono stati valutati per la riespansione e i danni alla ZP. Per ogni gruppo, una metà degli embrioni è stata lasciata in coltura per valutare la percentuale di schiusa, mentre l'altra metà è stata colorata a 6 o 24 h dallo scongelamento per la conta delle cellule. La percentuale di blastocisti sgusciate è stata valutata dopo 48 h di coltura post-scongelamento.

I dati riguardanti le ZP danneggiate, gli embrioni riespansi e quelli sgusciati sono espressi come percentuale e sono stati confrontati mediante test del Chi Quadrato. Il numero di cellule vive, morte ed il totale sono espressi come media \pm deviazione standard e sono stati confrontati mediante ANOVA. Entrambe le analisi sono state effettuate usando un pacchetto software (Statistica for Windows - Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). La significatività è stata considerata per $P < 0.05$.

Risultati

La percentuale di riespansione è stata inferiore per le blastocisti vitrificate in paillette ($P < 0.05$) e la percentuale di blastocisti sgusciate è stata più bassa per il gruppo delle paillette rispetto al controllo ($P < 0.05$) (Tab. 1).

Per quanto riguarda il numero di cellule, l'unica differenza riscontrata è stata nel maggior numero di cellule morte a 24 h dallo scongelamento, in entrambe i gruppi di embrioni vitrificati, rispetto al controllo ($P < 0.05$) (Tab. 2).

Tabella 1. Percentuali di riespansione e schiusa di embrioni bovini vitrificati dopo 48 h di coltura post-scongelo.

Gruppo	N° embrioni	% ZP danneggiate	% riespansi	% sgusciati
Paillette	111	6.3	93.7 ^b	41.0 ^b
Cryoloop	100	4.0	100.0 ^a	50.0 ^{a,b}
Controllo	90	—	—	68.3 ^a

(a,b) P<0.05

Tabella 2. Numero di cellule vive, morte e totali di embrioni bovini vitrificati dopo 6 e 24 h dallo scongelamento.

Gruppo	6 h post-scongelo			24 h post-scongelo		
	N° cell vive	N° cell morte	N° cell totali	N° cell vive	N° cell morte	N° cell totali
Paillette	57.7±8.8	9.1±4.7	66.8±12.3	68.5±9.8	29.6±14.1 ^b	98.1±18.8
Cryoloop	61.0±6.6	9.1±6.3	70.1±10.2	70.8±16.0	22.4±8.0 ^b	93.2±13.9
Controllo	57.9±15.3	6.2±3.4	64.1±15.8	74.0±10.1	5.5±2.8 ^a	79.5±11.5

(a,b) P<0.05

Discussioni

I risultati ottenuti dimostrano che la vitrificazione di blastocisti e blastocisti espanse bovine in cryoloop permette di ottenere una maggiore percentuale di sopravvivenza e una percentuale di embrioni che sgusciano *in vitro* tendenzialmente maggiore rispetto al metodo convenzionale in paillette.

L'unico studio in cui blastocisti di bovino espanse sono state vitrificate (Lane et al., 1999) riporta un 80.5% di riespansione e schiusa, rispetto al 100% del controllo. Le percentuali da noi ottenute sono inferiori, e ciò può essere probabilmente spiegato dal fatto che, nel nostro studio, sono state impiegate non solo blastocisti espanse ma anche blastocisti, influenzando così il numero di embrioni che raggiungono la schiusa. La differenza

percentuale tra controllo ed embrioni vitrificati in cryoloop è comunque simile (circa il 20%) nei due studi.

Nel cavallo (Oberstein et al., 2001) non è stata riscontrata alcuna differenza per numero di cellule e grado embrionale tra congelamento lento, vitrificazione in OPS e in cryoloop di embrioni $\leq 300 \mu\text{m}$. Anche nel presente studio non è stata riscontrata alcuna differenza nel numero di cellule vive, morte e totali per gli embrioni vitrificati nei due diversi contenitori. Il numero di cellule morte a 6 h dallo scongelamento è stato simile tra embrioni vitrificati e non, ma dopo 24 h di coltura il numero di cellule morte era superiore nelle blastocisti vitrificate rispetto a quelle non crioconservate, mantenendo comunque un numero simile di cellule vive.

Le soluzioni di vitrificazione impiegate in questo studio non sono state preparate seguendo il protocollo impiegato da Lane et al. (1999) nel bovino, ma è stato riadattato quello usato da Campos-Chillon et al. (2006) per la vitrificazione in paillette, in modo che il contenitore fosse l'unico fattore di variabilità. Sarebbe comunque interessante valutare i risultati della vitrificazione nei due diversi contenitori impiegando le soluzioni di vitrificazione secondo Lane et al. (1999).

La vitrificazione in cryoloop è più semplice e veloce rispetto al metodo in paillette, anche se, ai fini del trasferimento embrionale, è necessario effettuare le operazioni che abitualmente si compiono con embrioni congelati in glicerolo, con gli stessi vantaggi e svantaggi rispetto al trasferimento diretto effettuabile per gli embrioni congelati in EG o vitrificati in paillette.

In conclusione, blastocisti e blastocisti espanse di bovino possono essere vitrificate con maggior successo in cryoloop rispetto al metodo convenzionale in paillette, come supportato da una maggiore percentuale di sopravvivenza e una tendenza a sgusciare in maggior numero.

CAVALLO

4 – Produzione *in vitro* di embrioni a partire da oociti vitrificati prima e dopo IVM e fertilizzati mediante ICSI

Introduzione

La crioconservazione degli oociti rappresenta uno degli sviluppi più interessanti nel campo delle tecnologie riproduttive e diventerà un mezzo importante per la creazione di banche di materiale genetico degli animali domestici (Ledda et al., 2001; Arav et al., 2002). Nonostante i successi ottenuti in alcune specie, la crioconservazione degli oociti non è ancora una procedura che permetta di avere l'efficienza raggiunta nel congelamento degli spermatozoi e degli embrioni (Shaw et al., 2000; Woods et al., 2004). Al fine di poter crioconservare gli oociti in modo da ottenere una percentuale di sopravvivenza soddisfacente e una buona competenza di sviluppo, sono state impiegate diverse strategie, inoltre è stato anche esaminato quale fosse la fase meiotica migliore per la crioconservazione. Infatti, lo stadio del ciclo cellulare durante la meiosi sembra influenzare la sopravvivenza degli oociti di mammifero ed i risultati della crioconservazione in seguito ad una variabilità della sensibilità alle procedure di congelamento. Lo stadio di MII è quello preferibile per la crioconservazione in quanto presenta una migliore stabilità di membrana durante le procedure di raffreddamento; al contrario, gli oociti immaturi non verrebbero direttamente interessati dai problemi concernenti il fuso mitotico allo stadio di MII in quanto i loro cromosomi sono confinati nel nucleolo (Ledda et al., 2007).

Il congelamento lento tradizionale prevede curve di raffreddamento controllate, con una riduzione della temperatura tale da permettere scambi di liquido intra ed extracellulare senza gravi sbalzi osmotici e deformazione delle cellule. Un metodo alternativo al congelamento lento è rappresentato dalla vitrificazione, nella quale vengono impiegate alte concentrazioni di crioprotettori e curve di congelamento definite ultrarapide, che portano alla solidificazione delle soluzioni. Questa tecnica evita la formazione di cristalli di ghiaccio e i conseguenti danni cellulari (Liebermann et al., 2002).

Esistono pochi studi sulla crioconservazione di oociti equini (Hochi et al., 1994; Hochi et al., 1995; Hochi et al. 1996; Hurtt et al., 2001; Maclellan et al., 2001; Maclellan et al., 2002). La percentuale di sopravvivenza dopo congelamento lento (Hochi et al., 1994) o vitrificazione (Hochi et al., 1995; Hochi et al., 1996; Hurtt et al. 2000) è risultata bassa e solo in due casi è stata ottenuta con successo la fertilizzazione *in vitro* di oociti equini crioconservati (Hochi et al., 1994; Maclellan et al., 2001). Maclellan et al. (2002) hanno riportato la nascita di due puledri da oociti maturati *in vivo* vitrificati e trasferiti nell'ovidotto di cavalle inseminate. Fino ad ora non sono stati ancora ottenuti embrioni equini prodotti *in vitro* a partire da oociti vitrificati.

In questo studio abbiamo valutato la capacità di sviluppo embrionale *in vitro* di oociti equini vitrificati in cryoloop prima e dopo IVM e fertilizzati mediante ICSI.

Materiali e metodi

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

Recupero degli oociti e maturazione in vitro

Ovaie equine sono state prelevate al macello, nei mesi compresi tra aprile e giugno, e trasportate in soluzione fisiologica ad una temperatura di 25°C. Per il recupero degli oociti, follicoli di almeno 0.5 cm di diametro sono stati incisi con una lama da bisturi ed è stato effettuato lo scraping della parete follicolare con un cucchiaino di Volkmann. Una volta effettuata la ricerca degli oociti allo stereomicroscopio, solo quelli presentanti un citoplasma omogeneo e un cumulo compatto sono stati utilizzati per la prova. Gli oociti selezionati sono stati: 1) vitrificati immediatamente dopo il recupero (PREM) 2) maturati prima della vitrificazione (POSTM) per 24 h a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO₂ in TCM 199 addizionato con il 10% di FCS, 25 µl/ml di ITS, piruvato di sodio 1mM, 50 ng/ml di EGF, 100ng/ml di IGF1 0.1 UI di FSH e LH suino (Pluset, Laboratorios Calier, Barcellona, Spain) come riportato da Galli et al. (2002). Gli oociti utilizzati come controllo (CONTR) sono stati maturati nelle stesse condizioni per 24-26 h prima di essere sottoposti ad ICSI.

Vitrificazione e scongelamento degli oociti

La vitrificazione è stata effettuata in 3 passaggi, come descritto da Maclellan et al. (2002), con la differenza che il terreno base impiegato non è stato il G2 modificato ma HSOF. Gli oociti sono stati messi a contatto con i crioprotettori in 3 step: 5% dimetilsolfossido (DMSO, 0.7M) e 5% glicole etilenico (EG, 0.9M) in HSOF per 30 sec; 10% DMSO (1.4M) e 10% EG (1.8M) in HSOF per 30 sec; 20% DMSO (2.8M), 20% EG (3.6M), 10mg/ml di Ficoll e saccarosio 0.65 M in HSOF per circa 20 sec, prima di essere posizionati, mediante una pipetta pasteur di vetro tirata alla fiamma, su una cryoloop di nylon (Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA) ed immediatamente immersi in azoto liquido. Gli oociti sono stati conservati in azoto liquido per almeno 4 settimane.

Successivamente gli oociti sono stati scongelati immergendo la loop in una soluzione 0.25 M di saccarosio in HSOF e poi passandoli in soluzioni di saccarosio decrescenti (0.188 M e 0.125 M) per 30 sec ad ogni passaggio. Gli oociti PREM sono stati sottoposti a 24 h di IVM, quelli POSTM sono stati coltivati 2-3 h dopo lo scongelamento.

Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo

Gli oociti maturi, come accertato della presenza del primo globulo polare, sono stati fertilizzati mediante ICSI. Seme di stallone congelato è stato scongelato in acqua a 37°C per 30 sec e separato su un gradiente discontinuo di Percoll (45-90%). Il pellet è stato diluito ad una concentrazione di 4×10^6 spermatozoi/ml in SOFaa e successivamente diluito ulteriormente 1:1 con una soluzione al 12% di polivinilpirrolidone (PVP) in SOFaa con 6 mg/ml di BSA, 1 µg/ml di eparina e 20 µl/ml di PHE. Gli oociti denudati sono stati iniettati mediante un micromanipolatore (Narishige, Japan) equipaggiato con apparecchiatura piezo-elettrica (Prima Tech, Japan) ad un microscopio invertito con piastra riscaldata. Per l'ICSI, è stato selezionato uno spermatozoo motile nella soluzione contenente PVP, immobilizzato mediante gli impulsi piezo-elettrici e iniettato immediatamente nell'oocita. Oociti non vitrificati, maturati nelle stesse condizioni, sono stati impiegati come controllo. Gli oociti iniettati sono stati coltivati in SOFaa con 16 mg/ml di BSA fino al giorno 9 (giorno 0 = giorno dell'ICSI) a 38.5°C in atmosfera modificata al 5% di CO₂, 5% di O₂ e 90% di N₂.

Disegno sperimentale e analisi statistica

La vitrificazione è stata condotta in 5 repliche e tutti gli oociti sono stati iniettati lo stesso giorno. La percentuale di oociti divisi è stata calcolata sul numero di oociti maturi, cioè quelli iniettati. La percentuale di blastocisti al giorno 9 è stata calcolata sul numero di oociti divisi dopo ICSI. Per l'analisi statistica dei dati è stato usato il test del Chi Quadrato (Statistica for Windows - Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA); la significatività è stata considerata per $P < 0.05$.

Risultati

I risultati sono riportati nella tabella 1. Gli oociti vitrificati dopo maturazione hanno avuto una percentuale maggiore di degenerazione ($P < 0.05$) rispetto a quelli vitrificati prima della maturazione e a quelli di controllo. La percentuale di oociti iniettati, cioè di quelli che hanno raggiunto lo stadio di MII, non è risultata differente nei tre gruppi, così come la percentuale di divisione ($P > 0.05$). A causa dei bassi numeri di oociti iniettabili ottenuti in questo lavoro, la percentuale di blastocisti al giorno 9, calcolata sul numero degli zigoti, non è stata differente nei tre gruppi ($P > 0.05$).

Tabella 1. Sviluppo embrionale dopo ICSI di oociti equini vitrificati.

Gruppo	N. oociti	Deg (%)	MI I (%)	Divisi (%)	Blast g 9 (%)
PREM	33	12 (36.4) ^{a,b}	13 (39.4)	7 (53.9)	1 (14.3)
POSTM	64	25 (39.1) ^b	21 (32.8)	10 (47.6)	1 (10.0)
CONTR	60	12 (20.0) ^a	23 (38.3)	17 (73.9)	7 (41.2)

(a,b) $P < 0.05$

Discussioni

Per la prima volta è stata prodotta *in vitro* una blastocisti equina a partire da oociti vitrificati. Allo scongelamento nessun oocita ha presentato danni alla zona pellucida e la percentuale di degenerazione degli oociti immaturi dopo scongelamento non è risultata

differente rispetto al controllo. La percentuale di degenerazione degli oociti vitrificati dopo maturazione è risultata invece superiore a quella del controllo; questo dato non conferma quanto riscontrato da Hurtt et al. (2000) per oociti equini vitrificati in open pulled straws, in quanto in tale studio non risultava nessuna differenza con il controllo. È da sottolineare però che, probabilmente, la differenza percentuale riscontrata nello studio di Hurtt et al. non è risultata significativa per il basso numero di oociti impiegati per l'esperimento, inferiore al numero di oociti da noi utilizzati. Anche nel presente lavoro la mancata differenza tra la percentuale di degenerazione nel gruppo di oociti vitrificati pre-maturazione (36.4%) ed il controllo (20%) è probabilmente dovuta al basso numero di oociti nel primo dei due gruppi; questo inconveniente si è purtroppo verificato a causa di alcuni problemi insorti allo scongelamento delle cryoloop di tale gruppo che ha portato alla perdita di alcuni degli oociti vitrificati.

La percentuale di maturazione, rappresentata dal numero di oociti iniettati, non è stata differente tra i due gruppi vitrificati ed il controllo, confermando che la vitrificazione non altera i processi di maturazione nucleare negli oociti immaturi. Per quanto riguarda la maturazione citoplasmatica, rappresentata dal numero di oociti divisi dopo fertilizzazione mediante ICSI, non è stata riscontrata differenza nei tre gruppi, anche se è evidente un trend migliore per gli oociti non vitrificati.

I numeri relativamente bassi di embrioni prodotti non hanno permesso di trovare differenze nel numero di blastocisti prodotte al giorno 9, nonostante anche in questo caso è visibile un trend migliore per gli oociti non vitrificati. È comunque da sottolineare il successo ottenuto in entrambe i gruppi di oociti vitrificati, in quanto non è mai stata prodotta sino ad ora alcuna blastocisti *in vitro* a partire da oociti vitrificati e maturati *in vitro*.

Gli unici puledri nati a partire da oociti vitrificati sono stati ottenuti da trasferimento degli oociti in salpinge e tali oociti erano stati prelevati mediante aspirazione transvaginale ecoguidata del follicolo pre-ovulatorio dopo somministrazione di hCG (Maclellan et al., 2002), quindi l'oocita impiegato era maturato *in vivo*. La possibilità di produrre *in vitro* embrioni equini da oociti immaturi o maturati *in vitro* potrebbe permettere di sfruttare un maggior numero di oociti della cavalla donatrice e di ottenere gravidanze mediante l'ET convenzionale senza che sia praticata alcuna tecnica chirurgica sulla cavalla ricevente.

In conclusione, gli oociti equini possono essere vitrificati con successo in cryoloop, sia prima che dopo maturazione *in vitro*, con una buona percentuale di sopravvivenza e

mantenendo la capacità di sviluppo dopo fertilizzazione, come dimostrato dal raggiungimento dello stadio di blastocisti.

Ricerca finanziata dal MIUR Cofin PRIN 2003.

Pubblicazione: Merlo B, Iacono E, Colleoni S, Dell'Aquila E, Galli C, Mari G. Embryo development after ICSI of equine oocytes vitrified before and after IVM. Proceedings of Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Copenhagen, Denmark, 8-12 January 2005. *Reproduction, Fertility and Development* 2005, 17(1,2):195.

GATTO

5 – Effetto dell'EGF sulla maturazione nucleare e citoplasmatica di oociti

Introduzione

Nell'ultimo ventennio è stato fatto un notevole progresso nell'ambito della produzione di embrioni *in vitro* nel gatto e nei felidi selvaggi. Il gatto domestico è un modello di ricerca idoneo per i programmi di conservazione delle specie selvatiche, essendo la maggior parte delle 36 specie di felidi classificate come minacciate, vulnerabili o in pericolo di estinzione a causa del bracconaggio e della perdita dell'habitat naturale (Nowell e Jackson, 1996).

La maturazione *in vitro* degli oociti di gatto dipende da diversi fattori quali lo stadio del ciclo estrale (Donoghue et al., 1993; Spindler e Wildt, 1999), la qualità dei complessi cumulo-oocita (Wood e Wildt, 1997; Pope et al., 1997), il tempo di coltura (Goodrowe et al., 1989; Luvoni e Oliva, 1993; Wolfe e Wildt, 1996) e l'aggiunta di ormoni (Pope et al., 1997; Goodrowe et al., 1991; Wood et al., 1995; Schramm e Bavister, 1995). La maturazione dell'oocita può essere concettualmente divisa in due processi, quello nucleare e quello citoplasmatico; il primo è riferito alla ripresa della meiosi e alla progressione alla metafase II; la maturazione citoplasmatica, invece, è riferita ad altri eventi della maturazione non direttamente correlati alla progressione meiotica e che preparano l'oocita alla fertilizzazione e allo sviluppo preimpianto (Eppig et al., 1994; Eppig, 1996). Il meccanismo coinvolto nella rottura della vescicola germinale e le vie di segnalamento cellulare che guidano l'oocita alla metafase II in risposta al picco preovulatorio di gonadotropine non sono del tutto chiari (Eppig, 1999). Ciò nonostante, è stato riscontrato che l'EGF promuove la maturazione nucleare negli oociti di uomo (Das et al., 1991), bovino (Lorenzo et al., 1994) e suino (Singh et al., 1993), e la maturazione citoplasmatica nel topo (Das et al., 1991), bovino (Kobayashi et al., 1994), suino (Ding e Foxcroft, 1994) e uomo (Goud et al., 1998). Inoltre, gli effetti benefici dell'EGF sulla maturazione sono stati riscontrati nel ratto (Dekel e Sherizly, 1985), coniglio (Lorenzo et al., 1996), bufalo (Chauhan et al., 1999), pecora (Guler et al., 2000) e cavallo (Lorenzo et al., 2002).

Nel gatto l'EGF è stato utilizzato per la coltura di follicoli preantrali (Jewgenow e Göritz, 1995; Jewgenow, 1996; Göritz et al., 1996) e solo Gómez et al.(2003) hanno impiegato 10 ng/ml di EGF per l'IVM, ma non è stato attualmente effettuato nessuno studio sugli effetti dell'EGF sulla IVM degli oociti di gatto. Lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare se la supplementazione di un terreno di maturazione con diverse concentrazioni di EGF potesse aumentare la maturazione nucleare e citoplasmatica di oociti di gatto e la loro successiva capacità di sviluppo dopo fertilizzazione *in vitro*.

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 febbraio ed aprile, e mantenute in DPBS addizionato con 63 µg/ml di penicillina G sodica e 70 µg/ml di streptomicina 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 (MSOF). Gli oociti sono stati lavati 3 volte in HSOF e coltivati in 1) MSOF (controllo) 2) MSOF + 10 ng/ml di EGF (EGF10); 3) MSOF + 25 ng/ml di EGF (EGF25); 4) MSOF + 50 ng/ml di EGF (EGF50). Gli oociti sono stati messi in piastre 4-well contenenti il terreno da IVM precedentemente equilibrato (5 oociti per 100 µl) e coltivati in un incubatore al 5% di CO₂ a 38.5°C per 24 h.

Raccolta del seme e fertilizzazione in vitro

Dopo 24 h di maturazione, gli oociti sono stati fertilizzati *in vitro* con spermatozoi elettroiaculati 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 addizionato con 6 mg/ml di BSA mediante centrifugazione a 300 g per 5 min. Il pellet è stato risospeso, la motilità è stata valutata ed il volume della sospensione è stato aggiustato in modo da ottenere una concentrazione finale di 1.5×10^6 spermatozoi motili/ml. La sospensione così ottenuta è stata addizionata con 20 µL/ml di PHE e 10 µg/ml di eparina e impiegata per l'inseminazione di 5-10 oociti in microgocce da 100 µl sott'olio minerale per 18 h a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO₂.

Valutazione della maturazione e 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 denudati sono stati lavati una volta in HSOF con FCS al 10% per inattivare la tripsina e due volte in HSOF prima di essere messi in SOFaa addizionato con 16mg/ml di BSA per la coltura a 38.5 °C in aria umidificata al 5% CO₂. Dopo 12 h di IVC è stata valutata la percentuale di divisione e gli oociti non divisi sono stati colorati con il fluorocromo Hoechst 33258 (10 µg in 10 ml di PBS) per 30 min a temperatura ambiente, lavati in PBS e osservati al microscopio a fluorescenza per determinare la percentuale di maturazione. Solo gli oociti con globulo polare e metafase II evidenti sono stati considerati maturi. Gli zigoti divisi sono stati coltivati in SOF da IVC più il 10% di FCS fino al giorno 7 a 38.5 °C in un incubatore al 5% di CO₂. Lo sviluppo *in vitro* è stato valutato il giorno 6 e 7 di coltura (giorno 0 = giorno della fertilizzazione).

Disegno sperimentale ed analisi statistica

Oociti immaturi di I e II grado provenienti da diverse ovaie sono stati uniti prima di essere suddivisi equamente e in maniera casuale nei diversi gruppi di maturazione. In totale sono stati utilizzati 444 oociti e l'esperimento è stato condotto in 8 replicati. La percentuale di

maturazione è stata definita come il numero di oociti divisi e di quelli non divisi allo stadio di MII rispetto al numero totale di oociti. Gli oociti che non hanno raggiunto lo stadio di MII sono stati considerati immaturi, quelli col citoplasma frammentato o senza cromatina sono stati considerati degenerati. Le percentuali di divisione, di morule-blastocisti al giorno 6 e di blastocisti al giorno 7 sono state calcolate sul numero totale di oociti. La maturazione citoplasmatica è stata definita come il numero di zigoti in rapporto al numero totale di oociti. La capacità di sviluppo è stata definita come il numero di blastocisti prodotte al giorno 7 rispetto al numero totale di embrioni divisi. 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

La stessa proporzione ($P > 0.05$) di oociti coltivati ha raggiunto la MII indipendentemente dalle condizioni di IVM. L'incidenza della degenerazione non è stata differente tra i vari trattamenti ($P > 0.05$). Il numero di oociti divisi è stato maggiore ($P < 0.05$) per EGF25 rispetto a MSOF e EGF50 ma non differente ($P > 0.05$) da EGF10. Sebbene la percentuale di divisione per EGF 50 non sia risultata differente rispetto al controllo ($P > 0.05$), è stata inferiore ($P < 0.05$) rispetto gli altri gruppi supplementati con EGF (Tab. 1).

Tabella 1. Risultati dell'IVM di oociti di gatto in presenza di differenti concentrazioni di EGF.

Terreno IVM	N. oociti	MII (%)	Degenerati (%)	Divisi (%)
MSOF	110	74 (67.3)	12 (10.9)	48 (43.6) ^{b,c}
EGF10	116	91 (78.5)	13 (11.2)	60 (51.7) ^{a,b}
EGF25	104	80 (76.9)	10 (9.6)	64 (61.5) ^a
EGF50	114	86 (75.4)	11 (9.7)	44 (38.6) ^c

(a,b) $P < 0.01$, (a,c) $P < 0.001$, (b,c) $P < 0.05$

Il numero totale di embrioni che ha raggiunto almeno lo stadio di morula al giorno 6 di coltura è stato più alto per EGF25 rispetto a MSOF ($P < 0.01$) e EGF50 ($P < 0.001$) e non

differente ($P>0.05$) da EGF10. Inoltre il numero di morule al sesto giorno di coltura è stato significativamente minore ($P<0.05$) per EGF50 rispetto a EGF10 e EGF25. Il numero di blastocisti al giorno 6 è stato più alto ($P <0.05$) in EGF25 che in EGF50. La produzione di blastocisti al giorno 7 è stata in assoluto maggiore ($P <0.01$) per EGF25; rispetto al controllo, non si è ottenuto nessun miglioramento ($P >0.05$) aggiungendo 10 ng/ml o 50 ng/ml di EGF al terreno per l'IVM, ma l'aggiunta di 10 ng/ml ha permesso di ottenere un maggior numero di blastocisti ($P<0.05$) rispetto all'aggiunta di 50 ng/ml. La percentuale più alta ($P<0.001$) di blastocisti rispetto al numero totale di embrioni divisi (capacità di sviluppo) è stata raggiunta con l'aggiunta di 25 ng/ml di EGF al terreno da IVM. Nessuna differenza ($P>0.05$) è stata riscontrata fra gli altri trattamenti e il controllo (Tab. 2).

Tabella 2. Risultati della produzione di embrioni di gatto dopo IVM in presenza di diverse concentrazioni di EGF.

IVM	Giorno 6			Giorno 7	
	Mor (%)	Blast (%)	Totale (%)	Blast (%)	Bl/divisi (%)
MSOF	26 (23.6) ^{a,b}	11 (10.0) ^{a,b}	37 (33.6) ^{d,e}	17 (15.5) ^{g,h}	17/48 (35.4) ^l
EGF10	38 (32.8) ^a	15 (12.9) ^{a,b}	53 (45.7) ^{c,d}	25 (21.6) ^g	25/60 (41.7) ^l
EGF25	37 (35.6) ^a	20 (19.2) ^a	57 (54.8) ^c	39 (37.5) ^f	39/64 (60.9) ⁱ
EGF50	22 (19.3) ^b	11 (9.7) ^b	33 (29.0) ^e	13 (11.4) ^h	13/44 (29.5) ^l

(a,b)(g,h) $P<0.05$, (c,d) (d,e) (f,g) (f,h) $P<0.01$, (c,e) (i,l) $P<0.001$

Discussioni

Il presente studio è stato il primo a riportare gli effetti dell'aggiunta di EGF durante la maturazione *in vitro* di oociti di gatto. I risultati confermano che, anche nel gatto domestico, l'EGF promuove la maturazione *in vitro*. La maturazione nucleare, e quindi la percentuale di oociti che raggiungono lo stadio di MII, non è stata migliorata dall'aggiunta di EGF a nessuna delle concentrazioni considerate, a differenza di quella citoplasmatica. L'EGF ha migliorato la capacità di divisione degli oociti di gatto in maniera dose-correlata: l'aggiunta di 25 ng/ml di EGF ha permesso di ottenere i migliori risultati, 10 ng/ml risultati intermedi mentre 50 ng/ml può essere considerato un dosaggio troppo alto

per esercitare un effetto positivo. Inoltre in questo lavoro è stato dimostrato che l'aggiunta di 25 ng/ml di EGF al terreno di maturazione ha aumentato significativamente la produzione di blastocisti e la capacità di sviluppo degli oociti di gatto.

I componenti dei terreni e le condizioni di coltura possono influenzare ed anche modulare la regolazione meiotica degli oociti dei mammiferi (Downs e Mastropolo, 1997; Kito e Bavister, 1996). Ne consegue quindi che è necessario ottimizzare i sistemi di coltura tenendo conto di tutti i fattori essenziali per il completamento della maturazione dell'oocita *in vitro*. L'aggiunta di un fattore di crescita al terreno di maturazione per migliorare l'IVM nel gatto è stata riportata solo da Schramm e Bavister (1995) e da Gómez et al. (2003). Il GH non ha aumentato la capacità di sviluppo dopo IVF di oociti di gatto maturati *in vitro* (Schramm e Bavister, 1995), mentre le percentuali di IVM sono risultate migliori dopo l'aggiunta di IGF-I ad oociti di I e II grado (Gómez et al., 2003). È stato dimostrato che l'EGF controlla la crescita e la maturazione dell'oocita in diverse specie, ma non è stato trovato nessun articolo riguardo l'effetto sulla maturazione *in vitro* degli oociti di gatto. L'aggiunta di 50 ng/ml di EGF ad un terreno di maturazione in assenza di siero ha stimolato la maturazione nucleare in oociti equini (Lorenzo et al., 2002). Nel coniglio è stato ottenuto un incremento nel numero di oociti che raggiungono la MII in presenza di differenti concentrazioni di EGF, e la più efficace è risultata essere 10 ng/ml (Lorenzo, 1996). Nel bovino la presenza di solo EGF durante l'IVM ha permesso di aumentare la percentuale di oociti che raggiungono lo stadio di blastocisti dopo IVF e IVC (Lonergan et al., 1996). Nel bufalo la supplementazione del terreno da IVM con 20 ng/ml di EGF ha aumentato l'espansione del cumulo, la maturazione nucleare e la divisione post-fertilizzazione, ma non il successivo sviluppo embrionale di oociti con cumulo (Chauhan et al., 1999). Nel presente studio sono stati utilizzati solo oociti circondati da cumulo (I e II grado (Wood e Wildt, 1997)) e l'EGF, similmente a quanto riportato per oociti umani con cumulo (Goud et al., 1998), ha aumentato la maturazione citoplasmatica, con un risultato migliore ad una concentrazione di 25 ng/ml, ma non la maturazione nucleare. Goud et al. (1998) hanno riscontrato che non c'era alcun effetto positivo dell'EGF sul numero di oociti umani col cumulo che raggiungono lo stadio di MII in coltura. Tuttavia, un effetto positivo dell'EGF su oociti con cumulo è stato evidente alla fertilizzazione dopo ICSI. Un numero relativamente più alto di oociti ha avuto una fertilizzazione normale nel gruppo supplementato con EGF rispetto agli oociti non supplementati (Goud et al., 1998). Un

numero maggiore di oociti coltivati in assenza di cellule del cumulo ha completato la maturazione nucleare nel terreno supplementato con EGF rispetto agli oociti coltivati senza (Goud et al., 1998), quindi è stato ipotizzato che la mancanza di un effetto positivo dell'EGF sulla maturazione nucleare di oociti con cumulo potesse essere dovuta all'azione positiva delle gonadotropine attraverso le cellule del cumulo anche in assenza di EGF supplementare (Prin et al., 1987).

In questo studio la percentuale di maturazione nel gruppo supplementato con 50 ng/ml di EGF non è stata diversa da quella ottenuta negli altri gruppi. Tuttavia, anche se la percentuale di divisione e la produzione di blastocisti non è stata significativamente differente dal controllo, tali valori sono stati inferiori rispetto a quelli ottenuti nei gruppi supplementati con 10 e 25 ng/ml di EGF. Ciò potrebbe suggerire che concentrazioni troppo alte di EGF durante l'IVM potrebbero aver esercitato un effetto dannoso piuttosto che positivo sulla maturazione citoplasmatica degli oociti di gatto. L'aggiunta di EGF ad un terreno per IVM in assenza di siero ha migliorato la percentuale di maturazione nucleare, valutata con il raggiungimento della MII, di oociti bovini con cumulo solo alla concentrazione di 30 ng/ml, mentre non sono state riscontrate differenze a 10 e 50 ng/ml (Park et al., 1997). In un altro studio dove sono state valutate diverse concentrazioni di EGF (5, 10, 30 e 50 ng/ml) aggiunte a SOF-BSA in assenza di gonadotropine, è stato riscontrato che non c'erano differenze significative tra i gruppi e il controllo (oociti coltivati solo nel terreno di maturazione) nella percentuale di divisione. Tuttavia, la proporzione di morule e blastocisti ottenute dagli oociti maturati con 30 ng/ml di EGF era significativamente aumentata rispetto quella ottenuta a partire dagli oociti maturati nelle altre condizioni (Ali e Sirard, 2002).

I meccanismi ovarici ed intrafollicolari per la regolazione della crescita e maturazione oocitaria sono complessi. Il meccanismo mediante il quale i fattori di crescita regolano o modulano la ripresa della meiosi negli oociti può essere mediato attraverso le cellule del cumulo e/o della granulosa (Dekel e Sherizly, 1985; Brucker et al., 1991). La tirosina chinasi intrinseca dei recettori per l'EGF è attivata dal legame dell'EGF, comportando l'autofosforilazione dell'EGF-R e la conseguente fosforilazione tirosinica di numerosi substrati all'interno della cellula (Carpenter e Cohen, 1990). Parecchi esperimenti con bloccanti della tirosina chinasi hanno indicato il coinvolgimento della tirosina chinasi nell'azione dei fattori di crescita sulla maturazione di oociti suini (Inoue et al., 1995; Jung,

et al., 1993). Nel cavallo e nella pecora è stata recentemente dimostrata la presenza di EGF-R nel tessuto ovarico e che l'EGF ha un ruolo fisiologico nella regolazione della maturazione degli oociti attraverso la via della tirosina chinasi (Lorenzo et al., 2001). In uno studio riguardante l'impatto dell'EGF su follicoli preantrali di gatto coltivati, i risultati hanno indicato che l'EGF aumenta la percentuale di proliferazione delle cellule della granulosa (Jewgenow e Göritz, 1995). Osservazioni riguardanti l'effetto dell'EGF su piccoli follicoli di gatto hanno supportato il sospetto che l'EGF moduli la differenziazione ma non sia mitogeno per i follicoli preantrali (Jewgenow, 1996). La prima descrizione dell'EGF nei felidi fu fatta da Göritz et al. (1996). La presenza di EGF nelle ovaie feline fu esaminata in due modi differenti: localizzazione e misura dell'EGF, e rilevamento dei siti leganti l'EGF. Siti specifici leganti l'EGF sono stati rilevati sulle cellule della granulosa di follicoli primari, secondari e terziari e sulle cellule delle ghiandole interstiziali. È stato quindi dedotto che l'EGF abbia un ruolo importante nella follicologenesi ovarica nel gatto. Durante la fase di crescita esso agisce come fattore mitogeno inducendo la proliferazione delle cellule della granulosa, mentre nei follicoli antrali regola la differenziazione delle cellule della granulosa e la maturazione degli oociti (Göritz et al., 1996). Il nostro studio conferma che l'EGF regola la maturazione degli oociti di gatto. Altri esperimenti sono necessari per indagare i meccanismi stimolatori dell'EGF sulla maturazione di oociti felini. La capacità degli oociti di gatto di raggiungere la maturazione *in vitro* è circa del 50-60% e solo il 50% di questi è in grado di essere fertilizzato *in vitro* (Wood et al., 1995). In questo studio la supplementazione del terreno da IVM con 25 ng/ml di EGF ha permesso di ottenere una percentuale di divisione del 61.5% (80.0% degli oociti maturi) e una produzione di blastocisti del 37.5%. Questi risultati sono incoraggianti e l'aggiunta di EGF al terreno di maturazione potrebbe essere impiegata per migliorare le tecniche di riproduzione assistita non solo nel gatto domestico ma anche nelle specie feline non domestiche a rischio di estinzione. In conclusione, l'EGF non ha indotto un aumento della maturazione nucleare ma ha aumentato la maturazione citoplasmatica e la capacità di sviluppo di oociti di gatto, come dimostrato dal miglioramento della fertilizzazione e del conseguente sviluppo embrionale *in vitro*.

Pubblicazione: Merlo B, Iacono E, Zambelli D, Prati F, Belluzzi S. Effect of EGF on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. *Theriogenology* 2005, 63(7):2032-2039.

6 – Produzione *in vitro* di blastocisti di sesso predeterminato impiegando seme sessato

Introduzione

Il gatto domestico è un modello di ricerca idoneo per i programmi di conservazione delle specie selvatiche, dal momento che la maggior parte delle 36 specie di felidi sono classificate come minacciate, vulnerabili o a rischio di estinzione a causa del bracconaggio o per la perdita dell'habitat naturale (Nowell e Jackson, 1996). Inoltre, la richiesta di riproduzione assistita da parte degli allevatori di gatti è in aumento, in seguito alle ridotte variazioni genetiche nelle razze allevate (Axner e Linde-Forsberg, 2002). La possibilità di ottenere cucciolate di sesso predeterminato sarebbe un considerevole vantaggio sia per l'allevamento felino che per il recupero dei felidi selvatici.

Attualmente, l'unico metodo efficace ed affidabile per ottenere una pre-selezione del sesso prima del concepimento necessita della separazione degli spermatozoi X da quelli Y, seguita dal loro impiego per l'IA o l'IVF con successivo ET (Maxwell et al., 2004). Impiegando la citofluorimetria sono ottenibili popolazioni di spermatozoi X e Y con una purezza superiore al 90%. Il metodo si basa sulla colorazione degli spermatozoi con un fluorocromo che si lega al DNA, l'Hoechst 33342, e sulla separazione citofluorimetrica di questi in due popolazioni arricchite in cellule X o Y sulla base della differenza nel contenuto di DNA (Garner, 2006). La rianalisi di una parte degli spermatozoi sortati usando il citofluorimetro è il metodo standard per la validazione dell'accuratezza del sortaggio (Welch e Johnson, 1999). L'amplificazione del DNA mediante PCR e FISH di una singola cellula sono altre tecniche impiegate per verificare l'avvenuto sessaggio (Welch et al., 1995; Kawarasaki et al., 1998).

La produzione di prole di sesso predeterminato derivata da spermatozoi sessati in combinazione ad altre tecnologie riproduttive quali l'IVM, l'IVF, l'IVC e l'ET è stata raggiunta in diverse specie (bovino: Cran et al., 1993; Cran et al., 1994; pecora: Catt et al., 1996; suino: Rath et al., 1997; uomo: Levinson et al., 1995; Fugger et al., 1998). Nel gatto, le uniche blastocisti prodotte *in vitro* usando spermatozoi sortati col citofluorimetro provengono dal nostro laboratorio (Zambelli et al., 2006).

La PCR di sequenze sesso-specifiche del DNA è stata utilizzata per determinare il sesso embrionale in parecchie specie animali (Machaty et al., 1993; Pomp et al., 1995; Greenlee et al., 1998; Manna et al., 2003; Mara et al., 2004). Il sesso è determinato mediante l'amplificazione con PCR di due geni. Il metodo si basa sulla presenza (se maschio) o assenza (se femmina) di un amplicone affine alla sequenza specifica per il cromosoma Y (SRY) e sulla presenza di un frammento di PCR affine a sequenze omologhe sui cromosomi Y (ZFY) e X (ZFX) come controllo positivo della PCR. Fino ad oggi non è stato pubblicato alcun metodo per il sessaggio di embrioni di gatto mediante PCR.

Gli scopi della ricerca sono stati quelli di valutare la possibilità di produrre *in vitro* embrioni di gatto a partire da oociti maturati e fertilizzati *in vitro* con spermatozoi sortati mediante citofluorimetro e di verificare tramite l'impiego della PCR il sesso degli embrioni ottenuti dagli spermatozoi X e Y.

Materiali e metodi

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

Raccolta del seme e preparazione

Gli eiaculati di 10 gatti domestici, di età compresa tra i 2 e i 5 anni, sono stati raccolti mediante elettroeiaculazione (col permesso del Comitato Etico per la Ricerca) come descritto in precedenza (Howard et al., 1990). Ciascun gatto è stato sottoposto a due raccolte consecutive e gli eiaculati sono stati uniti. Il volume è stato determinato con una pipetta e la concentrazione è stata valutata utilizzando una camera di Bürker. La motilità è stata determinata soggettivamente osservando il seme ad un microscopio a contrasto di fase ad ingrandimento 400X. La motilità progressiva è stata annotata impiegando una scala da 0 a 5 (0= nessun movimento progressivo e 5= progressione in avanti, rettilinea e rapida) (Howard et al, 1986).

Nell'esperimento I gli eiaculati sono stati divisi in due parti, la prima è stata sortata mediante citofluorimetro, mentre la seconda è stata usata come controllo (non sortato).

Nell'esperimento II l'intero eiaculato è stato sortato e gli spermatozoi X e Y sono stati usati separatamente per l'IVF.

Aliquote di seme diluito a 100×10^6 spermatozoi/ml in TRIS-glucosio-citrato sono state colorate con Hoechst 33342 per 1 h a 35°C al buio mantenendo una proporzione di 1 μ l Hoechst (5 mg/ml soluzione stock) ogni 10×10^6 spermatozoi.

Subito prima del sortaggio è stato aggiunto un colorante alimentare (FD&C#40, Warner Jenkinson, St.Louis, MO, USA) in proporzione di 0.1 μ l di soluzione stock (25 mg/ml) ogni 10×10^6 spermatozoi, per smorzare la fluorescenza dell'Hoechst 33342 negli spermatozoi con le membrane danneggiate in modo da escluderli dal sortaggio. I campioni quindi sono stati filtrati attraverso un filtro di nylon con una porosità di 60 μ m per rimuovere i detriti o gli spermatozoi agglutinati.

Sortaggio

È stato utilizzato un citofluorimetro sorter MoFlo SX® (DakoCytomation Inc., Fort Collins, CO, USA) dotato di un laser argon (lunghezza d'onda 351 a 150 mW), modificato appositamente per il sortaggio degli spermatozoi (Johnson e Pinkel, 1986; Johnson e Welch, 1999). Come sheath fluid è stato utilizzato DPBS. La pressione dello sheath fluid è stata settata a 40 psi ed il numero di eventi processati al secondo è stato regolato su circa 15000 cellule. Gli spermatozoi sortati sono stati deviati in provette di polipropilene contenenti 500 μ l di una soluzione tampone al 2% di Tes-Tris-uovo (Johnson, 1991).

Nell'esperimento I gli spermatozoi sono stati sortati senza considerare il loro diverso contenuto in DNA ma sottoposti alle stesse condizioni di quelli sessati per la separazione in X e Y, incluso lo scarto degli spermatozoi con le membrane danneggiate.

Nell'esperimento II lo sperma è stato separato in due popolazioni arricchite di cellule X o Y.

Maturazione, fertilizzazione degli oociti e coltura degli embrioni

Gli oociti di gatto sono stati raccolti da ovaie ottenute dopo ovariectomia di 20 gatte domestiche, di età compresa tra 1 e 5 anni, nel periodo compreso tra febbraio ed aprile. Le ovaie sono state sminuzzate finemente con una lama da bisturi in una piastra Petri da 35 x

0.7 mm contenente 2 ml di HSOF e sono stati raccolti gli oociti di I e II grado (Wood e Wildt, 1997). Dopo tre lavaggi in HSOF, gli oociti sono stati maturati in un incubatore al 5% di CO₂ a 38.5°C per 24 h in SOFaa contenente 5 mg/ml di BSA, 0.1 UI di FSH-LH suino (Pluset, Laboratorios Calier, Barcelona, Spain), 25 ng/ml di EGF, 25 µl/ml di ITS e L-cisteina 1.2 mM.

I campioni di seme sortato e non sono stati centrifugati a 300 g per 8 min e risospesi in SOFaa supplementato con 6 mg/ml di BSA, 20 µl/ml di PHE e 10 µg/ml di eparina in modo da ottenere una concentrazione finale di 1x10⁶ spermatozoi motili/ml. Per l'inseminazione, 5-10 oociti sono stati co-coltivati sott'olio minerale in microgocce da 100 µl di sospensione di seme per 18 h a 38.5°C in aria al 5% di CO₂. Trascorso tale periodo, le cellule del cumulo sono state rimosse in una soluzione allo 0.25% di tripsina per 60 sec. Gli oociti sono stati poi lavati una volta in HSOF al 10% di FCS per inattivare la tripsina e due volte in HSOF prima di essere messi in SOFaa addizionato con 16mg/ml di BSA per la coltura a 38.5 °C in aria al 5% CO₂. Dopo 12 h di IVC, è stata valutata la percentuale di divisione embrionale e gli zigoti sono stati coltivati sott'olio in microgocce da 100 µl di medium da coltura fresco addizionato con FCS al 10% fino al giorno 7. Lo sviluppo embrionale è stato valutato il giorno 6 (giorno 0 = giorno della fertilizzazione) e nuovamente il giorno 7.

Gli embrioni che hanno raggiunto lo stadio di morula-blastocisti nell'esperimento II sono stati analizzati mediante PCR per la determinazione del sesso, come di seguito riportato.

Sessaggio embrionale

Gli embrioni allo stadio di morula-blastocisti sono stati trattati con pronase (1mg/ml in PBS modificato contenente lo 0.4% di BSA) al fine di rimuovere la zona pellucida, poi sono stati lavati due volte in PBS e trasferiti individualmente in provette contenenti 15 µl di acqua Molecular Biology grade. I blastomeri sono stati lisati tramite riscaldamento a 95°C per 10 min e successivo congelamento (in azoto liquido). La procedura di lisi è stata ripetuta due volte. I campioni sono stati quindi sottoposto a reazione di amplificazione (PCR); campioni di DNA genomico purificato dal sangue venoso utilizzando un Kit Qiagen sono stati utilizzati come controlli positivi della reazione di PCR.

L'amplificazione dei geni ZFX/ZFY è stata fatta usando primers specifici come riportato da Pomp et al. (1995) (Tab. 1). Il prodotto della PCR (446bp) era atteso sia nei maschi che nelle femmine. I primers utilizzati per l'amplificazione del gene SRY (Tab. 1) sono stati disegnati usando il Beacon Designer 2.07 Software (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA), sulla base della sequenza *Felis Catus* (AN: AY424645). Il prodotto (132 bp) era atteso solo nei maschi. Tutte le reazioni di amplificazione sono state effettuate in un volume totale di 25 µl contenente 7 µl di lisati embrionali o 10 ng di DNA genomico (controllo positivo), 1.75 µM di MgCl₂, 200 mM di ciascun dNTP, 1.5 U diTaq Platinum Polymerase (Invitrogen, Paisley, UK), 1X PCR Buffer (Invitrogen) e 0.4 µM di ogni primer per le sequenze ZFX/ZFY e la regione SRY. L'amplificazione è stata effettuata per 40 cicli a 94°C per 1 min, 55°C per 1 min, 72°C per 1 min. Nel primo ciclo la denaturazione è avvenuta a 95°C per 2 min. I prodotti dell'amplificazione (15 µl) sono stati analizzati su gel di agarosio al 2% colorato con etidio bromuro e visualizzato sotto luce UV.

La presenza di una sola banda (447bp), corrispondente all'amplificazione sui geni ZFX/ZFY, dimostrava che il campione derivava da un embrione di sesso femminile, mentre la presenza anche della seconda banda (132bp), corrispondente alla sequenza del cromosoma Y, indicava che il campione derivava da un embrione di sesso maschile.

Tabella 1. Sequenze dei primers senso e antisenso e lunghezza dei prodotti della PCR.

Primer	Sequenza (5'-3')	Lunghezza del prodotto (bp)
ZFX/ZFY	Senso: ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT	443
	Antisenso: GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT	
SRY	Senso: AGGACGGCTGTACGAAGG	132
	Antisenso: GACTGTCTTGGAGGGTTGTG	

Disegno sperimentale e analisi statistica

Esperimento I

Al fine di verificare la capacità di produrre embrioni di gatto con spermatozoi sortati, oociti di grado I e II, recuperati da diverse ovaie e maturati *in vitro*, sono stati uniti e poi distribuiti in maniera casuale e in eguali proporzioni nei due gruppi di IVF (con seme sortato o non sortato). In tutto sono stati impiegati 224 oociti e 6 eiaculati. La percentuale di divisione embrionale, di morule e blastocisti al giorno 6 e di blastocisti al giorno 7 sono state calcolate in rapporto al numero totale di oociti coltivati. I dati sono stati analizzati mediante test del Chi Quadrato (Statistica for Windows - Stat Soft Inc Tulsa, Oklahoma, USA). La significatività è stata considerata per $P < 0.05$.

Esperimento II

Un totale di 84 oociti di I e II grado maturati *in vitro* sono stati fertilizzati con spermatozoi X e Y sessati mediante citofluorimetro (4 eiaculati) al fine di ottenere embrioni di sesso predeterminato.

I dati ottenuti dalla valutazione del seme (volume concentrazione, motilità totale e progressiva) sono espressi come media \pm deviazione standard.

Risultati

Il volume medio degli eiaculati è stato $66.7 \pm 34.5 \mu\text{l}$, la concentrazione $436.9 \pm 316.7 \times 10^6/\text{ml}$, la motilità totale $72.2 \pm 12.5 \%$ e la motilità progressiva $4.7 \pm 0.7\%$.

I dati ottenuti dall'esperimento I sono mostrati nella Tabella 2. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata nella percentuale di divisione, di morule-blastocisti al giorno 6 e nella percentuale di blastocisti al giorno 7 impiegando seme sortato o non sortato per l'IVF ($P > 0.05$).

Tabella 2. Produzione di embrioni *in vitro* usando seme di gatto sortato o non (Esperimento I).

Seme	N. oociti	Divisi (%)	Mor-blast g 6 (%)	Blast g 7 (%)
Sortato	109	48 (44.0)	29 (26.6)	18 (16.5)
Non sortato	115	53 (46.1)	34 (29.6)	19 (16.5)

Nell'esperimento II la percentuale di divisione, di morule-blastocisti al giorno 6 e la percentuale di blastocisti al giorno 7 sono state rispettivamente 16/42 (38.1%), 14/42 (33.3%) e 6/42 (14.3%) per il gruppo di spermatozoi X e 18/42 (42.9%), 10/42 (23.8%) e 6/42 (14.3%) per il gruppo di spermatozoi Y.

Dei 24 embrioni che hanno raggiunto lo stadio di morula/blastocisti, 21 (87.5%) erano del sesso desiderato. In particolare 12 dei 14 (85.7%) embrioni derivati da spermatozoi X erano femmine e 9 dei 10 (90%) embrioni derivati da spermatozoi Y erano maschi (Fig. 1).

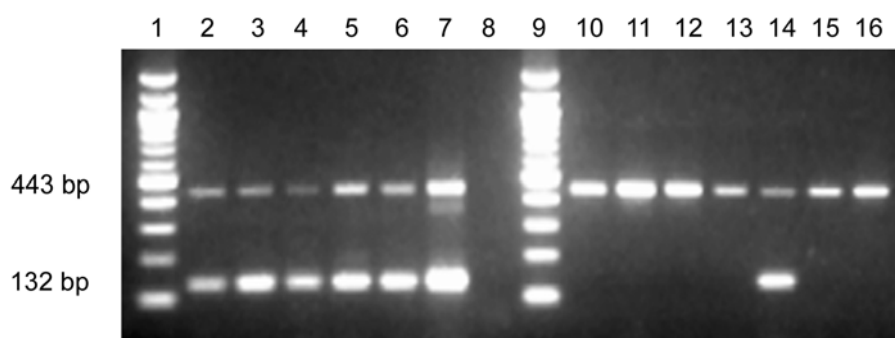


Figura 1. Determinazione del sesso di embrioni di gatto ottenuti con seme sessato mediante sperm sorter (Esperimento II): gel rappresentativo dei prodotti SRY e ZFX-ZFY della PCR, rispettivamente 132 e 443 bp. Pozzetti 1, 9: 100bp DNA size marker; pozzetti 2-7: embrioni presunti maschi: tutti erano del sesso atteso (tutti i campioni hanno mostrato sia I prodotti sia SRY che ZFX-ZFY della PCR); pozzetto 8: controllo negativo della PCR; pozzetti: embrioni presunti femmine: tutti erano del sesso atteso (è presente solo il prodotto ZFX/ZFY della PCR) con l'eccezione del campione nel pozzetto 14 nel quale era presente solo il prodotto SRY della PCR.

Discussioni

In questo studio è stata esaminata la possibilità di produrre embrioni felini a partire da oociti di gatto maturati e fertilizzati *in vitro* con spermatozoi sortati col citofluorimetro. Il sesso degli embrioni ottenuti dagli spermatozoi sessati X e Y è stato determinato mediante PCR.

Il seme sessato è stato impiegato con successo in sistemi di IVF in diverse specie (Rath et al., 1999; Lu et al., 1999; Gurthrie et al., 2002; Zhang et al., 2003; Spinaci et al., 2005; Morton et al., 2005; Xu et al., 2006; Wilson et al., 2006). La mancanza di differenze significative nella percentuale di blastocisti ottenute nell'Esperimento I con seme sortato o non, conferma i nostri dati precedenti (Zambelli et al., 2006) indicando che il seme di gatto, dopo l'intera procedura di sortaggio, mantiene una buona capacità fertilizzante e che può essere impiegato per una soddisfacente produzione *in vitro* di embrioni di gatto.

L'efficacia del sessaggio dello sperma mediante la citofluorimetria a flusso dipende non solo dalle differenze relative nel contenuto di DNA, ma anche dalla capacità di orientare in maniera precisa le teste degli spermatozoi rispetto al raggio laser e ai rivelatori ottici (Garner, 2006; Johnson, 2000). Gli spermatozoi di gatto, avendo teste abbastanza tonde, tendono a non essere facilmente orientabili nel flusso idrodinamico dello sperm sorter. Inoltre deve essere sottolineato che, essendo piccolo il volume di eiaculato di gatto e basso il numero di spermatozoi disponibili, non è stato possibile testare il rapporto più idoneo Hoechst 33342/numero di spermatozoi per ogni eiaculato, come può essere fatto per altre specie, al fine di ottenere la migliore risoluzione. Come conseguenza di tali fattori, è stato possibile sessare solo il 5-10% degli spermatozoi.

La validazione di laboratorio standard per l'accuratezza del sortaggio per la separazione degli spermatozoi X e Y è la rianalisi del materiale sortato (Welch e Johnson, 1999). Usando la rianalisi del materiale sortato, circa 5×10^5 spermatozoi per ciascun campione sessato vengono rianalizzati, ma non risortati, mediante il citofluorimetro dopo un ulteriore breve periodo di incubazione con Hoechst 33342 e dopo sonicazione, al fine di rimuovere le code per migliorare l'orientamento. Ovviamente questi spermatozoi sono persi dal punto di vista funzionale. Avendo a disposizione un basso numero di spermatozoi sessati, sono stati impiegati tutti per l'IVF in modo da ottenere blastocisti di sesso predeterminato. L'85.7% e il 90% delle blastocisti ottenute inseminando oociti maturati *in vitro* rispettivamente con popolazioni di seme X e Y erano del sesso desiderato; queste percentuali sono simili a quelle ottenute da Puglisi et al. (2006) nella specie bovina. Questo è il primo rapporto di produzione *in vitro* di blastocisti di gatto di sesso predeterminato usando seme sessato citofluorimetricamente. Questi risultati sono inoltre una convalida indiretta dell'accuratezza del sortaggio e suggeriscono una potenziale elevata purezza di sessaggio degli spermatozoi di gatto.

In conclusione, anche se sono necessari ulteriori studi per ottimizzare la procedura di sortaggio del seme in questa specie, i risultati ottenuti mostrano che spermatozoi sessati di gatto, ottenuti mediante sperm sorter ad alta velocità, possono essere impiegati con successo per la produzione *in vitro* di embrioni del sesso desiderato. Dal momento che il gatto è un buon modello per gli altri felidi, i risultati incoraggiano l'impiego di seme sessato per i programmi di conservazione delle specie feline esotiche in via di estinzione.

Gli autori ringraziano la “Società Italiana Produttori Sementi” .

Publicazione: Spinaci M, Merlo B, Zannoni A, Iacono E, De Ambrogi M, Turba ME, Zambelli D. *In vitro* production of cat blastocysts of predetermined sex using flow cytometrically sorted semen. *Theriogenology* 2007, 67:872-877.

7 – Blastocisti prodotte *in vitro* a partire da oociti vitrificati

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 valutare l'efficacia della vitrificazione di oociti di gatto in cryoloop e di valutare lo sviluppo embrionale dopo IVF con seme di gatto ottenuto mediante elettroeiaculazione e congelato.

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 CO₂ a 38.5°C per 24 h.

Vitrificazione degli oociti

Dopo la maturazione gli oociti sono stati lavati 2 volte in HSOF, quindi sono stati vitrificati mettendoli a contatto con i crioprotettori in 3 step: 10% EG (0.9M) in HSOF per 1 min; 20% EG (1.8M) in HSOF per 1 min; 40% EG (3.6M), 10mg/ml di Ficoll e saccarosio 0.3 M in HSOF per circa 20 sec, prima di essere posizionati, mediante una pipetta pasteur di vetro tirata alla fiamma, su una cryoloop di nylon (Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA) ed immediatamente immersi in azoto liquido. Gli oociti sono stati conservati in azoto liquido per almeno 4 settimane.

Successivamente gli oociti sono stati scongelati immergendo la loop in una soluzione 0.5 M di saccarosio in HSOF per 30 sec e poi sono stati lavati 3 volte in HSOF prima di essere 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 1×10^6 spermatozoi motili/ml. La sospensione così ottenuta è stata addizionata con 20 μ L/ml di PHE e 10 μ g/ml di eparina. Per l'inseminazione gli oociti sono stati trasferiti in 4-well contenenti 500 μ l della sospensione per IVF e co-coltivati per 18 h a 38.5°C in atmosfera modificata al 5% di CO₂, 5% O₂ e 90% N₂.

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 °C in atmosfera modificata al 5% di CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. 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 303 oociti e sono stati impiegati 159 oociti di controllo. L'esperimento è stato condotto in 2 replicati per gli oociti vitrificati, fertilizzati con seme congelato proveniente da 2 diversi gatti. Per gli oociti di controllo è stata effettuata una IVF aggiuntiva, nel mese di novembre, con seme proveniente da uno dei due gatti impiegati, in modo da ridurre la possibile influenza della qualità degli oociti prelevati nel

periodo compreso da ottobre fino alla prima settimana di febbraio. 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, di morule-blastocisti al giorno 6 e di blastocisti al giorno 7, 8 e di blastocisti sgusciate al giorno 10 sono state calcolate sul numero totale di oociti messi in IVC, sia per quelli vitrificati che per quelli di controllo. La capacità di schiusa è stata valutata calcolando il numero di blastocisti sgusciate rispetto al numero totale di blastocisti. La capacità di sviluppo è stata definita come il numero di blastocisti prodotte al giorno 8 rispetto al numero totale di embrioni divisi. 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 (Tab. 1).

Le percentuali di blastocisti al giorno 7, 8 sono state maggiori ($P < 0.01$) per gli oociti di controllo rispetto a quelli vitrificati, come pure quella di blastocisti/divisi ($P < 0.05$), mentre il rapporto tra blastocisti sgusciate/blastocisti è stato maggiore ($P < 0.05$) per il gruppo degli oociti vitrificati (Tab. 2).

Tabella 1. Sviluppo embrionale *in vitro* di oociti felini vitrificati (VITR) e non (CONTR).

Gruppo	N. oociti	Deg (%)	Divisi (%)	Mor-bl g 6 (%)
VITR	303	151 (49.8) ^a	49 (32.2) ^a	24 (15.8) ^a
CONTR	159	28 (17.6) ^b	67 (51.2) ^b	57 (43.5) ^b

(a,b) $P < 0.01$

Tabella 2. Sviluppo embrionale *in vitro* di blastocisti feline ottenute da oociti vitrificati (VITR) e non (CONTR).

Gruppo	Bl g 7 (%)	Bl g 8 (%)	Bl sg g 10 (%)	Bl sg g 10/bl (%)	Bl/divisi (%)
VITR	11 (7.2) ^a	18 (11.8) ^a	8 (5.3)	8/18 (44.4) ^c	18/49 (36.7) ^d
CONTR	34 (26.0) ^b	37 (28.2) ^b	7 (5.3)	7/37 (18.9) ^d	37/67 (55.2) ^c

(a,b) P<0.01; (c,d) P<0.05

Discussioni

La vitrificazione di oociti di gatto in cryoloop consente di ottenere oociti competenti in grado di svilupparsi *in vitro* sino allo stadio di blastocisti sgusciata. Questo è il primo studio in cui tale stadio è stato raggiunto a partire da oociti vitrificati.

La percentuale di sopravvivenza ottenuta nel presente studio (50.2%) dopo vitrificazione in cryoloop di oociti maturati *in vitro* e quella di divisione (32.2%), 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.

La crioconservazione degli oociti è considerata una tecnica sperimentale in tutte le specie, in quanto non sono ancora state ottenute percentuali di sopravvivenza, fertilizzazione e sviluppo embrionale adeguate (Luvoni, 2006). Infatti, nel gatto, nonostante le percentuali di sopravvivenza ottenute con il congelamento lento siano state soddisfacenti, non è stato possibile ottenere embrioni in grado di raggiungere lo stadio di blastocisti (Luvoni e Pellizzari, 2000), come invece è avvenuto per la vitrificazione in paillette, ma in percentuale non soddisfacente (3.1%, Murakami et al., 2004).

Nel presente studio la percentuale di blastocisti ottenute (11.8%) è stata inferiore rispetto al controllo (28.2%), ma comunque incoraggiante rispetto ai risultati sino ad ora ottenuti da oociti crioconservati. Inoltre, per la prima volta, è stato raggiunto lo stadio di blastocisti sgusciata. A tale proposito, la percentuale di blastocisti sgusciate è stata simile per i due

gruppi, con una capacità di schiusa maggiore per gli embrioni derivanti da oociti vitrificati, nonostante la loro minore capacità di sviluppo. È stato infatti riscontrato che blastocisti derivanti da oociti vitrificati sgusciano più facilmente di quanto non avvenga per quelle derivanti da oociti non crioconservati, inoltre gli embrioni derivanti da oociti vitrificati sono sgusciati in modo completo, similmente a quanto accade *in vitro* per altre specie, a differenza di quanto invece avviene solitamente *in vitro* nel gatto, in cui un certo numero di cellule rimane all'interno della ZP. Una probabile giustificazione di tale fenomeno può essere attribuita al fatto che, durante la vitrificazione, la ZP, pur non subendo danni visibili, venga comunque "indebolita" permettendo, successivamente, una più facile rottura da parte dell'embrione in espansione.

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.

CANE

8 – Maturazione *in vitro* di oociti in SOF addizionato con E2 e P4

Introduzione

Nonostante siano stati raccolti numerosi dati dai vari studi effettuati, le percentuali di IVM di oociti di cagna si aggirano intorno al 20% (Rodrigues e Rodrigues, 2006). Sono stati molteplici gli approcci tentati *in vitro* per la maturazione degli oociti canini, tra cui l'impiego di co-culture (Hewitt e England, 1999a; Otoi et al., 2000; Bogliolo et al., 2002; Hatoya et al., 2006), di diverse fonti proteiche (Otoi et al., 1999; Hewitt e England, 1999a; Bolamba et al., 2002; Rodrigues e Rodrigues, 2003b; Oh et al., 2005; Bolamba et al., 2006; Cui et al., 2006) e di ormoni (Hewitt e England, 1997; Hewitt e England, 1999b; Songsasen et al., 2002; Rodrigues e Rodrigues, 2003a; Willingham-Rocky et al., 2003; De los Reyes et al., 2005; Bolamba et al., 2006), con risultati talvolta controversi. Infatti la cagna ha un ciclo estrale caratteristico e gli oociti sono esposti ad alte concentrazioni di progesterone nell'ambiente follicolare, l'oocita viene poi ovulato allo stadio di GV e riprende e completa la meiosi nell'ovidotto; ne consegue che le condizioni ottimali per l'IVM possano differire da quelle degli altri mammiferi (Luvoni et al., 2005). Una più recente strategia adottata per l'IVM nel cane, in modo da mimare ciò che avviene *in vivo*, è stata la maturazione con un sistema sequenziale, come quello di esporre gli oociti per un breve periodo di coltura (60-240 min) a eCG (Songsasen et al., 2003) o di co-cultivare gli oociti in ovidotto isolato per 24 h e poi proseguire la coltura in goccia per 48 o 72 h (Luvoni et al., 2003).

Il terreno di maturazione più usato nel cane è il TCM199 (Mahi e Yanagimachi, 1976; Nickson et al., 1993; Hewitt et al., 1998; Otoi et al., 1999; Fujii et al., 2000; England et al., 2001; Luvoni et al., 2001; Saint-Dizier et al., 2001; Otoi et al., 2002; Bogliolo et al., 2002; Rodrigues e Rodrigues, 2003a,b; Luvoni et al., 2003; Rodrigues e Rodrigues, 2004; De los Reyes et al., 2005; Songsasen e Wildt, 2005; Oh et al., 2005; Otoi et al., 2006; Rodrigues et al., 2006) e sono scarsi gli studi effettuati con terreni semplici quali il mKRB (Yamada

et al., 1992; Yamada et al., 1993) o il SOF (Hewitt e England, 1999a; Bolamba et al., 2002; Rota e Cabianca, 2004). Il SOF ha portato a percentuali di maturazione simili (Hewitt e England, 1999a) o tendenzialmente inferiori (Rota e Cabianca) al TCM199 e nello studio in cui follicoli antrali sono stati maturati in SOF addizionato o meno con siero o BSA (Bolamba et al., 2002) le percentuali di maturazione non sono state influenzate dall'aggiunta di proteine, suggerendo che queste non fossero essenziali per la coltura di follicoli antrali nel SOF. Il massimo valore di MI e MII ottenute in SOF è stato comunque del 12.2% (Bolamba et al., 2002), quindi inferiore alla media ottenibile in questa specie. Scopo di questo studio è stato quello di verificare le percentuali di maturazione di oociti di cane nel SOF, adottato nel nostro laboratorio per l'IVM nel gatto, aggiungendo E2 e P4 in un sistema standard oppure in un sistema sequenziale.

Materiali e metodi

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

Raccolta degli oociti e maturazione in vitro

Le ovaie di 24 cagne di razza meticcica e di età superiore a 12 mesi sono state prelevate dopo ovariectomia. Lo stadio del ciclo estrale di tali animali è stato determinato attraverso la valutazione della morfologia ovarica. Sono state distinte tre fasi: 1) anestro, quando le ovaie non mostravano follicoli o corpi lutei evidenti; 2) estro (fase follicolare), quando sulle ovaie erano presenti uno o più follicoli di 2-10 mm di diametro; e 3) diestro, quando sulle ovaie erano presenti uno o più corpi lutei.

Le ovaie sono state rimosse e mantenute a temperatura ambiente in soluzione fisiologica sino al momento del recupero degli oociti, mediante sminuzzamento dell'ovaio con una lama di bisturi in capsule petri da 100 mm contenenti HSOF. Gli oociti sono stati cercati allo stereomicroscopio e selezionati per la maturazione in base all'aspetto del citoplasma (scuro ed omogeneo) e alla presenza di almeno 3 strati di cellule del cumulo.

Gli oociti sono stati lavati 3 volte in HSOF prima di essere trasferiti nel terreno di maturazione, la cui composizione base è stata la medesima del SOF per IVM impiegato nel

nostro laboratorio per la maturazione degli oociti felini, ovvero SOFaa addizionato con 5 mg/ml di BSA, 25 µl/ml di ITS, 25 ng/ml di EGF, L-cisteina 1.2 mM e 0.1 UI di FSH e LH suino (Pluset, Laboratorios Calier, Barcelona, Spain).

Indipendentemente dallo stadio del ciclo estrale degli animali, gli oociti sono stati uniti e distribuiti in modo uniforme e casuale in uno dei due seguenti protocolli di maturazione: 1) Standard (ST), 72 h in SOF per IVM + 2 µg/ml E2 + 8 ng/ml P4; 2) Sequenziale (SEQ), da 0 a 24 h in SOF per IVM + 2 µg/ml E2; da 24 a 48 h in SOF per IVM + 2 µg/ml E2 + 4 ng/ml P4; da 48 h a 72 h in SOF per IVM + 8 ng/ml P4. La maturazione è stata condotta a 38.5°C in aria umidificata al 5% di CO₂.

Valutazione dello stadio meiotico

Alla fine del periodo di maturazione, gli oociti sono stati decumulati in HSOF mediante azione meccanica esercitata con una pipetta. Gli oociti denudati sono stati poi colorati con Hoechst 33342 (10 µg/ml in PBS) per 15 min al buio a temperatura ambiente. La valutazione della configurazione meiotica è stata effettuata mediante un microscopio a luce UV. Sono stati considerati 3 gruppi: 1) oociti allo stadio di GV-GVBD; 2) oociti allo stadio di MI-MII; e 3) oociti degenerati, quelli in cui non è stato possibile distinguere la presenza di materiale cromosomico.

Analisi statistica

L'esperimento è stato effettuato in 7 replicati. I dati sono stati analizzati mediante test del Chi Quadrato (Statistica for Windows - Stat Soft Inc Tulsa, Oklahoma, USA). La significatività è stata considerata per $P < 0.05$.

Risultati

Delle 24 cagne ovariectomizzate, 5 erano in anestro, 3 in estro e 14 in diestro.

I risultati sono riportati in Tabella 1. Non è stata rilevata alcuna differenza significativa tra i due protocolli di maturazione in termini di oociti che hanno raggiunto lo stadio di MI-MII ($P > 0.05$).

Tabella 1. Stadio meiotico di oociti di cane maturati *in vitro* in presenza di E2 e P4 a dosaggio costante (ST) o variabile (SEQ).

IVM	N° oociti	N° GV-GVBD (%)	N° MI-MII (%)	N° deg(%)
ST	196	111 (56.6)	38 (19.4)	47 (24.0)
SEQ	178	104 (58.4)	31 (17.4)	43 (24.2)

Discussioni

La percentuale di oociti di cane che hanno raggiunto lo stadio di MI-MII dopo IVM in SOF in presenza di E2 e P4 non è risultata differente nel sistema standard e in quello sequenziale. Per la prima volta è stato possibile raggiungere in un terreno semplice percentuali di maturazione comparabili alla media del 20% ottenuta con terreni complessi quali il TCM199.

Il SOF è un terreno comunemente impiegato per l'IVC degli embrioni bovini. La formulazione di questo terreno è stata basata in origine sulle analisi biochimiche condotte sul fluido dell'ovidotto ovino (Tervit et al., 1972) e successivamente è stato modificato con l'aggiunta di aminoacidi (Gardner et al., 1994). Per l'impiego di questo terreno nella maturazione di oociti in diverse specie sono stati aggiunti siero, albumina, gonadotropine, fattori di crescita, ormoni e sostanze antiossidanti a seconda delle diverse necessità e dei diversi protocolli standard adottati nei vari laboratori.

Nel cane Hewitt e England (1999a) hanno raggiunto una percentuale dell'8% di MI-MII a 96 ore di IVM in SOF addizionato con il 4% di BSA; Rota e Cabianca (2004) hanno impiegato il SOF addizionato con FSH, LH ed E2 ottenendo una percentuale del 3.9% di MI; Bolamba et al. (2006) hanno ottenuto il 12.2% di MI-MII dopo 72 h di coltura di follicoli preantrali in SOF senza siero o BSA. Le percentuali di MI-MII da noi raggiunte (19.4% standard e 17.4 % sequenziale) sono state superiori a quelle ottenute negli altri studi dove è stato impiegato il SOF. In questo studio, il SOF da IVM impiegato nel nostro laboratorio per la maturazione di oociti di gatto, è stato supplementato con gli ormoni steroidei E2 e P4 in modo da mimare una possibile situazione *in vivo* nella cagna. Sebbene non sia stata condotta alcuna analisi del fluido dell'ovidotto nel cane, esso è una combinazione di secrezioni dell'ovidotto stesso e di una trasudazione elettiva del plasma

(Brackett e Mastroianni, 1974), per cui per la formulazione del dosaggio del P4 nel terreno standard, e particolarmente in quello sequenziale, sono stati presi in considerazione i valori plasmatici nel periodo periovulatorio nella cagna (Concannon et al., 1977; Marseloo et al., 2004). Il dosaggio degli estrogeni impiegato in questo studio è stato quello utilizzato per la maturazione di oociti bovini (Ponderato et al., 2001) e impiegato con successo anche nel cane (Kim et al., 2005). È probabile che la combinazione degli ormoni, gonadotropine, EGF e BSA nel protocollo da IVM da noi adottato abbia permesso di ottenere una più elevata percentuale di MI-MII rispetto agli altri studi in cui è stato impiegato il SOF.

In altri esperimenti è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di diverse concentrazioni di P4 ed E2, singolarmente o in associazione, sulla maturazione nucleare di oociti di cane; Willingham-Rocky et al. (2003) hanno riscontrato che l'aggiunta di progesterone ad alti dosaggi (0, 2000, 4000, 8000 ng/ml nell'esperimento I e 0, 20, 200, 2000 ng/ml nell'esperimento 2) non aumentava la percentuale di IVM di oociti di cane, mentre Kim et al. (2005) hanno riscontrato che l'aggiunta di E2 o P4 al terreno da IVM, per oociti prelevati nei diversi stadi del ciclo estrale, ha aumentato la percentuale di MII e che l'aggiunta di P4 in combinazione ad E2 ha promosso ulteriormente la maturazione rispetto all'E2 da solo in maniera dipendente dalla concentrazione di P4. Infantosi Vannucchi et al. (2006) hanno invece impiegato E2 e P4 in un sistema di co-coltura con cellule dell'ovidotto ed hanno riscontrato che E2 da solo non apporta effetti benefici per l'IVM come invece hanno riscontrato per il P4 e la combinazione E2 e P4. Nel presente studio la presenza continua di E2 e P4 oppure la presenza alternata dei due ormoni non ha comportato alcuna differenza a 72 h di maturazione, non permettendo quindi di ottenere alcuna informazione sull'interazione degli ormoni stessi. Ulteriori indagini andrebbero effettuate per valutare lo sviluppo meiotico in momenti diversi nel processo di maturazione.

In conclusione la combinazione di E2 e P4 in SOF, sia nel sistema standard che in quello sequenziale, ha permesso di ottenere percentuali di maturazione di oociti di cane che non si discostano dalla media in tale specie, raggiungendo livelli mai ottenuti con tale terreno.

BIBLIOGRAFIA

- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Mazni OA, Rutledge JJ. Post-thaw survival and pregnancy rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification. *Theriogenology* 1994;41:154.
- Ali A, Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Biol Reprod* 2002a;66:901-905.
- Ali A, Sirard MA. The effects of 17 beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. *Zygote* 2002b;10:65-71.
- Allen WR. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod Dom Anim* 2005;40:310-329.
- Allen WR, Pashen RL. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J Reprod Fertil* 1984;71:607-613.
- Allen WR, Rowson LEA. Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *J Reprod Fertil Suppl* 1975;23:525-530.
- Alm H, Torner H. *In vitro* maturation of horse oocytes. *Theriogenology* 1994;42:345-349.
- Alm H, Torner H, Blottner S, Nürnberg G, Kanitz W. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. *Theriogenology* 2001;58:817-829.
- Alvarenga MA, McCue P, Bruemmer JE, Neves Neto JR, Squires EL. Ovarian response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology* 2001;56:879-887.
- Amann RP. Issues affecting commercialization of sexed sperm. *Theriogenology* 1999;52:1441-1457.
- Andersen K. Insemination of frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene* 1975;10:1-4.
- Antczak DF, Allen WR. Invasive trophoblast in the genus *Equus*. In: The Riddle of the Foetal Allograft. Chaouat G (ed.), *Ann Immunol* 135D, 1984;301-351.
- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2002;187:77-81.
- Avery B, Brandenhoff HR, Greve T. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos, cultured from days 1-5 post insemination in either Menezo-B2 medium or in HECM-6 medium. *Theriogenology* 1995;44:935-945.

- Axner E, Linde-Forsberg C. Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In: Recent advances in small animal reproduction. Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C (eds.), New York: International Veterinary Information Service, 2002.
- Batallier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 2001;68:181–190.
- Belluzzi S, Garnum F, Soatti A. Fecondazione artificiale del cane con seme congelato. Artificial insemination in the dog with frozen semen. *Atti SISVet* 1988; Vol. 42:183.
- Betteridge KJ. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim Reprod Sci* 2003;79:203-244.
- Bézar J, Magistrini M, Duchamp G, Palmer E. Chronology of equine fertilization and embryonic development *in vivo* and *in vitro*. *Equine Vet J Suppl* 1989;8:105–110.
- Bogliolo L, Leoni G, Ledda S, Naitana S, Zedda M, Caruccio A, et al. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2001;56:955-967.
- Bogliolo L, Zedda MT, Ledda S, Leoni G, Naitana S, Pau S. Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on *in vitro* maturation of canine oocytes. *Reprod Nutr Dev* 2002;42:265-273.
- Bolamba D, Russ KD, Olson MA, Sandler JL, Durrant BS. *In vitro* maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology* 2002;58:1689-1703.
- Bolamba D, Russ KD, Harper SA, Sandler JL, Durrant BS. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 2006;65(6):1037-1047.
- Boland MP, Goulding D, Roche JF. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 1991;35:5-17.
- Bondioli KR, Westhusin ME, Looney CR. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 1990;33:165-174.
- Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD, Youngquist RS. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 1990;34:147–157.
- Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to conventional embryo production approach. *Theriogenology* 1999;51:59.
- Bowen JM. Artificial insemination in the horse. *Equine Vet J* 1969;1:98–110.
- Brackett BG. A review of *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 1983;19:1-15.
- Brackett BG, Mastroianni L. Composition of oviductal fluid. In: The oviduct and its functions. Johnson AD, Foley CW (eds.), New York: Academic Press; 1974:133-159.

- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982;27:147-158.
- Brink MF, Bishop MD, Pieper FR. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology* 2000;53:139-148.
- Brinsko SP, Ball BA, Ellington JA. *In vitro* maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares. *Theriogenology* 1995;44:461-469.
- Brück I, Grøndahl C, Høst T, Greve T. *In vivo* maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season. *Theriogenology* 1996;46:75-84.
- Brück I, Greve T, Hyttel P. Morphology of the oocyte-follicular connection in the mare. *Anat Embryol* 1999;199:21-28.
- Brucker C, Alexander NJ, Hodgen GD, Sandow BA. Transforming growth factor-alpha augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1991; 28:94-98.
- Callesen H, Greve T, Christensen F. ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 1987;27:217.
- Campbell KH, Mc Whir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from cultured cell line, *Nature* 1996;380:64-66.
- Campos-Chillon LF, Walker DJ, De la Torre-Sanchez JF, Seidel Jr GE. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology* 2006;65:1200-1214.
- Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, da Silva LDM. Cryopreservation of canine semen with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology* 2003;59:743-751.
- Cardoso RCS, Silva AR, da Silva LDM. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Anim Reprod Sci* 2006;92:384-391.
- Carnegie JA, Durnford R, Algire J, Morgan J. Evaluation of mitomycin-treated vero cells as a co-culture system for IVM-IVF derived bovine embryos. *Theriogenology* 1997;48:377-389.
- Carnevale EM. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Proc 15th Int Congr Anim Reprod. Research and Practice III*, 2004;vols 82-83:617-632.
- Carnevale EM, Ginther OJ. Use of a linear ultrasonic transducer for a transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. *J Eq Vet Sci* 1993;13:331-333.
- Carnevale EM, Squires EL, McKinnon AO. Comparison of Ham's F10 with CO₂ or HEPES buffer for the 24-h storage of equine embryos at 5°C. *J Anim Sci* 1987;65:1775-1781.
- Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho S, Scott TJ, Squires EL. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology* 2000;54:981-987.

Carnevale EM, Eldridge-Panuska WD, Caracciolo di Brienza V. How to collect and vitrify equine embryos for direct transfer. Proc 50th Ann Congr AAEP, Denver, CO, 2004:402–405.

Carney NJ, Squires EL, Cook VM, Seidel Jr GE, Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. Theriogenology 1991;36:23-32.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. J Biol Chem 1990; 265: 7709-7712.

Catt SL, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WMC, Evans G. Birth of a male lamb derived from *in vitro* matured oocytes fertilized by intracytoplasmic injection of a single “male” sperm. Vet Rec 1996;139:94-495.

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

Chauhan MS, Singla SK, Palta P, Manik RS, Madan ML. Effect of epidermal growth factor on the cumulus expansion, meiotic maturation and development of buffalo oocytes *in vitro*. Vet Rec 1999; 144:266-267.

Choi YH, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. Theriogenology 1993;40:959–966.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon Fa, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science 1998;280:1256-1258.

Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hylan D, Carter J, Pinto C, Paccamonti D, Godke RA. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. J Eq Vet Sci 1998;18:736–741.

Concannon PW, Hansel W, McEntee K. Changes in LH, progesterone and sexual behaviour associated with pre-ovulatory luteinization in the bitch. Biol Reprod 1977;17:604-613.

Cran DG, Johnson L, Miller NGA, Cochrane D, Polge CE. Production of bovine calves following separation of X- and Y- bearing sperm and *in vitro* fertilization. Vet Rec 1993;132:40-41.

Cran DG, Cochrane DJ, Johnson DJ, Wei H, Lu KH, Polge CE. Separation of X- and Y-chromosome bearing bovine sperm by flow cytometry for use in IVF. Theriogenology 1994;41:183.

Cui XS, Jin YX, Shen XH, Lee JY, Lee HS, Yin XJ, Kong IK, Kim NH. Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. Theriogenology 2006;66:267-274.

Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR, Leung BS. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. Fertil Steril 1991; 55(5): 1000-1004.

De los Reyes M, de Lange J, Miranda P, Palominos J, Barros C. Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on *in vitro* maturation of canine oocytes. Theriogenology 2005;64:1-11.

Dekel N, Sherizly I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. Endocrinology. 1985; 116:406-9.

- Del Campo MR, Donoso MX, Parrish JJ, Ginther OJ. *In vitro* fertilisation of *in vitro* matured oocytes. J Eq Vet Sci 1990;10:18–22.
- Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, Maritato F. Effects of follicular fluid supplementation of *in vitro* maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997;12:2766–2772.
- Ding J, Foxcroft GR. Epidermal growth factor enhances oocyte maturation in pigs. Mol Reprod Dev 1994; 39:30-40.
- Dobrinsky I, Lulai C, Barth AD, Post K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. J Reprod Fertil Suppl 1993;47:291–296.
- Donoghue AM, Johnston LA, Goodrowe KL, O'Brien SJ, Wildt DE. Influence of day of oestrus on egg viability and comparative efficiency of *in vitro* fertilization in domestic cats in natural or gonadotrophin-induced oestrus. J Reprod Fertil 1993 ; 98:85-90.
- Downs SM, Mastropolo AM. Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. Mol Reprod Dev 1997; 46:551-566.
- Dresser BL, Gelwicks EJ, Wachs KB, Keller GL. First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. J Exp Zool 1988;246:180–6.
- Edwards RG. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature 1965;208:349-351.
- Elsden RP, Hasler JF, Seidel Jr GE. Nonsurgical recovery of bovine eggs. Theriogenology 1976;6:523-532.
- England GCW, Vertsegen JP, Hewitt DA. Pregnancy following *in vitro* fertilization of canine oocytes. Vet Rec 2001;148:20-22.
- Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. Reprod Fertil Dev 1996; 8:485-489.
- Eppig JJ. Mouse oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development *in vitro*. In Richter JD (ed) A comparative methods approach to the study of oocytes and embryos. Oxford University press 1999, Oxford:3-9.
- Eppig JJ, Schroeder AC. Culture systems for mammalian oocyte development: progress and prospects. Theriogenology 1986;25:97-106.
- Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. Dev Biol 1994; 164:1-9.
- Eyestone WH, First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J Reprod Fertil 1989;85:715-720.
- Eyestone WH, Leibfried-Rutledge L, Northey DL, Gillman BG, First NL. Culture of bovine one and two-cell embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. Theriogenology 1987;28:1-7.

- Farin PW, Slenning BD, Britt JH. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Theriogenology* 1999;52:659-670.
- Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 2000;53:175-186.
- 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* 2000;65:9-13.
- Fugger EF, Black SH, Keyvanfar K, Schulman JD. Birth of normal daughters after Micro sort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:2367-2370.
- Fujii M, Otoi T, Murakami M, Tanaka M, Une S, Suzuki T. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J Vet Med Sci* 2000;62(3):305-307.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes, matured fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol Reprod* 1990;42:114-119.
- Galli C, Lazzari G. Practical aspects of IVM-IVF in cattle. *Anim Reprod Sci* 1996;42:371-379.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 2001;55:1341-1357.
- Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G, Duchamp G, Daels P, Lazzari G. Frozen-thawed embryos produced by ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology* 2002;58:705-708.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, colleoni S, Lagutina I, lazzari G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003a;59:599-616.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Inrini P, Panderata N, Dachi R, Lazzari G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003b;424:635-636.
- Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human reproduction* 2000; 15 (2): 395-401.
- Garcia A, Salaheddine M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 1998;50:575-585.
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Patt PA. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* 1994;50:390-400.
- Gardner DK, Lane MW, Lane M. Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72 h of development from the zygote. *Theriogenology* 1997;47:278.
- Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 2006;65:943-57.

- Gomez 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 Fert Dev* 2000;12:423–33.
- Gomez 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* 2003; 60:239-251.
- Gomez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, et al. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Clon Stem Cells* 2004;6:217–28.
- Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson JSM, Broadbent PJ. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* 1999;51:951-961.
- Goodrowe KL, Wall RJ, O'Brien SJ, Schmidt PM, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes. *Biol Reprod* 1988;39:355–72.
- Goodrowe KL, Howard JG, Schmidt PM, Wildt DE. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in-vitro fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* 1989;39:73-90.
- Goodrowe KL, Hay M, King WA. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes *in vitro*. *Biol Reprod* 1991; 45:466-470.
- Goodrowe KL, Hay MA, Platz CC, Behrns SK, Jones MH, Waddell WT. Characteristics of fresh and frozen thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1998;53:299–308.
- Gordon I, Lu KH. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology* 1990;33:77-87.
- Göritz F, Jewgenow K, Meyer HH. Epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the ovary of the domestic cat (*Felis catus*). *J Reprod Fertil* 1996; 106:117-124.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J Reprod Fertil* 1988;83:753-758.
- Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod* 1998; 13:1638-44.
- Gray KR, Bondioli KR, Betts CL. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* 1991;35:37-44.
- Greenlee AR, Krisher RL, Plotka ED. Rapid sexing of murine preimplantation embryos using a nested, multiplex polymerase chain reaction (PCR). *Mol Reprod Dev* 1998;49:261-267.
- Grøndhal C, Høst T, Brück I, Viuff D, Bézard J, Fair T, Greve T, Hyttel P. *In vitro* production of equine embryos. *Biol Reprod Monogr* 1995a;1:299–307.

- Grøndhal C, Hyttel P, Grøndhal M, Eriksen T, Gotfredsen P, Greve T. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation *in vivo*. *Mol Reprod Dev* 1995b;42:94–105.
- Grøndhal C, Hansen Th, Hossaini A, Heinze I, Greve T, Hyttel P. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro*-matured equine oocytes. *Biol Reprod* 1997;57:1495–1501.
- Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognie Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*. 2000, 54:209-218.
- Gurdon JB, Colman A. The future of cloning. *Nature* 1999;402:743-746.
- Guthrie HD, Johnson LA, Garrett WM, Welch GR, Dobrinsky JR. Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine. *Mol Reprod Dev* 2002;61:87–92.
- Hagemann LJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A, Peterson AJ, Schurmann A, Tervit HR. Development during IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev* 1999;53:451-458.
- Harrop AE. *Reproduction in the dog*. London:Bailliere-Tindall & Cox, 1960;1-204.
- Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003;79:245-264.
- Hasler JF, Hurtgen PG, Jin ZQ, Stokes JE. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* 1997;48:563-579.
- Hatoya S, Sugiyama Y, Torii R, Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, Kida K, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Inaba T. Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVM, IVF and IVC of canine oocytes. *Theriogenology* 2006;66(5):1083-1090.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995;43:141-152.
- Heape W. artificial insemination of mammals and subsequent fertilisation or impregnation of their ova. *Proc Royal Soc, London*, 1987;61:52-63.
- Heape W. On the artificial insemination of mares. *Veterinarian* 1898;71:202–212.
- Hewitt DA, England GCW. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51:83-91.
- Hewitt DA, England GCW. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 1997;50:123-139.
- Hewitt DA; England GCW. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell co-culture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 1999a;55:63-75.

- Hewitt DA, England GCW. Influence of gonadotrophin supplementation on the *in vitro* maturation of bitch oocytes. *Vet Rec* 1999b;144:237-239.
- Hewitt DA, Watson PF, England GCW. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology* 1998;49:1083-1101.
- Hill JR, Winger QA, Long CR, Looney CR, Thompson JA, Westhusin ME. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol reprod* 2000;62:1135-1140.
- Hinrichs K, Schmidt AL, Selgrath JP. Activation of horse oocytes. *Biol Reprod Monogr* 1995;1:319-324.
- Hinrichs K, Betschart RW, McCue PM, Squires EL. Effect of timing of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in mares. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;56:493-498.
- Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviducal transfer. *Biol Reprod* 2002;67:256-262.
- Hochi S, Fujimoto T, Choi Y, Braun J, Oguri N. Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing. *Theriogenology* 1994;42:1085-1094.
- Hochi S, Kimura K, Ito K, Hirabayashi M. Viability of immature horse oocytes cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1995;43:236.
- Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N. *In vitro* maturation and transmission electron microscopic evaluation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology* 1996;33:300-310.
- Hori T, Hagiuda K, Kawakami E, Tsutsui T. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology* 2005;63:1573-1583.
- Howard JG. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. In: M.E. Fowler and R.E. Miller, Editors, *Zoo and wild animal medicine IV*, WB Saunders Co., Philadelphia, PA 1999:449-457.
- Howard JG, Bush M, Wildt DE. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals. In *Current therapy in theriogenology 2*, Ed DA Morrow., Philadelphia: Saunders Company, 1986, pp 1047-1053.
- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl* 1990;11:204-215.
- Howard JG, Barone MA, Donoghue AM, Wildt DE. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J Reprod Fertil* 1992;96:175-186.
- Hudson JJ, McCue PM. How to increase embryo recovery rates and transfer success. *Proc 50th Ann Conv AAEP*, Denver, CO, 2004:406-408.
- Hunter RHF, Nichol R. A preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J Reprod Fertil* 1986;77:599-606.

- Hurtt AE, Landim-Alvarenga F, Seidel Jr GE, Squires EL. Vitrification of immature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 2000;54:119-128.
- Infantosi Vannucchi C, Motos de Oliveira C, Groke Marques M, Ortiz Avila Assumpcao ME, Visintin JA. *In vitro* canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone-supplemented media. *Theriogenology* 2006;66:1677-1681.
- Inoue M, Naito K, Aoki F, Toyoda Y, Sato E. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* 1995; 3:265-271.
- Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itaska J, Miki Y, Seike N, Kainuma H. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology* 1993;40:427-433.
- Jacobsen H, Schmidt M, Holm P, Sangild PT, Vajta G, Greve T, Callesen H. Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from *in vitro* produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelium cells. *Theriogenology* 2000;53:1761-1769.
- Jasko DJ. Comparison of pregnancy rates following non-surgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices. *Theriogenology* 2002;58:713-716.
- Jewgenow K. Impact of peptide growth factors on the culture of small preantral follicles of domestic cat. *Theriogenology* 1996; 45:889-895.
- Jewgenow K, Göritz F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cat and their characterisation before and after culture. *Anim Reprod Sci* 1995; 39:285-297.
- Johnson LA. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y bearing sperm. *Reprod Dom Anim* 1991;26:309-314.
- Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:93-107.
- Johnson LA, Pinkel D. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 1986;7:268-273.
- Johnson LA, Cran DG, Polge CE. Recent advances in sex preselection of cattle: flow cytometric sorting of X- and Y-chromosome bearing sperm based on DNA to produce progeny. *Theriogenology* 1994;41:51-56.
- Johnson LA, Welch GR. Sex pre-selection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 1999;52:1323-1341.
- Johnston 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.
- Jung T, Fulka J Jr, Lee C, Moor RM. Effects of the protein phosphorylation inhibitor genistein on maturation of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1993; 98:529-535.

- Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Biol Reprod* 2001;65:1127-1134.
- Kane MT. Culture media and culture of early embryos. *Theriogenology* 1987;27:49-57.
- KarjaNW, Otoi T, Murakami M, Yuge M, Fahrudin M, Suzuki T. Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat IVF embryos. *Reprod Fertil Dev* 2002;14:291-6.
- Kawarasaki T, Welch GR, Long CR, Yoshida M, Johnson LA. Verification of flow cytometrically-sorted X- and Y-bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. *Theriogenology* 1998;50:625-35.
- Keskintepe L, Brackett BG. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol Reprod* 1996;55:333-339.
- Keskintepe L, Burnley CA, Brackett BG. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biol Reprod* 1995;52:1410-1417.
- Keskintepe L, Pacholczyk g, Machnicka A, Norris K, Curuk MA, Khan I, Brackett BG. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod* 2002;67:409-415.
- Kim YJ, Kim HN, Han YM, Kim SJ, Kim BJ, Park YJ, Oh HG. Parentage testing for the offspring produced by embryo transfer with frozen embryos in the dog. *Korean J Vet Clin Med* 2000;17:234-237.
- Kim YJ, Kim BJ, You I. Embryo transfer with frozen embryos in the dog. *J Vet Clin* 2002;19:73-79.
- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Effects of estradiol-17 β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005;63:1342-1353.
- Kim YM, Ko DH, Uhm SJ, Chung KS, Lee HT. A new paper container for the vitrification of bovine embryos. *Reprod Fertil Develop* 2004;16:173.
- Kinney GM, Pennycook JW, Schriver MD, Templeton JW, Kramer DC. Surgical collection and transfer of canine embryos. *Biol Reprod* 1979 Suppl;20:96.
- Kito S, Bavister B. Maturation of hamster oocytes under chemically defined conditions and sperm penetration through the zona pellucida. *Zygote* 1996; 4:199-210.
- Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha on *in vitro* maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fertil* 1994; 100:439-446.
- Kraemer DC, Flow BL, Schriver MD, Kinney GM, Pennycook JW. Embryo transfer in the nonhuman primate, feline and canine. *Theriogenology* 1979;11:51-62.

- Kruip TAM, den Daas JHG. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 1997;47:43-52.
- Kuwayama M, Tasaka M, Hamano S. In-straw dilution of bovine IVF-blastocysts cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994;41:231.
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 1999;17:1234-1236.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999;72:1073-1077.
- Ledda S, Leoni G, Bogliolo L, Naitana S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology* 2001;55:1359-1371.
- Ledda S, Bogliolo L, Succu S, Ariu F, Bebbere D, Leoni GG, Naitana S. oocyte cryopreservation.oocyte assessment and strategies for improving survival. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:13-23.
- Lehn-Jensen H. Deep freezing of cattle embryos. *Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and AI, Illinois, 1984;vol.4:1-12.*
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol reprod* 1987;36:376-383.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1989;31:61-74.
- Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984;21:767-790.
- Leibo SP. Cryopreservation of embryos. *Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and AI, Dublin, Ireland, 1988;vol.5:370-377.*
- Leibo Sp, Mazur P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: *Methods in mammalian reproduction*. Daniel JC Jr (ed.), Academic Press, new York, 179-201.
- Leibo SP, Mapletoft RJ. Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America- proceedings of 17th Annual Convention of th american embryo Transfer Association, San Antonio, Texas,1998:91-98.
- Levinson G, Keyvanfur K, Wu JC, Fugger EF, Fields RA, Harton GL, Palmer FT, Sisson ME, Starr KM, Dennison-Lagos L, Calvo L, Sharins RJ, Bick D, Schulman DJ. DNA based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the prevention of X-linked disease. *Hum Reprod* 1995;10:979-982.
- Legrand E, Bencharif D, Barrier-Battut I, Delajarraud H, Cornière P, Fiéni F, Tainturier D, Bruyas JF. Comparison of pregnancy rates for days 7–8 embryos frozen in glycerol with and without previous enzymatic treatment of their capsule. *Theriogenology* 2002;58:721–723.

- Li LY, Meintjes M, Graff KJ, Paul JB, Denniston RF, Godke RA. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured oocytes aspirated from pregnant mares. *Biol Reprod Mono* 1995;1:309–318.
- Li X, Morris LH-A, Allen WR. Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Fertil* 2000;119:253–260.
- Li X, Morris LHA, Allen WR. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction* 2001;121:925–932.
- Libersky EA, Boatman D. Progesterone concentration in serum, follicular fluid, and oviductal fluid of the Golden Hamster during periovulatory period. *Biol Reprod* 1995;53:477-482.
- Liebermann J, Mawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 2002;67:1671-1680.
- Lindsey AC, Bruemmer JE, Squires EL. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. *Anim Reprod Sci* 2001;68:279–289.
- Lindsey AC, Morris LH-A, Allen WR, Schenk JL, Squires EL, Bruemmer JE. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. *Equine Vet J* 2002a;34:128–132.
- Lindsey AC, Schenk JL, Graham JK, Bruemmer JE, Squires EL. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow-sorted frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J* 2002b;34:121–127.
- Liu Z, Foote RM. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod* 1995;53:786-790.
- Lohuis MM. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology* 1995;43:51-60.
- Lonergan P, Carolan C, Mermillod P. Development of bovine embryos *in vitro* following oocyte maturation under defined conditions. *Repro Nutr Dev* 1994;34:329-339.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* 1996; 54:1420-1429.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation *in vitro* by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J Reprod Fertil* 1994, 101:697-701.
- Lorenzo PL, Rebollar PG, Illera MJ, Illera JC, Illera M, Alvarino JMR. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1996, 107:109-117.
- Lorenzo PL, Liu IK, Illera JC, Picazo-RA, Carneiro-GF, Illera-MJ, Conley-AJ, Enders-AC, Illera-M. Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway. *J Physiol Biochem* 2001, 57:15-22.

- Lorenzo PL, Liu IK, Carneiro GF, Conley AJ, Enders AC. Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. *Equine Vet J* 2002; 34:378-382
- Lu KH, Gordon I, Gallagher M, McGovern H. Pregnancy established in cattle by transfer embryo derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Vet Rec* 1987;121:159-160.
- Lu KH, Cran DG, Seidel GE Jr. *In vitro* fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 1999;52:1393-405.
- Luvoni GC, Oliva O. Effect of Medium-199 and fetal calf serum on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:203-207.
- Luvoni GC, Luciano AM, Modena S, Gandolfi F. Influence of different stages of the estrous cycle on cumulus-oocytes communications in canine oocytes: effects on the efficiency of *in vitro* maturation. *J Reprod Fertil Suppl* 2001;57:141-146.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Domest Anim* 2003;38:410-414.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. Factors involves in vivo and *in vitro* maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005;63:41-59.
- Luvoni GC, Chigioni S, Beccaglia M. Embryo production in dogs: from *in vitro* fertilization to cloning. *Reprod Dom Anim* 2006;41:286-290.
- Machaty Z, Paldi A, Csaki T, Varga Z, Kiss I, Barandi Z, Vajta G. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1993;98:467-70.
- Maclellan LJ, Lane M, Sims MM, Squires EL. Effect of sucrose or threalose on vitrification of equine oocytes 12 h or 24 h after the onset of maturation. *Theriogenology* 2001;55:310.
- Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology* 2002;58:911-919.
- Mahi CA, Yanagimachi R. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. *J Exp Zool* 1976;16:189-193.
- Manna L, Neglia G, Marino M, Gasparrini B, Di Palo R, Zicarelli L. Sex determination of buffalo embryos (*Bubalus bubalis*) by polymerase chain reaction. *Zygote* 2003;11:17-22.
- Mapletoft RJ, Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2005;24:393-403.
- Mara L, Pilichi S, Sanna A, Accardo C, Chessa B, Chessa F, Dattena M, Bomboi G, Cappai P. Sexing of *in vitro* produced ovine embryos by duplex PCR. *Mol Reprod Dev* 2004;69:35-42.
- Margalioth EJ, Bronson RA, Cooper GW, Rosenfeld DL. Luteal phase sera and progesterone enhance sperm penetration in the hamster egg assay. *Fertil Steril* 1988;50:117-122.

Marks SL, Dupuis J, Mickelsen WD, Memon MA, Platz CC. Conception by use of post-mortem epididymal semen extraction in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1994;204:1639–1640.

Marseloo N, Fontbonne A, Bassu G, Riviere S, Leblanc B, Rault D, Biourge V, Chastant-Maillard S. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. *Proceedings of the 5th international Symposium of Canine and Feline Reproduction 2004*;75-77.

Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 1986;7:270-273.

Massip A, van der Zwalmen P, Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 1987;27:69-79.

Maxwell WMC, Evans G, Hollishead FK, Bathgate R, de Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:79-95.

Mazur P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. *Proceedings of the 9th International Congress on Animal Reproduction and AI, 1980*;vol.1:99-114.

McKinnon AO, Wheeler MB, Carnevale EM, Squires EL. Oocyte transfer in the mare: preliminary observations. *J Eq Vet Sci* 1986;6:306–309.

McKinnon AO, Lacham-Kaplan O, Trounson AO. Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single

frozen-thawed spermatozoa into *in vivo* matured mare oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;56:513–517.

Meintjes M, Graff KJ, Paul JB, Denniston RS, Godke RA. *In vitro* fertilization and development of *in vitro*-matured oocytes aspirated from pregnant mares. *Biol Reprod Monogr* 1995;1:309–317.

Moor RM, Mattioli M, Ding J, Nagai T. Maturation of pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1990;40:197-210.

Morris LH-A, Hunter RHF, Allen WR. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J Reprod Fertil* 2000;118:95–100.

Morris LHA, Tiplady C, Allen WR. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Vet J* 2003;25:197–201.

Morton KM, Catt SL, Hollinshead FK, Maxwell WM, Evans G. The effect of gamete co-incubation time during *in vitro* fertilization with frozen-thawed unsorted and sex-sorted ram spermatozoa on the development of *in vitro* matured adult and prepubertal ewe oocytes. *Theriogenology* 2005;64:363-77.

Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 2001;76:618-620.

- Nagase H, graham EF, Niwa T, Yamashita S. Deep freezing bull semen in concentrated pellet-form. Proceedings of the 5th International Congress on Animal Reproduction and AI, 1964;vol.6:387-391.
- Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJ, Renton JP. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and *in vitro* fertilization in bitches. J Reprod Fertil Suppl 1993;47:231-240.
- Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and reaserch needs. Theriogenology 1991;35:109-124.
- Niemann H, Kues WA. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. Anim Reprod Sci 2003;79:291-317.
- Nickson DA, Boyd JS, Eckersall PD, Ferguson JM, Harvey MJA, Renton JP. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. J Reprod Fertil suppl 1993;47:231-240.
- Nizanski W, Dubiel A, Bielas W, Dejneka GJ. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. J Reprod Fertil Suppl 2001;57:365–369.
- Nöthling JO, Shuttleworth R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. Theriogenology 2005;63:1469–1480.
- Nöthling JO, Gerstenberg C, Volkmann DH. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. J Reprod Fertil Suppl 1997;51:109–116.
- Nowell P, Jackson P. In: Status survey and conservation action plan: wild cats. IUNC 1996, Gland, Switzerland:149-179.
- Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE, Seidel Jr GE, Carnevale EM, Squires EL. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. Theriogenology 2001;55:607-613.
- Okano T, Murase T, Asano M, Tsubota T. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. J Vet Med Sci 2004;66:1359–1364.
- Oh HJ, Fibrianto YH, Kim MK, Jang G, Hossein MS, Kim HJ, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Effects of canine serum collected from dogs at different estrous cycle stages on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. Zygote 2005;13(3):227-232.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. Effect of serum on the *in vitro* maturation of canine oocytes. Reprod Fertil Dev 1999;11:387-390.
- Otoi T, Murakami M, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Une S, Suzuki T. Development of canine oocytes matured and fertilised *in vitro*. Vet Rec 2000;146:52-53.
- Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer DC, Westusin M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. Reproduction 2002;124:775-781.

- Otoi T, Shin T, Kraemer D, Westhusin ME. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after *in vitro* maturation and fertilization. *Reprod Nutr Dev* 2004;44:631-637.
- Otoi T, Shimizu R, Naoi P, Wongsrikeao B, Agung B, Taniguchi M. Meiotic competence of canine oocytes embedded in collagen gel. *Repro Dom Anim* 2006;41:17-21.
- Palmer E, Bezard J, Magistrini M, Duchamp G. *In vitro* fertilisation in the horse: A retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44:375-384.
- 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.
- Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS, Lim JH. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum Reprod* 1999;14:2838-2843.
- Perkins JL. Fluid flow of the oviduct. In: *The oviduct and its functions*. Johnson AD, Foley CW (eds.), New York: Academic Press; 1974:119-132.
- Pashen RL, Lascombres FA, Darrow MD. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. *Equine Vet J Suppl* 1993;15:119-121.
- Pena AI, Johannisson A, Linde-Forsberg C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using a new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 1999;52:965-980.
- Pena AI, Johannisson A, Linde Forsberg C. Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J Reprod Fertil Suppl* 2001;57:371-376.
- Penfold L, Jost L, Evenson DP, Wildt DE. Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 2003;69:1730-5.
- Petersen MM, Wessel MT, Scott MA, Liu IKM, Ball BA. Embryo recovery rates in mares after deep intrauterine insemination with low numbers of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology* 2002;58:663-666.
- Pfaff R, Seidel GE, Squires EL, Jasko DJ. Permeability of equine blastocysts to ethylene glycol and glycerol. *Theriogenology* 1993;39:284.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. Energy substrate requirements for *in vitro* development of early cleavage-stage bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1996;44:193-199.
- Platz CC, Wildt DE, Seager SW. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1978;52:279-282.
- Polge C, Smith AU, parkers AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;164:666-668.

- Pomp D, Good BA, Geisert RD, Corbin CJ, Conley AJ. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J Anim Sci* 1995;73:1408-15.
- Ponderato N, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Galli C, Lazzari G. Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of butyrolactone I and roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. *Mol Reprod Dev* 2001;60:579-585.
- Pope CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 2000;53:163–74.
- Pope CE. *In vitro* fertilization and embryo transfer in felids. In: *Methods in molecular biology-germ cell protocols molecular embryo analysis live imaging transgenesis and cloning*, vol. 2. Schatten H (ed.), Totowa, NJ: The Humana Press, Inc.; 2004: 227–44.
- Pope CE, McRae MA, Plair BL, Keller GL, 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;42:513–25.
- Pope CE, McRae MA, 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 Reprod 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. *Anim Reprod Sci* 1998;53:221–36.
- Pope CE, Gomez MC, King AL, Harris RF, Dresser BL. Embryos produced *in vitro* after recovery of oocytes from ovaries stored at 4 °C for 24–28 h retain the competence to develop into live kittens after transfer to recipients. *Theriogenology* 2003;59:308.
- Pope CE, Gómez MC, Dresser BL. *In vitro* production and transfer of cat embryos in the 21st century. *Theriogenology* 2006;66:59-71.
- Prather RS, Barnes FL, Sims MM, Robl JM, Eyestone WH, First NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987;37:859-866.
- Prins GS, Wagner C, Weidel L, Gianfortoni J, Marut EL, Scommegna A. Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured *in vitro*. *Fertil Steril* 1987; 47:1035-1037.
- Puglisi R, Vanni R, Galli A, Balduzzi d, Parati K, Bongioni G, Crotti G, Duchi R, Galli C, Lazzari G, Aleandri R. *In vitro* fertilisation with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. *Reproduction* 2006; 132(3):519-526.
- Pushett DA, Lacham-Kaplan O, Gunn IM, Trounson AO. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and *in vitro* matured oocytes in domestic cats: a model for endangered species. *Theriogenology* 2000;57:400.
- Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at – 196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.

- Rall WF. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and implications. *Anim Reprod Sci* 1992;28:237-245.
- Rath D, Johnson LA, Dobrinski JR, Welch GR, Niemann H. Production of piglets preselected for sex following *in vitro* fertilization with X- and Y-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology* 1997;47:795-800.
- Rath D, Long CR, Dobrinski JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA. *In vitro* production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 1999;77:3346–3352.
- Renard JP, Zhou QI, LeBourhis D, Chavatte-Palmer P, Hue I, Heyman Y, Vignon X. Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. *Theriogenology* 2002;57:203-222.
- Richardson LL, Oliphant G. Steroid concentrations in rabbit oviductal fluid during oestrus and pseudopregnancy. *J Reprod Fertil* 1981;62:427-431.
- Riera FL, McDonough J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Vet J Suppl* 1993;15:116–118.
- Robl JM, Kasinathan p, Sullivan E, Kuroiwa Y, Tomizuka K, Ishida I. Artificial chromosome vectors and expression of complex proteins in transgenic animals. *Theriogenology* 2003;59:107-113.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 2003a;60:59-66.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL. Meiotic response of *in vitro* matured canine oocytes under different proteins and heterologous supplementation. *Reprod Domest Anim* 2003b;38:58-62.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004;67:215-223.
- Rodrigues BA, dos Santos LC, Rodrigues JL. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004;67:215-223.
- Rodrigues BA, dos Santos LC, Rodrigues JL. The effect of hyaluronan concentrations in hST-supplemented TCM199 on *in vitro* nuclear maturation of bitch cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology* 2006;66:1673-1676.
- Rose TA, Bavister BD. Effect of oocyte maturation medium *in vitro* development of *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1992;31:72-77.
- Rosenkrans CF Jr, First NL. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. *J Anim Sci* 1994;72:434-437.
- Rota A, Cabianna G. *In vitro* maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reprod Nutr Dev* 2004;44:105-109.

- Rota A, Iguer Ouada M, Versteegen J, Linde Forsberg C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology* 1999;51:1045–1058.
- Rota A, Rota A, Martini M, Milani M, Milani C, Romagnoli S. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:29–37.
- Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 2006;65:1848–1858.
- Roth TL, Swanson WF, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus in vitro. *Biol Reprod* 1994;51:441–51.
- Rowe RF, del campo MR, Critser JK, Ginther OJ. Embryo transfer in cattle:nonsurgical transfer. *Am J Vet Res* 1980;41:1024-1028.
- Rowson LEA, Dowling Df. An apparatus fir the extraction of fertlized eggs from living cow. *Vet Rec* 1949;61:191.
- Saint-Dizier M, Renard JP, Chastant-Maillard S. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* 2001;121:97-105.
- Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Dig* 1969;17:6-16.
- Schriver MD, Kraemer DC. Embryo transfer in the domestic feline. *American Ass Lab Animal Sci Publ*. 1978;78-4:12.
- Schramm RD, Bavister BD. Effects of gonadotrophins, growth hormone and prolactin on developmental competence of domestic cat oocytes matured *in vitro*. *Reprod fertile Dev* 1995; 7:1061-1066.
- Scott TJ, Carnevale EM, Maclellan LJ, Scoggin CF, Squires EL. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. *Theriogenology* 2001;55:705–715.
- Seidel GE. Cryopreservation of equine embryos. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1996;12:85–99.
- Shaw J, Oranratnachai A, Trunson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000;53:59-72.
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002;415:859.
- Silva AR, Cardoso RC, Uchoa DC, Silva LD. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 2003;59:821–829.
- Singh B, Barbe GJ, Armstrong DT. Factors influencing resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1993; 36:113-119.
- Smith AU, Polge C. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature* 1950;166:668-669.
- Smith C. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology* 1988a;29:203-212.
- Smith C. Genetic improvement of livestock using nucleus breeding units. *World Anim Rev* 1988b;65:2-10.

- Smith C, Ruane J. Use of sib testing as a supplement to progeny testing to improve the genetic merit of commercial semen in dairy cattle. *Can J Anim Sci* 1987;67:985-990.
- Sommerfeld V, Niemann H. cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 1999;38:95-105.
- Sojka NJ, Jennings LL, Hamner CE. Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L). *Lab Anim Care* 1970;20:198-204.
- Songsasen N, Wildt DE. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. *Mol Reprod Dev* 2005;72:113-119.
- Songsasen N, Yu I, Leibo SP. Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. *Mol Reprod Dev* 2002;62:407-415.
- Songsasen N, Yu I, Gomez M, Leibo SP. Effect of meiosis-inhibiting agents and equine chorionic gonadotrophin on nuclear maturation of canine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2003;65:435-445.
- Spinaci M, De Ambrogi M, Volpe S, Galeati G, Tamanini C, Seren E. Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and *in vitro* blastocyst development. *Theriogenology* 2005;64:191-201.
- Spindler RE, Wildt DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol Reprod* 1999; 61:188-194.
- Squires EL. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 1999;51:91-104.
- Squires EL, Garcia RH, Ginther OJ. Factors affecting the success of equine embryo transfer. *Equine Vet J Suppl* 1985;3:92-95.
- Squires EL, Wilson JM, Kato H, Blaszyk A. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1996;45:306.
- Stice SL, Robl JM, Ponce de leon FA, Jerry J, Golueke PG, Cibelli JB, Kane JJ. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology* 1998;49:129-138.
- 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, McRae MA, Wildt DE, Rall WF. Cryoprotectant toxicity and cryopreservation success in IVF-derived domestic cat embryos after embryo transfer. *Theriogenology* 1999;51:174 .
- Swanson WF, McRae MA, Bond JB, Melniczek JR, Haskens ME. Homozygous and heterozygous mucopolysaccharidosis kittens produced by transfer of frozen-thawed IVF embryos. *Biol Reprod Suppl* 2000;62:319.

- Takahashi Y, First NL. *In vitro* development of bovine one cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992;37:963-978.
- Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Hori T, Tsutsui T. Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. *J Vet Med Sci* 2000;62:1163–1167.
- Teruel M, Smith R, Catalano R. Growth factors and embryo development. *Biocell* 2000;24:107-122.
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 1972;30:493-497.
- Thibier M, Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 1995;43:71-80.
- Thompson JG, Allen NW, McGowan LT, Bell AC, Lambert MG, Tervit HR. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. *Theriogenology* 1998;49:1239-1249.
- Tsutsui T, Tezuka T, Shimizu T, Murao I, Kawakami E, Ogasa A. Artificial insemination with fresh semen in beagle bitches. *Jpn J Vet Sci* 1988;50:193–198.
- Tsutsui T, Shimada K, Nishi M, Kubo N, Murao I, Shimizu T, Ogasa A. An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jap J Vet Sci* 1989;51:797-800.
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Hanzai M, Hori T. Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. *J Vet Med Sci* 2000a;62:1241–1245.
- Tsutsui T, Tanaka A, Takagi Y, Nakagawa K, Fujimoto Y, Murai M, Hanzai M, Hori T. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J Vet Med Sci* 2000b;62:1247–1251.
- Tsutsui T, Hori T, Kawakami E. Intratubal transplantation of early canine embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 2001a;57:309-314.
- Tsutsui T, Hori T, Okazaki H, Tanaka A, Shiono M, Yokosuka M, Kawakami E. Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci* 2001b;63:401-405.
- Tsutsui T, Tanaka A, Hori T. Intratubal insemination with fresh semen in cats. *J Reprod Fertil Suppl* 2001c;57:347–351.
- Tsutsui T, Hori T, Endo S, Hayama A, Kawakami E. Intrauterine transfer of early canine embryos. *Theriogenology* 2006;66:1703-1705.
- Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:357-364.
- Vajta G, Murphy CN, Machaty Z, Prather RS, Greve T, Callesen H. In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the open-pulled straw method. *Vet Rec* 1999;144:180-181.

- Vajta G, Pushett D, Zafiroopoulos D, Trounson AO. Felid embryo vitrification. Proc 1st Int Symp Assist Reprod Tech Conservation Genetic Management Wildlife; 2001:127–32.
- Van Wagtendonk-de Leeuw AM, den Daas JHG, Rall WF. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus low freezing and three-step dilution. *Theriogenology* 1997;48:1071-1084.
- Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 1992;37:23-37.
- Voelkel SA, Hu YX. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 1992;37:687-697.
- von Baer KE. *De ovi mammalium et homini genesi*. 1827 (Facsimile in Sarton, 1931).
- Wagtendonk-de Leeuw AM van, den Daas JHG, Rall WF. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology* 1997;48:1071-1084.
- Wagtendonk-de Leeuw AM van, Mullaart ER, de Roos APW, Merton JS, den Daas JHG, Kemp B, de Ruigh L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 2000;53:575-597.
- Wall RJ. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology* 1996;45:57-68.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 2002;57:2105-2117.
- Welch GR, Johnson LA. Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology* 1999;52:1343-52.
- Welch GR, Waldbieser GC, Wall RJ, Johnson LA. Flow cytometric sperm sorting and PCR to confirm separation of X- and Y- bearing bovine sperm. *Anim Biotechnology* 1995;6:131-139.
- Wells DN, Misica PM, Tervit HR, Vivanco WH. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:369-378.
- Westhusin ME, Long CR, Shin T, Hill JR, Looney CR, Pryor JH, Piedrahita JA. Cloning to reproduce desired genotypes. *Theriogenology* 2001;55:35-49.
- Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986;320:63-65.
- Willet EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, Buckner PJ. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 1951;113:247.
- Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME, Kraemer DC. Effect of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. *Reproduction* 2003;126:501-508.

- Wilmot I, Rowson LEA. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973;92:686-690.
- Wilmot I, Schniecke AE, Mc Whir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.
- Wilson MS. Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:307-311.
- Wilson RD, Fricke PM, Leibfried-Rutledge ML, Rutledge JJ, Penfield CM, Weigel KA. *In vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 2006;65:1007-1015.
- Wolfe BA, Wildt DE. Development to blastocyst of domestic cat oocytes matured and fertilized *in vitro* after prolonged cold storage. *J Reprod Fertil* 1996; 106:135-141.
- 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.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 2004;48:146-156.
- Wright JM. Non-surgical embryo transfer in cattle: embryo-recipient interactions. *Theriogenology* 1981;15:43-56.
- Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale TL, Zhang J, Schenk J, Moreno JF, Dinnyes A, Ji W, Tian XC, Yang X, Du F. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. *J Dairy Sci* 2006;89:2510-2518.
- Xu KP, Greve T, Callesen H, Hyttel O. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1987;81:501-504.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Toyoda Y. Maturation, fertilization, and development of dog oocytes *in vitro*. *Biol Reprod* 1992;46:853-858.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawano Y, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y. *In vitro* maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:227-229.
- Yeoman RR, gerami-Naini B, Mitalipov S, Widmann-Browning AA, Wolf DP. Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod* 2001;16:1965-1969.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 2000;54:579-585.
- Young Le, Sinclair KD, Wilmot I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev reprod* 1998;3:155-163.

Zambelli D, Caneppele B, Castagnetti C, Belluzzi S. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Dom Anim* 2002; 37:310-313.

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

Zambelli D, Merlo B, Iacono E, De Ambrogi M, Volpe S, Spinaci M. Production of cat blastocysts after *in vitro* fertilization with flow cytometrically sorted spermatozoa. Proceedings of the 5th EVSSAR Congress, Budapest, 2006, p 295.

Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR. Recent studies on *in vivo* fertilization of *in vitro* matured horse oocytes. *Equine Vet J Suppl* 1989;8:10–13.

Zhang JJ, Muzs LZ, Boyle MS. *In vitro* fertilisation of horse follicular oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1990;26:361–365.

Zhang M, Lu KH, Seidel GE. Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls, *Theriogenology* 2003;60:1657–1663.

Zindl C, Asa CS, Gunzel Apel AR. Influence of cooling rate and addition of Equex paste on cooled and frozen thawed semen of generic gray (*Canis lupus*) and Mexican gray wolves (*C.l. bailey*). *Theriogenology* 2006;66:1797-802.