

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA



DOTTORATO DI RICERCA IN
PRODUZIONE E SANITA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE
ANIMALE
INDIRIZZO: SCIENZE DELL'ALLEVAMENTO ANIMALE
XIX CICLO

*Ottimizzazione dei protocolli di maturazione e
fertilizzazione in vitro nella specie bufalina
(Bubalus bubalis)*

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa

Bianca Gasparrini

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa

Maria Luisa Cortesi

Candidata:

Dott.ssa

Lucia Boccia

NOVEMBRE 2006

Indice

Capitolo 1

Introduzione

- pag. 3
- 1.1** Stato dell'arte: IVEP nel bufalo pag. 8
- 1.2** Maturazione in vitro (IVM) pag. 13
- 1.3** Fertilizzazione in vitro (IVP) pag. 21
- 1.4** Coltura in vitro (IVC) pag 25
- 1.5** Crioconservazione pag. 29

Parte sperimentale

pag. 31

Capitolo 2

Introduzione alla parte sperimentale

pag. 32

Capitolo 3

Studi sul processo di maturazione dell'oocita di bufalo

pag. 33

3.1 Esperimenti 1 e 2: studio della cinetica della progressione meiotica degli oociti di bufalo durante la IVM ed analisi dell'attività dell'MPF e delle MAP.

pag 36

3.2 Esperimento 3: effetto della durata di IVM sul cleavage e sullo sviluppo a blastocisti.

pag. 46

3.3 Esperimento 4: capacità antiossidante degli oociti e competenza.

pag. 54

Capitolo 4

La fecondazione nei mammiferi domestici

pag. 80

4.1 Esperimento 1: valutazione qualitativa del seme di bufalo.

pag. 91

4.2 Esperimento 2: co-incubazione dei gameti nella specie bufalina.

pag. 123

4.3 Esperimento 3: confronto tra media e fattori di motilità spermatica diversi.

pag. 138

4.4 Esperimento 4: valutazione di diversi agenti capacitanzi in vitro

pag. 146

Capitolo 5

Conclusioni

pag. 172

Bibliografia

pag. 177

CAP. 1.

INTRODUZIONE

L'importanza e la competitività dell'allevamento bufalino in Italia, rispetto alle altre realtà zootecniche ormai consolidate, è dimostrata dall'incremento del patrimonio nazionale che si è registrato in questi ultimi anni. La redditività della specie nel nostro Paese è garantita dall'esistenza di un prodotto come la mozzarella che ha assunto nel mercato un'immagine ben definita, tutelata da una certificazione DOP e che, soprattutto, è riconosciuta in un numero sempre maggiore di Paesi. Inoltre si è registrato, negli ultimi anni, un incremento dell'interesse mondiale nei confronti dell'allevamento del bufalo, dovuto al ruolo critico svolto da questa specie in molti paesi dove è sfruttata per la produzione di latte, carne e lavoro. Nei paesi tropicali situati a nord dell'equatore le condizioni ambientali, particolarmente quelle climatiche, fanno del bufalo un produttore di latte insostituibile. Infatti la perfetta interazione tra stagionalità riproduttiva, condizioni ambientali e disponibilità di foraggio nel corso dell'anno, fa sì che il bufalo riesca a compensare la perdita di latte bovino che si registra nella stagione umida (autunno-primavera), producendo proteine animali a costi competitivi.

L'accresciuto interesse nei confronti di questa specie, è dimostrato anche, nella nostra esperienza, da un sensibile aumento della richiesta di seme e di embrioni di bufalo Mediterraneo Italiano, da parte di un numero sempre maggiore di paesi del mondo. L'attenzione nei confronti della bufala di razza Mediterranea Italiana è giustificata dalle migliori performance produttive, imputabili ad anni di selezione genetica, e documentate, grazie alla creazione del Libro Genealogico. Il trend in crescita della richiesta di latte e la necessità di abbattere i costi fissi di produzione rendono indispensabile l'adozione di una pianificazione a livello aziendale improntata al miglioramento produttivo. In questo scenario la competitività dell'allevamento del bufalo in Italia sarà necessariamente vincolata all'utilizzo delle biotecnologie della riproduzione, che consentono di programmare gli indirizzi selettivi ed il loro conseguimento in tempi brevi.

La disponibilità di materiale genetico proveniente da tori provati, offre una base di partenza necessaria per continuare in modo più efficace il processo selettivo iniziato in maniera empirica dagli allevatori. A tale fine l'impiego dell'inseminazione strumentale nell'allevamento bufalino italiano dovrà necessariamente divenire una realtà ai fini di esaltare il contributo paterno al miglioramento genetico. Allo stato attuale, però, l'utilizzo della IS

rimane limitato a meno del 10 % dei bufali iscritti al Libro Genealogico perché l'efficienza è ancora bassa e fortemente condizionata dalla stagionalità della specie (Baruselli et al., 1997; Campanile et al., 2005). Per quanto riguarda, invece, le biotecnologie volte ad accelerare il progresso genetico per via materna nella specie bufalina, data la bassa e variabile risposta ai trattamenti di superovulazione (Misra A.K. 1997 ; Zicarelli L. 1997), si è sviluppato un crescente interesse nei confronti della tecnologia della produzione embrionale in vitro (IVEP). La messa a punto della tecnica dell'Ovum pick-up (OPU), per il prelievo in vivo, per via transvaginale ecoguidata, di oociti immaturi da animali donatori noti, consente, grazie alla sua ripetibilità, una produzione di embrioni per donatrice maggiore in un determinato intervallo di tempo, rispetto alle altre tecniche oggi disponibili. Ne consegue che l'OPU associato all'IVEP rappresenta, in particolare in questa specie, il migliore approccio per accelerare il miglioramento genetico, riducendo l'intervallo generazionale (Gasparrini, 2002).

La tecnologia OPU associata all'IVEP è stata con successo applicata alla specie bufalina sin dal 1994 (Boni et al, 1994; Boni et al., 1995; Boni et al., 1996; Boni et al., 1997; Neglia et al., 2003a). L'acquisizione di maggiori informazioni specie-specifiche

riguardanti la fisiologia embrionale, ottenute nell'arco di anni di sperimentazione, si è tradotta in un miglioramento significativo dell'efficienza di produzione embrionale in vitro, attestata da rese in blastocisti, ovvero di embrioni trasferibili, fino al 30 % (Gasparrini et al., 2006) e dall'ottenimento di gravidanze a termine dopo trasferimento di embrioni IVP congelati (Galli et al, 1998; Neglia et al., 2004). Ciononostante l'ottimizzazione dell'efficienza IVEP in questa specie si rende necessaria perché la tecnica OPU possa lasciare il campo della sperimentazione ed entrare nel mondo operativo.

Numerose ricerche sono state condotte con lo scopo di ottimizzare la tecnica OPU, adattandola alle caratteristiche fisiologiche della bufala, per incrementare il numero di oociti di buona qualità ottenibile da ciascun prelievo. È stato possibile evidenziare che, ripetendo il prelievo in ogni animale 2 volte alla settimana, si ottiene una popolazione di oociti più omogenea; infatti, con ogni intervento OPU, attraverso l'aspirazione di tutti i follicoli ecograficamente evidenziabili sull'ovaio, si ottiene un azzeramento della popolazione follicolare che non permette l'instaurarsi del fenomeno di dominanza. In particolare è' stato sperimentato il prelievo di oociti a 2, 3, 4 e 5 giorni d'intervallo ed è stato visto che con l'OPU effettuato ogni 4 giorni si ottiene la maggiore

percentuale di morule e blastocisti (Boni et al. 1993). Ultimamente, la percentuale di embrioni trasferibili che si ottiene con OPU associato ad IVEP, si è elevata in modo consistente (Neglia et al. 2003) e si è notato che utilizzando oociti prelevati con Ovum pick up piuttosto che da ovaie di animali da macello, l'efficienza dell'IVEP, in termini di percentuale di blastocisti, migliora (29.7 vs 19.9; Neglia et al. 2003). Presumibilmente ciò deriva da una maggiore predisposizione degli oociti bufalini a danni cellulari, dovuti a processi autolitici che si verificano quando le ovaie sono prelevate dalla cavità peritoneale. Quando si applica la tecnica OPU, gli oociti prelevati in vivo vengono trasferiti in un terreno di maturazione (Caracciolo di Brienza et al., 2001) in tempi più brevi rispetto a quando si utilizzano ovaie da macello. In quest'ultimo caso, infatti, tra il prelievo delle ovaie al macello e l'inizio della loro lavorazione in laboratorio trascorrono quasi sempre almeno 3 - 4 ore. Inoltre, nonostante attraverso la produzione embrionale in vitro si siano ottenute blastocisti (Boni et al., 1994a; Boni et al., 1994b; Boni et al., 1999; Chauhan et al., 1997a; Gasparrini et al., 2000; Madan et al., 1994a; Madan et al., 1994b; Totey et al., 1992) ed alcuni trasferimenti di embrioni congelati prodotti in vitro siano stati coronati da successo (Chauhan et al., 1997a; Madan et al.,

1994b; Totey et al., 1996b), i risultati, in termini di gravidanze portate a termine, sono ancora poco soddisfacenti (Madan et al., 1996).

Probabilmente, la scarsa efficienza, è in parte legata al fatto che l'intero sistema di IVEP nel bufalo è stato sviluppato sulla base di esperienze acquisite in altre specie facendo particolare riferimento alla specie bovina. È, infatti, verosimile che la fisiologia, il metabolismo e le esigenze colturali dei gameti e degli embrioni bufalini siano differenti e richiedano maggiori approfondimenti.

1.1 STATO DELL'ARTE: IVEP NEL BUFALO

Sulla base di quanto precedentemente detto, sarebbe meglio utilizzare come materiale di studio oociti ottenuti in vivo con la tecnica OPU; tuttavia ciò comporterebbe la necessità di una disponibilità continua di un elevato numero di soggetti da sottoporre bisettimanalmente ad Ovum pick up, per assicurare un numero adeguato di oociti da destinare alla ricerca.

Per ridurre costi e tempi nella routine di laboratorio, è, quindi, necessario ricorrere ad ovaie di animali da macello, come fonte di oociti da utilizzare a scopo sperimentale nei laboratori per migliorare l'efficienza delle diverse fasi dell'IVEP.

Nella maggior parte dei Paesi in cui la specie è allevata, uno dei

principali fattori limitanti la sperimentazione scientifica è rappresentato dalla scarsa reperibilità di materiale sperimentale, ovvero di ovaia provenienti da animali macellati.

Inoltre, va enfatizzato che una delle principali limitazioni dell'IVEP nel bufalo è dovuta alla più bassa percentuale di recupero di complessi cumulo-oocita (COC) che si ottiene rispetto, ad esempio, alla specie bovina, in cui la tecnica è utilizzata a scopo commerciale almeno nei Paesi zootecnicamente più avanzati. Quando si aspirano follicoli di diametro compreso tra 2 e 8 mm, la media di oociti recuperati da ciascun ovaio varia tra 0.7 (Totey et al, 1992) e 1.7 (Das et al., 1996) e l'alta incidenza di follicoli atresici riduce la percentuale di oociti di buona qualità che oscilla tra 0.4 (Madan et al., 1996; Totey et al., 1992), 0.9 (Das et al., 1996), 1.76 (Samad et al., 1998) e 2.4 (Gasparrini et al., 2000). Questo rappresenta già un grosso limite rispetto alla specie bovina in cui si recuperano mediamente da ciascun ovaio 10 oociti di buona qualità.

Quanto detto non dovrebbe sorprendere viste le caratteristiche fisiologiche della bufala: i follicoli primordiali variano tra 10.000 e 19.000 (Danell 1987; Samad et al., 1979) rispetto ai 150.000 della vacca (Erickson 1966), ed anche i follicoli antrali sono in numero ridotto durante tutti gli stadi del ciclo estrale (Kumar et al. 1997).

Inoltre, normalmente, la bufala è macellata quando la sua produttività e la sua fertilità sono compromesse o quando è alla fine della sua carriera produttiva e la sua riserva follicolare è ormai ridotta. Infatti, a differenza del bovino, la carriera produttiva della bufala oltrepassa generalmente i 12 anni. È stato anche dimostrato che la presenza del corpo luteo riduce considerevolmente la percentuale di recupero (Nandi et al. 2000) poiché le cellule luteiniche occupano gran parte dell'ovaio ed impediscono lo sviluppo follicolare. Inoltre spesso in presenza del corpo luteo si osserva un follicolo dominante e, solitamente, gli altri follicoli sono piccoli e difficilmente accessibili con l'ago che si utilizza per l'aspirazione.

Allo scopo di aumentare il numero di oociti ottenibile da ciascun ovaio, sono stati illustrati diversi metodi di recupero quali la dissezione follicolare, lo "slicing" (tagliuzzamento) e la puntura follicolare (Boni 1994a; Boni et al., 1994b). Nel suddetto lavoro con lo slicing è risultato un numero totale di oociti per ovaio quasi doppio rispetto all'aspirazione (8.4 vs 4.3) mentre gli oociti di buona qualità erano 3.9 vs 2.9. L'incrementato recupero è spiegato dalla possibilità di accedere, con questa tecnica, ai follicoli presenti sia sulla superficie dell'ovaio, sia nello spessore dello stroma corticale ovarico. Ne consegue, però, che la

popolazione oocitaria è più eterogenea e, quindi, tale incremento tende a ridursi quando si considerano gli oociti di buona qualità. A differenza di quanto si è osservato nel bovino (Katska 1984), nella bufala la tecnica della dissezione follicolare non ha dato un significativo aumento della percentuale di recupero. Tuttavia si è osservato un incremento di oociti di buona qualità, probabilmente legato all'eliminazione del danno meccanico, che è, invece, associato alle altre tecniche. Gli oociti bufalini, infatti, sono più sensibili ai danni meccanici rispetto a quelli bovini poiché le cellule del cumulo non sono fortemente ancorate alla superficie dell'oocita, quindi, tendono a perdere adesione più facilmente. La dissezione follicolare, comunque, non è utilizzata nella routine di laboratorio perché in questa specie i follicoli sono profondamente ancorati allo stroma ovarico e l'impiego di questa tecnica comporterebbe un eccessivo dispendio di tempo. Si ricorre, dunque, quasi sempre all'aspirazione dei follicoli con un ago collegato ad una pompa da vuoto, al fine di mantenere costante la pressione e di evitare un eccessivo dispendio di tempo che potrebbe compromettere la vitalità degli oociti.

La fase di recupero è chiaramente seguita dalla selezione degli oociti di buona qualità. Nel bovino è stata stabilita una chiara correlazione tra la morfologia dell'oocita e la sua competenza,

intesa come capacità di essere fecondato e di svilupparsi fino allo stadio di blastocisti. Chauhan et al. (1998) hanno, quindi, stabilito una classificazione basata sulla valutazione morfologica degli oociti bufalini che ne riflette la competenza allo sviluppo. Nella nostra esperienza, la valutazione morfologica degli oociti consente di classificarli in:

GRADO A: con citoplasma omogeneo e ricoperti per l'intera superficie da diversi strati di cellule del cumulo;

GRADO B: con citoplasma omogeneo e circondati per almeno il 70 % della superficie da più strati di cellule del cumulo;

GRADO C: con poche cellule del cumulo, o completamente nudi;

GRADO D: oociti degenerati;

ESPANSI: oociti caratterizzati da cellule del cumulo espanse e picnotiche.

Idealmente solo gli oociti di grado A e B sono utilizzabili per l'IVEP, ma dato il problema del basso recupero, a volte, quando si mira ad ottenere un maggior numero di embrioni, si utilizzano anche gli oociti di grado C.

Tutte le altre categorie sono escluse.

1.2 MATURAZIONE IN VITRO (IVM)

I risultati ottenuti nel campo della produzione embrionale in vitro sono stati possibili grazie agli studi effettuati su quanto si verifica fisiologicamente nell'animale in vivo.

L'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio con la produzione rispettivamente di Gn-Rh, gonadotropine (LH e FSH) e steroidi ovarici quali l'estradiolo 17- β e il progesterone (Seren et al.; 1997) controlla il ciclo ovarico e, quindi, la funzione riproduttiva.

La crescita del follicolo antrale fino alla grandezza di 3 - 4 mm non dipende necessariamente dalla presenza degli ormoni gonadotropi; dai 4mm allo stadio preovulatorio, invece, è fortemente condizionata dalla presenza delle gonadotropine ed è caratterizzata da un'aumentata risposta delle cellule follicolari all'FSH ed all'LH e da un'aumentata sintesi steroidea, in particolare dell'estradiolo 17 β (E_2). Nei piccoli follicoli antrali lo sviluppo è regolato dai fattori di crescita che influenzano la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule follicolari. Questi fattori di crescita (Gospodurowicz 1977) sono classificati, in base alla loro struttura ed attività biologica, in: Fattori di Crescita Epidermale (EGF), Fattori di Crescita dei Fibroblasti (FGF), Fattori di Crescita Simil-Insulinici (IGF) e Fattori di Crescita β -Trasformanti (TGF- β).

Quando il corpo luteo regredisce l'aumento dell'LH induce un aumento di sintesi di E_2 nel follicolo dominante che porta alla comparsa di un maggior numero di recettori per l'LH nelle cellule della granulosa. Contemporaneamente, l'inibina e l' E_2 riducono il rilascio di FSH, la qual cosa si traduce nella regressione dei follicoli subordinati. Con il raggiungimento del climax da parte dell' E_2 , il picco di LH porta alla differenziazione delle cellule della granulosa, alla mobilitazione dei granulociti nella teca interna dei follicoli preovulatori e, grazie al rilascio di interleuchine, si giunge all'ovulazione (Kruip 1997).

La maturazione dell'ocita include una serie di modulazioni di organelli e di inclusi cellulari così come di trascrizioni genomiche, che sono indispensabili per il raggiungimento della sua competenza meiotica e del suo sviluppo. L'ocita del follicolo dominante va, poi, incontro ad ulteriori modifiche ed acquisisce tutte le competenze strutturali per lo sviluppo embrionale dopo un'eventuale fecondazione.

Durante l'accrescimento, che si verifica nel follicolo preantrale, l'ocita è incapace di riprendere il processo meiotico. La ripresa della divisione meiotica e la successiva ovulazione (Mattioli 1997) sono dovute al picco preovulatorio di gonadotropine (LH e FSH) in follicoli antrali di 8mm (bovino). Poiché gli oociti non presentano

sulla loro membrana recettori per le gonadotropine, l'LH induce la maturazione agendo su recettori presenti a livello delle cellule della granulosa. In follicoli bovini antrali più piccoli di 8mm, studi di ibridazione in situ hanno dimostrato l'assenza di RNAm per i recettori per l'LH nella parete della granulosa, che sono, invece, presenti nella teca interna, con conseguente inibizione alla ripresa della meiosi.

Secondo Mattioli et al. (1997) la parete del follicolo, sotto lo stimolo dell'LH, produce un fattore solubile che, agendo direttamente sull'ocita, determina un temporaneo aumento di AMPc intracellulare, accelerando la progressione meiotica. L'AMPc è invece considerato un inibitore della maturazione quando è presente in maniera costante.

L'LH e l'FSH agiscono sulla teca e sulle cellule della granulosa del follicolo preovulatorio esercitando un'attività steroidogenetica con il passaggio dalla sintesi di estrogeni a quella di progestinici. La parete follicolare, inoltre, è in grado di produrre fattori solubili, come l'OMI, un inibitore della maturazione, la cui secrezione è inibita dal picco di LH, ma anche fattori di crescita (IGF, EGF) che invece avviano la maturazione.

Rilevanti interazioni tra cellule somatiche ed oocita si verificano all'interno del complesso cumulo-oocita. Numerose prove

sperimentali hanno dimostrato che le cellule del cumulo controllano molte funzioni cellulari dell'oocita sia mediante il rilascio di fattori solubili sia sfruttando la via delle giunzioni intracellulari che permettono a metaboliti, a segnali intracellulari così come a ioni, di diffondere ai diversi tipi cellulari.

È stato proposto che all'interno del COC l'oocita sia mantenuto in arresto meiotico dall'AMPc prodotto dalle cellule del cumulo e trasferito all'oocita mediante le giunzioni intracellulari. È stato, quindi, suggerito che il picco di LH, causando la chiusura delle giunzioni, isola l'oocita dall'inibizione AMPc dipendente e non permette neppure la penetrazione dell'OMI.

Sebbene gli esatti substrati non siano stati identificati è generalmente accettato che la progressione attraverso il ciclo cellulare meiotico è regolata da una serie di proteine chinasi e fosfatasi.

Due complessi proteici sono implicati nella regolazione della progressione meiotica: MPF (M-phase promoting factor) e il CSF (cytostatic factor)

Una complessa serie di eventi a cascata è innescata dal picco di LH che porta ad un aumento dell'attività dell'MPF in coincidenza con la rimozione del 1° arresto meiotico ed è mantenuta a livelli elevati durante il 2° arresto meiotico da un secondo fattore, il

fattore citostatico (CSF).

È generalmente accettato che i principali componenti del CSF siano:

1. Un prodotto del protooncogene c-mos
2. MAPK (mitogen associated protein kinase)
3. Cdk2 chinase

Infine l'ovulazione avviene quando l'oocita ha completato la maturazione nucleare, quando cioè, ha raggiunto lo stadio di metafase II ed ha subito una serie di modificazioni citoplasmatiche e di membrana che lo preparano alla fertilizzazione.

È, dunque, intuitivo che, anche durante il processo di maturazione in vitro, gli oociti debbano disporre di un terreno di coltura che gli permetta di raggiungere la maturazione nucleare e citoplasmatica, considerando che, sia nel caso dell'OPU, sia quando si ricorre ad ovaie da macello, si aspirano, di norma, follicoli con un diametro compreso tra i 2 e gli 8 mm, quindi contenenti oociti immaturi. I terreni utilizzati per l'IVM sono media complessi come il TCM 199 (Madan et al. 1994a), l'Ham's F-10 (Totey et al. 1993b) e il Waymouth (Ravindranatha et al. 2001). Questi terreni, originariamente studiati per le colture cellulari, per sostenere lo sviluppo degli oociti devono essere

addizionati di siero, che apporta proteine, fattori di crescita e previene l'indurimento della zona pellucida. Le diverse fonti di siero che si possono utilizzare sono: il siero fetale di vitello (FCS; Totey et al., 1992; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1993b), siero fetale bovino (FBS; Chauhan et al., 1997c; Chauhan et al., 1998), siero di bufala in estro (EBS; Totey et al., 1992; Madan et al., 1994b; Chauhan et al., 1998), siero di bufala in proestro (pro-EBS; Samad et al., 1998), siero di vacca in calore (ECS; Samad et al., 1998), siero umano (HS; Chuangsoongneon e Kamonpatana, 1991) e siero di bufala superovulata (SBS, Chauhan et al., 1998). Anche se la maturazione in vitro può essere ottenuta senza l'uso di ormoni (Madan et al., 1994a ; Madan et al., 1994b), è stato dimostrato che gli oociti, in presenza di gonadotropine e di estradiolo, raggiungono percentuali di maturazione e fertilizzazione migliori (Totey et al., 1992; Totey et al., 1993a). La scelta degli ormoni dipende, inoltre, dal terreno utilizzato per la maturazione: in Hams F-10 la sola presenza di LH migliora la percentuale di maturazione; nel caso del TCM 199, invece, oltre all'LH è necessaria l'aggiunta di FSH ed estradiolo (Totey et al., 1993b).

Abbiamo precedentemente visto che le cellule del cumulo rivestono un ruolo di fondamentale importanza nel processo di

maturazione (Pawshe e Totey, 1993). Sulla base di ciò, per poter utilizzare anche oociti denudati, al fine di aumentare il materiale di ricerca a disposizione, si è provato a maturare gli oociti su monostrati di cellule del cumulo. In questo modo, in particolare con l'uso di monostrati al giorno 6, (Pawshe e Totey 1993) sono state migliorate le percentuali di maturazione e fertilizzazione. Risultati soddisfacenti sono stati ottenuti da Chauhan et al. (1997) sostituendo ormoni e siero con il fluido follicolare di bufala, aggiunto, nella misura del 20 %, al terreno di maturazione. In effetti, il fluido follicolare può rappresentare un valido supplemento per la maturazione in vitro visto che contiene gonadotropine, estradiolo, progesterone (Totey et al., 1993b), fattore di crescita trasformante β (TGF- β) ed il peptide inibina (Palta et al., 1996). Inoltre è stata riscontrata la presenza di altri numerosi fattori di crescita che, come abbiamo visto, rivestono un ruolo importante nel processo di maturazione e nello sviluppo post-fertilizzazione.

Comunque è meglio evitare la variabilità legata all'impiego di fluidi di natura biologica; per questo è consigliabile utilizzare terreni chimicamente definiti o semi-definiti (Abdon et al., 2001; Gupta et al. 2002; Raghu et al., 2002). Gli oociti di bufalo possono essere coltivati fino allo stadio di blastocisti ricorrendo a

terreni privi di siero (Raghu et al., 2002), con l'aggiunta di albumina sierica bovina (BSA), FSH, EGF e insulina-transferrina-selenio (ITS).

Un miglioramento dell'efficienza di produzione embrionale in vitro è stata ottenuta in diverse specie con l'aggiunta di cisteamina, composto tiolico di basso peso molecolare, al terreno di maturazione. È stato dimostrato, infatti, che la cisteamina migliora lo sviluppo e la quantità di embrioni bovini ed ovini incrementando la sintesi di glutatione (GSH) (de Matos et al., 1996; de Matos et al., 2000). Quest'ultimo riveste un ruolo fondamentale nella protezione delle cellule dallo stress ossidativo, che rappresenta uno dei maggiori fattori che ostacolano lo sviluppo di embrioni di mammifero in vitro. È stato osservato, infatti, che la concentrazione di GSH aumenta a livello ovarico durante la maturazione in vivo e protegge l'oocita negli stadi di sviluppo successivi (Perreault et al., 1988). Anche nel bufalo è stato valutato l'effetto di questa sostanza sulla produzione embrionale in vitro ed è emerso che la cisteamina, aggiunta in concentrazioni di 50 μ M (Gasparrini et al., 2000), è in grado di migliorare significativamente l'IVEP anche in questa specie aumentando la percentuale di embrioni e migliorandone la qualità.

In uno studio successivo è stato dimostrato che gli oociti di bufalo sintetizzano GSH ex novo durante l'IVM, similmente ad altre specie (de Matos et al., 1996; de Matos et al., 2002) e che l'aggiunta di cisteamina al mezzo di IVM migliora lo sviluppo embrionale attraverso un aumento della sintesi di GSH (Gasparrini et al 2003).

1.3 FERTILIZZAZIONE IN VITRO (IVF)

Nella specie bufalina l'IVF rappresenta un punto critico del sistema della produzione embrionale in vitro. Infatti, da quanto emerso nella nostra esperienza, nonostante la percentuale di maturazione nucleare in vitro degli oociti bufalini sia simile a quella osservata per gli oociti bovini (87% vs 94%), il cleavage risulta significativamente più basso (65% vs 84%). Ciò indicherebbe che il sistema di coltura in vitro utilizzato è in grado di supportare lo sviluppo degli embrioni di bufalo e che, probabilmente, dovrebbero essere perfezionate la maturazione e la fertilizzazione in vitro per ottenere nel bufalo percentuali di divisione simili a quelle del bovino.

Ancora non è stato chiarito, infatti, se ciò sia dovuto a problemi nella fase di fertilizzazione in vitro o ad un inadeguato sistema di maturazione, visto che, durante quest'ultima fase, nell'oocita si

verificano una serie di modificazioni a livello nucleare e citoplasmatico, che ne consentono poi la fertilizzazione. Comunque, è noto che uno dei principali fattori limitanti l'efficienza IVEP nella specie bufalina è dato dalla bassa qualità del seme congelato. È stato dimostrato, infatti, che il congelamento determina danni acrosomiali, rottura di enzimi, alterazioni dello scambio ionico e del pH e perdita di motilità (Meur et al., 1988). È stato, inoltre, evidenziato che la membrana plasmatica degli spermatozoi di bufalo è più fragile, soprattutto, nella regione acrosomiale. Un altro limite è rappresentato dalla grande variabilità nella capacità fecondante di tori diversi: solo il 10% dei tori testati nel nostro laboratorio è caratterizzato da una buona capacità fecondante in vitro.

Un passaggio critico dell'IVF è la capacitazione del seme, che nel bovino può essere fatta seguendo diversi metodi, mentre nel bufalo l'unica procedura di successo è con l'impiego di eparina. Il seme può essere preincubato con eparina (Madan et al., 1994b; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Chauhan et al., 1997a; Boni et al. 1994b; Boni 1994; Bacci et al., 1991; Boni et al., 1999) oppure l'eparina può essere direttamente aggiunta al terreno di fertilizzazione (Totey et al., 1992; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1996; Gasparrini et al.,

2000; Neglia et al, 2001). La concentrazione ottimale di eparina, però, varia in funzione del toro utilizzato; ne consegue che è necessario quindi testare in laboratorio il seme di ogni toro prima di poterne fare un uso regolare.

Quando si ricorre al seme congelato, è importante scegliere spermatozoi con elevata motilità. A questo scopo si può ricorrere alla tecnica dello “Swim up” (Chuangsoongneon e Kamonpatana, 1991; Madan et al, 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Nandi et al., 1998; Boni et al., 1994; Bacci et al., 1991; Boni 1994; Neglia et al., 2001), o alla densità di diversi gradienti di Percoll (Boni et al., 1999; Totey et al., 1993b; Totey et al., 1993a; Gasparrini et al., 2000). Inoltre è stato dimostrato che sostanze quali la caffeina (Totey et al., 1992; Madan et al., 1994b; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c ; Bacci et al., 1991) e la teofillina (Jainudeen et al., 1993) migliorano la motilità e la capacità fecondante ed allo stesso scopo, sono stati aggiunti con successo al terreno di fertilizzazione penicillamina, ipotaurina ed epinefrina (Madan et al., 1994b; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1996). I media più comunemente usati per l'IVF sono il “Tyrode's modified medium” (TALP; Totey et al., 1992; Totey et al., 1996; Gasparrini et al., 2000; Boni et al., 1994) o il “Brackett and Olifant” (BO; Totey et

al., 1992; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Nandi et al., 1998; Bacci et al., 1991).

Un altro fattore che sicuramente influenza l'efficienza della fertilizzazione in vitro è la proporzione di spermatozoi-oociti incubati. I risultati migliori sono stati ottenuti con una concentrazione di 2×10^6 spermatozoi per ml. In questo modo, infatti, si hanno soddisfacenti percentuali di cleavage (65%) senza che aumenti l'incidenza di polispermia, che è nota incrementare in presenza di una concentrazione troppo elevata di spermatozoi (Gasparrini et al 2002).

Inoltre è importante sottolineare il ruolo delle cellule del cumulo responsabili, tanto nel bovino quanto nel bufalo, di un effetto positivo sia sul cleavage che sulla produzione di blastocisti. Probabilmente ciò è dovuto alla capacità delle cellule del cumulo di indurre o, comunque di contribuire alla capacitazione e alla reazione acrosomiale del seme attraverso la secrezione di glicosamminoglicani (Ball et al., 1983) e di aumentare la motilità, come dimostrato in campo umano (Tesarik et al., 1990). Si è anche supposto che le cellule del cumulo catturino gli spermatozoi attraverso un meccanismo di chemiotassi (Chian et al., 1996) o che agiscano in modo meno specifico, semplicemente

aumentando la superficie di contatto tra spermatozoi ed oociti (Cox et al., 1993) e selezionando un ridotto numero di spermatozoi capaci di reagire con l'oocita (Carrel et al., 1993).

1.4 COLTURA IN VITRO (IVC)

Un punto di non facile risoluzione, nella prospettiva di migliorare l'efficienza dell'IVEP, è rappresentato dal riconoscimento di un sistema capace di supportare lo sviluppo embrionale in vitro. Anche se è stato dimostrato che gli embrioni bufalini possono essere coltivati con successo nelle tube di coniglio (Chantarepreteep et al., 1989) e di pecora (Galli et al., 1998), l'uso di ospiti intermedi rappresenta sicuramente una procedura poco pratica, soprattutto se la produzione embrionale è su larga scala. Nel 1987, grazie all'opera di Gandolfi e Moore, si è dato largo spazio al sistema di coocultura. Tali autori hanno dimostrato la possibilità di sviluppo di embrioni ovini allo stadio di pre-compattazione, fino allo stadio di blastocisti se coltivati in TCM 199 con siero e cellule oviduttali. Gli studi successivi (Totey et al., 1992; Madan et al., 1994a; Jainudeen et al., 1993), dedicati allo sviluppo di un sistema di coocultura con cellule oviduttali al fine di supportare lo sviluppo di embrioni bufalini in vitro, hanno dato percentuali di blastocisti limitate (8.2%). Un aumento

dell'efficienza dell'IVEP si è ottenuto nel momento in cui i presunti zigoti sono stati coltivati utilizzando monostrati di cellule del cumulo in presenza di cellule oviduttali (Madan et al., 1994a). L'azione promuovente delle cellule somatiche sullo sviluppo embrionale, è verosimilmente ascrivibile alla secrezione di fattori embriotrofici, quali quelli di crescita. D' altra parte, è stato dimostrato che blastocisti coltivate in presenza di IGF-1 sono caratterizzate da un maggior numero di cellule (Narula et al., 1996) e che l'aggiunta d'insulina nella fase di IVC o la combinazione di BSA, EGF e ITS (Raghu et al., 2002) può aumentare la percentuale di embrioni prodotti (Chauhan et al., 1997b). La disponibilità, poi, in forme pathogen free di linee cellulari quali cellule di fegato di ratto bufalino (BRL; Reed et al., 1996) e cellule renali di scimmia (VERO; Lay et al., 1992) ha fatto sì che queste fossero preferite alle cellule oviduttali ottenute da materiale da macello che sono potenzialmente contaminanti. Si è anche dimostrato che oociti bufalini fertilizzati possono essere coltivati con successo su monostrati di cellule di fegato di ratto bufalino in TCM 199 con il 10% di siero fetale bovino (FCS) o in coocoltura con cellule "Vero". (Boni et al, 1994b; Boni et al.,1999). Un evento importante nel campo della produzione embrionale in vitro, è stata la formulazione di un medium di coltura definito

(Tervit et al., 1972) chiamato “synthetic oviductal fluid” (SOF). Per quanto riguarda il bufalo, si conosce, ancora oggi, molto poco in merito alle esigenze metaboliche degli embrioni. Per acquisire maggiori informazioni risulta necessario l’uso di un terreno chimicamente definito, poiché l’interazione tra il medium e le cellule somatiche non consente di identificare con esattezza i fattori embiotrofici e le caratteristiche fisiche dell’ambiente culturale che si delinea. Boni et al. nel 1999 hanno considerato l’ipotesi di coltivare embrioni bufalini in un sistema definito, cioè in assenza di siero e di cellule. Operando in questo senso, quindi, sono stati confrontati due differenti sistemi di coltura: TCM 199 addizionato di siero fetale bovino al 10% in cocoltura con cellule BRL ed il SOF con 0.5% di amminoacidi essenziali, 1% di amminoacidi non essenziali e 8 mg/ml di albumina sierica bovina (BSA). Nel caso del SOF la tensione di ossigeno dell’ambiente d’incubazione è stata ridotta al 7%. Da questa prova è emerso che l’impiego del SOF consente di ottenere non solo migliori percentuali di blastocisti rispetto all’uso di cellule come substrato culturale (13.7% vs 7%), ma anche embrioni morfologicamente migliori, con un nodo embrionale più compatto ed in grado di svilupparsi più velocemente. Quest’ultima caratteristica è importante nella valutazione della qualità di embrioni prodotti in

vitro; a tal proposito Totey et al. (1996) hanno dimostrato che vi è una diretta correlazione tra l'efficienza della produzione embrionale e la velocità di sviluppo degli embrioni e che embrioni precoci hanno normalmente un numero di cellule maggiore.

Un altro parametro che rappresenta un buon indice di qualità embrionale è la capacità di rompere la zona pellucida, ossia la capacità di sgusciare. In un buon sistema IVEP si può, infatti, osservare la presenza di blastocisti bufaline sgusciate già a 6 giorni dall'inseminazione e la percentuale di embrioni prodotti viene valutata non oltre il giorno 7 post IVF. Questo perché il prolungamento dei tempi di coltura favorisce solo la valutazione numerica delle blastocisti prodotte, ma non aiuta a stabilirne la vitalità, poiché è accertato che embrioni che si sviluppano lentamente sono anche meno vitali.

Recentemente, nel campo della produzione embrionale in vitro nell'uomo e nel bovino, si sono utilizzati sistemi di coltura con media sequenziali (Gardner e Lane 1998). In questo modo è stato possibile adattare alcuni componenti del medium di coltura alle diverse fasi dello sviluppo embrionale, nel tentativo di assecondare le esigenze metaboliche embrionali che, verosimilmente cambiano tra le prime fasi di divisione ed il raggiungimento dello stadio di blastocisti.

Il ricorso a terreni di composizione diversa nel corso della coltura embrionale potrebbe, quindi, contribuire al miglioramento dell'efficienza dell'IVEP anche nella specie bufalina.

1.5 CRIOCONSERVAZIONE

Nel caso della specie bufalina esistono pochissime informazioni in merito alla crioconservazione di embrioni. Il principale fattore limitante la diffusione in campo della tecnologia OPU-IVEP in questa specie è rappresentato dalla scarsa resistenza al congelamento degli embrioni bufalini prodotti in vitro, verosimilmente imputabile all'elevato contenuto lipidico (Boni et al., 1992). Si può ovviare a tale problema effettuando la coltura in vivo, nelle tube di pecora, di zigoti previamente maturati e fecondati in vitro, in quanto si è dimostrato che la permanenza nell'ovidutto incrementa la resistenza degli embrioni al congelamento. Nel 1998 Galli et al hanno riportato la nascita di tre vitelli dal trasferimento di 9 embrioni crioconservati; in questo caso oociti prelevati con Ovum Pick up erano stati fertilizzati in vitro e a due giorni dall'IVF erano stati trasferiti in ovidutto di pecora, prima di essere crioconservati mediante congelamento lento.

Embrioni bufalini interamente prodotti in vitro sono stati

vitrificati con una metodica previamente utilizzata nella specie ovina (Naitana S. et al., 1996) con risultati soddisfacenti; in questa esperienza è stata riportata una percentuale di sopravvivenza, valutata come ripristino di una normale morfologia, riespansione della blastocella e sviluppo in vitro, del 65 % (Gasparrini et al., 2001). Non sono emerse differenze tra i vari stadi di sviluppo considerati, mentre è stato dimostrato che embrioni che si sviluppano precocemente resistono meglio alla vitrificazione rispetto a quelli più tardivi. Recentemente si sono ottenute gravidanze a termine dal trasferimento di embrioni bufalini interamente prodotti in vitro, che erano stati vitrificati con la stessa metodica. (Neglia et al., 2003b)

La nascita di vitelli bufalini, ottenuta dal trasferimento di embrioni vitrificati con il metodo tradizionale delle paillettes, è stata inoltre riportata da Duran et al. nel 2004, con un'efficienza del 10.9%.

PARTE SPERIMENTALE

CAP. 2

INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE

Come abbiamo visto in precedenza, la minore efficienza dell'IVEP che si riscontra nel bufalo, rispetto alla specie bovina, è imputabile alla più bassa percentuale di cleavage. Infatti, quando le percentuali di blastocisti vengono calcolate sugli zigoti, le differenze di efficienza tra le due specie si annullano. Quanto detto suggerisce che il sistema di coltura in vitro utilizzato è idoneo a sostenere lo sviluppo embrionale e spinge a ricercare le cause della minore resa nei primi stadi della lavorazione, ossia nella maturazione e nella fertilizzazione in vitro. Infatti la minore efficienza di fertilizzazione può essere imputabile, da una parte alla mancata acquisizione, da parte degli oociti, della competenza nel corso della maturazione, e dall'altra, all'inadeguatezza del sistema di IVF. Pertanto si è voluto analizzare entrambi questi aspetti, allo scopo di ottimizzare l'efficienza di fertilizzazione nel bufalo.

Il lavoro è stato dunque articolato in due parti. Nella prima si è focalizzata l'attenzione sulla fase di maturazione dell'oocita, mentre nella seconda si sono esaminati alcuni fattori che possono giocare un ruolo chiave nel processo di fecondazione.

CAP. 3

STUDI SUL PROCESSO DI MATURAZIONE DELL'OOCITA DI BUFALO

Il processo di maturazione è essenziale affinché l'oocita abbia una piena competenza allo sviluppo e quindi, lo sviluppo di un adeguato sistema di coltura per la IVM degli oociti rappresenta una condizione fondamentale per il miglioramento dell'efficienza IVEP. A conferma di ciò, si ricorda che nella specie bovina, in cui il sistema IVEP è ben collaudato e molto più efficiente rispetto ad altre specie domestiche meno studiate, la produzione delle blastocisti, a partire da oociti maturati in vitro, è inferiore a quella ottenibile da oociti maturati in vivo ma fecondati e coltivati in vitro (Dominko et al 1997, Rizos et al 2002, Blondin et al 2002). Ciò evidenzia la necessità di individuare le condizioni ottimali per l'IVM al fine di migliorare lo sviluppo embrionale. È noto che la durata della maturazione gioca un ruolo critico per il successivo sviluppo, poiché tempi inappropriati di maturazione possono provocare aberrazioni della struttura della cromatina (Dominko et al 1997), invecchiamento dell'oocita (Hunter 1989, Hunter and Greve 1997) e ridotto sviluppo (Marston et al 1964, Chian 1992). È stato dimostrato che lo spermatozoo è in grado di penetrare

l'ocita anche prima che questo abbia completato il processo di maturazione (Chian et al 1992, Niwa et al 1991) in questo caso, però, lo sviluppo successivo risulta ridotto. Pertanto il tempo ottimale per eseguire la fecondazione in vitro (IVF) corrisponde alla maturazione ultimata. È noto che il tempo necessario per il completamento della maturazione in vitro differisce tra le diverse specie, variando dalle 18-24 ore nei bovini (Sirard et al 1989, Neglia et al 2001) alle 36-48 ore nel maiale (Prather et al 1998). Nella specie bovina è stato riportato che, per aumentare la resa in blastocisti, la durata del tempo di maturazione in vitro può variare tra le 18 (Park et al 2005) e le 24 (Ward et al 2002) ore.

Nel bufalo, i pochi studi effettuati sulla cinetica della maturazione degli oociti in vitro hanno dato risultati discrepanti, con la più alta percentuale di oociti in metafase II riscontrata, in un lavoro, già a partire dalle 15 ore (Neglia et al 2001) mentre in un altro solo dopo le 24 ore di IVM (Yadav et al 1997). Malgrado l'incongruità dei dati riguardanti la velocità di maturazione degli oociti di bufalo, la maggior parte degli autori tende ad espletare la fecondazione in vitro 24 ore dopo l'inizio dell'IVM.

Lo scopo di questo lavoro è stato, pertanto, quello di:

1. approfondire lo studio della cinetica della progressione meiotica degli oociti di bufalo durante la IVM (esperimento 1);

2. analizzare, nel corso dell'IVM del bufalo, l'attività dell'MPF e delle MAP chinasi, ovvero di quelle molecole chiave coinvolte nell'induzione e nella regolazione del processo di maturazione della cellula uovo (esperimento 2);
3. individuare il momento ottimale per eseguire l'IVF in questa specie (esperimento 3);
4. verificare l'influenza dell'aggiunta di composti tiolici al medium di IVM (esperimento 4).

3.1 ESPERIMENTI 1 E 2: STUDIO DELLA CINETICA DELLA PROGRESSIONE MEIOTICA DEGLI OOCITI DI BUFALO DURANTE LA IVM ED ANALISI DELL'ATTIVITÀ DELL'MPF E DELLE MAPK.

MATERIALI E METODI

Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma (Milano, Italia), se non diversamente specificato.

Recupero degli oociti: Le ovaia di bufala sono state prelevate al macello in soluzione fisiologica antibiotata con 150 mg/1 di kanamicina a 30-35 °C e trasportate in laboratorio entro 3-4 ore dall'avvenuta macellazione. I complessi cumulo-oocita (COC) sono stati recuperati mediante aspirazione dei follicoli del diametro di 2-8 mm, utilizzando un ago di 18 G connesso ad una pompa di aspirazione, operante a pressione negativa controllata (40-50 mm Hg). Si è proceduto, quindi, con la valutazione morfologica dei COC così raccolti e loro selezione: solo quelli di grado A e B (Neglia et al 2003), caratterizzati da cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo, sono stati utilizzati per la fase sperimentale.

Maturazione in vitro (IVM): Per la maturazione in vitro degli oociti si è utilizzato un terreno commerciale, il TCM 199 tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio ed addizionato di

siero fetale di vitello (FCS) al 10 %, 0.2 mM di piruvato di sodio, 0.5 µg/ml di FSH, 5 µg/ml di LH, 1 µg/ml di 17β-estradiolo, 50 µg/ml di kanamicina e 50 µM di cisteamina (Gasparrini et al 2000).

I COC selezionati, previo abbondante lavaggio in TCM 199, tamponato con 15 mM di HEPES e 5 mM di bicarbonato di sodio (H199) e addizionato del 10 % di FCS (H199), completato da un lavaggio nel terreno finale di maturazione, sono stati posti in gocce di 50 µl (10 COC/goccia) dello stesso medium, coperte di olio minerale. La IVM è stata effettuata alla temperatura di 38.5°C, in atmosfera gassosa controllata con il 5 % di CO₂ in aria umidificata.

Valutazione dello stato di maturazione nucleare: Gli oociti sono stati denudati, rimuovendo le cellule del cumulo mediante spipettamento, in medium H199 e lavati abbondantemente. Successivamente sono stati fissati con metanolo al 60 % in PBS, colorati con 2.5 µg/ml di Hoechst 33342 per 15 minuti e posizionati su un vetrino portaoggetti per la successiva valutazione del loro stato nucleare, effettuata con un microscopio invertito Nikon Diaphot 300 dotato di filtri fluorescenti.

Lo stato nucleare è stato così descritto:

1. GV, contenente un singolo grande nucleo con filamenti di cromatina distribuiti uniformemente (fig. 1, 2, 3);
2. GVBD, identificato dalla scomparsa del nucleolo compatto e della membrana nucleare e dalla progressiva condensazione della cromatina;
3. metafase I (M-I), con cromosomi distinguibili posizionati nella zona equatoriale del fuso meiotico (fig. 4, 5, 6);
4. anafase I (A-I), con l'inizio della separazione dei due gruppi di cromosomi verso i poli opposti del fuso;
5. telofase I (T-I), con la completa separazione dei due gruppi cromosomici;
6. telofase I con uno dei gruppi di cromosomi contenuto in una zona che formerà il corpo polare (T-I PB);
7. metafase II (M-II), con la piastra metafasica e il primo corpo polare estruso nello spazio perivitellino (fig. 7, 8).



Fig. 1: Stadio di GV in oocita di bufalo



Fig. 2: Stadio di GV in oocita di bufalo

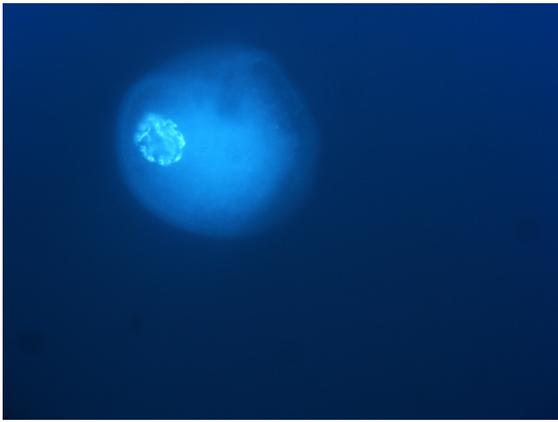


Fig. 3: Stadio di GV in oocita di bufalo

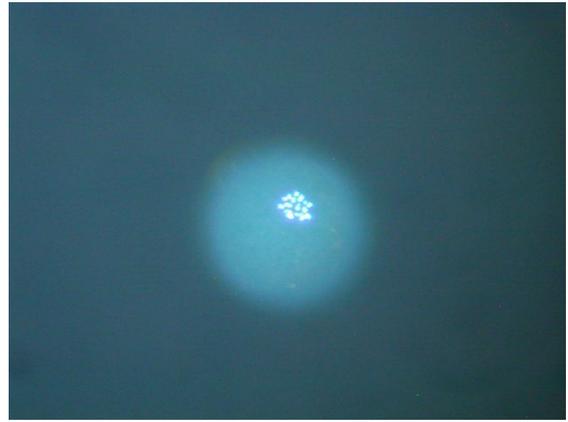


Fig. 4: Stadio di MI in oocita di bufalo



Fig. 5: Stadio di MI in oocita di bufalo



Fig. 6: Stadio di MI in oocita di bufalo



Fig. 7: Stadio di Metafase II in oociti maturi di bufalo

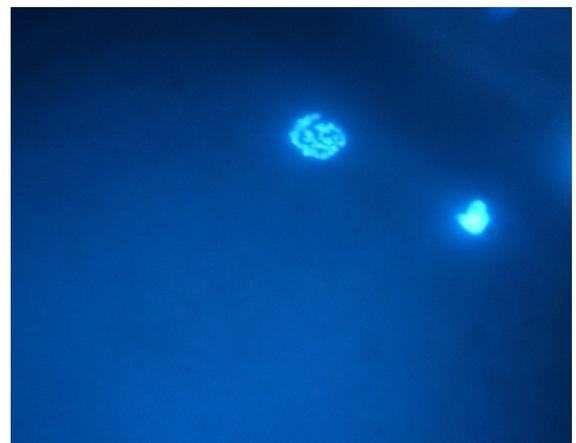


Fig. 8: Stadio di Metafase II in oociti maturi di bufalo

DISEGNO SPERIMENTALE

Esperimento 1: Valutazione dello stato nucleare.

Un numero totale di 310 oociti, suddivisi in 4 repliche, sono stati maturati in vitro per 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, e 24 ore allo scopo di studiare la cinetica della progressione meiotica in vitro. Alla fine di ogni periodo di maturazione, gli oociti, privati delle cellule del cumulo, sono stati fissati e colorati come precedentemente descritto. Basandosi sui risultati ottenuti, l'esperimento è stato replicato riducendo gli intervalli di tempo a 1 ora nella finestra temporale compresa tra le 18 e le 24 ore, al fine di identificare il tempo ottimale di maturazione, ovvero il tempo in cui si osserva la maggiore percentuale di oociti in metafase II.

Questa seconda prova è stata effettuata su un totale di 224 oociti ed è stata suddivisa in 3 repliche.

Esperimento 2: Valutazione delle attività chinasiche

Per la prova è stato utilizzato un campione rappresentativo di oociti (n=113) derivanti dalla prova precedente e colorati con Hoechst, per valutare lo stato nucleare, e stoccati a -80°C in attesa delle analisi mirate alla misurazione delle attività chinasiche. Le analisi sono state effettuate mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide, usando un sistema tampone discontinuo di Laemmli (Laemmli 1970) con un gel di

funzionamento del 12%. L'attività di MPF negli oociti (n = 65) è stata analizzata mediante misurazione dell'attività chinasi dell'istone H1 (Naito e Toyoda, 1991) mentre l'attività delle MAPK (n = 48) è stata stimata mediante l'analisi della proteina mielinica basica (Chesnel et al 1995). L'attività sia delle chinasi sia dell'MPF è stata quantificata misurando la densità delle bande della pellicola autoradiografica con il densitometro.

ANALISI STATISTICA

Per l'esperimento 1 le differenze tra le percentuali delle classi di stato meiotico raggiunto dagli oociti ai diversi tempi di incubazione sono stati analizzati col test del Chi-Quadrato. Tutti gli oociti degenerati sono stati esclusi dai totali per il calcolo delle percentuali.

Per l'esperimento 2 le differenze nei livelli di chinasi fra i 7 gruppi di sviluppo meiotico su menzionati sono state analizzate mediante ANOVA.

RISULTATI ESPERIMENTO 1

La cinetica della progressione meiotica è mostrata in Tabella 1.

È stato osservato che al tempo 0 la maggior parte degli oociti era nello stadio di GV mentre l'incidenza di questa fase della

maturazione diminuiva ($P < 0.05$) a partire dalle sei ore successive all'inizio dell'IVM.

Lo stadio di GVBD, con i differenti gradi di condensazione della cromatina, è stato riscontrato tra le 0 e le 9 ore, con le percentuali più elevate ($P < 0.05$) a 6 ore post-maturazione.

Lo stadio di M-I è stato osservato tra le 9 e le 15 ore post-IVM, con un aumento significativo ($P < 0.05$) della percentuale a 12 ore.

Infine è stato rilevato che la più alta proporzione ($P < 0.05$) di oociti completa la maturazione nucleare, raggiungendo lo stadio di M-II, tra le 21 e le 24 ore post-IVM. Quando il range di osservazione è stato ristretto ad intervalli di 1 ora tra le 18 e le 24 ore, è emerso che, sebbene approssimativamente circa il 50% degli oociti abbia raggiunto lo stadio di MII tra 18 e 19 ore post-IVM, le percentuali più elevate ($P < 0.05$) di oociti maturi sono state riscontrate tra le 20 e le 24 ore (Tabella 2).

RISULTATI ESPERIMENTO 2.

Il valore di MPF e di MAPK è stato riportato uguale a 100 negli oociti in metafase II (MII), ed i relativi livelli nelle altre fasi sono stati riferiti in termini percentuali rispetto ai livelli in MII. I più bassi livelli delle attività di MAPK e di MPF sono stati trovati negli oociti allo stadio di GV (tempi di IVM di 0-6 ore - 40% e 17.2%

rispettivamente) e di GVBD (IVM di 6-9 ore - 41,2% e 18%) mentre risultano aumentati nella fase di MI (IVM di 9-15 ore - 95.1% e 82.8% rispettivamente). È interessante notare che i livelli delle chinasi sono stati simili nelle fasi di MI e MII laddove i livelli di MPF sono stati significativamente più bassi ($P < 0.01$) nella fase di MI rispetto a quelli rilevati in MII.

Stadio meiotico	Durata (ore) della maturazione								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
GV	21 (65.6) ^a	15 (46.9) ^{ab}	10 (29.4) ^b			1 (2.9) ^c	1 (3.2) ^c		
GVBD	10 (31.2) ^a	16 (50.0) ^{ab}	20 (58.8) ^b	10 (31.2) ^a					
MI	1 (3.1) ^a	1 (3.1) ^a	4 (11.8) ^a	22 (68.7) ^b	32 (97.0) ^c	26 (76.5) ^b	2 (6.4) ^a	2 (5.5) ^a	1 (2.6) ^a
AI					1 (3.0) ^a	4 (11.8) ^a	5 (16.1) ^{ab}	1 (2.8) ^a	1 (2.6) ^{ac}
TI						1 (2.9) ^a	7 (22.6) ^b		2 (5.1) ^a
TI PB							6 (19.3) ^a	1 (2.8) ^b	
MII						2 (5.9) ^a	10 (32.2) ^b	32 (88.9) ^c	35 (89.7) ^c
Totali	32	32	34	32	33	34	31	36	39
Degenerati	1					1	2	1	2

Tabella 1: Stadi meiotici di oociti di bufalo a differenti tempi della maturazione in vitro.

a, b, c valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.05)

Tabella 2: Stadi meiotici di oociti di bufalo a differenti tempi della maturazione in vitro.

Stadio meiotico	Durata (ore) della maturazione						
	18	19	20	21	22	23	24
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
GV	3 (10.0)	1 (3.3)	1 (3.4)			1 (3.2)	
GVBD			1 (3.4)				
MI	4 (13.3) ^a	6 (20.0) ^{ab}	1 (3.4) ^{ac}	5 (15.6) ^a	1 (3.4) ^{ac}	2 (6.4) ^a	4 (12.5) ^a
AI		1 (3.3)					
TI		2 (6.6)	3 (10.3)				
TI PB	9 (30.0) ^a	4 (13.3) ^{ab}			1 (3.4) ^b		
MII	14 (46.7) ^a	16 (53.3) ^a	23 (79.3) ^b	27 (84.4) ^b	27 (93.1) ^b	28 (90.3) ^b	28 (87.5) ^b
Totali	30	30	29	32	29	31	32
Degenerati	1	2	3	2	2	1	

^{a, b, c} valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.05)

3.2 ESPERIMENTO 3: EFFETTO DELLA DURATA DI IVM SUL CLEAVAGE E SULLO SVILUPPO A BLASTOCISTI.

MATERIALI E METODI

I COC (n=581), recuperati per aspirazione da ovaia da macello, sono stati maturati in vitro per 18, 21, 24, 27 e 30 ore, come precedentemente descritto, e successivamente sono stati fertilizzati. Gli spermatozoi da utilizzare per la fecondazione in vitro sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato di un toro precedentemente testato per la IVF. Il seme è stato trattato mediante la procedura dello swim-up per 1 ora, utilizzando il medium Ham's. Il pellet ottenuto dopo centrifugazione del surnatante è stato risospeso in modo da ottenere una concentrazione finale di 2×10^6 /ml spermatozoi nel terreno di fecondazione.

I COC sono stati lavati due volte in Tyrode's Albumine Lactate Pyruvate (Lu et al., 1987) tamponato con 20mM di HEPES e 5mM di Bicarbonato di Sodio (HEPES TALP). L'ultimo lavaggio è stato effettuato in Tyrode's Albumine Lactate Pyruvate tamponato con 25 mM di bicarbonato di Sodio (Fert TALP) ed addizionato di 0.2 mM di penicillamina, 0.1 mM di ipotaurina e 0.01 mM di eparina. L'inseminazione è stata effettuata in gocce di 50 μ l (5

oociti/goccia) dello stesso terreno a 38.5°C, in presenza del 5% di CO₂ in aria per una durata di 20-22 ore.

Circa 24 ore dopo la IVF i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fertilizzazione, denudati delle cellule del cumulo mediante ripetuto spipettamento, lavati 2 volte in medium SOF Hepes-tamponato e sono stati coltivati in gocce (10 zigoti/goccia) di 20 µl di Synthetic Oviduct Fluid (SOF; Tervit et al., 1972), tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio al quale sono stati aggiunti aminoacidi essenziali e non essenziali e 8 mg/ml di albumina serica bovina (SOFaaBSA). Al giorno 5 di coltura è stata fatta una valutazione del cleavage e gli oociti degenerati e indivisi sono stati eliminati mentre gli embrioni sono stati trasferiti in medium fresco per ulteriori due giorni di IVC.

La produzione di blastocisti è stata valutata il giorno 8 post-inseminazione (pi).

ANALISI STATISTICA

Le differenze nelle percentuali di cleavage e blastocisti osservate fra i differenti gruppi di stadio meiotico (vedi esperimento precedente) sono state analizzate con il test del Chi-Quadrato. È stata, inoltre, effettuata un'analisi di correlazione fra i tempi di maturazione e le percentuali di cleavage e blastocisti.

Risultati Esperimento 3

L'analisi della correlazione ha mostrato una associazione lineare significativa, con diminuzione progressiva di efficienza all'aumentare dei tempi di maturazione, in termini di cleavage ($r = -0.681$; $P < 0.05$), che di blastocisti valutate rispetto ai COC ($r = -0.834$; $P < 0.05$) e di blastocisti calcolate sugli oociti divisi ($r = -0.711$; $P < 0.05$). In particolare, la percentuale di cleavage a 18 ore di maturazione è risultata simile a quella registrata a 21 ore (tabella 3) ma significativamente più alta ($P < 0.05$) rispetto a tutti gli altri tempi di maturazione (24, 27 e 30 ore). Le percentuali più alte ($P < 0.05$) di blastocisti/COC sono state osservate ai due tempi più precoci di maturazione (18 e 21 ore) rispetto ai due tempi più tardivi (27 e 30 ore). Quando gli oociti sono stati fatti maturare per 24 ore le percentuali di blastocisti sono state significativamente diverse ($P < 0.05$) soltanto da quelle ottenute dagli oociti fatti maturare per 30 ore. Le percentuali di oociti divisi che raggiungono lo stadio di blastocisti sono state significativamente più basse ($P < 0.05$) al tempo di maturazione di 27 e 30 ore confrontate a quelle registrate a 18 ore, mentre valori intermedi sono stati trovati a 21 e 24 ore (tabella 3).

Tabella 3: Effetti della durata di maturazione in vitro sullo sviluppo embrionale nel bufalo.

Durata (ore) della maturazione	n	Divisi n (%)	Blastocisti (n)	Blastocisti/COC (%)	Blastocisti/divisi (%)
18	120	80 (66,7) ^a	30	25,0 ^a	37.5 ^a
21	118	74 (62,7) ^{ab}	23	19.5 ^a	31.1 ^{ab}
24	111	60 (54,0) ^{bc}	20	18.0 ^{ab}	33.3 ^{ab}
27	113	55 (48,7) ^{cd}	11	9.7 ^{bc}	20.0 ^b
30	119	44 (37,0) ^d	9	7.6 ^c	20.0 ^b

^{a, b, c} valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.05)

DISCUSSIONE

Sebbene nel bovino il completamento della maturazione degli oociti non è necessario perché si abbia la penetrazione e la decondensazione della testa dello spermatozoo (Chian et al 1992, Niwa et al 1991), lo sviluppo embrionale risulta fortemente ridotto in caso di prematura coincubazione dei gameti. Il completamento della meiosi è quindi considerato unanimemente il miglior tempo per l'espletamento dell'IVF. La discordanza dei pochi dati reperibili in letteratura per quanto riguarda la durata della maturazione in vitro nella specie bufalina ci ha indotti ad effettuare una valutazione completa della progressione meiotica

dal momento in cui gli oociti recuperati vengono introdotti nel sistema di IVM alle 24 ore post-IVM.

In questo studio è stato osservato che il raggiungimento dello stadio di MII si verifica a partire dalle 18-19 ore dall'IVM, ma la maggior parte degli oociti di bufalo completa la maturazione nucleare tra le 20 e le 24 ore. Questi risultati sono in disaccordo con un precedente lavoro (Neglia et al 2001), in cui la maggior parte degli oociti di bufalo aveva raggiunto lo stadio di MII tra le 15 e le 19 ore dopo l'inizio dell'IVM ed era stata osservata un' aumentata incidenza di oociti degenerati ai tempi successivi, la qual cosa aveva suggerito che la maturazione nucleare nel bufalo potesse essere anticipata rispetto a quella della specie bovina. D'altro canto, altri autori hanno riportato, nel bufalo, che la più alta proporzione di oociti in MII si riscontra dopo le 24 ore di IVM (Yadav et al 1997, Singh et al 1992). Una grande variazione dei tempi di maturazione degli oociti maturati in vitro è stata riscontrata anche nel bovino (Fulka et al 1980, Suss et al 1985, Sato et al 1977, Edwards 1965). La differente percentuale di maturazione degli oociti osservata nel bufalo nei diversi studi, può essere causata da differenti condizioni di IVM e, in particolar modo, dalla qualità degli oociti di partenza che, in questa specie, è influenzata da vari fattori. È ormai risaputo che nel bovino gli

oociti che maturano prima hanno una probabilità maggiore di raggiungere lo stadio di blastocisti (Dominko et al 1992, Van der Westerlaken 1994). Basandosi su questa osservazione, è ipotizzabile che nel precedente esperimento la qualità degli oociti utilizzati come materiale di partenza fosse stata migliore, in quanto il sistema di maturazione in vitro è rimasto invariato.

In conclusione, sulla base dei risultati sulla cinetica della maturazione ottenuti nel presente studio, è possibile affermare che il miglior tempo per eseguire l'IVF nel bufalo è tra le 20 e le 24 ore dopo l'IVM.

I risultati dell'esperimento 3 hanno dimostrato che la durata di IVM influenza la competenza allo sviluppo degli oociti di bufalo, con una diminuzione progressiva di efficienza all'aumentare della durata di IVM da 18 fino a 30 ore. Di conseguenza, il momento ottimale per l'IVF nel bufalo sembra essere a 18 ore dopo l'IVM o, comunque non oltre le 24 ore. Infatti, l'IVF effettuata a tempi successivi alle 24 ore ha provocato un deterioramento significativo della competenza allo sviluppo degli oociti. Tale risultato non è stato inatteso perché, al momento dell'inseminazione, gli oociti fecondati a 27 e 30 ore già mostravano un aspetto morfologico peggiore. Questi risultati confermano osservazioni precedenti che hanno mostrato un

effetto nocivo dell'invecchiamento degli oociti sullo sviluppo post-partenogenetico e post-fertilizzazione in questa specie (Gasparrini et al 2004).

È noto che il prolungamento dell'arresto in MII prima dell'IVF provoca una perdita graduale di capacità fertilizzante e di sviluppo embrionale, in modo simile ad altre specie (First et al 1988). Si pensa che la vita fertile degli oociti di mammifero duri soltanto 6-12 ore, dopodiché si possono verificare delle anomalie dei granuli corticali e dei microtubuli che, pur non compromettendone necessariamente la competenza ad essere fertilizzati, ne impediscano il successivo sviluppo (Long et al 1994, Hunter et al 1989).

Nei bovini il raggiungimento della fase di MII è tra le 18 e le 24 ore dopo l'inizio dell'IVM. Diversi autori (Ward 2002, Monaghan 1993) hanno riportato che la durata ottimale di maturazione degli oociti bovini in vitro per ottimizzare il rendimento a blastocisti è di 24 ore. Questi risultati sono in disaccordo con quelli di Semple (Semple et al 1993) che hanno segnalato la più alta produzione di blastocisti da oociti fatti maturare per soltanto 14 ore. Per concludere, Park et al (Park et al 2005) recentemente hanno riportato una migliore produzione di blastocisti ed un più elevato tasso di gravidanza riducendo la durata dell'IVM a 18 ore. Questi

risultati conflittuali possono essere dovuti alla presenza di molti fattori che interessano lo sviluppo embrionale in vitro, compreso il toro differente usato in esperimenti differenti.

Nell'esperimento 2 le fluttuazioni dei livelli di MPF nel bufalo sembrano differenti da quelle osservate in altre specie; in particolare, nessuna differenza è stata registrata fra lo stadio di GV e quello di GVBD mentre un aumento significativo dei livelli di MPF è stato trovato in MII rispetto alla fase di MI.

Sembra che le MPF e MAPK potrebbero guidare diversamente la ripresa e la progressione meiotica all'arresto MII in questa specie.

3.3 ESPERIMENTO 4: CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE DEGLI OOCITI E COMPETENZA

È stato suggerito che la produzione di GSH sia critica per l'acquisizione della competenza allo sviluppo degli oociti a livello citoplasmatico (Eppig, 1996); de Matos ed altri (1995 e 1997) hanno proposto che la misurazione della concentrazione intraocitaria di GSH alla fine dell'IVM potrebbe essere utilizzata come un indicatore dell'avvenuta maturazione citoplasmatica.

Un incremento dello stress ossidativo, che si esprime con l'innalzamento dei livelli embrionali di perossido d'idrogeno, è attribuibile alla stessa coltura in vitro. Nella maggior parte delle cellule esistono degli efficaci sistemi antiossidanti preposti alla difesa dai radicali liberi, quali la catalasi e la superossido dismutasi nonché composti tiolici che agiscono come tamponi metabolici, chelando le specie attive dell'ossigeno (Del Corso et al 1994).

Il glutatione (GSH), composto solforato non proteico, gioca un ruolo determinante nella protezione delle cellule dai danni ossidativi. Tale composto svolge diverse altre funzioni intervenendo nel trasporto aminoacidico, nella sintesi di DNA e proteine e nella riduzione dei disolfidi (Lafleur et al 1994). Inoltre

dopo la fecondazione prende parte alla decondensazione della testa dello spermatozoo e, quindi, alla formazione del pronucleo maschile (Calvin et al 1986, Yoshida et al 1993, Miyamura et al 1995). Nel topo il GSH è coinvolto in diversi eventi embrionali, quali la proliferazione e il differenziamento cellulare negli stadi tardivi dello sviluppo pre-impianto e, come costituente di coenzimi, contribuisce al metabolismo generante energia (Lim et al 1996).

È stato dimostrato che questo importante composto è sintetizzato durante la maturazione in vitro di oociti di topo (Calvin et al 1986), criceto (Perreault et al 1988), maiale (Yoshida et al 1993), bovino (Miyamura et al 1995), pecora (de Matos et al 2002) e bufalo (Gasparrini et al 2003). A livello ovarico il contenuto di GSH dell'oocita incrementa progressivamente nel corso della maturazione, fino al momento dell'ovulazione (Perreault et al 1988), per costituire un pool di riserva che proteggerà la cellula negli stadi successivi dello sviluppo embrionale (Telford et al 1990).

È stato dimostrato che alcuni composti tiolici a basso peso molecolare, quali la cisteamina e il β -mercaptoetanololo, incrementano la sintesi di glutatione in embrioni bovini (Takahashi et al 1993). È stato anche riportato che, in presenza

di β -mercaptoetanolo, l'aggiunta di cisteina al terreno di maturazione, si traduce in un incremento dei livelli di GSH e in un miglioramento della competenza allo sviluppo degli oociti di maiale (Abeydeera et al 1999). Nella specie bovina è stato provato che l'aumentata concentrazione intracitoplasmatica di glutatione, causata dall'aggiunta di cisteamina e di β -mercaptoetanolo al terreno di coltura, stimola lo sviluppo di embrioni di 6-8 cellule fino allo stadio di blastocisti (Takahashi et al 1993).

De Matos et al. (1996, 2000) hanno dimostrato nelle specie bovina ed ovina che la cisteamina, aggiunta nella fase di maturazione in vitro, determina un miglioramento qualitativo dello sviluppo embrionale, stimolando la sintesi di glutatione. È stato inoltre dimostrato che composti tiolici quali la cisteamina, il β -mercaptoetanolo, la cistina e la cisteina introdotti nel sistema di IVM incrementano la sintesi di GSH in oociti di capre prepuberi, ma solo la cisteamina migliora anche lo sviluppo embrionale (Rodríguez-González et al 2003).

La presunta maggiore sensibilità ai danni ossidativi degli oociti/embrioni bufalini, dovuta al loro maggiore contenuto lipidico, ha indotto Gasparrini et al. (2000) a verificare l'efficacia di tale composto tiolico sullo sviluppo embrionale della bufala. In una prima esperienza è stato registrato un notevole incremento

della produzione embrionale in seguito all'utilizzo di tale composto durante la maturazione in vitro anche in questa specie (Gasparrini et al 2000).

Più recentemente è stato dimostrato, dagli stessi autori, che il sensibile miglioramento dello sviluppo embrionale ottenuto con l'introduzione della cisteamina nel medium di IVM, è imputabile alla stimolazione della sintesi oocitaria di GSH (Gasparrini et al 2003).

I risultati di questo studio hanno dimostrato che gli oociti di bufalo sintetizzano ex novo GSH durante la maturazione in vitro, analogamente a quanto descritto in altre specie (de Matos et al 1996, Bannai et al 1984) e che, il miglioramento dello sviluppo embrionale, ottenuto con l'aggiunta di cisteamina al medium di IVM, è dovuto all'incrementata sintesi di glutatione. La capacità degli oociti bufalini di sintetizzare GSH è attestata dai più bassi livelli di GSH riscontrati, appunto, negli oociti immaturi e negli oociti maturati in presenza di butionina sulfoximina (BSO), un potente inibitore della sintesi di GSH. È, inoltre, emerso che la sintesi di GSH durante la IVM gioca un ruolo fondamentale ai fini dello sviluppo embrionale successivo, come dimostrato dal calo della produzione embrionale osservato in presenza di BSO (Gasparrini et al 2003).

Il principale fattore limitante la sintesi di glutatione a livello cellulare, mediante il ciclo della γ -glutamilsteina sintetasi, è rappresentato dalla disponibilità di cisteina nell'ambiente extracellulare. Tale aminoacido, d'altronde, è molto instabile in quanto rapidamente ossidato a cistina nel mezzo di coltura (Sagara et al 1993). Composti solforati a basso peso molecolare, quali la cisteamina o il β -mercaptoetanololo, riducendo la cistina a cisteina, promuovono l'assunzione di quest'ultima da parte delle cellule e, conseguentemente, stimolano la sintesi di glutatione (Bannai et al 1984).

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare se aumentando la disponibilità nel mezzo di IVM di cistina, uno dei precursori del ciclo della γ -glutamilsteina-sintetasi, in presenza di cisteamina, sarebbe ulteriormente incrementata la sintesi di GSH da parte degli oociti e se ciò avrebbe migliorato l'efficienza complessiva della IVEP nella specie bufalina.

In particolare sono stati valutati gli effetti dell'aggiunta al mezzo di IVM dei composti tiolici su: (esperimento 4.1) concentrazione intracitoplasmatica di GSH negli oociti, (esperimento 4.2) maturazione nucleare e formazione dei pronuclei in seguito alla

fecondazione, (esperimento 4.3) percentuale di cleavage e sviluppo embrionale post-fertilizzazione, inteso come resa in blastocisti.

MATERIALI E METODI

Reagenti e media: A meno che non sia altrimenti specificato tutti i reagenti sono stati forniti dalla Sigma (Milano, Italia).

Il medium di IVM (B199) consiste in TCM199 tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio, a cui è stato aggiunto il 10 % di siero fetale bovino (FCS), 0.2 mM di piruvato, 0.5 µg/ml FSH, 5 µg/ml LH, 1 mg/ml 17β-estradiolo e 50 µg/ml kanamicina.

Durante le fasi di lavaggio gli oociti sono stati tenuti in TCM199 + 10% di FCS, tamponato con 15 mM di HEPES e 5 mM di bicarbonato di sodio (H199).

Il medium di fertilizzazione che è stato usato è il Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (Lu et al 1987) a cui sono state aggiunte 0.2 mM di penicillamina, 0.1 mM di ipotaurina e 0.01 mM di eparina.

Il medium di coltura usato è stato il Fluido Sintetico Oviduttale (SOF) che contiene amminoacidi essenziali e non, e 8 mg/ml di Albumina Sierica Bovina (Tervit et al 1972).

Sia i media di fertilizzazione che di coltura sono stati tamponati con 25 mM di bicarbonato di sodio che è stato poi sostituito da 20

mM di HEPES e 5 mM di bicarbonato di sodio quando gli oociti e gli embrioni sono stati processati al di fuori degli incubatori a CO₂.

Recupero degli oociti e maturazione in vitro (IVM): Le ovaie di bufalo sono state raccolte al macello e trasportate, entro le 3-4 ore dalla macellazione, al laboratorio in soluzione fisiologica antibiotata con 150 mg/l di kanamicina ad una temperatura di circa 35°C.

I complessi cumulo-oocita (COC) sono stati raccolti mediante



Figura 9. Recupero di oociti mediante aspirazione

aspirazione di follicoli con diametro compreso fra i 2 e gli 8 mm, usando un ago di 18 G connesso ad una pompa di aspirazione operante ad una pressione negativa controllata (40–50 mm HG). I

COC raccolti sono stati quindi

classificati morfologicamente: solo quelli con un cumulo compatto e non atresico e citoplasma omogeneo sono stati utilizzati per la fase sperimentale.

I COC selezionati sono stati abbondantemente lavati in H199, con un singolo lavaggio nel terreno finale di maturazione, quindi sono stati posti in gocce di 50 µl (10 COC/goccia) dello stesso medium, coperte con olio minerale.

La IVM è stata effettuata alla temperatura di 38.5°C per 22–24 ore in atmosfera gassosa controllata con il 5% di CO₂ in aria umidificata.

Dosaggio del glutatione (HPLC): Il contenuto di GSH è stato misurato in oociti maturati in vitro in condizioni sperimentali differenti, secondo il metodo descritto da Cereser et al. (Cereser et al 2001) e modificato secondo Feugang et al. (Feugang et al 2004). Gli oociti sono stati denudati, ovvero privati delle cellule del cumulo mediante ripetuto spipettamento e lavati diverse volte in PBS addizionato di 1 mg/ml polivinilpirrolidone (PVP) per rimuovere ogni traccia di GSH contenuta nel medium TCM 199. Gli oociti quindi sono stati messi in 25 µl di soluzione fisiologica in provette eppendorf (3–5 oociti/provetta) e conservati a -80°C fino al momento dell'indagine.

Il giorno del saggio i campioni sono stati scongelati e ricongelati velocemente per tre volte in azoto liquido per rompere le membrane cellulari. Sono stati aggiunti 100 µl di acido metafosforico al 6% ad ogni campione, che quindi è stato sonicato per 5 minuti a 125 W–47 kHz -6% (Branson).

I campioni sono stati centrifugati a 4°C per 7 min a 10000 g, dopodichè sono stati raccolti 100 µl del surnatante che sono stati utilizzati per la derivazione con O-ftalalalde (OPA). Ogni campione

estratto, al quale sono stati aggiunti 100 μ l della soluzione OPA (5mg/ml), è stato incubato per 5 minuti a 4°C al buio. La reazione è stata fermata aggiungendo 800 μ l di NaH_2PO_4 0.5 M. I campioni derivatizzati sono stati filtrati utilizzando microfiltri di 0.22 μ m (Sterivex) direttamente in una provetta di vetro con tappo a vite da 1.5 ml (Merck Eurolab, Belgio) e poi usati direttamente per la misurazione HPLC.

Il sistema HPLC (Termoseparazione) era fornito di un autocampionatore programmabile (AS 1000), di una pompa di iniezione (P100), e di un rilevatore fluorimetrico (Fl 3000) settato a 340 nm (excitation) e 420 nm (emission) per rilevare l'OPA.

La separazione è stata raggiunta utilizzando una colonna a fase inversa Xterra1 MS C-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 mm diametro delle particelle) (Waters, Mitford, MA). La cromatografia è stata eseguita a 30° C alla velocità di flusso di 7 ml/min. La fase mobile era costituita da 8% (v/v) acetonitrile HPLC (Merck-Eurolab) in una soluzione 50 mM di sodio acetato (Fluka Chemika, Buchs, Switzerland) preparata in acqua per HPLC. Il pH è stato portato a 6.2 con acido acetico 1M.

Durante l'analisi i campioni sono stati conservati a 4°C nell'autocampionatore. Ciascun campione è stato analizzato due

volte. Quindi è stata eseguita l'eluizione isocratica nel corso di 10 minuti.

Fecondazione in vitro (IVF) e coltura in vitro (IVC): Gli spermatozoi utilizzati per la fecondazione in vitro sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato di un toro precedentemente testato per la fecondazione in vitro (IVF).

Il seme è stato trattato mediante la procedura dello swim-up per 1 ora, utilizzando il medium Ham's. Il pellet ottenuto dopo la centrifugazione del surnatante è stato risospeso in modo da ottenere una concentrazione di 2×10^6 /ml nel medium di fecondazione. L'inseminazione è stata eseguita in gocce di 50 μ l di medium di fecondazione coperto da olio minerale (5 oociti/goccia), quindi i gameti sono stati incubati per 22–24 ore a 38.5°C in presenza del 5% di CO₂.

Circa 24 ore dopo l'IVF i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fecondazione, privati del cumulo mediante ripetuto spipettamento, lavati due volte in medium SOF tamponato con HEPES e distribuiti in gocce da 20 μ l di SOF tamponato con bicarbonato di sodio. La coltura in vitro è stata eseguita in camere modulari a tenuta, nelle quali veniva insufflata una miscela gassosa composta dal 5% di CO₂, 7% di O₂ e 88% di N₂ a 38.5°C. La valutazione del cleavage, ovvero la percentuale di

embrioni divisi a due cellule, è stata valutata al giorno 5 di coltura (giorno 0 = giorno dell'inseminazione). Gli oociti indivisi sono stati eliminati dalle piastre, e gli embrioni trasferiti in un terreno fresco per ulteriori 2 giorni. La resa embrionale (TE), intesa come percentuale di morule compatte (TM) e blastocisti (BL) è stata valutata al giorno 7.



Figura 10. Gruppo di blastocisti di bufalo prodotte in vitro

La valutazione delle blastocisti è stata ripetuta anche al giorno 8, per assicurarsi che gli embrioni allo stadio

TM registrato al giorno 7 si fossero sviluppati a BL nelle 24 ore di coltura successive.

Valutazione della maturazione nucleare e della formazione di pronuclei.

Gli oociti e i presunti zigoti sono stati denudati rispettivamente a 22 ore dalla maturazione e a 20 ore dalla fecondazione, quindi fissati in metanolo al 60% in PBS e colorati con 1 mg/ml di Hoescht 33342 per valutare lo stato di maturazione nucleare e il normale sviluppo dei pronuclei.

Il tasso di maturazione nucleare è stato calcolato valutando la percentuale di oociti che hanno raggiunto lo stadio di MII. La presenza, all'interno degli oociti fertilizzati, di due pronuclei ben sviluppati e sincroni, è stata, invece, considerata indicativa di una normale fecondazione.

DISEGNO SPERIMENTALE

In tutti gli esperimenti sono state confrontate 4 condizioni di maturazione differenti:

- 1) Gruppo controllo: medium B199;
- 2) Gruppo cisteamina: medium B199 + 50 μ M di cisteamina;
- 3) Gruppo cistina: medium B199 + 0.3 mM cistina;
- 4) Gruppo cisteamina+cistina: medium B199 + 0.3 mM cistina in presenza di 50 μ M cisteamina.

Le concentrazioni ottimali di cisteamina e cistina erano state determinate in lavori precedenti (Gasparrini et al 2000, Gasparrini et al 2004).

Nell'esperimento 4.1, un totale di 271 oociti, nell'arco di 16 repliche, è stato usato per le misurazioni del GSH (n = 63, 72, 68 e 68 oociti rispettivamente nei gruppi Controllo, Cisteamina, Cistina, e Cisteamina+Cistina).

Nell'esperimento 4.2, un totale di 416 oociti (4 repliche) è stato

distribuito a random nei 4 gruppi di maturazione. Un campione di oociti (N= 167) è stato fissato 22 ore dopo l'IVM per valutare lo stato di maturazione nucleare, mentre i rimanenti (N=249) sono stati prima fecondati e poi fissati per valutare la formazione dei pronuclei e l'incidenza della polispermia.

Nell'esperimento 4.3 sono stati utilizzati un totale di 1111 COC, in 8 repliche. I COC sono stati assegnati ai 4 differenti gruppi di maturazione, fecondati e coltivati in vitro per valutare lo sviluppo embrionale.

ANALISI STATISTICA

Le differenze fra i risultati delle 4 condizioni di maturazione in ciascun esperimento sono state analizzate mediante ANOVA (SPSS 11.5, 2004). Per normalizzare la distribuzione dei dati espressi in percentuale è stata utilizzata la trasformazione angolare. Una proporzione a zero è stata considerata pari a $1/(4n)$, (Snedecor and Cochran 1980). Le differenze tra le medie sono state analizzate con il test di Duncan.

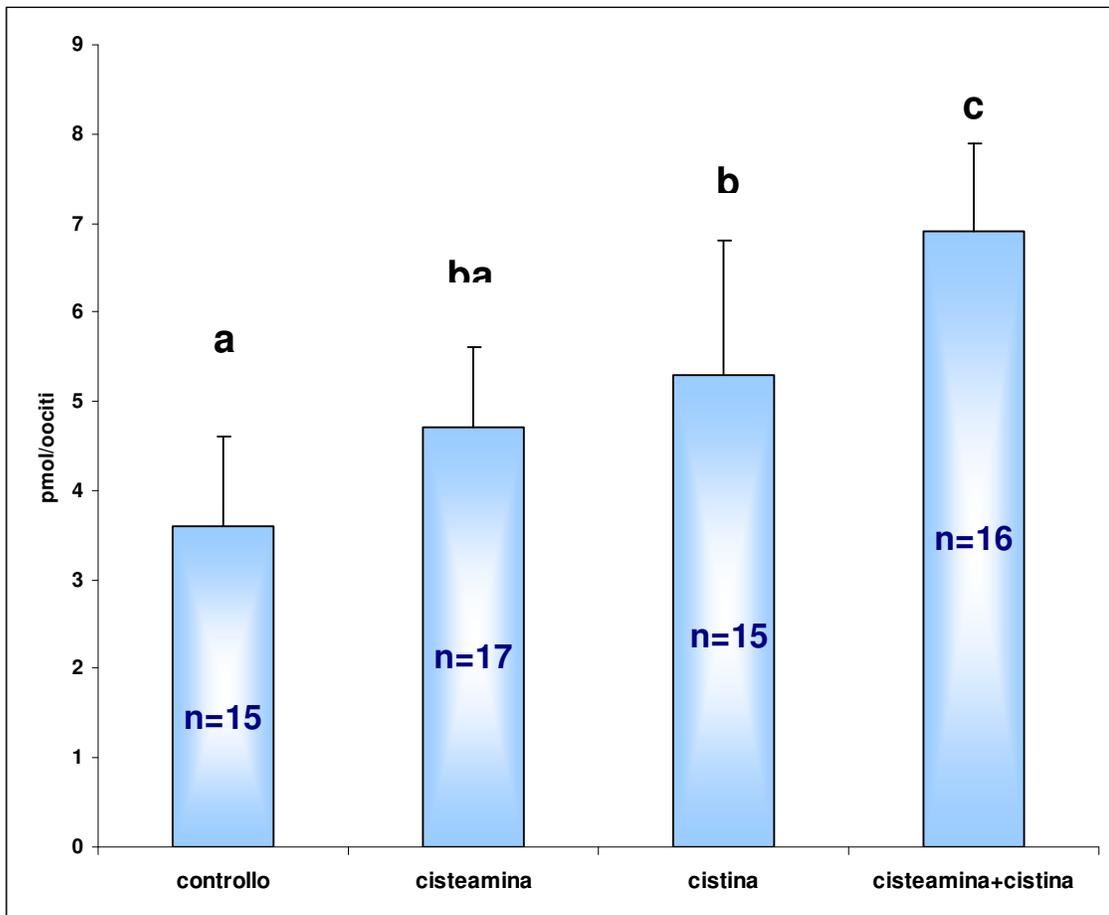
Il test non parametrico di Kruskal-Wallis, è stato utilizzato alternativamente quando la trasformazione angolare non era in grado di normalizzare i dati sulle percentuali (SPSS 11.5, 2004).

RISULTATI Esperimento 4.1

I risultati delle misurazioni di GSH sono mostrati nel grafico 1.

Un aumento progressivo dei livelli di GSH è stato osservato negli oociti maturati nei gruppi Controllo, Cisteamina, Cistina, e Cisteamina+Cistina (ossia, rispettivamente, pmol/oociti \pm S.E.: 3.6 ± 0.3 , 4.7 ± 0.2 , 5.4 ± 0.4 , 6.9 ± 0.3).

Grafico 1: Concentrazione intracitoplasmatica di GSH (media \pm ESM) in oociti di bufalo maturati in assenza di composti tiolici (controllo), in presenza di 50 μ M cisteamina (cisteamina), 0.3 mM di cistina e in presenza contemporanea di cisteamina e di cistina (cisteamina+cistina).



a,b,c Valori contraddistinti con lettere diverse differiscono significativamente ($P < 0.05$)
n = indica il numero di repliche

La concentrazione intracitoplasmatica di GSH è risultata significativamente incrementata ($P < 0.05$) negli oociti maturati in tutti e tre i gruppi il cui il medium era stato arricchito con composti tiolici, rispetto al gruppo di controllo.

Fra i gruppi “arricchiti” i livelli di GSH più alti sono stati registrati in oociti maturati in presenza contemporanea di cisteamina e di cistina (Gruppo cisteamina+cistina), rispetto a tutti gli altri gruppi ($P < 0.05$).

Il contenuto intracitoplasmatico di GSH non è risultato statisticamente diverso negli oociti maturati in presenza della sola cisteamina o della sola cistina.

RISULTATI Esperimento 4.2

La percentuale di oociti che hanno raggiunto lo stato di metafase II al termine dell'IVM è risultata simile in tutti i gruppi, come mostrato in Tabella 4. In merito alla fertilizzazione, non sono state osservate differenze significative nelle percentuali di oociti con uno sviluppo normale e sincrono dei pronuclei (PN) dopo l'IVF, fra il gruppo di controllo e il gruppo arricchito con cisteamina. Invece, nei gruppi in cui era presente la cistina, sia da sola che in presenza di cisteamina, la percentuale di oociti che hanno mostrato uno sviluppo regolare dei due pronuclei è risultata

decisamente più alta, rispetto ai due gruppi in cui la cistina era assente ($P < 0.05$).

L'incidenza di polispermia non è stata statisticamente differente fra i gruppi.

Tabella 4: Effetti dell'aggiunta di composti tiolici al medium di IVM sulla maturazione nucleare, sullo sviluppo normale dei pronuclei (2PN) e sulla polispermia

Trattamento	Oociti, n	M II (%) (media \pm S.D.)	inseminati oociti, n	2 PN (%) (media \pm S.D.)	Polispermia (%) (media \pm S.D.)
Controllo	60	92.8 \pm 10.5	68	50.4 \pm 7.6 a	1.5 \pm 2.9
Cisteamina	39	92.5 \pm 15.0	66	57.9 \pm 12.1 a	2.5 \pm 5.0
Cistina	37	95.0 \pm 5.8	63	71.1 \pm 13.6 b	10.3 \pm 6.9
Cistina + cisteamina	31	94.7 \pm 6.1	52	81.4 \pm 7.3 b	4.3 \pm 5.4

a, b, c valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente ($P < 0.05$)

RISULTATI Esperimento 4.3

I risultati sulla fecondazione e sullo sviluppo embrionale sono riportati nella Tabella 5.

In tutti i gruppi supplementati è stata ottenuta una percentuale di cleavage significativamente maggiore rispetto al gruppo di controllo. Inoltre, l'aggiunta di cistina, in presenza di cisteamina, ha significativamente aumentato la percentuale di cleavage rispetto al gruppo con sola cisteamina ($P < 0.05$). Il cleavage nel gruppo con sola cistina ha ottenuto un valore intermedio tra i gruppi con sola cisteamina e quello cistina + cisteamina. Anche lo sviluppo post-fecondazione a TE è stato significativamente più alto in tutti i gruppi arricchiti rispetto al controllo ($P < 0.05$). Inoltre, l'uso combinato di cistina e cisteamina si è tradotto in una percentuale di TE significativamente più alta rispetto al gruppo arricchito con sola cisteamina. Anche la quantità di oociti che si sviluppano a blastocisti al giorno 7 di coltura, sebbene significativamente più alta del controllo ($P < 0.05$), è stata simile in tutti e tre i gruppi arricchiti. La percentuale di TE che era ancora allo stadio di morula al giorno 7 non è stata statisticamente differente fra i gruppi (media \pm S.D.: 16.7 \pm 25, 11.1 \pm 13.4, 7.7 \pm 8.5 e 21.3 \pm 13.7 per i gruppi controllo, cisteamina, cistina e cistina + cisteamina).

Quando si è calcolata la percentuale di TE in relazione agli oociti divisi, ovvero fecondati, si è osservato un miglioramento significativo nei tre gruppi arricchiti, rispetto al controllo (media \pm S.D.: 29.2 ± 9.9 , 38.8 ± 7.9 , 43.8 ± 11.0 e 42.4 ± 10.4 per i gruppi controllo, cisteamina, cistina e cistina + cisteamina; $P < 0.05$). Non sono state comunque evidenziate differenze fra i tre gruppi arricchiti. Allo stesso modo, quando la percentuale di blastocisti ottenuta al giorno 7 è stata calcolata in relazione ai divisi, l'efficienza più bassa è stata ritrovata nel gruppo di controllo (media \pm S.D.: 23.9 ± 8.4 , 34.1 ± 7.1 , 40.3 ± 10.1 e 32.6 ± 6.2 ; $P < 0.05$).

Tabella 5: Effetti dell'aggiunta di composti tiolici al medium di IVM sul cleavage e sul successivo sviluppo embrionale

Trattamenti	Oociti, n	Cleavage (%) (media \pm S.D.)	TE G1&2/COC (%) (media \pm S.D.)	BL G 1&2/COC (%) (media \pm S.D.)
Controllo	286	55.0 ± 14.1 a	17.1 ± 6.9 a	11.8 ± 4.3 a
Cisteamina	285	66.1 ± 10.6 b	23.8 ± 3.9 b	22.7 ± 6.6 b
Cistina	231	73.5 ± 10.6 bc	29.2 ± 7.3 bc	26.9 ± 6.8 b
Cistina + cisteamina	309	78.4 ± 5.3 c	30.9 ± 5.8 c	25.4 ± 4.5 b

a, b, c valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente ($P < 0.05$)

DISCUSSIONE

Lo scopo del presente studio è stato quello di verificare se l'arricchimento del medium di IVM con altri substrati, come la cistina in presenza di cisteamina, avrebbe incrementato le riserve di GSH degli oociti determinando un miglioramento generale dell'efficienza dell'IVEP nel bufalo.

Nel TCM199, ampiamente usato per l'IVM, la concentrazione di cisteina è molto bassa ($0.6 \mu\text{M}$) e, a causa della sua rapida autossidazione, risulta praticamente assente nel medium. Nello stesso medium la cistina è presente in concentrazioni relativamente basse ($83.2 \mu\text{M}$). Quindi, è opportuno specificare che il medium B199 che abbiamo utilizzato come controllo, conteneva comunque livelli minimi di composti tiolici.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'arricchimento del medium di IVM con composti tiolici aumenta significativamente la riserva di GSH negli oociti di bufalo, rispetto al medium non arricchito. All'interno di questi gruppi sono stati osservati livelli di GSH simili negli oociti maturati in presenza di cisteamina o di cistina. La maggiore concentrazione intracitoplasmatica di GSH è stata comunque trovata nel gruppo in cui gli oociti erano stati maturati in presenza di entrambi i composti.

Si può ritenere, pertanto, che l'aumento della concentrazione di

cistina, in presenza di agenti riducenti quali la cisteamina, si sia tradotto in una maggiore disponibilità di cisteina, che può essere utilizzata dalle cellule per la sintesi di glutatione.

Inoltre, sebbene il tasso di maturazione (percentuale di oociti in MII) fosse simile per tutti i gruppi, l'aspetto morfologico degli oociti e l'espansione del cumulo in seguito all'IVM erano migliorate nei due gruppi in cui era stata aggiunta la cistina (figura 11). Inoltre l'aggiunta di cistina, in presenza o assenza di cisteamina, ha avuto un'influenza positiva sul processo di fertilizzazione e, più precisamente, sullo sviluppo dei pronuclei, verosimilmente grazie all'incremento nella produzione di GSH, senza peraltro, aumentare la polispermia. È stato ipotizzato che negli oociti di mammifero la riserva di GSH sintetizzata durante la maturazione, assicuri la riduzione dei legami disulfidici nel nucleo degli spermatozoi e, conseguentemente, promuova la decondensazione della testa nel PN maschile durante la fecondazione (Perreault et al 1984, Perreault et al 1988, Wiesel et al 1981). La riduzione dei legami disulfidici delle protamine spermatiche è necessaria perché le stesse siano rimpiazzate dagli istoni di origine oocitaria, e, quindi, perché il nucleo dello spermatozoo si sviluppi nel PN maschile (Yanagimachi et al 1994, Perreault et al 1990).

È stato dimostrato che la riduzione dei legami disulfidici negli spermatozoi serve anche per il disassemblamento del segmento intermedio della coda dello spermatozoo, che rappresenta il passo iniziale per la formazione del centrosoma nello zigote (Palacios et al 1993) e che risulta, quindi, importante per l'apposizione dei pronuclei. Sutowsky e Schatten (1996) hanno dimostrato che la presenza di GSH durante l'IVM nel bovino è importante per disassemblare l'assonema, per la conseguente formazione dell'aster spermatico ed, infine per l'apposizione dei pronuclei. Tutto ciò conferma le osservazioni fatte da altri autori in specie differenti (Calvin et al 1986, Perreault et al 1984), in cui la concentrazione di GSH sarebbe risultata correlata positivamente alla capacità dell'ocita di formare il pronucleo maschile. Ad esempio, nel suino è stato dimostrato che l'aggiunta di cisteina e cisteamina nel medium di IVM aumenta il contenuto di GSH negli oociti (Yoshida et al 1993, Yamauchi et al 1999) e favorisce la formazione del pronucleo maschile in seguito alla fecondazione. È stato, inoltre, riportato che, in oociti di capre prepuberi, la presenza di β -mercaptoetanolo, cisteamina, cistina e cisteina durante la maturazione in vitro, aumenta la sintesi di GSH (Rodriguez-Gonzalez et al 2003). Nello stesso studio sia la cisteamina che il β -mercaptoetanolo hanno migliorato la

formazione del PN maschile nelle uova monospermiche, ma solo la cisteamina ha aumentato l'incidenza dello sviluppo sincrono dei due pronuclei e la percentuale di blastocisti ottenute. Nel bufalo un' aumentata incidenza della formazione contemporanea dei pronuclei è stata osservata in oociti maturati in presenza di β -mercaptoetanolo, altro noto agente riducente (Songsasen et al 2002).

Il nostro studio ha dimostrato che nel bufalo solo l'aggiunta di cistina in presenza o meno di cisteamina ha influenzato lo sviluppo contemporaneo dei PN in seguito all'IVF mentre l'arricchimento del medium di IVM con la sola cisteamina non ha migliorato significativamente l'IVF.

Tale miglioramento si è riflesso sul maggior cleavage registrato nell'esperimento 4.3. Questo è un risultato importante, in quanto, come riportato, la bassa percentuale di cleavage generalmente registrata nel bufalo è un fattore importante che limita l'efficienza dell'IVF in questa specie.

È stato precedentemente detto che l'aggiunta di cisteamina durante l'IVM migliora lo sviluppo embrionale nel bovino e nella pecora, aumentando la sintesi di GSH (de Matos et al 2002, de Matos et al 1996, de Matos et al 2000). L'aggiunta di β -mercaptoetanolo, cisteina e cistina nel medium bovino determina

comunque un effetto positivo sugli embrioni, probabilmente come risultato dell'alta concentrazione intracellulare di GSH (de Matos et al 2000). Inoltre è stato dimostrato che la presenza del β -mercaptoetanololo durante l'IVM aumenta i livelli di GSH negli oociti di suino e la resa in blastocisti (Abeydeera et al 1998).

In questo studio, fra i gruppi arricchiti, quello in cui si sono state utilizzate insieme cistina e cisteamina durante l'IVM ha dato un significativo aumento anche di resa in TE, rispetto al gruppo in cui veniva aggiunta la sola cisteamina.

Quando è stata aggiunta la sola cistina durante l'IVM, la percentuale di cleavage e la resa embrionale sono state intermedie fra il gruppo con la sola cisteamina e quello con cistina+cisteamina. Comunque, la morfologia embrionale è risultata migliorata in entrambi i media arricchiti con cistina; in particolare gli embrioni erano più chiari e mostravano un nodo embrionale ben definito.

Come precedentemente accennato, è possibile supporre che questo effetto sinergico di cistina e cisteamina sullo sviluppo embrionale sia dovuto all'aumento della riserva di GSH negli oociti, in seguito alla maggiore disponibilità del precursore amminoacidico cisteina. In assenza di cisteamina, come precedentemente riportato (Madan et al 1994), la conversione di

cistina in cisteina per la sintesi di GSH è mediata dalle cellule del cumulo.

Come precedentemente postulato da Gasparrini et al. (Gasparrini et al 2003), è come se le riserve aumentate di GSH risultassero avere una grande capacità antiossidante negli oociti di bufalo, in grado di proteggere le cellule nei successivi stadi di sviluppo. Questo è anche stato sostenuto da de Matos et al. (de Matos et al 2000), che ha dimostrato che l'aumento delle riserve di GSH generate durante l'IVM bovina permane durante i processi di fecondazione e sono ancora presenti all'inizio della coltura embrionale.

È interessante notare che non ci sono state differenze significative fra i tre gruppi arricchiti nella percentuale di embrioni che si sviluppano più velocemente. Per chiarezza va sottolineato che tutti gli embrioni che erano allo stadio di morula al giorno 7 si sono sviluppati a blastocisti il giorno 8. Ciò indica che erano solo leggermente in ritardo. Questo comunque è un aspetto importante in quanto è risaputo che una maggiore velocità nello sviluppo riflette di solito una migliore qualità degli embrioni. Tuttavia, quando entrambi i composti tiolici sono stati combinati assieme durante l'IVM, una maggiore quantità di oociti si divide, ma lo sviluppo post-fecondazione sembrerebbe leggermente

rallentato. Inoltre, l'alta produzione di TE, ottenuta aggiungendo cistina al medium a cui è stata aggiunta cisteamina, sembra principalmente correlata al maggior cleavage, in quanto le percentuali di oociti divisi che si sviluppano a TE non sono state dissimili fra tutti i gruppi arricchiti.

Alla luce di quanto detto possiamo concludere che l'uso combinato di cistina e cisteamina si traduce in un miglioramento dello sviluppo embrionale in vitro nella specie bufalina, che risulta mediato dalla sintesi del glutatione.

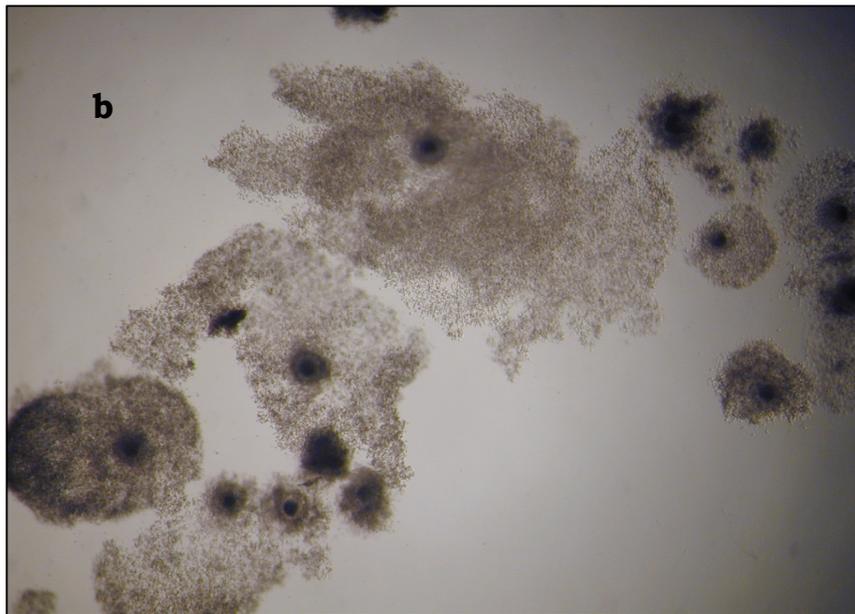
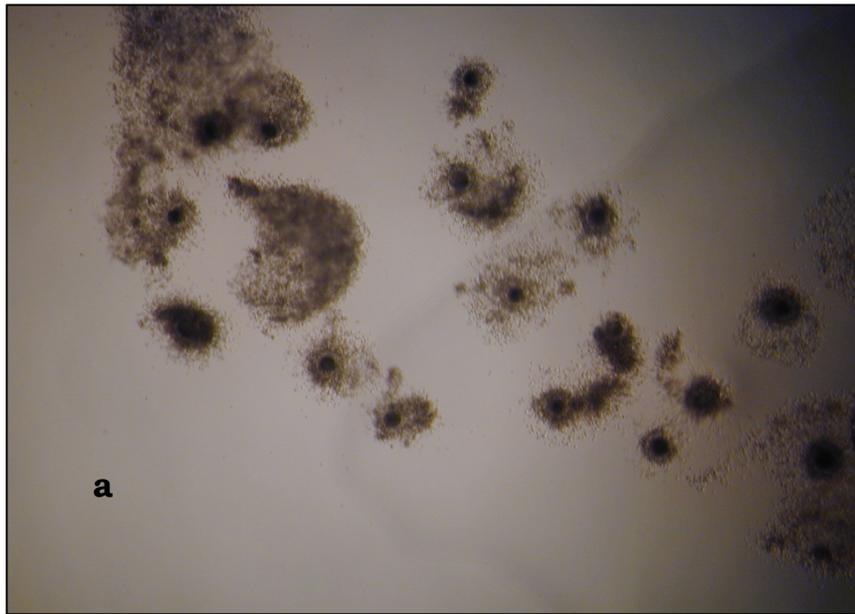


Figura 11: (a) Oociti di bufalo maturati in presenza di cisteamina
(b) Oociti di bufalo maturati in presenza di cisteamina e cistina

CAP 4

LA FECONDAZIONE NEI MAMMIFERI DOMESTICI

Il processo di fecondazione consiste nella fusione di due cellule, il gamete maschile e quello femminile, per formare una singola cellula: lo zigote. Tale processo dipende dalla sincronizzazione nell'incontro tra i due differenti tipi cellulari all'interno del tratto riproduttivo femminile. Il sito di fecondazione nella maggior parte dei mammiferi è la giunzione istmo-ampollare dell'ovidotto.

Quando parliamo di fecondazione è opportuno tener presente un complesso di fenomeni che si realizzano secondo step temporali successivi, che permettono l'ingresso dello spermatozoo nella cellula uovo. Essi sono: la capacitazione, il riconoscimento e legame del gamete maschile alla zona pellucida (ZP), la reazione acrosomiale, la penetrazione della ZP, la fusione dei gameti.

Gli spermatozoi di mammifero nel testicolo, pur essendo morfologicamente differenziati, non possiedono motilità progressiva e non sono in grado di fertilizzare. Anche se la capacità di movimento è acquisita durante la maturazione epididimale, lo spermatozoo è incompetente alla fertilizzazione finché non soggiace ad un limitato periodo di permanenza nel tratto riproduttivo femminile. I cambiamenti fisiologici che si

realizzano nello spermatozoo durante questa permanenza nel tratto femminile sono comunemente denominati come “capacitazione del seme”. Gli eventi molecolari implicati nel processo di capacitazione includono la rimozione del colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo, con conseguente alterazione del potenziale di membrana, e l'aumentata fosforilazione delle proteine tirosiniche addette all'induzione dell'iperattivazione e della reazione acrosomiale (Visconti P.E. et al 2002).

La capacitazione è dipendente dalla temperatura, dal pH, dalla concentrazione del Ca^{++} . Il processo di capacitazione comporta la rimozione delle proteine seminali ed epididimali dalla superficie dello spermatozoo, alterazioni di molecole di superficie (glicoproteine) della membrana plasmatica dello spermatozoo, variazione dell'attività metabolica, aumento della motilità.

Esistono vari enzimi e fattori del tratto femminile (non specie-specifici, né filo-specifici) che sono implicati nel processo di capacitazione (arilsolfatasi, fucosidasi, taurina).

Il processo di capacitazione inizia con un efflusso di colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo con conseguente diminuzione del rapporto colesterolo/fosfolipidi, seguito da un incremento dei processi di metilazione e da un aumento della

sintesi di fosfatidilcolina a partire da fosfatidil-etanolamina.

Ciò comporta: una iperpolarizzazione di membrana, ed un aumento della sua fluidità, con un aumento del flusso ionico di calcio e bicarbonato.

L'entrata di calcio induce la formazione di una riserva endogena a livello dell'acrosoma, dei mitocondri e forse del nucleo (in genere l'accumulo di calcio si ha a livello del reticolo endoplasmatico, ma lo spermatozoo ne è privo).

Inoltre l'iperpolarizzazione della membrana e l'aumento del flusso di ioni Ca^{++} e HCO_3^- attivano l'adenilato-ciclastasi per la formazione di AMPc dall'ATP. L'AMPc attiva una proteina chinasi A (PKA) che induce la fosforilazione di proteine tirosiniche. La fosforilazione delle proteine tirosiniche è data anche dal legame dell'Epidermal Growth Factor (EGF) al suo recettore (EGFR).

Le proteine tirosiniche che vengono fosforilate sono:

- le SNARE, proteine della testa dello spermatozoo altamente conservate, che inducono la polimerizzazione dei filamenti di actina che si dispongono in posizione sub-acrosomiale in modo da captare la fosfatidilcolina (PCL), attivata durante la reazione acrosomiale.
- le AKAP (A Kinase Anchoring Protein), proteine strutturali di ancoraggio della coda dello spermatozoo. Le AKAP attivate

inducono un cambiamento della struttura e della funzionalità del flagello in modo da iperattivarlo. La iperattivazione è caratterizzata dall'aumento della motilità dello spermatozoo (tale aumento della motilità è molto evidente in alcune specie come ad es. l'uomo).

A questo punto lo spermatozoo è attratto dall'ocita e ne attraversa le cellule del cumulo. La reazione acrosomiale è innescata dall'interazione dello spermatozoo capacitato con la zona pellucida. L'interazione dei gameti è un evento specie-specifico che inizia con il riconoscimento e, quindi, il legame di molecole complementari presenti sulla membrana plasmatica dello spermatozoo (recettori) e sulla superficie della zona pellucida (ligandi).

Ciò innesca un processo di trasduzione di segnali mediati dal Ca^{++} che esita nella reazione acrosomiale, ovvero nel rilascio degli enzimi acrosomiali, quali esterasi, acrosina e neuroaminidasi, necessari perché lo spermatozoo oltrepassi la zona pellucida e, quindi, lo spazio perivitellino per raggiungere la membrana plasmatica dell'ocita.

La reazione acrosomiale è indotta da diversi fattori quali:

- l'agonista naturale ZP3 (primo sito di riconoscimento dei gameti);

- il progesterone (con funzione di priming): sensibilizza il gamete agli stimoli inducenti la reazione acrosomiale;
- il fluido follicolare (FF);
- le secrezioni delle cellule del cumulo (prostaglandine, steroli, Gags, glicoproteine);
- le modificazioni della permeabilità di membrana;
- le modificazioni dei livelli intracellulari di Ca^{++} ;
- l'alcalinizzazione del citoplasma.

Lo spermatozoo entra in contatto con la zona pellucida dell'ocita, sulla quale si trovano le glicoproteine ZP, che sono in grado di interagire con recettori specifici presenti sulla testa dello spermatozoo.

Sono presenti 3 classi di ZP (1-2-3). La ZP3 interagisce con il recettore specifico sulla testa dello spermatozoo e porta da un lato, all'attivazione dell'adenilato ciclasi con produzione di AMPc e, dall'altro, all'attivazione della fosfolipasi C (PLC).

L'AMPc attiva una protein - chinasi A (PKA) che, a sua volta, determina l'apertura dei canali di Ca^{++} della membrana acrosomiale esterna e conseguente rilascio di calcio acrosomiale.

La PLC agisce sui fosfolipidi di membrana per formare il diacilglicerolo (DAG) e l'inositolo trifosfato (IP3). L'IP3 si lega al proprio recettore (IP3R) e induce il rilascio di calcio acrosomiale; il

DAG ha attività fusogenica, attiva la fosfolipasi A2, che genera acido arachidonico, e la protein-chinasi C (PKC) che apre i canali di Ca^{++} della membrana plasmatica con conseguente rilascio di calcio acrosomiale.

Il rilascio di calcio acrosomiale attiva i SOCC (store operated calcium channels), i canali di calcio a livello della membrana plasmatica, con entrata di Ca^{++} per “riempire” le riserve endogene. L'innalzamento del calcio induce la dispersione dei filamenti di actina necessaria per l'esocitosi della vescicola acrosomiale, dovuta alla fusione della membrana plasmatica e della membrana acrosomiale esterna. Lo spermatozoo espone il segmento equatoriale necessario per la fusione dei due gameti.

L'entrata dello spermatozoo porta all'attivazione dell'oocita, caratterizzata da modificazioni nucleari, di membrana e citoplasmatiche.

Anche in questo caso si susseguono una serie di eventi:

- una prima ondata di depolarizzazione di membrana;
- un periodo di latenza;
- una seconda ondata di depolarizzazione;
- la reazione corticale (o di zona nei mammiferi), che induce l'esocitosi dei granuli corticali;
- la ripresa della meiosi.

La reazione corticale è caratterizzata dall'esocitosi dei granuli corticali che sono legati da sottili filamenti e sono presenti sotto la membrana plasmatica dell'oocita. Essi contengono enzimi e mucopolisaccaridi che vengono rilasciati nello spazio perivitellino. I mucopolisaccaridi rilasciati dai granuli causano, nello spazio perivitellino, un rapido influsso di acqua che distende la membrana perivitellina, che poi si indurisce per accumulo di granuli cristallini.

Tra le modifiche si ha anche l'idrolisi dei gruppi glucidici presenti sulla ZP3.

L'ipotesi principale è che la reazione corticale serva a prevenire la polispermia. Ciò però non è sicuro, in quanto tale reazione richiede un tempo troppo lungo affinché possa evitare l'entrata di spermatozoi soprannumerari. Si presume, quindi, che serva ad alterare chimicamente la ZP in modo da fornire un ambiente batteriologicamente protetto per l'embrione.

Inoltre la membrana plasmatica della cellula uovo ingloba i granuli corticali portando alla formazione di una membrana plasmatica a mosaico che ha doppia funzione: indurre il "blocco vitellino", caratterizzato dalla polarizzazione della ZP non più attaccabile da altri spermatozoi, e determinare l'incremento dell'area di superficie con un aumento del turnover metabolico

dell'oocita attivato.

Il messaggero universale che innesca la ripresa della meiosi è un incremento del Ca^{++} intracellulare nella forma di una lunga serie di oscillazioni. Tale incremento attiva la proteina chinasi II calmodulina-dipendente (CAMK II) che inattiva il CSF, che a sua volta determina una rapida caduta dei livelli di MPF. Si ottiene così l'uscita dall'arresto in MII. L'incremento di Ca^{++} è causato dall'ingresso dello spermatozoo che permette il suo rilascio dalle riserve endogene.

Due sono le ipotesi possibili che spiegano come fa lo spermatozoo ad innescare il rilascio di Ca^{++} intracellulare (Whitaker and Swann, 1993).

1) Ipotesi del recettore: secondo la prima ipotesi, sulla membrana plasmatica dell'oocita sarebbe presente un recettore per lo spermatozoo probabilmente accoppiato ad una proteina G o ad una chinasi-tirosina. Queste proteine, a loro volta, determinerebbero l'attivazione di una fosfoinositidasi C che stimola la produzione di inositolo 1, 4, 5 trifosfato, un comune agonista del rilascio del Ca^{++} . Diverse linee di ricerca supportano tale teoria. Nelle uova dei mammiferi la stimolazione delle proteine G, indotta sia attraverso iniezioni di GTPS, (guanosine-5'-O-3-thiotriphosphate) attivatore della proteina G, resistente

all'idrolisi (Miyazaki, 1988; Fissore et al., 1995), sia mediante attivazione dei recettori di superficie della proteina G, determina oscillazioni del calcio intracellulare (Miyazaki, 1991). Inoltre tali agonisti possono anche essere utilizzati per iniziare l'attivazione dell'oocita (Williams et al., 1992; Moore et al., 1993).

2) Ipotesi del fattore solubile: la seconda ipotesi suggerisce che lo spermatozoo introduca nell'oocita, dopo la fusione delle membrane dei gameti, un fattore solubile che sarebbe responsabile delle oscillazioni del Ca^{++} intracellulare. A conferma di tale ipotesi si è visto che, negli oociti di mammiferi, l'iniezione di estratti di sperma determina rilasci ripetuti di calcio (Swann, 1990, 1994; Homa and Swann, 1994; Wu et al., 1997), esocitosi dei granuli corticali e sviluppo fino allo stadio di blastocisti (Stice and Robl, 1990; Dozortsev et al., 1995). Inoltre tale ipotesi, è avvalorata ulteriormente dall'utilizzo della tecnica di iniezione intracitoplasmatica di sperma (ICSI). L'ICSI è una tecnica che consiste nel trasferimento meccanico di un singolo spermatozoo all'interno del citoplasma oocitario, bypassando, pertanto l'interazione recettoriale di superficie. L'iniezione spermatica, e la successiva attivazione dell'oocita e fertilizzazione, sono state utilizzate per molti anni come strumento di ricerca negli echinodermi e negli anfibi. Nei mammiferi i primi studi sull'ICSI

sono stati riportati da Uehara e Yanagimachi nel 1976 (Uehara and Yanagimachi 1976). Da allora questa tecnica è stata standardizzata e migliorata in diverse specie di mammiferi.

Entrambe le ipotesi sono realistiche ed è verosimile che i due meccanismi coesistano.

Fase finale della fecondazione

Ripresa la meiosi, il secondo globulo polare viene espulso dalla cellula uovo dopo la penetrazione dello spermatozoo e a questo punto inizia la formazione del pronucleo femminile. I due pronuclei aumentano di dimensione ed il pronucleo maschile presenta una decondensazione della cromatina anticipata rispetto al pronucleo femminile. I due pronuclei diventano, quindi, indistinguibili. L'evento successivo allo sviluppo dei pronuclei è la singamia ovvero l'unione dei due pronuclei a formare lo zigote. Successivamente avverrà la prima divisione cellulare (I cleavage).

La fecondazione in vitro nel bufalo

Le basse percentuali di cleavage (divisione a 2 cellule) riportate nella specie bufalina (Gasparrini, 2002; 2004; Neglia et al. 2003), indicano che la fecondazione rappresenta un momento critico della procedura IVEP in questa specie. Nella specie bufalina la maggior parte dei protocolli utilizzati sono frutto di estrapolazione di protocolli provati con successo in altre specie. Si è ritenuto

interessante, pertanto, indagare alcuni fattori che possono essere responsabili della bassa efficienza di fertilizzazione in questa specie.

Lo scopo di questa seconda parte del lavoro è stato quello di esaminare diversi fattori che influenzano l'efficienza dell'IVF nel bufalo. In particolare il lavoro è stato finalizzato a:

- Valutare la qualità del seme congelato di tori diversi (esperimento 1);
- Stabilire il miglior tempo di co-incubazione dei gameti (esperimento 2);
- Confrontare diversi terreni e fattori di motilità spermatica (esperimento 3);
- Testare diversi agenti capacitanti in vitro (esperimento 4).

4.1 ESPERIMENTO 1: Valutazione qualitativa del seme di bufalo

Si è per molto tempo ritenuto che un importante fattore limitante l'IVEP nel bufalo fosse la qualità scadente del seme congelato in quanto, il congelamento determina danni strutturali e funzionali (Meur et al., 1988). Inoltre autori indiani (Totey et al 1992) hanno riportato percentuali di cleavage e di blastocisti nettamente inferiori con il seme congelato rispetto a quello fresco. Allo scopo di avvalorare questa ipotesi la capacità fecondante del seme bufalino fresco è stata messa a confronto con quella del seme bufalino congelato (Wilding et al., 2003). È stato necessario utilizzare oociti bovini, a causa della limitata disponibilità di materiale sperimentale bufalino, che, come precedentemente riportato, rappresenta un serio impedimento alla ricerca scientifica in questa specie. Durante la stessa prova è stata anche stimata l'attività mitocondriale del seme bufalino in diverse condizioni di conservazione. Diversamente da quanto dimostrato precedentemente (Totey et al., 1992), non sono state riscontrate significative differenze tra il seme fresco e quello congelato di bufalo, nella percentuale di penetrazione e di cleavage (PR: 69.4 +/- 9.4 vs 79.6 +/- 4.7; CR: 60.3 +/- 4.2 vs 70.5 +/- 7.3 rispettivamente; Wilding et al., 2003). L'attività mitocondriale è

stata solo leggermente più bassa negli spermatozoi congelati rispetto a quelli freschi. Questi risultati suggeriscono che i metodi di congelamento sono migliorati rispetto al passato, e che attualmente non sia questo il principale limite dell'IVF nella specie bufalina.

Una problematica irrisolta è rappresentata, invece, dall'estrema variabilità della capacità fertilizzante che si riscontra in vitro tra diversi tori bufalini che, unitamente alla mancanza di dati riferibili ai nostri riproduttori, comporta la necessità di effettuare un appropriato screening in laboratorio prima di poter utilizzare un dato seme in un programma di IVEP. Si precisa che nella nostra esperienza solo il 10% dei tori testati risulta idoneo alla IVF (Gasparrini, 2002).

La selezione dei riproduttori maschi nelle diverse specie domestiche è stata finora effettuata sulla base di valutazioni cliniche e di laboratorio che hanno un valore diagnostico indiscutibile in quanto consentono di esaminare la funzione del tratto genitale maschile e, quindi, di eliminare evidenti casi di infertilità o di ipofertilità. Ciononostante, i test di laboratorio utilizzati di routine nei centri tori, pur fornendo delle indicazioni di massima, non sono sufficienti a determinare a priori il livello di fertilità che un dato seme analizzato raggiungerà, particolarmente

dopo IS. È noto che, una stima più accurata della fertilità di un eiaculato si ottiene effettuando il maggior numero di test di fertilità in vitro. Inoltre, non è infrequente che un seme, valutato positivamente sulla base di diversi parametri associati alla fertilità testati in laboratorio, dia risultati scadenti alla IVF. Questa problematica penalizza gravemente la diffusione dei programmi IVEP in campo nel bufalo e la possibilità, per il nostro Paese, di essere competitivo nel mercato internazionale come produttore di genetica. Infatti, allo stato attuale, le crescenti richieste di embrioni di bufalo geneticamente superiori si scontrano con la difficoltà obiettiva di selezionare un riproduttore geneticamente interessante che abbia caratteristiche di alta fertilità in vitro. Sebbene questo “effetto toro” sia particolarmente evidente in vitro, non è possibile escludere che i risultati incostanti ottenuti con la IS in questa specie, possano essere spiegati anche dall'utilizzo di seme proveniente da tori ipofertili. Elaborazioni in corso lascerebbero presupporre che una certa variabilità esista anche nella fertilità in vivo, come d'altra parte ampiamente riportato nella specie bovina.

È opportuno menzionare che, nel nostro Paese, una problematica è data dal numero limitato di tori bufalini disponibili che, tra l'altro sono affetti da un alto tasso di reincrocio, dato che

provengono da allevamenti in cui si registra un'alta percentuale di consanguineità. Un altro aspetto che non va trascurato riguarda la stagionalità riproduttiva della specie che generalmente nel maschio si caratterizza con una riduzione della libido. Ciò comporta che, nei periodi dell'anno a luce crescente, i tori non saltano e, quindi, non producono eiaculati. Il fatto che i bufali non saltino nella stagione sfavorevole non ha consentito una valutazione delle caratteristiche del seme in funzione della stagione dell'anno. Non si può, pertanto, escludere che gli eiaculati raccolti subito prima e/o subito dopo questo periodo di cessazione dell'attività riproduttiva, siano ipofertili.

È stato ormai dimostrato che il ruolo del gamete maschile non si esaurisce nell'espletamento del processo fecondativo ma, al contrario, è stato riconosciuto un importante contributo paterno allo sviluppo embrionale successivo, come indicato dall'alta incidenza di riassorbimenti embrionali dovuti ad alterazioni genetiche e centrosomiali paterne nelle diverse specie (Yanagimachi et al. 2005). Per questo assume fondamentale importanza la valutazione del seme da destinarsi all'IVF.

METODI DI VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DEL SEME

Le prove di laboratorio di routine sulla qualità del seme prevedono una valutazione quantitativa (volume, concentrazione e

numero di spermatozoi) ed una valutazione qualitativa (aspetto, motilità e morfologia). Test più specifici sono utilizzati per valutare la vitalità degli spermatozoi, l'integrità della membrana plasmatica, lo stato dell'acrosoma.

Valutazione quantitativa

Volume: misurato in millilitri, è utile per calcolare il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato.

Concentrazione: la concentrazione spermatica può essere determinata con un emocitometro, una camera di Makler o con uno spettrofotometro; quest'ultimo metodo è più veloce, anche se meno preciso e viene generalmente utilizzato quando occorrono frequenti valutazioni. Una stima corretta è importante perché influenza la determinazione della concentrazione finale nella dose utilizzata per l'inseminazione strumentale. Il numero totale di spermatozoi, calcolato come prodotto tra concentrazione spermatica e volume dell'eiaculato, è probabilmente uno dei più importanti parametri per la valutazione della fertilità del toro. Esso è influenzato dalla stagione, dalla frequenza dell'eiaculazione, dall'età, dalla grandezza dei testicoli e da diverse malattie della riproduzione.

Valutazione qualitativa

Aspetto: il seme fresco ha un aspetto grigio chiaro opaco. La

presenza di residui, urina o sangue nell'eiaculato indica problemi nel tratto riproduttivo o urinario.

Motilità: è stata a lungo considerata il criterio più importante per la valutazione della fertilità. Per facilitare la valutazione il seme viene diluito con un mestruo di buona qualità perché concentrazioni spermatiche elevate possono ostacolare una buona valutazione. La motilità è suscettibile delle condizioni ambientali, quindi è necessario lavorare in condizioni di temperatura ambientale ottimali.

Per aumentare ulteriormente l'attendibilità della stima della motilità, l'analisi dovrebbe essere eseguita da un operatore esperto mediante un microscopio adeguato. Varie tecniche e strumenti sono stati sviluppati per valutare la motilità degli spermatozoi, come la fotomicrografia ad intervallo di tempo, la spettrofotometria o analisi computerizzata, ma il loro limite è quello di essere molto costose.

I parametri usati nella stima della motilità comprendono la percentuale di spermatozoi mobili, quella della motilità progressiva e la velocità degli spermatozoi.

La valutazione della motilità al microscopio risulta essere molto soggettiva e richiede una buona esperienza da parte dell'operatore perché sia attendibile. L'analisi computerizzata dello sperma

(CASA) è stata introdotta più di dieci anni fa (Jasko et al., 1988) ed è utilizzata regolarmente in molti laboratori per la valutazione del seme. È una tecnica obiettiva che valuta la motilità secondo i criteri impostati. Può analizzare ulteriori aspetti della motilità quali la motilità lineare e circolare, la velocità critica, media, rettilinea e curvilinea, che possono essere correlati con l'abilità a penetrare l'ocita e quindi ad attivarlo.

Morfologia: Esistono diversi metodi di valutazione morfologica e diversi sistemi di classificazione del seme.

Le caratteristiche morfologiche dello sperma possono essere valutate attraverso un microscopio ottico 100x.

Un microscopio ottico può essere utilizzato per analizzare gli strisci di seme asciugati all'aria trattati con apposite colorazioni usate per la preparazione dei vetrini.

Le colorazioni più usate sono la colorazione di Wright, la Giemsa e quella con ematossilina-eosina. La colorazione eosina-nigrosina – India ink, semplice da eseguire, è probabilmente quella maggiormente utilizzata.

La visualizzazione dei dettagli morfologici può essere migliorata di molto fissando le cellule con soluzioni tamponate formol-saline o con gluteraldeide, poi si osservano le cellule non colorate con un microscopio a contrasto di fase o, preferibilmente, con uno a

contrasto di fase interferenziale.

Le anomalie morfologiche osservate negli spermatozoi vengono classificate in :

- Primarie: sono associate a difetti durante la spermatogenesi, quindi sono di origine testicolare; si dividono a loro volta in sottogruppi di anomalie: della testa, della porzione intermedia e della coda;
- Secondarie: si creano a livello dei dotti deferenti e, come le primarie, si classificano in sottogruppi.

Attualmente si tende a registrare il numero di particolari difetti morfologici, come acrosoma arrotondato, goccioline protoplasmatiche prossimali o distali, agglutinazione delle teste e delle code, corpo rigonfio, code attorcigliate. In tal modo si hanno informazioni più dettagliate sulla popolazione degli spermatozoi evitando, così, conclusioni errate sulla natura dei difetti riscontrati.

La percentuale degli spermatozoi morfologicamente normali è positivamente correlata con la motilità. Accade spesso, però, che il seme abbia una buona motilità ma allo stesso tempo presenti gravi anomalie morfologiche che ne riducono la fertilità; è anche possibile che alcuni riproduttori abbiano diverse anomalie spermatiche ma mostrino una normale fertilità.

È stato dimostrato che gli spermatozoi anormali non esercitano un'influenza negativa diretta sugli spermatozoi normali. In generale la percentuale di spermatozoi morfologicamente normali presente in un campione è simile alla percentuale di spermatozoi con motilità progressiva; comunque uno spermatozoo normale può mostrare una motilità normale ma essere incapace di fecondare una cellula uovo (Barnabe 1997).

Gli standard minimi per classificare come “probabilmente fertile” un seme bufalino sono: **a)** più di 500000 spermatozoi/mm³ ; **b)** più del 60% di spermatozoi mobili con motilità progressiva e **c)** più del 70% di spermatozoi conformi alla normale morfologia (Barnabe 1997).

Morfometria della testa dello spermatozoo: La tecnologia computerizzata può essere utilizzata anche per analizzare la forma delle teste degli spermatozoi, oltre che per la valutazione della loro motilità. È stato riscontrato che i riproduttori sub-fertili hanno una percentuale molto bassa, pari al 19%, di spermatozoi che presentano la testa di normale morfologia mentre nei soggetti fertili tale percentuale è pari al 52%.

Valutazione dell'integrità della membrana: L'integrità della membrana plasmatica è essenziale per la sopravvivenza degli spermatozoi. Diversi metodi di colorazione sono stati messi a

punto per determinare eventuali danni della membrana plasmatica.

Questa tecnica si basa sul principio che il colorante viene assorbito solo dalle membrane danneggiate, quindi gli spermatozoi con membrane integre risulteranno non colorati (Graham, 1996; Magistrini et al., 1997).

Vengono valutate due porzioni della cellula spermatica.

La prima è la membrana plasmatica; se la membrana esterna è stata danneggiata, il DNA contenuto e la stessa funzione cellulare potrebbero essere compromesse.

La seconda parte che può essere valutata è la membrana acrosomiale; se l'acrosoma, che contiene gli enzimi necessari nel processo di fertilizzazione, è danneggiato, la cellula spermatica perde la sua capacità di fecondare.

Le colorazioni per la valutazione della morfologia spermatica (Wright, Giemsa, ematossilina-eosina, eosina-negrosina – India ink) sono utilizzate anche per la valutazione dell'integrità della membrana plasmatica.

Gli altri tipi di colorazione, che richiedono l'uso di un microscopio a fluorescenza, possono essere suddivisi in due gruppi: colorazione con campione fissato e colorazione con campione vitale.

I metodi di colorazione a fluorescenza più utilizzati sono: quella con l'Hoechst 33342 (Eliason and Treichl, 1971); la doppia colorazione del DNA con ioduro di propidio (PI) combinato con carbossifluoresceina diacetato (CFDA) (Garner et al., 1986; Harrison and Vickers, 1990) o con SYBR-14 (Garner et al. 1994; Magistrini et al. 1996), o carbossidimetilfluoresceina diacetato (CDMFDA) (Ericsson et al., 1993; Magistrini et al., 1997).

Test della crescita Iposmotica (HOS): Il test HOS è una tecnica utilizzata per studiare l'integrità della membrana spermatica ed è una alternativa alla colorazione vitale; infatti questo test indica non solo se la membrana è intatta ma anche se è osmoticamente attiva, condizione fondamentale nel processo di fertilizzazione.

Quando esposto ad una soluzione iposmotica, lo spermatozoo con membrana intatta e funzionale si rigonfia per stabilire un equilibrio osmotico tra i componenti intra ed extracellulari, e ciò si manifesta con una caratteristica crescita di volume della coda dello spermatozoo. Il test HOS è più appropriato per definire la fertilità del seme congelato più che di quello fresco visto che il danneggiamento della membrana è un fattore molto limitante per quest'ultimo. È stato osservato che tori con bassi tassi di rigonfiamento iposmotico (meno del 40%) manifestano una fertilità scadente.

Integrità dell'acrosoma: La reazione acrosomica fisiologica è un determinato processo che avviene soltanto negli spermatozoi vivi, ed è chiamata “vera reazione acrosomica”. Viceversa, la perdita dell'acrosoma, causata da cambiamenti degenerativi della membrana, per esempio a seguito del congelamento, è chiamata “falsa reazione acrosomica” (Bedford, 1970). Per differenziare queste due reazioni, vengono combinate le colorazioni vitali con quelle acrosomiali. La colorazione acrosomiale da sola può essere usata per valutare eventuali anomalie dell'acrosoma, oppure per evidenziare i danni acrosomiali indotti dalla crioconservazione, oppure per verificare indirettamente l'avvenuta capacitazione in vitro.

Lo stato dell'acrosoma dello spermatozoo con un acrosoma largo (toro, bufalo) può essere valutato con microscopio con contrasto di fase o con contrasto di fase interferenziale, senza colorazioni. In altre specie, come quella equina, l'acrosoma non colorato è troppo piccolo per essere visualizzato accuratamente. Per questo motivo sono state usate specifiche tecniche per evidenziare l'acrosoma e, quindi, rendere possibile la visualizzazione al microscopio a fluorescenza o a campo chiaro (Cross and Meizel, 1989).

Per la valutazione al microscopio a fluorescenza, vengono

utilizzate due tipi di sonde fluorescenti. Il primo tipo, che comprende le lecitine e gli anticorpi, evidenzia i materiali intracellulari associati all'acrosoma, e richiede la permeabilizzazione delle cellule. Il secondo tipo di sonde a fluorescenza comprende dei reagenti che vengono utilizzati senza aver prima permeabilizzato le cellule, come la clortetraciclina (CTC, Kaul .et al 2000).

Il saggio a fluorescenza della clortetraciclina, è un metodo di colorazione diretta che ci permette di differenziare non solo gli spermatozoi con avvenuta o meno reazione acrosomiale ma anche quelli capacitati e non. Questa colorazione si basa sulla capacità della CTC di formare un complesso con il calcio di membrana che emette fluorescenza; la localizzazione delle bande fluorescenti varia con lo stato di capacitazione e consente di distinguere le diverse categorie di spermatozoi.

La colorazione che utilizza la lecitina agglutinina estratta dal *Pisum sativum* (PSA), coniugata con la fluoresceina isotocianato (FITC) è detta FITC-PSA, e permette di accertare la reazione acrosomiale degli spermatozoi vivi (Kaul .et al 2000).

Esiste un'altra colorazione che impiega una lecitina, la FITC-PNA che utilizza sempre la fluorosceina isotocianato ma combinata con agglutinina estratta dall'arachide (*Arachis hypogea*, Cheng et

al., 1996). Quest'ultima rispetto alla colorazione FITC-PSA risulta essere più chiara nel mostrare i diversi stadi della reazione acrosomica.

Un'altra colorazione utilizzata per accertare lo stato di capacitazione degli spermatozoi è la Merocianina 540, una colorazione idrofobica capace di colorare intensamente le membrane cellulari quando i loro componenti sono modificati, come nel caso di spermatozoi capacitati.

La valutazione viene effettuata mediante citometria a flusso.

La doppia colorazione Trypan blue/Giemsa è stata messa appunto da Kovács e Foote nel 1992 e dà la possibilità di verificare la vitalità spermatica, attraverso la valutazione dell'integrità dell'acrosoma, della membrana della testa e della coda e anche la morfologia spermatica; infatti, dalla combinazione dei due coloranti si ha una distinzione netta delle parti vive da quelle non vitali.

È possibile ottenere una distinzione di 12 classi di spermatozoi in base alla testa dello spermatozoo che può essere viva o morta, con la coda intatta, persa o danneggiata e in base allo stato dell'acrosoma. Spermatozoi che presentano integra la membrana della testa ma una coda colorata, quindi danneggiata, vengono considerati immobili e per questo classificati come spermatozoi

non vitali (Nagy et al., 1999).

La metodica risulta di semplice applicazione, poco costosa e dà la possibilità di leggere i vetrini anche a distanza di anni.

Questa colorazione è stata sperimentata sugli spermatozoi di molti mammiferi quali: toro, stallone, coniglio, cane, gatto, topo, yak, ariete, capra e cervo. Data la semplicità e la rapidità di questa metodica, si è ritenuto interessante verificarne l'adattabilità alla specie bufalina al fine di poterla utilizzare, per uno screening preliminare, per la previsione della capacità fertilizzante in vitro di tori diversi.

Una standardizzazione delle tecniche di valutazione del seme è molto difficile a causa delle enormi differenze negli eiaculati di diversi tori e perfino tra eiaculati dello stesso toro.

La messa a punto di una tecnica valida per la previsione della fertilità in vitro è molto importante perché consentirebbe di ridurre i costi e i tempi per selezionare un seme da destinare all'IVF.

Allo stato attuale, infatti, l'unica risposta affidabile si ottiene con ripetute prove di IVF che, data la scarsità di materiale sperimentale in questa specie, significano tempi lunghi prima di poter giungere alla conclusione che un dato seme possa essere utilizzato in vitro.

SCOPO DEL LAVORO

Scopo di questo studio, pertanto è stato:

- Esperimento 1.1: verificare l'efficacia della doppia colorazione Trypan blue/Giemsa nella valutazione della qualità di semi di diversi tori bufalini;
- Esperimento 1.2: valutare in vitro per gli stessi tori l'effettiva capacità fecondante e verificare le eventuali relazioni tra questa ed i risultati della colorazione Trypan blue/Giemsa.

ESPERIMENTO 1.1

La prima fase della ricerca è consistita nella messa appunto della metodica della colorazione Trypan blue/Giemsa e nella standardizzazione di tutti i parametri necessari ad una corretta esecuzione e lettura dei vetrini, secondo quanto riportato da Kovács e Foote (Kovács e Foote 1992) per adattarla alla specie bufalina.

MATERIALI

La soluzione di Trypan blue allo 0.27% è stata ottenuta aggiungendo 1 ml di Trypan blue (Sigma T-8154 0.4%) a 1 ml di fisiologica (0.9% NaCl).

Il fissativo è stato ottenuto aggiungendo 86 ml di una soluzione 1 N di HCl a 14 ml di una soluzione al 37% di Formaldeide con l'aggiunta di 0.2 g di Neutral red (Sigma N-2880).

La colorazione Giemsa è stata preparata fresca prima dell'uso aggiungendo 7,5% di una soluzione Giemsa stock (Sigma GS-500) ad acqua distillata.

METODI

Per la colorazione, il seme è stato diluito in soluzione fisiologica (0,9% NaCl), con una diluizione 1:10

Una goccia di Trypan blue allo 0,27% ed una goccia di seme diluito sono state deposte sul bordo di un vetrino; utilizzando un altro vetrino le due gocce sono state mescolate e strisciate, mantenendo i due vetrini in posizione parallela l'uno all'altro durante lo striscio. In questo modo sono stati preparati due vetrini da ciascun campione. Dopo lo striscio i vetrini sono stati asciugati all'aria in posizione pressoché verticale.

I vetrini sono stati posti in giare sterili contenenti il fissativo per 2 minuti e poi lavati con acqua di rubinetto prima e poi con acqua distillata. I vetrini sono stati, quindi, immersi nel colorante Giemsa in apposite giare per diverse ore. Dopo la colorazione i vetrini sono stati ancora una volta lavati prima con acqua di

rubinetto e poi con acqua distillata. Dopo il lavaggio i vetrini sono stati posti per due minuti in un contenitore con acqua distillata e poi lasciati asciugare all'aria verticalmente. Sui vetrini è stato posizionato un coprioggetto con Entellan (Merck 1.07960).

La lettura dei vetrini è stata eseguita con microscopio NICON DIAPHOT 300 utilizzando ingrandimenti 40x e 100x con immersione ad olio.

Si è proceduto, pertanto, alla caratterizzazione del seme congelato di diversi tori disponibili (N =6).

La lettura degli strisci di seme colorati ha permesso di evidenziare le seguenti categorie cellulari:

- Vivi con acrosoma: testa e coda vitali con acrosoma intatto (Fig. 12);
- Vivi senza acrosoma: testa e coda vitali senza acrosoma (Fig. 13);
- Morti con acrosoma: testa e coda non vitali con acrosoma intatto (Fig. 14);
- Morto senza acrosoma: testa e coda non vitali e senza acrosoma (Fig. 15).

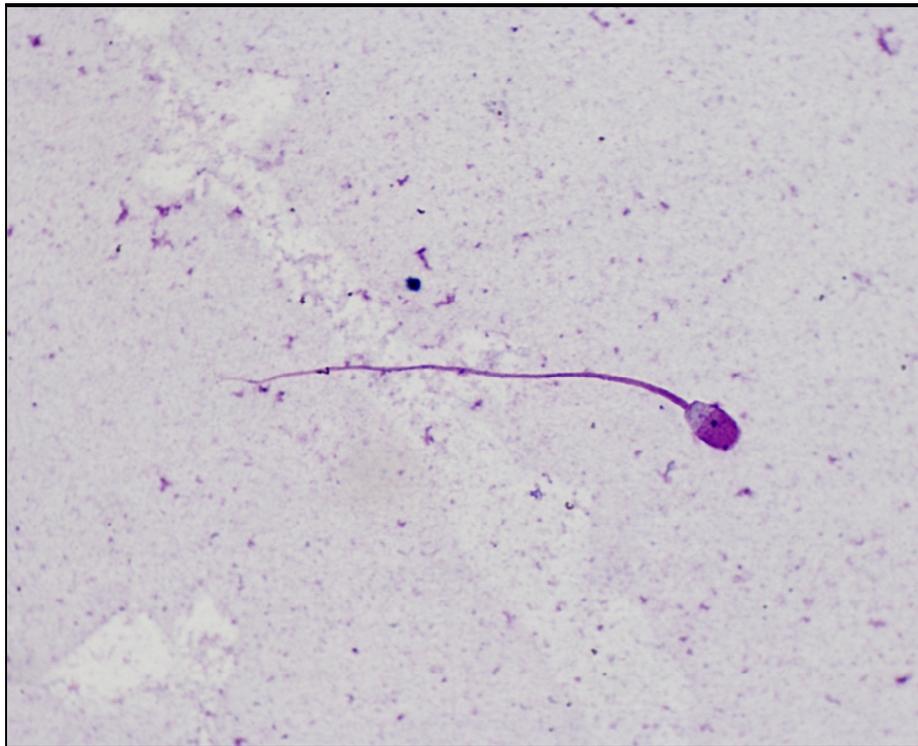


Fig. 12: spermatozoo vivo con testa e coda vitali con acrosoma intatto

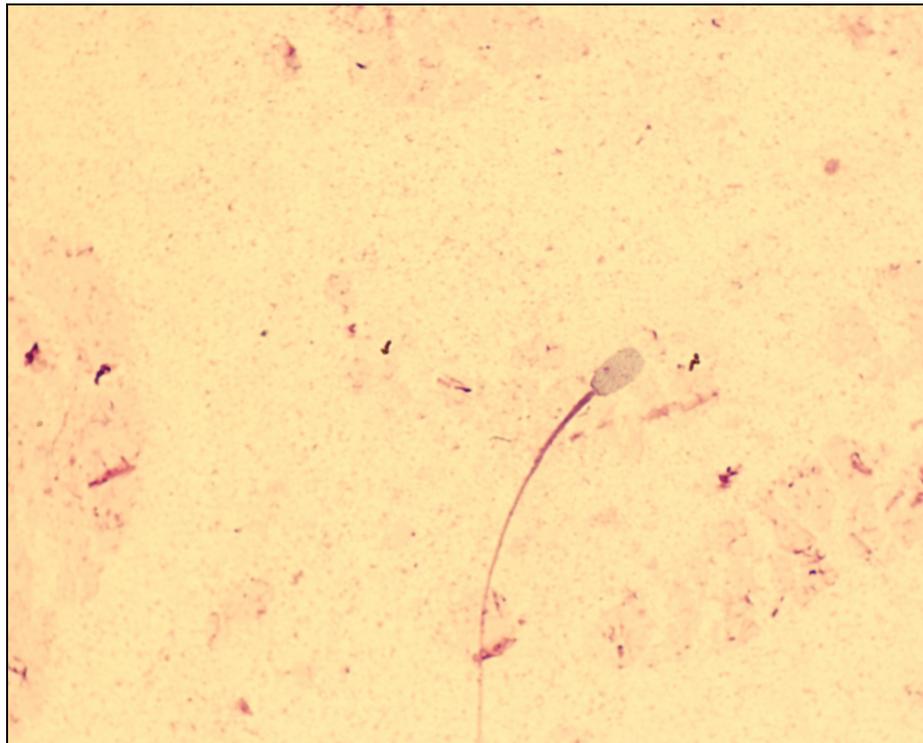


Fig. 13: spermatozoo vivo con testa e coda vitali senza acrosoma



Fig. 14: spermatozoo morto con testa e coda non vitali con acrosoma intatto

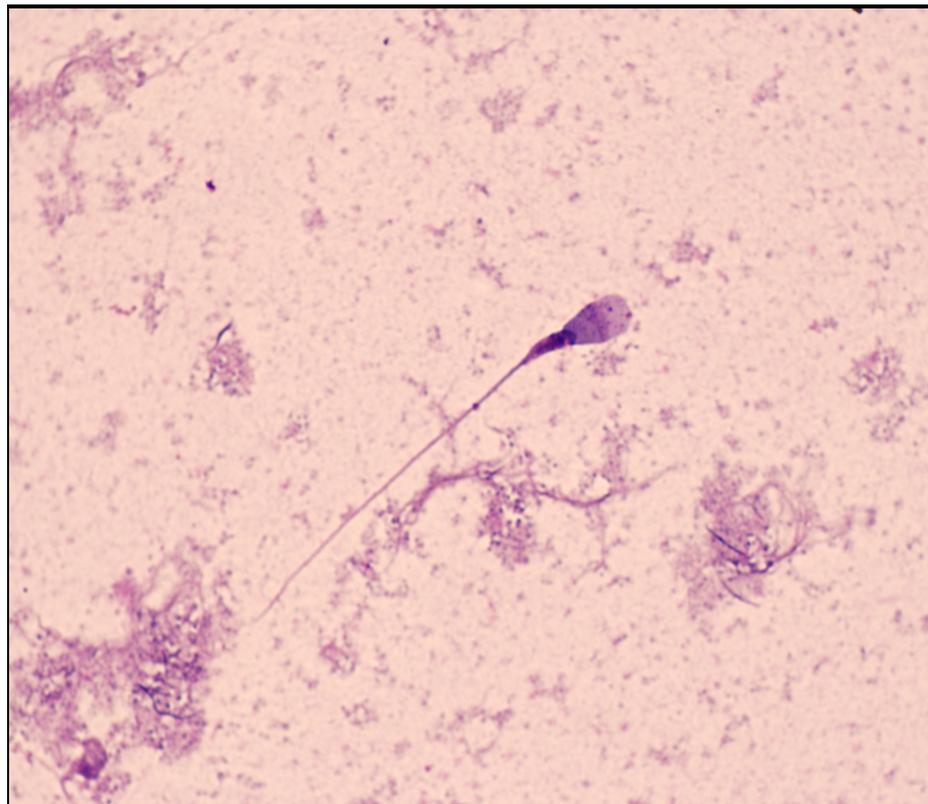


Fig. 15: Spermatozoo morto con testa e coda non vitali e senza acrosoma

Per la classificazione della testa e della coda come vive o morte e per lo stato dell'acrosoma sono stati considerati i colori assunti dalle singole regioni durante la colorazione (fig. 16).

La testa è stata definita viva quando assumeva un colore bianco o rosa pallido, se invece era scura, grigia oppure viola scuro è stata definita morta. La coda se assumeva colore rosa è stata classificata viva, se nera o viola scuro è stata considerata morta. L'acrosoma se colorato in porpora è stato ritenuto intatto, se era assente qualsiasi traccia di colore e, quindi, appariva bianco, è stato considerato assente.

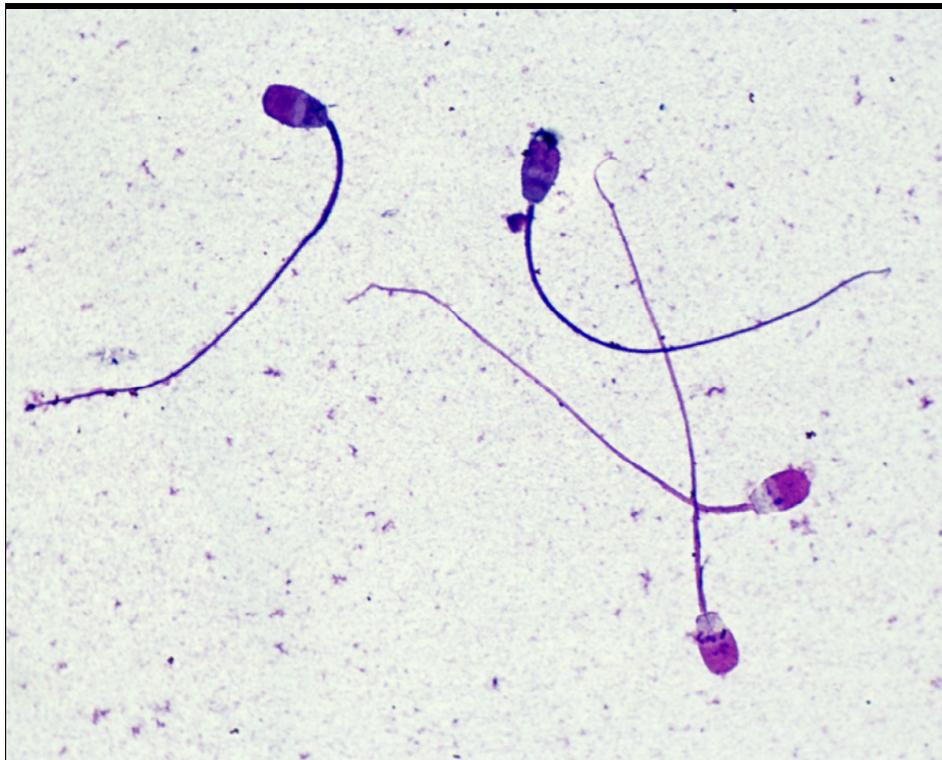


Fig 16: Spermatozoi di bufalo vivi e morti evidenziati alla colorazione Trypan Blue/Giemsa.

ESPERIMENTO 1.2

MATERIALI E METODI

Nella seconda fase si è proceduto all'utilizzo degli stessi semi per valutare l'effettiva capacità fecondante in vitro.

La prova è stata eseguita utilizzando oociti di bufalo (*Bubalus bubalis*) ottenuti da ovaie di animali macellati.

Le ovaie sono state raccolte presso un macello locale e trasportate in laboratorio in soluzione fisiologica salina (0.9 % NaCl) contenente 150 mg/L di Kanamicina. Dal momento del prelievo fino all'arrivo in laboratorio, le gonadi sono state mantenute in un termos portatile alla temperatura di 30-35°C per circa 3-4 ore.

In laboratorio le ovaie sono state lavate ripetutamente con la medesima soluzione fisiologica supplementata d'antibiotico, al fine di ridurre al minimo i rischi di contaminazione, poi si è proceduto all'aspirazione dei follicoli.

I complessi cumulo oocita (COC) sono stati aspirati dai follicoli di piccolo e medio calibro (2-8 mm) visibili sulla superficie dell'ovaio, utilizzando un ago del diametro di 18 Gauge collegato ad una pompa da vuoto mantenendo costante la pressione di aspirazione (40 mmHg) durante tutta la lavorazione. Il fluido follicolare è stato esaminato in piastre Petri ed i COC raccolti sono stati posti in un comune terreno di coltura (TCM 199), tamponato con 15 mM di

hepes e 5 mM di bicarbonato di sodio e addizionato con il 10 % di siero fetale bovino (H-199). I COC sono stati lavati diverse volte in H-199 e, prima di porli in maturazione, è stata effettuata una valutazione morfologica al fine di scartare quelli di bassa qualità. Soltanto i COC appartenenti alle categorie A e B sono stati utilizzati.

Per la maturazione in vitro (IVM) È stato utilizzato TCM 199 tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio e addizionato di 0.2 mM di acido piruvico e 10 % di siero fetale bovino (B 199). Il medium di maturazione è stato ulteriormente supplementato di 0.5 µg/ml di FSH, 5 µg/ml di LH, 1 µg/ml di 17-β-estradiolo e completato con l'aggiunta di cisteamina alla concentrazione di 50 µM e cistina alla concentrazione di 0.3 mM (Gasparrini et al., 2006).

I COC selezionati, quindi, dopo essere stati lavati un'ultima volta nel medium di maturazione, sono stati posti nel suddetto medium in piastre petri contenenti gocce di 50 µl (10 COC/goccia), ricoperte d'olio minerale.

Le piastre così preparate sono state poste in un incubatore con il 5% di CO₂ in aria, a 38.5°C per circa 21 ore.

Fertilizzazione e coltura in vitro

Gli spermatozoi sono stati preparati da paillette di seme

congelato-scongelo ottenuto dai tori (N =6) precedentemente utilizzati nell'esperimento 1.1.

Per l'IVF, il seme è stato trattato con la procedura dello swim-up per 1 ora. Il pellet ottenuto dopo centrifugazione è stato risospeso ad una concentrazione finale di $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ nel medium di fertilizzazione. La fecondazione è stata realizzata in gocce di 50 μl del medium di fertilizzazione sotto olio minerale (5 oociti per goccia) a 38.5 °C con il 5% di CO₂ in aria umidificata. Dopo circa 22 ore dalla IVF i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fertilizzazione, denudati delle cellule del cumulo con spipettamento delicato, lavati due volte in H-SOF e coltivati in gocce da 20 μl di SOF tamponato con bicarbonato di sodio. La coltura è stata effettuata a 38.5 °C in camere modulari a tenuta, nelle quali veniva insufflata una miscela gassosa composta di 5% CO₂, 7% O₂ e 88% N₂.

La valutazione del cleavage, ovvero la percentuale di embrioni divisi a due cellule, è stata valutata al giorno 5 di coltura (giorno 0 = giorno dell'inseminazione). Gli oociti indivisi sono stati eliminati dalle piastre, e gli embrioni trasferiti in un terreno fresco per ulteriori 2 giorni. La resa embrionale (TE), intesa come percentuale di morule compatte (TM) e blastocisti (BL) è stata valutata al giorno 7.

La valutazione delle blastocisti è stata ripetuta anche al giorno 8, per assicurarsi che gli embrioni allo stadio TM registrato al giorno 7 si fossero sviluppati a BL nelle 24 ore di coltura successiva.

ANALISI STATISTICA

Nell'esp 1.1 e nell'esperimento 1.2 le differenze tra tori nelle percentuali di spermatozoi vivi e morti con presenza o assenza di acrosoma e le differenze tra tori nelle percentuali di cleavage e di blastocisti sono state testate con il test del "chi" Quadrato.

RISULTATI esperimento 1.1

La metodica utilizzata si è rivelata di semplice impiego ed adattabile alla specie bufalina.

Nell'esperimento 1.1 i risultati hanno evidenziato che le percentuali di spermatozoi vivi con acrosoma integro sono influenzate dal toro, con valori statisticamente più elevati ($P < 0.01$) per i tori 1,2 e 6 verso 3,4 e 5 (Tabella 6). Il toro 3 ha mostrato le percentuali più basse ($P < 0.01$) di spermatozoi vivi con acrosoma rispetto a tutti gli altri tori presi in esame.

Analogamente alle percentuali di spermatozoi vivi con acrosoma anche le percentuali di spermatozoi morti con acrosoma sono state influenzate dal toro, con valori quindi più elevati ($P < 0.01$)

per il toro 3 verso tutti gli altri. Le percentuali di spermatozoi vivi senza acrosoma sono state molto basse con valori simili per tutti i tori tranne che per il toro 6 ($P < 0.01$). Questo è un dato importante per la valutazione di un eventuale effetto di destabilizzazione della membrana acrosomiale indotta dal congelamento.

Le percentuali di spermatozoi morti senza acrosoma, sono state più basse ($P < 0.01$) per i tori 1,2 e 6 rispetto ai tori 3,4 e 5.

RISULTATI esperimento 1.2

Nell'esperimento 1.2 i risultati mostrano una certa variabilità nell'attitudine all'IVF dei diversi tori testati (tabella 7).

Le percentuali di cleavage sono state influenzate dal toro; infatti il toro 6 ha mostrato percentuali di cleavage più alte ($P < 0.01$) rispetto al toro 1 e al 3. I tori 2,4 e 5 invece hanno dato valori intermedi. Prendendo in esame le percentuali di blastocisti calcolate sul totale degli oociti fecondati, si può affermare che solo il toro 3 ha dato i risultati peggiori, i tori 2, 4 e 6 sono risultati buoni, mentre i tori 1 e 5 hanno dato valori intermedi (tabella 7). Si può affermare che in generale i tori che hanno avuto il cleavage più alto hanno anche dato migliori percentuali di blastocisti (tabella 7). Dai dati emerge che uno solo dei tori esaminati (3) ha mostrato problemi di cleavage, solo il toro 5, pur avendo un

cleavage alto, ha dimostrato problemi nello sviluppo embrionale successivo. Quando si riportano le blastocisti sugli oociti divisi il toro 3 che aveva dato i risultati peggiori in termini di cleavage e blastocisti sugli oociti totali raggiunge valori simili al toro 1,2 e al toro 5, ma con valori statisticamente diversi solo rispetto al toro 6 ($P < 0.01$).

Tabella 6: Percentuali delle categorie di spermatozoi dopo la colorazione

TORO	N.totali	N. vivi con acrosoma (%)	N. morti con acrosoma (%)	N. vivi senza acrosoma (%)	N. morti senza acrosoma (%)
1	625	454 (72.7 %)A	164 (26.2 %)A	0 (0 %)A	7 (1.1 %)A
2	647	450 (69.6 %)Aa	178 (27.5 %)A	0 (0 %)A	19 (2.9 %)A
3	401	103 (25.7 %)B	206 (51.4 %)B	0 (0 %)ABa	92 (22.9 %)Ba
4	351	156 (44.4 %)C	133 (37.9 %)C	0 (0 %)ABa	62 (18 %)B
5	444	186 (41.9 %)C	173 (39 %)C	20 (3.7 %)AB	65 (14.3 %)Bb
6	830	614 (72 %)Ab	106 (14.2 %)D	74 (9.1 %)Bb	36 (4.7 %)A

A, B, C valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.01)

a, b, c valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.05)

Tabella 7: Effetto toro sulle percentuali di cleavage e Blastocisti

TORO	N.totali	N. (% cleavage)	N. (% TM-BL/cleaved)	N. (% TM-BL/totali)
1	246	135 (54.88 %) Ba	37 (27.4 %) a	37 (15.04 %) ABad
2	181	116 (64.09 %) AB	36 (31.03 %) B	36 (19.89 %) ACDac
3	179	56 (31.28%) C	13 (23.2 %) a	13 (7.26 %) Bb
4	203	126 (62.07 %) AB	51 (40.48 %) Bb	51 (25.12 %) C
5	210	138 (65.71 %) ABb	25 (18.12%) A	25 (11.9 %) BDbd
6	285	198 (69.47 %) A	63 (31.82%) B	63 (22.1 %) ACc

A, B, C valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.001)

a, b, c valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.05)

DISCUSSIONE

I risultati del presente lavoro hanno confermato l'esistenza di un marcato "effetto toro" nella IVF della specie bufalina, confermando risultati precedenti.

Nell'esperimento 1.1 è stato dimostrato che la doppia colorazione trypan-blue/giemsà può essere utilizzata per la specie bufalina e può fornire indicazioni aggiuntive sulla qualità del seme, riuscendo a dare indicazioni sufficienti per effettuare uno screening preliminare ed eliminare almeno i tori decisamente scadenti in tempi rapidi.

Infatti la classificazione dei tori in base alla percentuale crescente di spermatozoi vivi con acrosoma è stata la seguente: 3,5,4,2,6,1 mentre quella ottenuta in base alle percentuali crescenti di TM-BL/tot è stata: 3,5,1,2,6,4.

Come si può rilevare l'accordo tra le due classificazioni si è osservato per 4/6 tori (67%), mentre risultati discordanti sono stati trovati per il toro 4 ed il toro 1. Il toro 4, infatti, pur avendo evidenziato solo un 44,4% di spermatozoi vivi con acrosoma integro, ha poi fornito buoni risultati in termini di cleavage e blastocisti quando testato sull'IVF. Al contrario il toro 1 pur avendo avuto alte percentuali di spermatozoi vivi con acrosoma integro, non ha avuto il miglior cleavage e sicuramente ha dato

percentuali di blastocisti minori rispetto al toro 4. Ovviamente per stabilire l'esistenza di una correlazione tra gli spermatozoi vivi con acrosoma integro e la capacità fecondante in vitro, andrebbe ampliata la casistica, sia estendendo l'analisi ad un numero maggiore di tori, sia ripetendola su lotti di paillettes diverse di ciascun toro.

La conclusione che possiamo trarre da questo lavoro è che la colorazione effettuata può essere utilizzata per fare uno screening preliminare allo scopo di escludere alcuni tori dall'IVF che presentano già allo scongelamento un'alta percentuale di spermatozoi morti, ma la risposta migliore rimane quella che si ottiene dopo ripetute prove di IVF, valutando sia le percentuali di cleavage che di blastocisti.

Sarebbe utile, comunque, poter disporre anche di dati sulle percentuali di gravidanze ottenute in vivo dopo inseminazione strumentale, in quanto alcune aberrazioni centrosomiali possono essere responsabili di problemi che intervengono in un momento successivo, come ad esempio in caso di riassorbimenti embrionali, evenienza purtroppo molto frequente in questa specie. Si ritiene dunque necessario ampliare la casistica per poter avvalorare questa ipotesi. Sicuramente si può affermare che l'alta variabilità nella capacità fertilizzante in vitro rende indispensabile

l'individuazione di un buon toro qualora si decida di effettuare l'IVEP nella specie bufalina.

4.2 ESPERIMENTO 2: CO-INCUBAZIONE DEI GAMETI NELLA SPECIE BUFALINA

Un altro fattore che può influenzare lo sviluppo embrionale è la durata di co-incubazione dei gameti.

Sulla base degli studi sulla cinetica degli eventi di fertilizzazione, è stato suggerito che la durata ottimale della co-incubazione degli spermatozoi-oociti, al fine di ottenere un aumento delle percentuali di blastocisti nei bovini è compresa tra le 18 e le 24 ore. Tuttavia, è noto che la co-incubazione prolungata dei gameti durante l'IVF risulta nell'esposizione degli oociti e degli embrioni a livelli elevati di specie reattive dell'ossigeno prodotte dagli spermatozoi, che possono avere effetti nocivi sullo sviluppo embrionale (Gianaroli et al 1996). È stato inoltre segnalato che l'incidenza della polispermia aumenta all'aumentare dei tempi di co-incubazione dei gameti durante l'IVF (Sumantri et al 1997). Attualmente la tendenza nell'IVF umana è di accorciare il tempo di co-incubazione per ridurre l'effetto negativo relativo alle alte concentrazioni degli spermatozoi (Gianaroli et al 1996, Quinn et al 1998, Kochhar et al 2003). Sulla base di questi presupposti, sono stati studiati in diverse specie gli effetti di riduzione del tempo di co-incubazione dei gameti sullo sviluppo degli embrioni

in vitro. Nei bovini è stato dimostrato che la percentuale di cleavage si riduce significativamente facendo diminuire la co-incubazione da 10 a 5 ore (Ward et al 2002, Sumantri et al 1997, Kochhar et al 2003) e che un periodo di co-incubazione di 10 ore è sufficiente per ottenere buone percentuali di cleavage e di blastocisti (Ward et al 2002). In uno studio precedente, è stato valutato l'effetto di una riduzione del tempo di co-incubazione da 20 a 8 ore sul cleavage e sullo sviluppo di blastocisti nel bufalo (Gasparrini et al 2004). Anche se il cleavage è stato significativamente più basso al tempo di co-incubazione più corto, le percentuali di blastocisti, valutate sul totale degli oociti divisi, non sono state differenti. Infatti, una proporzione significativamente più elevata di oociti divisi si è sviluppata significativamente a blastocisti nel gruppo 8 ore rispetto al gruppo 20 ore. In base alle nostre conoscenze, non ci sono informazioni disponibili sulla cronologia della penetrazione spermatica degli oociti di bufalo in vitro; è stato, pertanto, ipotizzato che è necessario un intervallo di tempo più lungo di 8 ore perchè lo spermatozoo di bufalo penetri gli oociti in vitro. D'altra parte, il migliore sviluppo a blastocisti degli oociti divisi nel gruppo 8 ore indicherebbe che estendere il tempo di co-incubazione possa essere nocivo per lo sviluppo embrionale.

Questa osservazione interessante ha suggerito di studiare gli effetti dei tempi intermedi di co-incubazione sullo sviluppo in vitro degli embrioni di bufalo per ottimizzare l'efficienza di IVEP.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del lavoro è stato pertanto quello di:

- studiare l'influenza dei tempi di co-incubazione dei gameti sulla fertilizzazione e sullo sviluppo successivo degli embrioni di bufalo in vitro
- valutare l'incidenza della polispermia in funzione della durata di co-incubazione dei gameti

MATERIALI E METODI

Salvo indicazioni contrarie tutti i reagenti sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Company (Milano, Italia).

La prova è stata eseguita utilizzando oociti di bufalo (*Bubalus bubalis*) ottenuti da ovaie di animali macellati.

Le ovaie sono state raccolte presso un macello locale e trasportate in laboratorio in soluzione fisiologica salina (0.9 % NaCl) contenente 150 mg/l di Kanamicina. Dal momento del prelievo fino all'arrivo in laboratorio, le gonadi sono state mantenute in un termos portatile alla temperatura di 30-35°C per circa 3-4 ore. In

laboratorio le ovaie sono state lavate ripetutamente con la medesima soluzione fisiologica supplementata d'antibiotico, al fine di ridurre al minimo i rischi di contaminazione, poi si è proceduto all'aspirazione dei follicoli.

I complessi cumulo oocita (COC) sono stati aspirati dai follicoli di piccolo e medio calibro (2–8 mm) visibili sulla superficie dell'ovaio, utilizzando un ago del diametro di 18 Gauge collegato ad una pompa da vuoto mantenendo costante la pressione di aspirazione (-40 mmHg) durante tutta la lavorazione.

Il fluido follicolare è stato esaminato in piastre petri ed i COC raccolti sono stati posti in un comune terreno di coltura (TCM 199), tamponato con 15 mM di hepes e 5 mM di bicarbonato di sodio e addizionato con il 10 % di siero fetale bovino (H-199). I COC sono stati lavati diverse volte in H-199 e, prima di porli in maturazione, è stata effettuata una valutazione morfologica al fine di scartare quelli di bassa qualità. Soltanto i COC appartenenti alle categorie A e B sono stati utilizzati.

Per la maturazione in vitro (IVM) È stato utilizzato TCM 199 tamponato con 25 mM di bicarbonato di sodio e addizionato di 0.2 mM di acido piruvico e 10 % di siero fetale bovino (B 199). Il medium di maturazione è stato ulteriormente supplementato di 0.5 µg/ml di FSH, 5 µg/ml di LH, 1 µg/ml di 17-β-estradiolo e

completato con l'aggiunta di cisteamina alla concentrazione di 50 μM (Gasparrini et al., 2000).

I COC selezionati, quindi, dopo essere stati lavati un'ultima volta nel medium di maturazione, sono stati posti nel suddetto medium in piastre petri contenenti gocce di 50 μl (10 COC/goccia), ricoperte d'olio minerale. Le piastre così preparate sono state poste in un incubatore con il 5% di CO_2 in aria, a 38.5°C per circa 21 ore.

Gli Spermatozoi sono stati preparati da seme congelato-scongelo ottenuto da un toro precedentemente testato per l'IVF nel nostro laboratorio. Il seme è stato trattato con la procedura dello swim-up per 1 ora. Il pellet ottenuto dopo centrifugazione è stato risospeso ad una concentrazione finale di $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ nel medium di fertilizzazione.

La fecondazione è stata realizzata in gocce di 50 μl del medium di fertilizzazione sotto olio minerale (5 oociti per goccia) a 38.5°C con il 5% di CO_2 in aria umidificata.

A tempi diversi dalla IVF i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fertilizzazione, denudati delle cellule del cumulo con spipettamento delicato, lavati due volte in H-SOF e coltivati in gocce da 20 μl di SOF tamponato con bicarbonato di sodio.

La coltura è stata effettuata a 38.5 °C .con il 5% di CO₂, il 7% di O₂ e l'88% di N₂ in camere modulari a tenuta.

DISEGNO SPERIMENTALE

Esperimento 2.1: Effetto del tempo di co-incubazione dei gameti sul cleavage e sullo sviluppo embrionale

Gli oociti (n = 740, 4 repliche) sono stati maturati e fertilizzati in vitro come precedentemente descritto. I presunti zigoti sono stati rimossi dalle gocce di IVF a 8, 12, 16 e 20h post inseminazione (pi) e sono stati posti in coltura. Il giorno 5 dopo l'inseminazione è stata effettuata la valutazione del cleavage, gli oociti indivisi e degenerati sono stati scartati e gli embrioni sono stati trasferiti nel mezzo fresco per ulteriori due giorni di IVC. La produzione di blastocisti è stata valutata il giorno 7.

Esperimento 2.2 Effetto dei tempi di co-incubazione dei gameti sulla fertilizzazione monospermica e polispermica

Gli oociti (n = 372, 4 repliche) sono stati co-incubati con il seme per 4, 8, 12, 16 e 20 ore pi. Ad ogni tempo di co-incubazione, gli oociti sono stati rimossi dalle gocce di IVF e denudati delle loro cellule del cumulo con spipettamento delicato in HSOF. In seguito è stata effettuata la rimozione della zona pellucida tramite digestione enzimatica usando 2 mg/ml di pronase per 3-5 minuti,

dopodiché gli oociti sono stati fissati con metanolo al 60% in PBS e sono stati colorati con 2.5 µg/ml di Hoechst 33342 per 15 minuti per la valutazione microscopica successiva. Per ogni tempo sono stati valutati il tasso totale di penetrazione, e sono state distinte la fertilizzazione monospermica e polispermica. Inoltre tale prova ha consentito di monitorare, la cinetica della penetrazione, della decondensazione della testa dello spermatozoo e della formazione dei pronuclei (PN), che sono state valutate soltanto negli oociti (n=170) che hanno mostrato la fertilizzazione monospermica.

ANALISI STATISTICA

Le differenze nelle percentuali di blastocisti e di cleavage, come pure le percentuali di fertilizzazione monospermica e polispermica e di penetrazione, fra i gruppi di co-incubazione sono state analizzate mediante il test chi Quadrato.

RISULTATI

A seguito della co-incubazione dei gameti per 8 ore, la percentuale di cleavage è stata significativamente più bassa ($P < 0.05$) se paragonata a quella osservata a 16 e a 20 ore (tabella 8). Aumentando il tempo di co-incubazione a 12 ore si è ottenuto

un aumento del cleavage che però non è stato statisticamente differente, da quello registrato sia a 8 che a 20 ore. La percentuale più elevata di blastocisti ($P < 0.05$) è stata osservata alla co-incubazione di 16 ore rispetto a tutti gli altri tempi. Tuttavia, quando le blastocisti sono state calcolate sui divisi non sono emerse differenze tra i tempi di co-incubazione di 8, 12 e 16 ore. Al contrario, estendendo la co-incubazione fino 20 ore la proporzione di oociti divisi che si è sviluppata a blastocisti è diminuita significativamente ($P < 0.05$) confrontata con il tempo 16 ore.

Quando la durata di co-incubazione è stata ridotta a 4 ore, sia la percentuale di penetrazione totale, sia la sola penetrazione monospermica sono risultate significativamente inferiori ($P < 0.05$) rispetto a tutti gli altri tempi (tabella 9).

Al contrario, i più alti tassi di penetrazione ($P < 0.05$) sono stati registrati a 16 e a 20 ore pi rispetto a tutti gli altri tempi. Percentuali più elevate di fertilizzazione monospermica sono state trovate sia a 16 che a 20 ore pi rispetto a 4 ed a 8 ore mentre a 12 ore pi la penetrazione monospermica non è stata differente da quella osservata a 8 e a 20 ore pi. È stato anche osservato che l'incidenza di polispermia aumenta significativamente ($P < 0.05$) a 20 ore di co-incubazione dei gameti rispetto a 4, a 8 e a 12 ore ma

con valori simili a quella registrata a 16 ore. Tuttavia, nessuna differenza significativa nell'incidenza di polispermia è stata trovata fra i gruppi 4, 8, 12 e 16 ore.

Questo esperimento, inoltre, ha consentito di valutare la cinetica degli eventi di fertilizzazione nel bufalo dopo l'IVF, come è indicato in tabella 10. A 4 ore di co-incubazione la maggior parte degli oociti penetrati ha presentato una testa condensata dello spermatozoo. La decondensazione della testa dello spermatozoo è stata osservata a 8 ore di co-incubazione e la formazione dei PN è stata descritta fra le 12 e le 20 ore pi, con la più alta percentuale ($P < 0,05$) di oociti che mostrano 2 PN a 20 ore di co-incubazione.

Tabella 8: Effetto della co-incubazione dei gameti sullo sviluppo di oociti di bufalo in vitro.

Co-incubazione (ore)	N oociti	Divisi (%)	Blastocisti (n)	Blastocisti/COC (%)	Blastocisti/Divisi (%)
8	185	81 (43.8) ^a	28	15.1 ^a	34.6 ^{ab}
12	181	96 (53.0) ^{ac}	27	14.9 ^a	28.1 ^{ab}
16	190	122 (64.2) ^b	49	25.8 ^b	40.2 ^a
20	184	114 (62.0) ^{bc}	30	16.3 ^a	26.3 ^b

^{a, b, c} valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.05)

Tabella 9: Effetti della co-incubazione dei gamete sulla percentuale di penetrazione oocitaria, e sulla fertilizzazione monospermica e polispermica.

Co-incubazione (ore)	N oociti	Penetrazione (%)	Monospermia (%)	Polispermia (%)
4	71	20 (28.2) ^a	15 (21.2) ^a	5 (7.0) ^a
8	70	31 (44.3) ^b	26 (37.1) ^b	5 (7.1) ^a
12	72	37 (51.4) ^b	32 (44.4) ^{bd}	5 (6.9) ^a
16	76	59 (77.6) ^c	48 (63.2) ^c	10 (13.2) ^{ab}
20	83	65 (78.3) ^c	49 (59.0) ^{cd}	16 (19.3) ^b

^{a, b, c} valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.05)

Tabella 10: Percentuale di oociti penetrati normalmente che mostrano uno spermatozoo con testa condensata (CSH), con testa decondensata (DSH), e due pronuclei sincroni (2PN) a diversi tempi di co-incubazione.

Co-incubazione (ore)	N. oociti	CSH N (%)	DSH N (%)	2 PN N (%)
4	15	14 (93.3) ^a	0 (0) ^a	1 (6.7) ^a
8	26	14 (53.8) ^b	10 (38.5) ^b	2 (7.7) ^a
12	32	7 (21.9) ^c	9 (28.1) ^{bc}	16 (50.0) ^b
16	48	12 (25.0) ^c	6 (12.5) ^{ac}	30 (62.5) ^{bc}
20	49	8 (16.3) ^c	2 (4.1) ^a	39 (79.6) ^c

^{a, b, c} valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.05)

DISCUSSIONE

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti dei tempi di co-incubazione dei gameti sulla fertilizzazione e sullo sviluppo embrionale nel bufalo.

I risultati dell'Esperimento 2.1 hanno dimostrato che il tempo ottimale di co-incubazione dei gameti, per l'efficienza IVEP nel bufalo, è di 16 ore. Si precisa che non si è ritenuto opportuno considerare in questo primo esperimento le 4 ore di co-incubazione perché uno studio precedente aveva già descritto un decremento significativo del cleavage con le 8 ore: allo scopo, invece, di ottenere maggiori informazioni sulla cinetica effettiva di penetrazione nell'esperimento 2.2 si è considerato anche il tempo 4 ore.

Riducendo la durata della co-incubazione a 8 ore si è verificata una riduzione significativa del cleavage, simile a quella riportata nella specie bovina (Ward et al 2002, Kochhar et al 2003) e in uno studio preliminare sul bufalo (Gasparrini et al 2004). Le percentuali di cleavage più elevate sono state osservate, invece, a 16 e 20 ore mentre valori intermedi sono stati trovati a 12 ore.

I risultati dell'esperimento 2.2, dove abbiamo valutato la cronologia della penetrazione spermatica, hanno mostrato che il più alto tasso di penetrazione e in particolare di fertilizzazione monospermica negli oociti di bufalo si ottiene a 16 e 20 ore dalla fecondazione. Infatti, sebbene un incremento significativo della polispermia sia stato registrato a 20 ore dopo la fecondazione, la fertilizzazione monospermica è risultata comunque più alta a questo tempo rispetto a quella osservata a 4 e 8 ore ed è stata paragonabile alla percentuale di cleavage riportata nell'esperimento 2.1.

Per quanto riguarda lo sviluppo embrionale post-fertilizzazione, la più alta percentuale di blastocisti, rispetto al totale degli oociti fecondati, è stata ottenuta dopo 16 ore di co-incubazione dei gameti. Quando, invece, le percentuali di blastocisti sono state calcolate sugli oociti divisi, non sono emerse differenze tra le 8 e le 12 ore di co-incubazione rispetto alle 16 ore, mentre un

decremento significativo è stato riportato a 20 ore rispetto a 16 ore.

Un aspetto interessante che emerge da queste osservazioni è che la più bassa percentuale di blastocisti registrata ai minori tempi di co-incubazione potrebbe essere dovuta semplicemente alla percentuale di cleavage inferiore; infatti gli oociti che si erano divisi a 8 e 12 ore si sono sviluppati ulteriormente con la stessa efficacia del gruppo a 16 ore. Risultati simili sono stati riportati nel bovino da Kochhar et al che hanno evidenziato come, a dispetto del cleavage sub-ottimale, la proporzione di oociti divisi che si sviluppano a blastocisti è più alta a 6 ore di co-incubazione (Kochhar et al 2003). Nel nostro lavoro, prolungando la co-incubazione dei gameti da 16 a 20 ore nel bufalo sono stati ottenuti risultati peggiori poiché, a dispetto della percentuale di cleavage che è risultata simile, la produzione di blastocisti è stata inferiore sia quando calcolata sul totale degli oociti che sugli embrioni divisi.

È stato suggerito che in altre specie il prolungamento della co-incubazione nelle condizioni di IVF, in cui alte concentrazioni di spermatozoi sono incubati in piccoli volumi di medium, determina la produzione di alti livelli di enzimi idrolitici (Rehman et al 1994) e di radicali liberi (Aitken et al 1994) che danneggiano gli oociti.

Inoltre è stata evidenziata una correlazione tra l'incremento del tempo di co-incubazione dei gameti e l'incidenza di polispermia. Anche nel nostro lavoro la polispermia è incrementata al maggior tempo di co-incubazione considerato, la qual cosa suggerirebbe un suo possibile ruolo causale nel determinare il ridotto sviluppo post-fertilizzazione osservato, appunto a 20 ore, anche se la percentuale di penetrazione monospermica è risultata sovrapponibile a quella del cleavage riportata nell'esperimento 2.1, per cui non è possibile escludere che anche altri fattori siano in gioco. Queste osservazioni suggeriscono che sarebbe conveniente rimuovere quanto prima i presunti zigoti dal medium di IVF, una volta avvenuta la penetrazione spermatica, per minimizzare il tempo di esposizione degli embrioni a condizioni avverse.

Poiché il principale scopo della tecnologia IVEP è quello di ottenere un numero maggiore di embrioni trasferibili, possiamo concludere che, per incrementare la percentuale di blastocisti nella specie bufalina, l'incubazione dei gameti per almeno 16 ore risulta necessaria ed è preferibile non estenderne la durata oltre questo tempo.

Nel presente studio, infatti, allungando la durata di co-incubazione a 20 ore è stato possibile ottenere un' elevata

efficienza di fertilizzazione ma lo sviluppo embrionale successivo è stato, in qualche modo, penalizzato.

Sebbene sia stato riportato nell'esperimento 2.2 una maggiore percentuale di polispermia, non è possibile allo stato attuale escludere che altri fattori abbiano esercitato un' influenza negativa ed abbiano creato delle condizioni avverse, come, ad esempio, la presenza di radicali liberi e/o altri cataboliti rilasciati nel medium dagli spermatozoi morti o addirittura l'inadeguatezza del medium di IVF utilizzato.

4.3 ESPERIMENTO 3: CONFRONTO TRA MEDIA E FATTORI DI MOTILITÀ SPERMATICA DIVERSI

L'identificazione di un sistema ottimale per la fertilizzazione in vitro è una fase critica per migliorare l'efficienza della produzione embrionale in vitro nella specie bufalina. È possibile che il medium utilizzato di routine nel nostro laboratorio non sia idoneo a sostenere la fase di fecondazione nella specie bufalina.

Ricordiamo che i media più comunemente usati per l'IVF sono il "Tyrode's modified medium" (TALP; Totey et al., 1992; Totey et al., 1994 ab; Totey et al., 1996; Gasparri et al., 2000; Boni et al., 1994) o il "Brackett and Olifant" (BO; Totey et al., 1992; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Nandi et al., 1998; Bacci et al., 1991). La capacitazione in vitro degli spermatozoi di bufalo viene eseguita incubando gli spermatozoi mobili, precedentemente separati con la tecnica dello swim-up oppure con diversi gradienti di percoll, in media contenenti fattori che aumentano anche la motilità come l'eparina e la caffeina (Chauhan et al. 1998; Nandi et al. 1998), la teofillina (Jainudeen et al. 1993; Chauhan et al. 1998), la pentoxifillina (Ramesha et al. 2000) e la combinazione di penicillamina, ipotaurina ed epinefrina (PHE Totey et al. 1996). La

maggior parte degli autori indiani utilizza per l'IVF nel bufalo il BO come medium, l'eparina come fattore capacitante e la caffeina come fattore inducente la motilità spermatica (Chauhan et al.1998, Nandi et al 1998).

Nel nostro laboratorio, invece, si utilizza il TALP come medium, l'eparina come fattore capacitante ed una combinazione di ipotaurina e penicillamina per indurre la motilità spermatica (Gasparrini et al 2002).

Si è dunque, ritenuto necessario effettuare un confronto diretto dei due sistemi di IVF maggiormente utilizzati nella specie bufalina e valutare eventuali interazioni tra il medium e i fattori di motilità spermatica che pure differiscono nei due sistemi. Non si può, infatti, escludere, che la bassa efficienza di fertilizzazione nelle nostre condizioni operative sia dovuta ad un inappropriato microambiente.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto confrontare l'efficacia di diversi sistemi di IVF sulle percentuali di cleavage e di blastocisti.

I sistemi confrontati sono stati i seguenti :

- 1) medium TALP, con ipotaurina-penicillamina ed eparina;
- 2) medium BO, con ipotaurina-penicillamina ed eparina;

- 3) medium TALP, con caffeina ed eparina;
- 4) medium BO, con caffeina ed eparina.

MATERIALI E METODI

I complessi cumulo-oocita (n=516), recuperati da animali macellati, sono stati fatti maturare in vitro in TCM 199 + FCS 10%, 0.5 µg/ml FSH , 5 µg/ml LH, 1 µg/ml 17 β estradiolo and 50 µM cisteamina a 38.5°C con il 5% di CO₂ in aria umidificata per 24 ore.

Gli oociti maturi sono stati assegnati a caso ai quattro gruppi di fertilizzazione. In particolare, l'IVF è stata effettuata a 38.5°C con il CO₂ di 5% in aria umidificata nel medium Tyrode's modificato (TALP) o nel medium di Brackett Oliphant (BO), in presenza di 0.01 mM di eparina; ogni medium è stato completato con una miscela di 0.2 mM di penicillamina e 0.1 mM di ipotaurina oppure 5 mM di caffeina. Il seme congelato-scongelo di un toro già testato per l'IVF nel nostro laboratorio è stato trattato con la procedura dello swim-up ed usato ad una concentrazione finale di 20⁶/ml. Dopo 20-22 ore i presunti zigoti sono stati coltivati in medium SOF, completato con amminoacidi essenziali e non essenziali e BSA, in atmosfera gassosa col 5% di CO₂ il 7% di O₂ e 88% di N₂ fino alla fase di blastocisti.

ANALISI STATISTICA

Le percentuali di cleavage e di blastocisti sono state analizzate mediante un modello fattoriale completo 2 x 2 (SPSS 11.0) utilizzando il tipo di medium ed i fattori di motilità spermatica come variabili. L'analisi usata consente l'identificazione delle differenze statistiche fra i trattamenti indipendentemente dalle interazioni (Searle 1971).

RISULTATI

Il confronto tra i due medium, indipendentemente dagli SMIF usati, non ha evidenziato alcuna differenza nelle percentuali di cleavage (43.7% vs 39.3% rispettivamente in TALP e in BO). Al contrario i più alti tassi di cleavage sono stati registrati con la ipotaurina - penicillamina vs caffeina (47.7% vs 35.3%; $P < 0.05$), indipendentemente dal medium impiegato (Tabella 11). Tuttavia, è stata trovata un'interazione significativa fra i media e gli SMIF; in effetti l'aggiunta della ipotaurina e della penicillamina ha migliorato significativamente la percentuale di cleavage rispetto alla caffeina nel medium TALP (59.6% vs 27.9%; $P < 0.05$) mentre nessuna differenza è stata osservata in BO (35.9% vs 42.7% rispettivamente).

Inoltre riguardo alle percentuali di blastocisti (tabella 12) è stato

trovato un effetto significativo del medium, con la più alta produzione embrionale in TALP vs BO (13.9% vs 6.8%; $P < 0.05$). Le percentuali di blastocisti sono migliorate in presenza della ipotaurina -penicillamina vs caffeina (13.6% vs 7.2%; $P < 0.05$). Si è vista un' interazione significativa fra il medium e gli SMIF, con una più alta percentuale embrionale in presenza di ipotaurina -penicillamina vs caffeina in TALP (20.7% vs 7.1% rispettivamente; $P < 0.05$) ma non in BO (6.4% vs 7.2% rispettivamente). Le differenze riscontrate si annullano quando le percentuali embrionali sono calcolate sugli oociti divisi, con l'eccezione di un più basso rendimento di BO vs TALP (15.9% vs 31.1%; $P = 0.057$).

Tabella 11: Effetti dei medium (TALP vs BO) e degli agenti che inducono la motilità spermatica (Ipotaurina + Penicillamina vs Caffeina) sulla percentuale di cleavage.

Gruppi	TALP	BO	TOTALE
Ipotaurina +Penicillamina	59.6±6.9 ^a	35.9±14.3	47.7±16.4 ^a
Caffeina	27.9±3.7 ^b	42.7±10.7	35.3±10.8 ^b
TOTALE	43.7±17.7	39.3±12.3	41.5±14.9

^{a, b, c} valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente ($P < 0.05$)

Tabella 12: Effetti dei medium (TALP vs BO) e degli agenti che inducono la motilità spermatica (Ipotaurlna + Penicillamina vs Caffeina) sulla percentuale di blastocisti.

Gruppi	TALP	BO	TOTALE
Ipotaurlna +Penicillamina	20.7±7.2 ^a	6.4±4.8	13.6±9.4 ^a
Caffeina	7.1±4.8 ^b	7.2±4.3	7.2±4.2 ^b
TOTALE	13.9±9.1 ^c	6.8±4.2 ^d	10.4±7.8

^{a, b, c} valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente (P<0.05)

DISCUSSIONE

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di confrontare due diversi medium di fertilizzazione utilizzati nella produzione embrionale in vitro nella specie bufalina. Un confronto diretto tra questi due media non era mai stato fatto prima, dunque questa prova è stata utile per valutare l'effettiva efficienza del sistema di IVF nella specie bufalina.

I due media più comunemente usati per l'IVF sono il "Tyrode's modified medium" (TALP; Totey et al., 1992; Totey et al., 1994 ab; Totey et al., 1996; Gasparrini et al., 2000; Boni et al., 1994) o il "Brackett and Olifant" (BO; Totey et al., 1992; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Nandi et al., 1998; Bacci et al., 1991). A questi medium si aggiungono poi diversi fattori per la

capacitazione del seme e per aumentare la motilità spermatica quali quelli utilizzati per la prova cioè l'eparina, la caffeina, l'ipotaurina e la penicillamina.

In questo esperimento è stato dimostrato che i risultati migliori si ottengono con il medium TALP addizionato di ipotaurina e penicillamina, sia se andiamo a considerare le percentuali di cleavage e di blastocisti che valutando eventuali interazioni tra i diversi fattori componenti ciascun sistema (tabelle 11 e 12). L'osservazione che una minore percentuale di oociti fertilizzati raggiunge lo stadio di blastocisti nel BO suggerisce un' influenza negativa di questo medium anche sullo sviluppo post-fertilizzazione.

Il presente lavoro ha dimostrato che il medium da noi utilizzato è idoneo, ed il nostro sistema appropriato perché delle varie combinazioni testate la migliore è stata comunque il nostro controllo.

È opportuno precisare che altri autori hanno riportato efficienze migliori con BO e caffeina (40-50%, Nandi et al 2002, Chauhan et al 1998) rispetto ai risultati da noi riportati in questo studio. È ipotizzabile che queste discrepanze nei risultati siano dovute alla composizione del medium utilizzato; infatti Madan et al (Madan et al 1994) hanno dimostrato che l'aggiunta di 10mM di Ca^{++} alla

composizione originale del medium BO (Brackett and Oliphant 1975) può aumentare la percentuale di fertilizzazione a causa di un effetto del calcio nei processi di reazione acrosomiale sugli spermatozoi già attaccati alle cellule del cumulo. Ad ogni modo anche nel BO modificato l'efficienza di cleavage riportata da altri autori è stata bassa.

In altri termini l'efficienza del cleavage è bassa sia nei lavori dove si utilizza il medium Talp, sia nei lavori dove si utilizza il medium BO. In tutti i casi comunque è stata utilizzata l'eparina come agente capacitante.

Dunque non possiamo escludere che l'eparina possa non essere idonea ad indurre il processo di capacitazione spermatica nella specie bufalina.

4.4 ESPERIMENTO 4: VALUTAZIONE DI DIVERSI AGENTI CAPACITANTI IN VITRO

È noto che gli spermatozoi di mammifero acquisiscono la capacità fecondante all'interno delle vie genitali femminili attraverso un processo denominato capacitazione. Questo processo implica una serie di eventi biochimici che culminano nella fosforilazione di specifiche proteine tirosiniche. Diversi studi hanno dimostrato che la capacitazione è uno step maturazionale degli spermatozoi che li prepara all'esocitosi dell'acrosoma, che avviene in seguito all'interazione con le proteine della zona pellucida (Vrendenburgh-et al 1995), e all'iperattivazione (Yanagimachi 1988).

È possibile indurre la capacitazione in vitro incubando gli spermatozoi nel fluido oviduttale (McNutt et al 1991, Parrish et al 1989) oppure per alcune specie, in un medium contenente albumina sierica bovina (Go et al 1985), calcio (Handrow et al 1989) e bicarbonato (Boatman et al 1991)

È stato anche dimostrato che l'incubazione con eparina è richiesta per indurre la capacitazione di spermatozoi bovini in vitro (Parrish et al 1988). Sebbene diversi agenti inducono la capacitazione in vitro, l'eparina è ancora il metodo più efficiente

utilizzato nella maggior parte delle specie domestiche incluso il bufalo. Ancora una volta si applica per il bufalo quanto valido in altre specie e, quindi, non si può escludere che il processo di capacitazione sia “ostacolato” nell’IVF.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato, pertanto, quello di valutare l’efficacia di differenti agenti ad indurre la capacitazione in vitro di spermatozoi di bufalo.

In particolare sono state analizzate 4 sostanze: siero di bufala in estro (esperimento 4.1), fluido follicolare (esperimento 4.2), progesterone (esperimento 4.3) e nitroprusside di sodio (esperimento 4.4).

In tutti gli esperimenti la capacitazione è stata valutata indirettamente stimando la capacità degli spermatozoi ad andare incontro alla reazione acrosomiale dopo incubazione con lisofosfatidilcolina, un lipide fusogenico, noto per indurre la reazione acrosomiale solo negli spermatozoi capacitati (fig. 16) senza effetti sulla motilità (Parrish et al 1988).

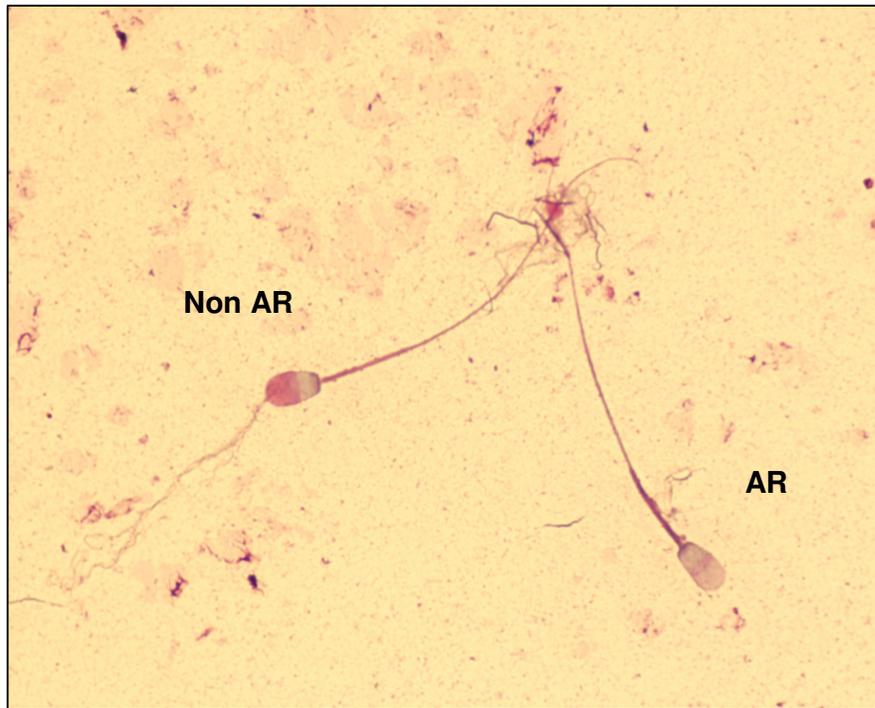


Fig. 16: spermatozoi di bufalo con avvenuta reazione acrosomiale (AR) e senza avvenuta reazione acrosomiale (Non AR).

ESPERIMENTO 4.1: Effetto del siero di bufala in estro sulla capacitazione in vitro di spermatozoi di bufalo.

Diversi fluidi biologici esplicano un' azione capacitante sugli spermatozoi in vitro. Ad esempio, nella specie ovina, il siero di pecora in estro durante l'IVF (Grazyna Ptak et al 1999) viene utilizzato allo scopo di ottimizzarne i risultati.

In questa specie, pertanto, il fattore di capacitazione impiegato non è l'eparina. Questa osservazione ci ha suggerito di verificare se anche il siero di bufala in estro (BES) possa esercitare un ruolo

importante durante il processo di capacitazione del seme di bufalo, specie che presenta maggiori affinità con la specie ovina a causa della stagionalità.

MATERIALI E METODI

Raccolta e preparazione del siero di bufala in estro

I campioni di sangue sono stati ottenuti da bufale in calore e trasportati in condizioni sterili in laboratorio. I campioni di BES, ottenuti dopo centrifugazione, sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'uso.

Preparazione del seme

Spermatozoi congelati-scongelati di un toro precedentemente testato per l'IVF sono stati trattati con la procedura dello swim-up in modo da selezionare solo la popolazione mobile mentre un campione di spermatozoi (N = 1546) è stato valutato immediatamente dopo lo swim-up per valutare l'incidenza della perdita acrosomiale negli spermatozoi non trattati (tempo 0). I rimanenti spermatozoi sono stati incubati: 1) in presenza di 0.01 mM di eparina (controllo) per 1 (N = 2072), 2 (N = 1953) e 3 (N = 2132) ore, 2) in presenza di 20 % di BES per 1 (N = 1452), 2 (N = 1718) e 3 (N = 1805) ore e 3) con il 20 % di BES in presenza di

0.01 mM di eparina per 1 (N = 1831), 2 (N = 2281) e 3 (N = 2177) ore.

Dopo l'incubazione con questi agenti, gli spermatozoi sono stati esposti per 15 minuti a 60 µg/ml di lisofosfatidilcolina. La lisofosfatidilcolina estratta da fegato di bovino (Sigma,L-5004) è stata dissolta in metanolo per HPLC con una concentrazione di 5mg/ml, divisa in aliquote da 60µl e conservata a -20°C.

Il giorno dell'uso, il metanolo è stato fatto evaporare sotto azoto, ed è stato aggiunto il medium (TALP con 60mg/ml di albumina) per ottenere una soluzione stock contenente 600µg di lisofosfatidilcolina/ml. L'albumina è stata aggiunta per ridurre l'effetto negativo della lisofosfatidilcolina sulla vitalità spermatica.

Un volume totale di 125µl è stato usato per ogni gruppo.

Un volume di 112,5µl di sospensione spermatica è stato coincubato con 60 µg/ml di lisofosfatidilcolina (12.5µl di soluzione stock di lisofosfatidilcolina) in una eppendorf da 1.5ml per 15 minuti in incubatore a 38.5°C con il 5%CO₂.

Fissazione e colorazione degli spermatozoi

Il seme è stato fissato e colorato mediante colorazione Trypan blue/Giemsa già descritta precedentemente (Kovács and Foote

1992). La reazione acrosomiale è stata valutata mediante analisi microscopica.

ANALISI STATISTICA

La proporzione di spermatozoi che presentavano reazione acrosomiale in ogni gruppo di tempo di incubazione (1 vs 2 vs 3 ore) è stata usata per valutare l'efficienza della capacitazione tra le differenti condizioni di incubazione. Le differenze tra i gruppi di tempo e condizioni di incubazione sono state analizzate mediante ANOVA (SPSS 11.0).

RISULTATI

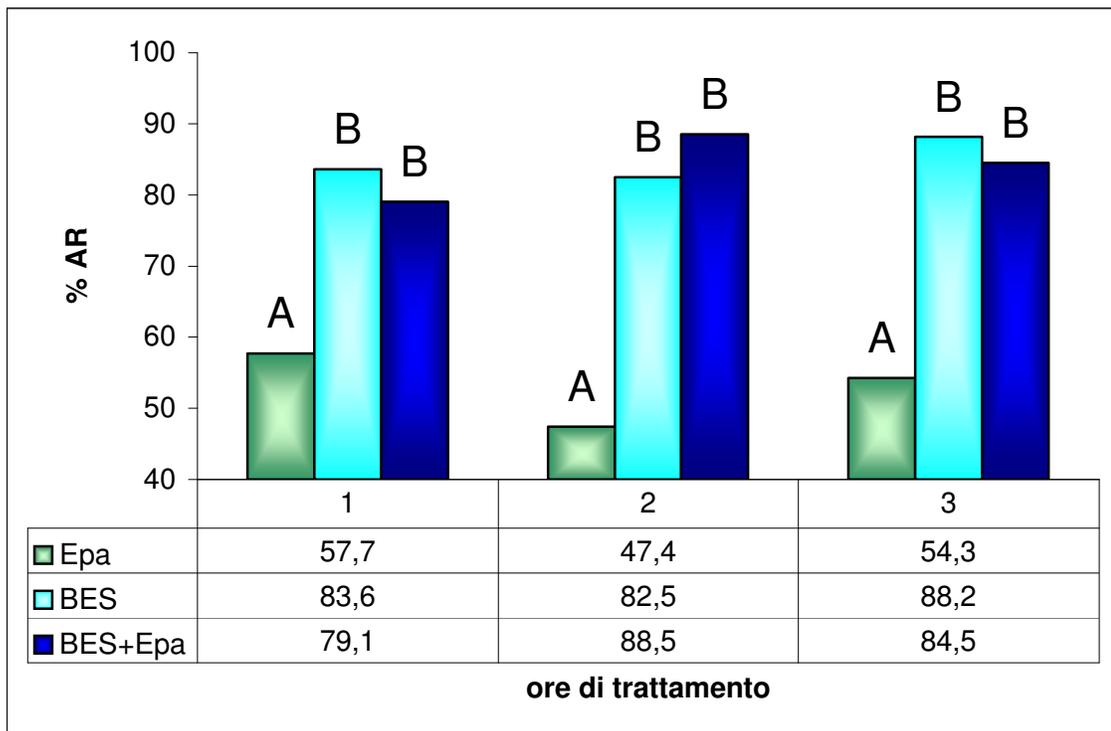
Nessuno spermatozoo morto è stato trovato nei gruppi, poiché la popolazione spermatica era stata precedentemente selezionata attraverso lo swim-up.

Al tempo 0 la reazione acrosomiale è stata osservata solo in una piccola proporzione di spermatozoi (15,3%); questo potrebbe essere dovuto sia ai danni che precedono la morte cellulare, sia alla capacitazione indotta dal congelamento.

All'interno di ciascun trattamento, il prolungamento del tempo di incubazione da 1 a 3 ore non ha modificato l'incidenza della reazione acrosomiale (grafico 2).

Un risultato importante di questo studio è che, sul totale dei risultati, il BES da solo o in combinazione con l'eparina, ha indotto la reazione acrosomiale in una proporzione di spermatozoi più alta ($P < 0.01$) rispetto all'eparina (grafico 2).

Grafico 2: Reazione acrosomiale (%) in spermatozoi trattati con Eparina, Bes, Eparina + Bes.



A, B, C valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente ($P < 0.01$)

ESPERIMENTO 4.2: Effetto del fluido follicolare sulla capacitazione in vitro di spermatozoi di bufalo.

Al momento dell'ovulazione, i componenti del fluido follicolare possono passare nell'ovidotto oppure essere associati ai complessi cumulo-oocita.

Il fluido follicolare di vari mammiferi possiede l'abilità di capacitare gli spermatozoi (Gwatkin and Anderson 1969; Yanagimachi, 1969a) e di indurre la reazione acrosomiale dopo incubazione in vitro (Yanagimachi 1969b; Lui et al, 1977).

Nel fluido follicolare bovino (Lenz et al, 1982) sono stati evidenziati fattori come l'albumina sierica bovina (Lui et al, 1977) e i glicosaminoglicani (Meizel and Turner, 1986), che iniziano la reazione acrosomiale negli spermatozoi capacitati di criceto, e che possono capacitare gli spermatozoi bovini (Parrish et al, 1988). È stata anche dimostrata l'influenza del fluido follicolare bovino sulla capacitazione in vitro di spermatozoi bovini (Tamara L. McNutt and Gary J. Killian, 1991).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'efficienza del fluido follicolare di bufala ad indurre la capacitazione in vitro di spermatozoi di bufalo.

MATERIALI E METODI

Il fluido follicolare (FF) è stato ottenuto da ovaie di bufale macellate. In laboratorio le ovaie sono state lavate ripetutamente con soluzione fisiologica supplementata di antibiotico, al fine di ridurre al minimo i rischi di contaminazione, poi si è proceduto all'aspirazione dei follicoli.

Il fluido follicolare è stato aspirato dai follicoli dominanti, utilizzando un ago del diametro di 18 Gauge collegato ad una pompa da vuoto mantenendo costante la pressione di aspirazione (40 mmHg) durante tutta la lavorazione. Successivamente il fluido è stato filtrato con filtro da 0.45 μ m e stoccato a -20°C fino al momento dell'uso.

Preparazione del seme

Spermatozoi congelati-scongelati di un toro precedentemente testato per l'TVF sono stati trattati con la procedura dello swim-up in modo da selezionare solo la popolazione mobile. Gli spermatozoi sono stati incubati: 1) in presenza di 0.01 mM di eparina (controllo) per 1 (N =1276), 2 (N = 1136) e 3 (N =1119) ore, 2) in presenza di 20% di FF per 1 (N = 455), 2 (N = 469) e 3 (N = 495) ore, 3) in presenza di 40% di FF per 1 (N = 465), 2 (N = 585) e 3 (N = 485) ore 4) in presenza di 60% di FF per 1 (N = 427),

2 (N = 476) e 3 (N = 471) e 5 in presenza di 80% di FF per 1 (N = 487), 2 (N = 433) e 3 (N = 483) ore.

Dopo l'incubazione con questi agenti, gli spermatozoi sono stati esposti per 15 minuti a 60 µg/ml di lisofosfatidilcolina come precedentemente descritto.

Fissazione e colorazione degli spermatozoi

Il seme è stato fissato e colorato mediante colorazione Trypan blue-Giemsa già descritta precedentemente (Kovács e Foote 1992) e la reazione acrosomiale è stata valutata mediante analisi microscopica.

ANALISI STATISTICA

Le differenze tra le percentuali di spermatozoi che presentavano reazione acrosomiale sono state analizzate mediante ANOVA.

RISULTATI

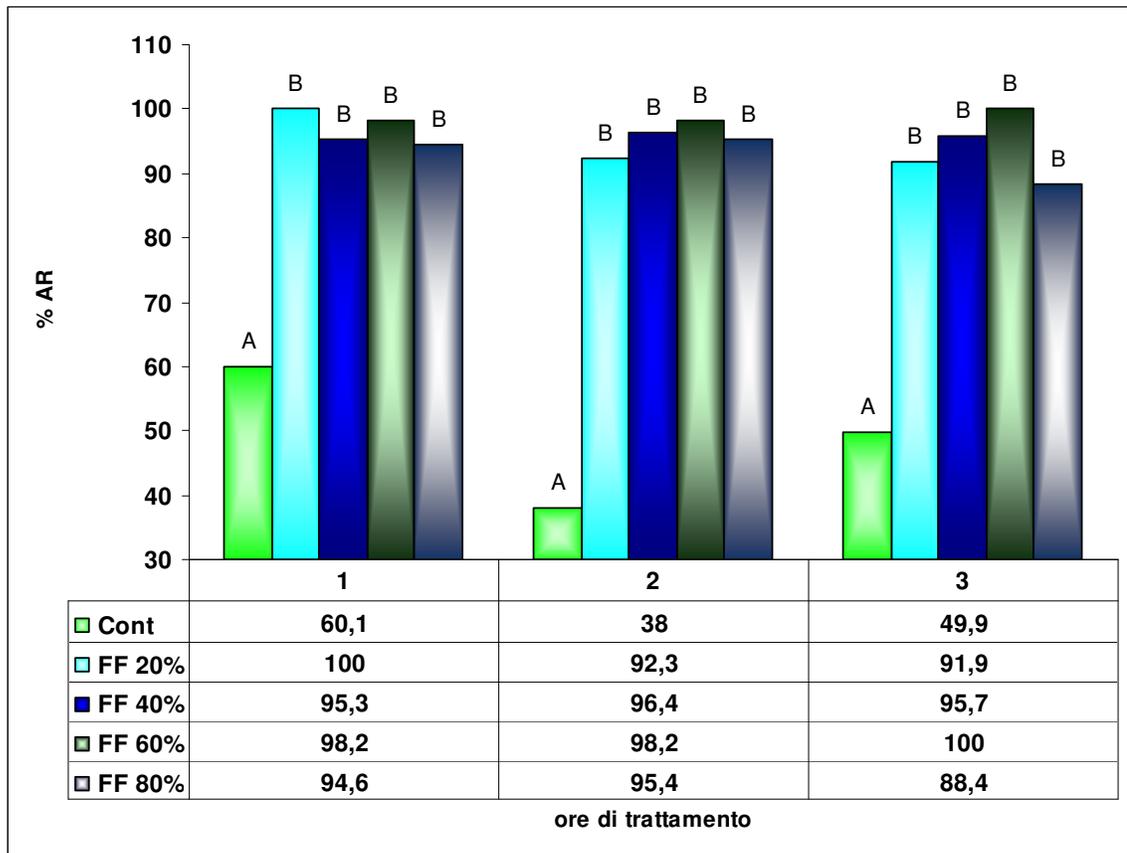
I risultati sono riportati nel grafico 3.

Anche in questo caso non sono stati trovati spermatozoi morti poiché la popolazione spermatica era stata precedentemente selezionata attraverso lo swim-up.

Nessuna differenza è stata trovata tra i tempi di incubazione

all'interno di ogni gruppo di trattamento. Il trattamento degli spermatozoi con fluido follicolare ha incrementato significativamente la percentuale di reazione acromiale ($P < 0.001$) rispetto all'eparina, indipendentemente dalla concentrazione utilizzata.

Grafico 3: Reazione acromiale (%) in spermatozoi trattati con eparina (Cont) o Fluido follicolare (FF).



A, B, C valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente ($P < 0.01$)

ESPERIMENTO 4.3: EFFETTO DEL NITROPRUSSIDE DI SODIO SULLA CAPACITAZIONE IN VITRO DEL SEME DI BUFALO .

INTRODUZIONE

Si ritiene che la capacitazione sia parte di un processo ossidativo e che l'anione superossido (O_2^-) sia richiesto per indurre la capacitazione del seme umano (de Lamirande and Gagnon, 1993), e degli spermatozoi di toro (O' Flaherty et al., 1997), mentre l' H_2O_2 è implicato nella capacitazione nel criceto (Bize et al., 1991) e negli spermatozoi umani (Griveau et al., 1994). Nei vari tipi cellulari, lo stato di riduzione intracellulare è importante nella regolazione degli enzimi presumibilmente addetti ai meccanismi di trasduzione dei segnali (Aitken et al., 1995; Hancock et al., 2001). Alle concentrazioni fisiologiche, l' O_2^- , l' H_2O_2 e l'ossido nitrico (NO) sono considerate le specie reattive principali che partecipano alle reazioni di riduzione nei vari processi biologici (Hancock et al., 2001). L'ossido nitrico è un gas biologicamente attivo, generato da quasi tutte le cellule dell'organismo (Nathan, 1992); per il relativo basso peso molecolare e la natura lipofilica, diffonde rapidamente attraverso le membrane lipidiche ed è implicato in una varietà di meccanismi di trasduzione di segnali cellulari fisiologici in molti tessuti, mediante attivazione della

guanililciclastasi (Lowenstein et al 1994). L'NO è sintetizzato in vivo, durante la conversione da l-arginina a l-citrulina dall'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS) usando l'O₂ e il NADPH come substrati (Moncada and Higgs, 1993). L'NO è stato rilevato nell'epididimo, nel testicolo (Zini et al, 1996) e nell'utero umani (Telfer et al, 1995), suggerendo che potrebbe partecipare alla maturazione e alla capacitazione dello sperma. La presenza dell'NO, inoltre, è stata evidenziata negli spermatozoi umani, di topo e di ariete (Lewis et al., 1996; Herrero et al., 1996; Funahashi, 2002).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare se il nitroprusside di sodio (SNP), un generatore di NO in vitro, migliora la capacitazione in vitro degli spermatozoi di bufalo.

MATERIALI E METODI

Preparazione del seme

Spermatozoi congelati-scongelati di un toro precedentemente testato per l'IVF sono stati trattati con la procedura dello swim-up in modo da selezionare solo la popolazione mobile. Gli spermatozoi sono stati incubati: 1) in presenza di 0.01 mM di eparina (controllo) per 1 (N = 266), 2 (N = 270) e 3 (N = 306) ore 2) in presenza di 0.1 µM di SNP per 1 (N = 255), 2 (N = 306) e 3 (N =

302) ore 3) in presenza di 1 μM di SNP per 1 (N = 259), 2 (N = 304) e 3 (N = 255) ore 4) in presenza di 10 μM di SNP per 1 (N = 302), 2 (N = 286) e 3 (N = 260) ore.

Dopo l'incubazione con questi agenti, gli spermatozoi sono stati esposti per 15 minuti a 60 $\mu\text{g/ml}$ di lisofosfatidilcolina, come precedentemente descritto.

Fissazione e colorazione degli spermatozoi

Il seme è stato fissato e colorato mediante colorazione Trypan blue/Giemsa già descritta precedentemente (Kovács e Foote 1992) e la reazione acrosomiale è stata valutata mediante analisi microscopica. La proporzione di spermatozoi che presentavano reazione acrosomiale in ogni gruppo è stata usata per valutare l'efficienza della capacitazione a differenti condizioni di incubazione.

ANALISI STATISTICA

Le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante test del chi Quadrato

RISULTATI

I risultati sono riportati nel grafico 4.

Nessuno spermatozoo morto è stato trovato nei gruppi, poiché la popolazione spermatica è stata precedentemente selezionata attraverso lo swim-up.

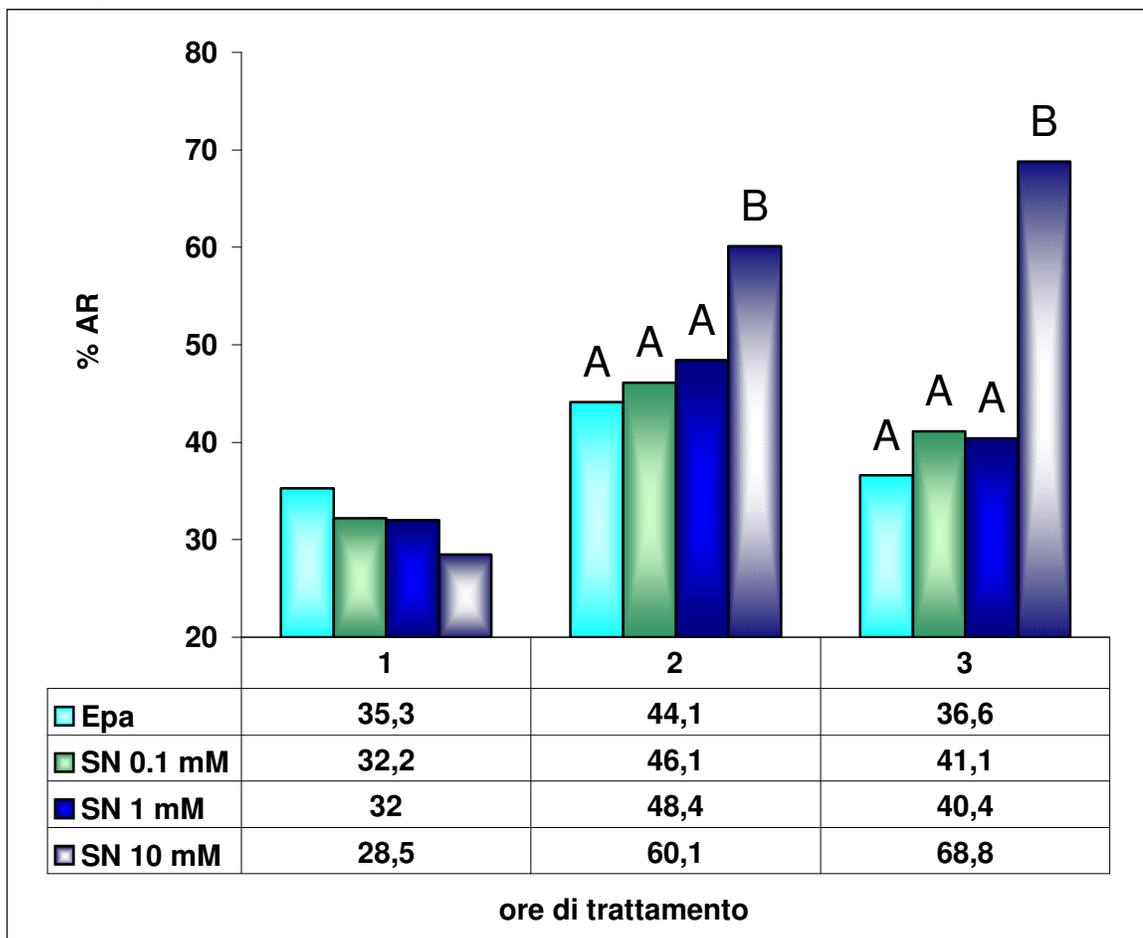
Alla prima ora di trattamento sia con eparina che con il Nitroprusside di sodio, la proporzione di spermatozoi che hanno mostrato reazione acrosomiale, è stata simile (grafico 4).

Prolungando il tempo di incubazione a 2 ore, il SNP ha incrementato significativamente ($P < 0.01$) la percentuale di reazione acrosomiale negli spermatozoi trattati ma solo alla maggiore concentrazione utilizzata.

Analogamente, quando il trattamento è stato prolungato a 3 ore, il SNP ha aumentato significativamente la proporzione di spermatozoi con reazione acrosomiale ($P < 0.01$) rispetto all'eparina (controllo).

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata nelle differenti concentrazioni utilizzate di SNP anche alla terza ora di trattamento.

Grafico 4: Reazione acromiale (%) in spermatozoi trattati con eparina (Cont) o Nitroprusside di sodio (SNP).



A B, C valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente ($P < 0.01$)

ESPERIMENTO 4.4: EFFETTO DEL PROGESTERONE ESOGENO SULLA CAPACITAZIONE IN VITRO DI SPERMATOZOI DI BUFALO.

INTRODUZIONE

Il progesterone secreto dalle cellule del cumulo o liberato con il liquido follicolare può agire sugli spermatozoi prima del legame con la zona pellucida (Andersen 1991).

Il progesterone è presente in alte concentrazioni nel liquido follicolare così come nella matrice del cumulo degli oociti (Osman et al 1989) rappresentando un possibile fattore stimolante il transito degli spermatozoi nel tratto genitale femminile e la fertilizzazione. Nel tratto genitale femminile è stato trovato in una forma legata alle proteine (Fehl et al 1995).

È stato studiato l'effetto del progesterone esogeno sulla capacitazione e sulla reazione acrosomiale degli spermatozoi bovini dopo scongelamento (Lukoseviciute et al 2004), evidenziandone l'effetto su entrambi i processi.

Alla luce di quanto detto, lo scopo del lavoro è stato quello di valutare se anche nella specie bufalina, il progesterone esogeno possa determinare un miglioramento della capacitazione in vitro negli spermatozoi trattati.

MATERIALI E METODI

Preparazione aliquote

Il progesterone (1mg/ml) è stato dissolto in etanolo per ottenere aliquote da 50 μ l (50 μ g/5 μ l).

Il solvente è stato selezionato dopo un' opportuna indagine preliminare per valutarne la tossicità confrontato con il DMSO (dimetilsulfossido).

Preparazione del seme

Spermatozoi congelati-scongelati di un toro precedentemente testato per l'IVF sono stati trattati con la procedura dello swim-up in modo da selezionare solo la popolazione mobile. In questo caso gli spermatozoi sono stati incubati: 1) in presenza di un medium privo di agenti capacitanti (controllo) per 1 (N = 272), 2 (N = 240) e 3 (N = 311) ore; 2) in presenza di 0.01 mM di eparina per 1 (N = 302), 2 (N = 342) e 3 (N = 301) ore ;3) in presenza di 0.1 μ g di P4 per 1 (N = 258), 2 (N = 326) e 3 (N = 303) ore ; 4) in presenza di 1 μ g di P4 per 1 (N = 305), 2 (N = 271) e 3 (N = 283) ore; 5) in presenza di 10 μ g di P4 per 1 (N = 285), 2 (N = 311) e 3 (N = 302) ore. Dopo l'incubazione con questi agenti, gli spermatozoi sono stati esposti per 15 minuti a 60 μ g/ml di lisofosfatidilcolina come precedentemente descritto.

Fissazione e colorazione degli spermatozoi

Il seme è stato fissato e colorato mediante colorazione Trypan blue/Giemsa già descritta precedentemente (Kovács e Foote 1992).

La reazione acrosomiale è stata valutata mediante analisi microscopica. La proporzione di spermatozoi che presentavano reazione acrosomiale in ogni gruppo è stata usata per valutare l'efficienza della capacitazione nelle differenti condizioni di incubazione.

ANALISI STATISTICA

Le differenze tra i gruppi delle percentuali di spermatozoi capacitati sono state analizzate mediante test del chi Quadrato.

RISULTATI

I risultati sono riportati nel grafico 5.

Nessuno spermatozoo morto è stato trovato nei gruppi, poiché la popolazione spermatica era stata precedentemente selezionata attraverso lo swim-up.

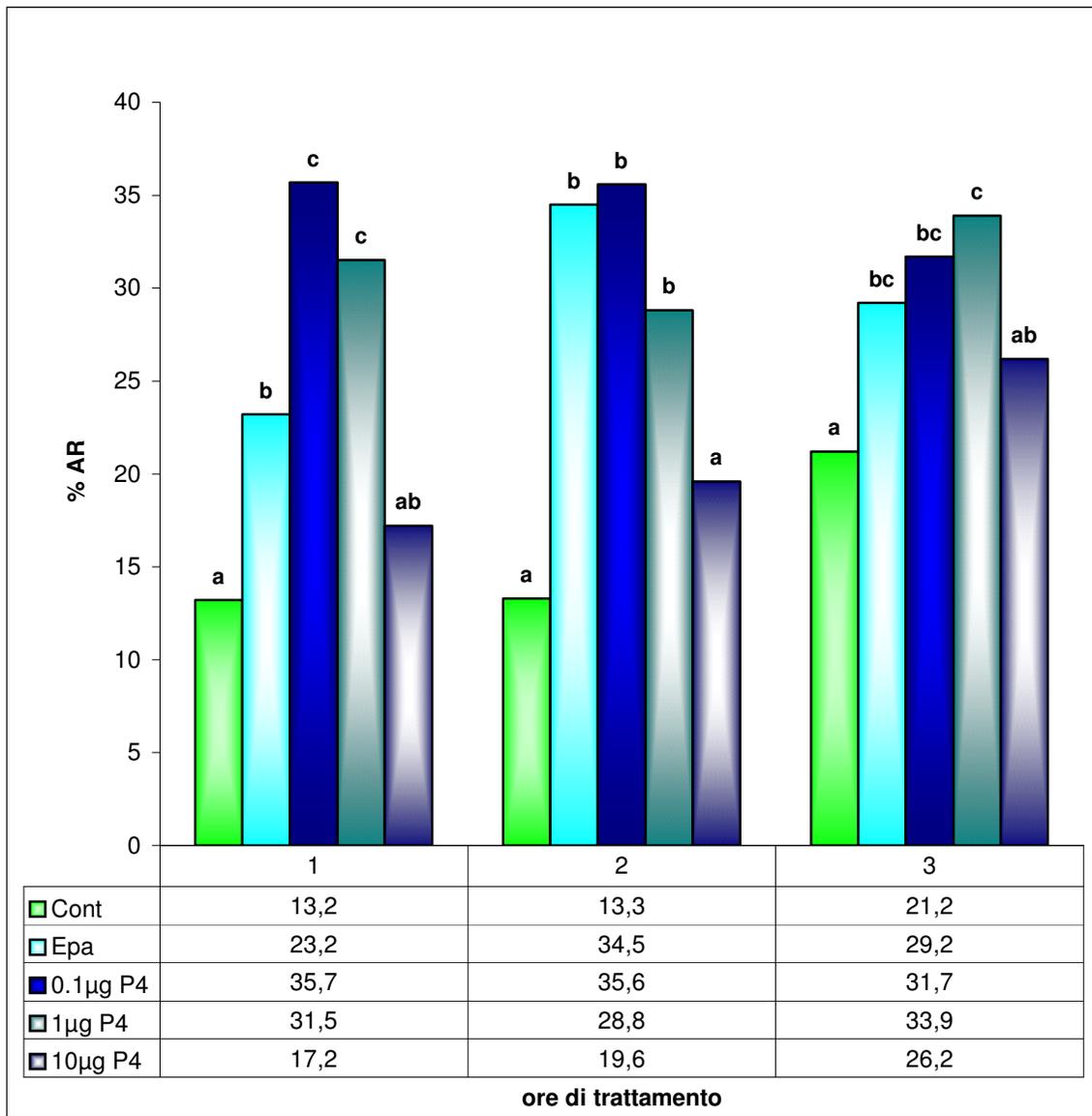
Alla prima ora, sia il trattamento con eparina che con progesterone alle concentrazioni di 0.1 μ g e 1 μ g hanno incrementato significativamente ($P < 0.05$) la percentuale di

reazione acrosomiale rispetto al controllo. Inoltre le due concentrazioni intermedie di progesterone utilizzate hanno aumentato ulteriormente la proporzione di reazione acrosomiale ($P < 0.05$) anche rispetto all'eparina. Invece il trattamento degli spermatozoi alla concentrazione di $10\mu\text{g}$ di P4 è stato simile sia al controllo che all'eparina.

Alla seconda ora, invece, sia il trattamento con eparina che quello con progesterone alle due concentrazioni più basse hanno incrementato significativamente la reazione acrosomiale ($P < 0.05$) rispetto al controllo ma con valori simili tra i gruppi considerati. Anche alla seconda ora di trattamento la concentrazione più alta di P4 ha presentato valori simili al controllo.

Alla terza ora di trattamento si è osservato che, come per le due ore precedenti, sia l'eparina che il progesterone alle due concentrazioni più basse utilizzate hanno determinato un aumento significativo ($P < 0.05$) di reazione acrosomiale rispetto al controllo. Non sono però emerse differenze statisticamente significative tra i gruppi trattati con il P4 e l'eparina.

Grafico 5: Reazione acrosomiale (%) in spermatozoi trattati con eparina (Epa), Progesterone (P4) o in medium privo di agenti capacitanti (Cont)



a, b, c, d valori contraddistinti da lettere diverse, all'interno di una stessa colonna, sono diversi significativamente ($P < 0.05$)

DISCUSSIONE

Nel bufalo, in generale, l'efficienza della produzione embrionale in vitro è più bassa rispetto al bovino, come risultato di una più bassa percentuale di cleavage. Il migliore sviluppo embrionale ottenuto con l'attivazione chimica degli oociti indotta dall'etanolo rispetto all'IVF suggerisce che l'IVF rappresenta una fase critica della tecnologia IVEP in questa specie, che dunque deve essere ottimizzata per migliorare la produzione embrionale.

Non è possibile escludere che il processo di capacitazione richiesto dagli spermatozoi per acquisire la capacità fecondante sia compromesso nel processo di IVF.

Sebbene molti agenti siano stati provati per indurre la capacitazione in vitro, l'eparina è ancora il metodo più efficiente ed utilizzato nella maggioranza delle specie, inclusa quella bufalina.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di confrontare l'efficacia di differenti sostanze ad indurre la capacitazione degli spermatozoi di bufalo in vitro.

L'avvenuta capacitazione è stata valutata indirettamente, stimando la capacità degli spermatozoi ad andare incontro alla reazione acrosomiale dopo incubazione con lisofosfatidilcolina, un lipide fusogenico capace di indurre la reazione acrosomiale

solo negli spermatozoi capacitati (Parrish JJ et al 1998).

Come abbiamo già detto diversi fluidi biologici esplicano un'azione sulla capacitazione in vitro, dunque negli esperimenti 4.1 e 4.2 abbiamo voluto testarne due diversi.

Nell'esperimento 4.1 abbiamo testato l'effetto del siero di bufala in estro, ed abbiamo evidenziato come sorprendentemente la co-incubazione degli spermatozoi di bufalo con il siero, sia in presenza che in assenza di eparina, ha incrementato notevolmente ($P < 0.01$) la percentuale di capacitazione negli spermatozoi trattati rispetto all'eparina, che è l'agente capacitante maggiormente utilizzato nelle specie domestiche, compreso il bufalo. È importante specificare che nei nostri studi l'eparina è stata usata alla stessa concentrazione utilizzata di routine nel nostro sistema di IVF.

Nell'esperimento 4.2 il trattamento degli spermatozoi con fluido follicolare ha incrementato significativamente la percentuale di reazione acromiale ($P < 0.01$) rispetto all'eparina indipendentemente dalla concentrazione utilizzata e dalle ore di trattamento. Questo dato è risultato in accordo con lavori precedentemente scritti da altri autori che riportavano la capacità del fluido follicolare di diverse specie di mammifero ad indurre la capacitazione spermatica (Gwatkin and Anderson, 1969;

Yanagimachi, 1969a).

Ricordiamo inoltre che nella specie bovina è stato dimostrato che il fluido follicolare contiene fattori come l'albumina sierica bovina (Lui et al., 1977) e i glicosaminoglicani (Meizel and Turner, 1986) che giocano un ruolo importante nel processo di capacitazione. I risultati ottenuti nel presente lavoro suggeriscono che alcuni fattori del fluido follicolare abbiano un ruolo determinante nell'induzione dei meccanismi molecolari coinvolti nel processo di capacitazione del seme di bufalo.

Nell'esperimento 4.3 testando l'effetto del nitroprusside di sodio sulla capacitazione in vitro di spermatozoi di bufalo abbiamo dimostrato che anche in questa specie l'NO partecipa ad una serie di eventi implicati nel processo di maturazione e di capacitazione spermatica, come riportato in altre specie (Lewis et al., 1996; Herrero et al., 1996; Funahashi, 2002). Infatti l'azione promuovente la capacitazione degli spermatozoi di bufalo di questa sostanza è stata evidente alla seconda e alla terza ora di trattamento con un miglioramento rispetto all'eparina. Probabilmente in questo caso è stato importante prolungare il trattamento per diverse ore per una valutazione più accurata dell'effetto tempo-trattamento.

Analogamente al nitroprusside di sodio anche il progesterone ha

incrementato significativamente ($P < 0.05$) la proporzione di spermatozoi capacitati rispetto all'eparina (esperimento 4.4) ma solo alla prima ora il che farebbe presupporre che il progesterone esogeno probabilmente esplica la sua azione sulla capacitazione spermatica in tempi relativamente rapidi. Infatti questo effetto significativo è stato meno evidente alle ore successive di trattamento, laddove probabilmente l'eparina ha raggiunto la sua massima azione capacitante.

I risultati di quest'ultimo esperimento, non differiscono da quanto riportato nella specie bovina (Lukoseviciute et al 2004) in cui era stato comunque dimostrato l'effetto di questa sostanza sulla capacitazione spermatica, seppure con risultati differenti dal nostro per quanto concerne la concentrazione utilizzata di progesterone. Infatti nella specie bovina gli effetti migliori erano stati ottenuti alla concentrazione più alta di progesterone utilizzata ($10\mu\text{g/ml}$) ed alla terza ora di trattamento.

In conclusione, dunque, possiamo affermare che altre sostanze possono essere utilizzate per la capacitazione del seme in vitro nella specie bufalina.

Sarebbe necessario, comunque, ampliare la casistica dei risultati ma soprattutto investigare l'effetto dell'aggiunta di tali sostanze al sistema di IVF per valutare eventuali interazioni con gli oociti e

miglioramenti delle percentuali di cleavage e di blastocisti.

Tutto ciò sarebbe particolarmente interessante soprattutto per quanto riguarda l'effetto del siero di bufala in estro. Infatti i risultati ottenuti ci incoraggiano a testare questa sostanza nel medium di fertilizzazione analogamente a quanto già avviene nella pecora, laddove l'eparina nel medium di fertilizzazione è stata già da anni sostituita dal siero di pecora in calore.

Alla luce di quanto dimostrato si può ipotizzare che una inadeguata capacitazione spermatica potrebbe essere uno dei fattori responsabili delle basse percentuali di cleavage riportate in questa specie.

CAP. 5

CONCLUSIONI

Il bufalo è una risorsa di bestiame fondamentale per molti sistemi ecologicamente svantaggiati. In Italia, invece, il bufalo di razza Mediterranea Italiana è importante per l'economia locale grazie alla sua alta produzione di latte e la sua genetica molto richiesta nel mondo.

Al momento l'IVEP rappresenta il miglior modo per accelerare il progresso genetico per via materna, a causa delle limitazioni ormai provate dei programmi della MOET in questa specie (Zicarelli 1997, Misra et al 1997).

Sebbene l'efficienza dell'IVEP sia enormemente aumentata in questi ultimi anni (Gasparrini et al 2002, Gasparrini et al 2004) e siano state ottenute gravidanze a termine (Madan et al 1994a, Neglia et al 2004), diverse questioni ancora restano aperte.

La prima è che l'efficienza complessiva dell'IVEP è originariamente compromessa dal basso cleavage di solito registrato in questa specie (Neglia et al 2003). Un altro grande problema è rappresentato dalla scarsa congelabilità degli embrioni bufalini prodotti in vitro, che potrebbe essere il risultato di condizioni subottimali durante la coltura.

Lo scopo di questo lavoro è stato dunque, quello di individuare le possibili cause del basso cleavage in questa specie, analizzando criticamente due delle fasi principali, ovvero la maturazione e la fecondazione.

Nella prima parte del lavoro abbiamo focalizzato l'attenzione sulla fase di maturazione degli oociti di bufalo allo scopo di approfondire lo studio della cinetica della progressione meiotica durante la IVM, di analizzare, nel corso dell'IVM del bufalo, l'attività dell'MPF e delle MAP chinasi, di individuare il momento ottimale per eseguire l'IVF in questa specie e di verificare l'influenza dell'aggiunta di composti tiolici al medium di IVM.

I risultati ottenuti in questa prima fase ci hanno chiarito alcuni aspetti prima non noti in questa specie e necessari all'individuazione di alcuni parametri indispensabili all'ottimizzazione della procedura.

Infatti abbiamo dimostrato che la maturazione nucleare avviene tra le 20 e le 24 ore dalla IVM, e che questo lasso di tempo è quindi il migliore per effettuare la IVF tenendo in considerazione anche che, come in altre specie, l'attività delle MAP chinasi è risultata correlata alla progressione meiotica e quindi all'avvenuta maturazione. Sarebbe consigliabile anticipare l'intervento di IVF piuttosto che ritardarlo, visto che a partire dalle 24 ore è stato

dimostrato un peggioramento dell'efficienza riferibile all'invecchiamento del gamete femminile.

Il risultato sicuramente più importante ottenuto nella prima parte del lavoro è quello dell'esperimento 4, laddove abbiamo voluto verificare l'influenza dell'aggiunta di cistina al medium di IVM in cui era già presente un altro composto tiolico (cisteamina). Infatti abbiamo dimostrato che, similmente ad altre specie, l'aggiunta di composti tiolici gioca un ruolo importante nella protezione delle cellule dai danni ossidativi grazie alla sintesi di glutatione. Inoltre a differenza di quanto si verificava con l'utilizzo della sola cisteamina, l'uso di cistina ha migliorato anche le percentuali di cleavage (raggiungendo valori medi del 75%), probabilmente favorendo la formazione del pronucleo maschile. Questo è un risultato importante, in quanto, come dicevamo, la bassa percentuale di cleavage generalmente registrata nel bufalo è un fattore importante che limita l'efficienza dell'IVEP in questa specie.

Nella seconda parte del lavoro, invece, si è ritenuto interessante, indagare alcuni fattori che possono essere responsabili della bassa efficienza di fertilizzazione in vitro nella specie bufalina. In particolare il lavoro è stato finalizzato a valutare la qualità del seme congelato di tori diversi, stabilire il miglior tempo di co-

incubazione dei gameti, confrontare diversi terreni e fattori di motilità spermatica, e testare diversi agenti capacitanti in vitro.

È stata dimostrata la possibilità di effettuare uno screening preliminare di ogni singolo toro prima di farne un uso regolare nella procedura IVEP, grazie all'utilizzo di una colorazione molto semplice ed economica quale quella Trypan Blue/Giemsa, sebbene il miglior modo per testare un toro resta ancora quello di valutare l'effettiva capacità fecondante in vitro.

Un altro fattore che si è ritenuto interessante investigare è stato il tempo ideale di co-incubazione dei gameti in questa specie, e nell'esperimento 2 (parte seconda) abbiamo dimostrato che l'incubazione dei gameti per almeno 16 ore risulta necessaria ed è preferibile non estenderne la durata oltre questo tempo.

Abbiamo anche dimostrato che il medium Talp da noi utilizzato è idoneo a sostenere il processo di fertilizzazione dando risultati migliori rispetto all'altro medium utilizzato di routine nella IVF del bufalo (BO).

Sicuramente i risultati più importanti della seconda parte del lavoro sono stati quelli ottenuti nell'esperimento 4 laddove abbiamo testato sostanze alternative all'eparina per la capacitazione del seme. Risultati davvero soddisfacenti si sono avuti dall'utilizzo di fluidi biologici (esperimenti 4.1 e 4.2) che

hanno migliorato notevolmente le percentuali di spermatozoi capacitati.

Tutto ciò ci lascia presupporre che lo stesso effetto si potrebbe ottenere anche con l'utilizzo di questi fluidi direttamente nel medium di fertilizzazione, lasciando quindi aperto un nuovo canale di ricerca che andrebbe sicuramente esplorato per ottimizzare ulteriormente l'efficienza della produzione embrionale in vitro nella specie bufalina.

BIBLIOGRAFIA

Abdon ASS, Kandil OM, Otoi T Suzuki T. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotrooin on cleavage rate and development of in vitro fertilized buffalo embryos. Anim Reprod Sci 2001; 65: 215-223.

Abeydeera L. R., Wang W. H., Cantley T. C., Prather R. S., Day B. N. Glutathione content and embryo development after in vitro fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. Zygote 1999; 7: 203-210;

Aitken JR. A free radical theory of male infertility. Reprod Fertil Dev 1994;6:19-24

Aitken RJ, Peterson M, Fisher H, Buckingham D, Van Duin M. Redox regulationof tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its rule in the control of human sperm function. J Cell Sci. 1995;198, 2017-2025.

Andersen CY: Concentrations of free oestradiol and progesterone in human preovulatory follicular fluid. *Hum Reprod* 1991;6, 359-364.

Bacci M.L., Galeati G., Mattioli M., Boni R., Seren E. In vitro maturation and in vitro fertilization of buffalo oocytes. *Proc III World Buffalo Congress, Varna 1991*,: 599-603.

Ball G.D., Leibfried M.L., Lenz R.W., Ax R.L., Bavister B.D., First N.L. Factors affecting successful in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1983;28:717-725.

Bannai S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochem Biophys Acta* 1984; 779:289-306;

Barnabe VH. Collection and evaluation of the sperm. Third course on biotechnology of reproduction in buffaloes, 1997;125-128.

Baruselli P.S, Mucciolo R.G, Visintin J.A ,Viana W.G, Arruda R.P, Madureira E.H, Oliveira C.A, Molero-Filho J.R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Theriogenology* 1997 JUn;47(8):1531-47.

Bedford J. M.: Sperm capacitation and fertilization in mammals.

Biol. Reprod. 1970;Suppl. 2: 128-158

Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. Biol

Reprod 1991;44:398-403.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA.

Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biol Reprod

2002;66:38-43.

Boatman DE, Robbins RS. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility and acrosome

reactions. Biol reprod 1991; 44: 806-813.

Boni R, Di Palo R, Barbieri V, Zicarelli L. Ovum pick-up in deep anestrus buffaloes. Proc IV World Buffalo Congress 1994a; 3:

480-482.

Boni R, Roviello S, Barbieri V, Zicarelli L. In vitro embryo production in buffalo species. Atti XLVIII Convegno Nazionale SISVET 1994b;1:307-312.

Boni R, Roviello S, Gasparrini B, Langella M, Zicarelli L. In vitro production of buffalo embryos in chemically defined medium. Buffalo J 1999;1:115-120.

Boni R, Sangella L, Dale B, Roviello S, Di Palo R, Barbieri V. Maturazione in vitro di oociti bufalini: indagine ultrastrutturale. Acta Med Vet 1992;38:153-61.

Boni R. In vitro production in bovine and buffalo species. Buffalo J. 1994, supplement 2:147-160.

Boni R., Roviello S., Gasparrini B., Zicarelli L. Pregnancies established after transferring embryos yielded by Ovum Pick-Up and in vitro embryo production in Italian buffalo cows. V World Buffalo Congress, Caserta, 1997: 787-792.

Boni R., Wurth Y.A., Roviello S., Barbieri V., Kruip TH.A.M.. Effetto della distanza tra prelievo e recupero sulle

caratteristiche morfologiche e sull'efficienza di produzione embrionale in vitro di oociti prelevati mediante Ovum Pick-up. Proc. XLVII S.I.S.Vet 1993. 1: 475-480.

Boni R., Zicarelli L., Kruip Th.A.M. Impact of ovum pick-up (OPU) technique for research and animal breeding. Proc Symp "Reproduction & animal breeding advances and strategy", 1995: 211-221.

Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biology of Reproduction 1975: 12, 260-274.

Calvin H. I., Grosshans K., Blake E. J. Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries and ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg . Gamete Res 1986; 14:265-275;

Campanile G., Neglia G., Gasparri B., Galiero G., Prandi A., Di Palo R., D'Occhio MJ. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. Theriogenology 2005 Maggio;63(8):2334-40.

Caracciolo di Brienza V., Neglia G., Masola N., Gasparri B., Di Palo R., Campanile G. Produzione embrionale in vitro in media chimicamente definiti. Atti I Congresso Nazionale sull'allevamento del Bufalo, Eboli (SA), Italia, Ott. 3-5 2001: 341-344.

Carrel D.T., Middleton R.G., Peterson C.M., Jones K.P., Urry R.L. Role of the cumulus in the selection of the morphologically normal sperm and induction of the acrosome reaction during human in vitro fertilization. Arch Androl 1993;31: 133-137.

Cereser C, Guichard J, Draï J, Bannier E, Garcia I, Boget S, et al. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. J Chromatogr B 2001;752(1):123-32.

Chantareprateep P., Lohachit C., Techakumphu M., Kobayashi G., Virakul P., Kunayongkrit A., Prateep P., Limskul A. Early embryonic development in thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 1989; 31, No. 6: 1131-1139.

Chauhan M.S., Katiyar P.K., Singla S.K., Manik R.S., Madan M.L.
Production of buffalo calves through in vitro fertilization. Ind.
J. Anim. Sci. 1997a; 67: 306-308.

Chauhan M.S., Manik R.S., Singla S.K., Katiyar P., Madan M.L.
Effect of insulin on in vitro development of in vitro produced
embryos in co-culture sistem. Ind. J. Anim. Prod . Manag.
1997b ;13: 19-24.

Chauhan M.S., Palta P., Das S.K., Katiyar P., Madan M.L.
Replacement of serum and hormone additives with follicular
fluid in the IVM medium: effect on maturation, fertilization and
subsequent development of buffalo oocytes in vitro.
Theriogenology 1997c;48: 461-469.

Chauhan M.S., Singla S.K., Palta P., Manik R.S., Madan M.L. In
vitro maturation and fertilization, and subsequent development
of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryo: effects of oocytes quality
and type of serum. *Reprod. Fertil. Dev.* 1998;10: 173-177.

Cheng FP., Fazeli A., Voorhout W. F., Marks A., Bevers M.M., Colenbrander B.:Use of PNA (Peanut agglutinin) to assess the acrosomal status and the zona pellucida induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J. Androl.* 1996;17: 674-682.

Chesnel F., Eppig JJ. Induction of precocious germinal vesicle breakdown (GVB) by GVB-incompetent mouse oocytes: possible role of mitogen-activated protein kinases rather than p34cdc2 kinase *Biol Reprod.* 1995 Apr;52(4):895-902.

Chian R.C., Park C.K., Sirard M.A. 1996. Cumulus cells act as a sperm trap during in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 258.

Chian RC, Niwa K, Nakahara H. Effect of sperm penetration in vitro on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J Reprod Fertil* 1992;96:73-8

Chuangsoongneon U., Kamonpatana M. Oocyte maturation, in vitro fertilization and culture system for developing preimplantation Swamp buffalo embryos using frozen-thawed semen. *Buffalo J* 1991;7: 189-198.

Cox J.F., Hormazabal J., Santa Maria A. Effect of cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology* 1993; 40: 1259-1267.

Cross N. L., Meizel S.: Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.* 1989 41: 635-641.

Danell B. "Oestrus behaviour, ovarian morphology and cyclic variations in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers" PhD thesis (Sveriges Lantbruksuniversitet: Uppsala, Sweden), 1987

Das G.K., Jain G.C., Solanki V.S., Tripathi V.N. Efficacy of various collection methods for oocytes retrieval in buffalo. *Theriogenology* 1996;46: 1403-1411.

De Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biol Med* 1993;14: 157-166.

De Matos D. G., Gasparrini B., Pasqualini S. R., Thompson J. G.
Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 2002; 57: 1443-1451;

De Matos D.G., Furnus C.C. The importance of having high glutathione level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53 (3): 761-771.

De Matos D.G., Furnus C.C., Moses D.F., Martinez A.G., Matkovic M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Molec. Reprod. Dev.* 1996;45: 451-457.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1995 Dec;42(4):432-6.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 1997;57:1420-5.

Del Corso A, Cappiello M, Mura U. Thiol-dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int J Biochem* 1994;26:745-50.

Dominko T, First NL. Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence and is affected by gonadotrophins. *Theriogenology* 1992;37:203

Dominko T, First NL. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 1997;47:456-67.

Dozortsev D., Rybouchkin A., Desutter P. Qian C., Dhont M. Human oocyte activation following intracytoplasmic sperm injection the role of the sperm cell. *Hum. Reprod.* 1995;10, 403-407.

Duran DH., Pedro PB., Venturina HV., Hufana RD., Salazar AL., Duran PG. and Cruz LC. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 2004; 61: 1429-1439.

Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965;196:349-51.

Eliasson R., Treichl L.: Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 1971;22: 134-137.

Eppig J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:485-9.

Erickson B.H. Developmental and senescence of post-natal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 1966;25: 800-805.

Ericsson S.A., Garner D.L., Thomas C.A., Downing T.W., Marshall C. E.: Interrelationships among fluorometric analyses of

spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine sperm atozoa. *Theriogenology* 1993;39: 1009-1024.

Fehl P, Miska W, Henkel R. Further indications of the multi-component nature of the acrosome reaction-inducing substance of follicular fluid. *Mol Reprod Dev* 1995;42, 80-88.

Feugang JM, De Roover R, Moens A, Le´onard S, Dessy F, Donnay I. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology* 2004;61:71-90.

First NL, Leibfried-Rutledge ML, Sirard MA. Cytoplasmic control of oocyte maturation and species differences in the development of maturational competence. *Prog Clin Biol Res.* 1988;267:1-46.

Fissore R.A., Pinto-Correia C, Robl J.M. Inositol trisphosphate induced Ca^{++} release in the generation of calcium oscillations in bovine eggs. *Biol. Reprod.* 1995;53, 766-774.

Fulka J, motlikJ. In vitro maturation. In: Proceedings of the Ninth International Congress of Animal reproduction and Artificial insemination, Madrid, vol. 2,1980:55-62.

Funahashi H. Induction of capacitation and the acrosome of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system. *Reproduction* 2002;124, 857-864.

Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day B. Use of low-salt culture medium with elevated oocyte glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1994;51:633-863.

Galli C., Duchi R., Crotti G., Lazzari G. Embryo production by Ovum pick-up in Water Buffalo. *Theriogenology* 1998;50: 259.

Gardner D.K., Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum free media. *Human Reprod.* 1998;13: 101-102.

- Garner D. L., Johnson L. A., Yue S. T., Roth B. L., Haugland R. P.
Dual staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 1994;15: 620-629.
- Garner D. L., Pinkel D., Johnson L. A., Pace M. M.: Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 1986;34: 127-138.
- Gasparrini B, Boccia L, De Rosa A, Monaco E, Di Palo R, Zicarelli B. Effects of cystine during in vitro maturation on embryo development in buffalo species. In: Second International Meeting on Veterinary Morpho-functional Biotechnologies, July 1-3; 2004. p. 3.
- Gasparrini B. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. Proc. Annual Conference International Embryo Transfer Society, Foz do Iguassu, Parana, Brasil. *Theriogenology* 2002; 57: 237-256.
- Gasparrini B. Optimizing reproduction in buffalo through application of biotechnology. In: 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR) 2004; p. 7-12.

Gasparri B., Boccia L., Marchandise J., Di Palo R., George F., Donnay I., Zicarelli L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds : effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* 2006 Jan 20; 65(2): 275-87.

Gasparri B., Neglia G., Caracciolo di Brienza V., Campanile G., Di Palo R. and Zicarelli L. Preliminary analysis of vitrified in vitro produced embryos. Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Omaha, Nebraska, USA, January 13-16. *Theriogenology* 2001; 55: 307.

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

Gasparri B., Sayoud H., Neglia G., de Matos D., Donnay I., Zicarelli L. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 2003; 60: 943-952.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Tosti E, Panzella S. Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in vitro fertilization improves the implantation rate. *Hum Reprod* 1996;11:166-71.

Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol reprod* 1985; 32: 145-153.

Gospodurowicz D. e Birwell C.R. *Endocrinology* 1977;100, 1108-1120.

Graham, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 1996;12: 119-130.

Grazyna Ptak, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P. Offspring from One-Month-Old Lambs: Studies on the Developmental Capability of Prepubertal Oocytes. *Biology Of Reproduction* 1999;61, 1568–1574.

Griveau JF, Renard P, Le Lannou D. An in vitro promoting role for Hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Andrology* 1994;17, 300-307.

Gupta PSP, Nandi S, Ravindranatha BM, Sarma PV. In vitro maturation of buffalo oocytes with epidermal growth factor and fibroblast growth factor. *Ind J Anim Sci* 2002; 72: 20-23.

Gwatkin RBL, Anedersen OF. Capacitation of hamster spermatozoa by bovine follicular fluid. *Nature*. 1969;224:1111-1112.

Hancock J, Desikan R, Nell S. Role of oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 2001;29,345-350.

Handrow RR, First NL, Parrish JJ. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J Exp Zool* 1989; 252:174-182.

Harrison R.A.P., Vickers S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1990;88: 343-352.

Herrero MB, Perez Martinez S, Viggiano M, Polak JM, Gimeno MF. Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1996;8,931-934.

Homa S.T. and Swann K. A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarization in human oocytes. *Hum Reprod.* 1994;9, 2356-2361.

Hunter RHF, Greve T. Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod Domest Anim* 1997;32:137-42.

Hunter RHF. Aging of the unfertilized cow egg in vivo: how soon is fertility compromised. *Vet Rec* 1989;124:489-90.

Jainudeen M.R., Takahashi Y., Nihayah M., Kanagawa H. In vitro maturation and fertilization of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 1993 31: 205-212.

Jasko D.J., Little, T.V., Smith, K., Lein, D.H., Foote R.H.:
Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology*
1988;30: 1159-1167.

Katska L. Comparison of two methods for recovery of ovarian
oocytes from slaughter cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 1984;7: 461-
463.

Kaul G, Sharma GS, Singh B and Gandhi KK. Capacitation and
acrosome reaction in buffalo bull spermatozoa assessed by
chlortetracycline and *Pisum sativum* agglutinin fluorescence
assay. *Theriogenology* 2001;55: 1457-1468.

Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA. Influence of the
duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and
sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Anim
Reprod Sci* 2003;77:33-49.

Kovacs A., Foote R.H.: Viability and acrosome staining of bull,
boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnic and Histochemistry*
1992;67:119-124.

Kruip Th. A.M. Follicle-oocyte relationship in cattle – A search to an alternative method for oocyte maturation and embryo production in vitro. Supplement to the N° 4 of *Bubalus Bubalis* 1997.

Kumar A., Solanki V.S., Jindal S.K., Tripathi V.N., Jain G.C. Oocytes retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. *Anim. Reprod. Sci.* 1997;47: 189-195.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lafleur MVM, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ, Retel J. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Radic Res* 1994;21:9–17.

Lay Y.M., Stein D.F., Soong Y.K., Tang Y.X., Grifo J., Malter H.E., Talansky B.E., Cohen J., Liu H.C., Rosenwaks Z. Evaluation of Vero cell co-culture system for mouse embryos in various media. *Hum. Reprod.* 1992;7: 276-280.

Lenz RN, Ax RL, Grimek HJ, First NL. Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances an acrosome reaction in bovine sperm. *Biochem Biophys Res Comm.* 1982; 106: 1092-1098.

Lewis SEM, Donneily ET, Sterling ESL, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U. Nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum. Reprod.* 1996;2,873-878.

Lim J. M., Liou S. S., Hansel W. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 1996; 46: 429-439.

Long CR, Damiani P, Pinto-Correia C, Maclean LA, DUBY RT, Robl JM. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *J Reprod Fertil.* 1994 Nov;102(2):361-9.

Lowenstein CJ, Dinerman J, Snyder SH. Nitric Oxide a physiologic messenger. *Ann. Int. Med.* 1997;120, 227-237.

Lu K. H., Gordon I., Gallagher M., Mc Govern H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* 1987;121: 259-260.

Lui CN, Cornett LE, Meizel S. Identification of the bovine follicular protein involved in the in vitro induction of the hamster sperm acrosome reaction. *Biol Reprod.* 1977; 17:34-41.

Lukoseviciute K, Zilinskas H, Januskauskas A. Effect of Exogenous Progesterone on Post-thaw Capacitation and acrosome reaction of bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 2004;39,154-161.

Madan M.L., Chauhan M.S., Singla S.K., Manik R.S. Pregnancies established from Water buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts derivad from in vitro matured, in vitro fertilized oocytes and co-cultured with cumulus and oviductal cells. *Theriogenology* 1994a;42: 591-600.

Madan M.L., Das S.K., Palta P. Application of reproductive technologies to buffaloes. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42: 299-306.

Madan M.L., Singla S.K., Chauhan M.S., Manik R.S. In vitro production and transfer of embryos in buffaloes. *Theriogenology* 1994b;41: 139-143.

Magistrini M., Guitton E., Levern Y., Nicolle J. C., Vidament M., Kerboeuf D., Palmer E.: New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology* 1997;48: 1229-1235.

Magistrini M., Vidament M., Clement F., Palmer E.: Fertility prediction in stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42: 181-188.

Marston JH, Chang MC. The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. *J Exp Zool* 1964;15:237-51.

Mattioli M. Molecular aspectz of gonadotropin-induced oocyte maturation. Supplement to the N° 4 of *Bubalus bubalis* 1997.

McNutt TL, Killian GJ. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation in vitro. *J Androl* 1991; 12: 244-252.

Meizel S, Turner KO. Glicosaminoglycans stimulate the acrosome reaction of previously capacitated hamster sperm. *J Exp Zool.* 1986 237:137-139.

Meur S.K., Roy S.B., Mohan G., Dhoble R.I. Cryogenic changes in seminal proteins of cattle and buffalo. *Theriogenology* 1988; 30: 1005-1010.

Misra A.K. Application of biotechnologies to buffalo breeding in India. Third course on Biotechnology of Reproduction in buffaloes. Caserta-Italy-October 6-10, supplement to N° 4 of *Bubalus bubalis*, 1997;141-166.

Miyamura M., Yoshida M., Hamano S., Kuwayama M. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 43(1):282.

Miyazaki S. Inositol 1,4,5- trisphosphate – induced calcium release and guanine nucleotide-binding protein-mediated periodic calcium rises in golden hamster eggs. *J. Cell. Biol.* 1988;106, 345-353.

Miyazaki S. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium* 1991;12, 205-216.

Monaghan P, Carolan C, Lonergan P, Sharif H, Wahid H, Gordon I. The effect of maturation time on the subsequent in vitro development of bovine oocytes. *Theriogenology* 1993;39:270.

Moncada S, Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J of Med*, 1993;329,2002-2012.

Moore G.D., Kopf G.S., Schultz R.M. Complete mouse egg activation in the absence of sperm by stimulation of exogenous G-protein coupled receptors. *Dev. Biol.* 1993;159, 669-678.

Nagy SZ., Hazas G., Bali Papp Á., Ivancsics J., Szasz F., Szasz F. JR., Kovacs A., Foote R. H.: Evaluation of sperm tail membrane

integrity by light microscopy. *Theriogenology* 1999;52:1153-1159 .

Naitana S., Loi P., Ledda S., Cappai P., Dattena M., Bogliolo L., Leoni G. Effect of biopsy and vitrification on in vitro survival of ovine embryos at different stages of development. *Theriogenology*. 1996 Oct 1;46(5):813-24.

Naito and Toyoda. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J Reprod Fertil* 1991 93; 2:467-73.

Nandi S., Chauhan M.S., Palta P. Effect of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1998;50: 1251-1262.

Nandi S; Chauhan M.S., Palta P. Effect of a corpus luteum on the recovery and developmental potential of buffalo oocytes. *Vet. Rec* 2000; 147: 580-581.

Nandi S, Raghu HM, Ravindranatha BM, Chauhan MS.
Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in vitro:
Premises and Promises. *Reprod Dom Anim* 2002;37, 65-74.

Narula A., Maneesh Taneja, Totey S.M. Morphological
development, cell number and allocation of cells to
trophectoderm and inner cell mass of in vitro fertilized and
parthenogenetically developed buffalo embryos the effect of
IGF-1. *Mol. Reprod. Dev.* 1996;44: 343-351.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.
FASEB J 1992;6, 3051-3064.

Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R,
Campanile G, Antonio Presicce G, Zicarelli L. Bovine and
buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from
abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration.
Theriogenology. 2003 Mar;59(5-6):1123-30.

Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R,
Zicarelli L. First pregnancies to term after transfer of buffalo

vitricified embryos entirely produced in vitro. *Vet Res Commun* 2004;28:233–6 (special issue).

Neglia G., Gaparrini B., Caracciolo di Brienza V., Presicce G.A., Zicarelli L. Buffalo and bovine in vitro embryo production from Ovum Pick-up and abattoir derived oocytes. Proc of A.S.P.A. XIV Congress, Firenze, June 12–15 2001: 624–626.

Neglia G., Gasparrini B., Caracciolo di Brienza V., Di Palo R. and Zicarelli L. First pregnancies to term after transfer of buffalo vitricified embryos entirely produced in vitro. Proceedings LVII Convegno S.I.S.VET., Ischia, Napoli, Italia, 25–27 Settembre 2003b: 445–446.

Neglia G., Gasparrini B., Caracciolo di Brienza V., Di Palo R., Zicarelli L. First pregnancies carried to term after transfer of vitricified buffalo embryos entirely produced in vitro. *Vet Res Commun*. 2004 Aug;28 Suppl 1:233-6.

Neglia G., Marino M., Di Palo R., Wilding M., Caracciolo di Brienza V., Dale B., Gasparrini B., Zicarelli L. A comparison of in vitro maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine

oocytes using confocal microscopy. 27th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), Omaha, Nebraska, USA, Jan 13–16, 2001. *Theriogenology* Jan 2001; 55: 488.

Niwa K, Park CK, Okuda K. Penetration in vitro of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991;91:329-36.

O'Flaherty C, Beconi V, Beorlegui NB. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide of capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 1997;29, 269-275.

Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S.: Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160, 828-833.

Palacios MJ, Joshi HC, Simerly C, Schatten G. γ -Tubulin during early mouse development. *J Cell Sci* 1993;104:383–9.

Palta P., Prakash B.S., Manik R.S., Madan M.L. Inhibin in individual buffalo ovarian follicles in relation to size. *Indian J. Exp. Biol.* 1996;34: 606-608.

Park Y-S, Kim S-S, Kim J-M, Park H-D, Byun M-D. The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology* 2005;64:123-34.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 1989; 40:1020-1025.

Pawshe C.H., Totay S.M. Effects of cumulus cells monolayer on in vitro maturation of denuded oocytes of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 1993;39: 281.

Perreault S.D., Barbee R.R., Slott V.L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* 1988;125: 181-186.

Perreault S.D., Wolff RA, Zirkin BR. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol* 1984;101:160-7.

Prather RS and Day BN. Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology* 1998;49(1):23-32.

Quinn P, Lydic ML, Ho M, Bastuba M, Hendee F, Brody SA. Confirmation of the beneficial effects of brief co-incubation of gametes in human in vitro fertilization. *Fertile steril* 1998;69:399-402.

Raghu H.M., Nandi S., Reddy S.M. Development of buffalo oocyte to the blastocyst stage in vitro in serum free, semi defined media: effect of insulin-trasferrin-selenium end epidermal growth factor. *Vet. Rec.* Aug 2002;31;151(9):260-5.

Ramesha KP, Balakrisnan M, Murthy LK, Balakrisnan CR.: Additive effect of pentixyfylline and heparin on buffalo sperm motility and fertilization of oocytes matured in culture. *Buffalo J* 2000;16, 63-71.

- Ravindranatha B.M., Nandi S., Gupta P.S.P., Sarma P.V.
Comparison of three different media on maturation of buffalo oocytes in vitro. *Ind. J. Anim. Sci.* 2001;71: 841-843.
- Reed W.A., Suh T., Bunch T.D., White K.L. Culture of in vitro fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rat liver (BRL) cells, or BRL-cell-conditioned medium. *Theriogenology* 1996;45: 439-449.
- Searle S.R. *Modello lineare*. 1971 John Wiley & figli; XXI: 533
- Rehman N, Collins AR, Suh TK, Wright RW. Effect of sperm exposure time on in vitro fertilization and embryo development of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1994;41:1447-52
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro vs in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002;61:234-48.
- Rodríguez-González E., López-Bejar M., Mertens M.J., Paramio M.T. Effects on in vitro embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during

- maturation of prepubertal goat oocytes. *Mol Reprod Dev* 2003; 65(4): 446-453;
- Sagara J., Miura K., Bannai S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and in suspens. *J Neurochem* 1993; 61: 1667-1671
- Samad H.A., Khan I.Q., Rehman N.U., Ahamad N. 1998. The recovery, in vitro maturation and fertilization of Nili-Ravi buffalo follicular oocytes. *Asian Aust J. Anim. Sci.*; 11: 491-497.
- Samad H.A., Nasser A.A. 1979. A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. *Compendium 13 FAO/SIDA Int. Course Anim. Reprod.*
- Sato E, Iritani A, Nishikawa Y. Factors involving in vitro maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 1977;23:12-18.
- Semple E, Loskutoff N, Leibo SP, Betteridge KJ. Effects of culture medium and maturation time on in vitro development of bovine oocytes into blastocysts. *Theriogenology* 1993;39:307.

Seren E., Parmeggiani A. Oestrus cycle in Italian Buffalo. Third course on biotechnology of reproduction in buffaloes, Caserta, Italy, October 6-10 1997: 21-28.

Singh R, Majumdar AC. Chronological changes of buffalo follicular oocyte maturation in vitro. Indian J Anim Sci 1992;82:205-209.

Sirard MA, Florman H, Leibfried-Rutledge ML, First NL. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biol Reprod 1989;40:1527-63.

Snedecor and Cochran. Statistical methods 1980.

Songsasen N, Apimeteetumrong M. Effects of β -mercaptoethanol on formation of pronuclei and developmental competence of swamp buffalo oocytes. Anim Reprod Sci 2002;71:193-202.

SPSS 11.0.1. 2002 Mc Graw Hill NY.

Stice S.L. and Robl J.M. Activation of mammalian oocytes by effector obtained from rabbit sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 25, 272-280.

Sumantri C, Boediono A, Ooe M, Murakami M, Saha S, Suzuki T. The effect of sperm-oocyte incubation time on in vitro embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. *Anim Reprod Sci* 1997;48:187-95.

Suss U, Wuthrich K. Stages of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1985; 23:281.

Sutovsky P, Schatten G. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. *Biol Reprod* 1997; 56:1503-12.

Swann K. A cytoplasmic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 1990;110, 1295-1302.

Swann K. Ca^{++} oscillations and sensitization of Ca^{++} release in unfertilized mouse eggs injected lead a sperm factor. *Cell Calcium* 1994;15, 331-339.

Takahashi M., Nagai T., Hamano S., Kuwayama M., Okamura N., Okano A. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod* 1993; 49: 228-232.

Telfer JF, Norman JL, Cameron L. Identification of nitric oxide in human uterus. *Human Reprod.* 1995; 10:19-23.

Telford N. A., Watson A. J., Schultz G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 90-100.

Tervit H.R., Whittingham D.G., Rowson L.E. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 1972;30 (3): 493-497.

Tesarik J., Mendoza Oltras C., Tesart J. Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 88: 665-675.

Totey S.M., Pawshe C.H., Appa Rao K.B.C.. In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and its interaction with gonadotrophins. *J. Reprod. Fert. Supplement* 1996;50: 113-119.

Totey S.M., Pawshe C.H., Singh G.P. Effects of bull and heparin, and sperm concentrations on in vitro fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1993a; 39: 887-898.

Totey S.M., Pawshe C.H., Singh G.P. In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus bubalis*): effects of media, hormones and sera. *Theriogenology* 1993b;39: 1153-1171.

Totey S.M., Singh G., Teneja M., Pawshe C.H., Talwar G.P. In vitro maturation, fertilization and development of follicular

oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Reprod. Fertil.* 1992;95: 597-607.

Totey S.M., Daliri M, Appa Rao KBC, Pawshe CH, Taneja M, Chillar RS. Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell number and sex ratios in buffalo embryos generated in vitro. *Theriogenology* 1996b;45:521-533.

Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 1976; 15: 467-470.

Van der Westerlaken LAJ, van der Schans A, Eyestone WH, de Boer HA. Kinetics of first polar body extrusion and the effect of time of stripping of the cumulus and time of insemination on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 1994;42:361-70.

Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology* 2002;53,133-150.

Vrendenburgh-Wilberg WL, Parrish JJ. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev* 1995; 40:490-502.

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;57:2105-17.

Whitacker M.J. and Swann K. Lighting the fuse at fertilization. *Development* 1993; 117, 1-12.

Wiesel S, Schultz GA. Factors which may affect removal of protamine from sperm DNA during fertilization in the rabbit. *Gamete Res* 1981;4:25-34.

Wilding M., Gasparrini B., Neglia G., Dale B., Zicarelli L. Mitochondrial activity and fertilization potential of fresh and cryopreserved buffalo sperm. Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, Jan 11-14 , Auckland, New Zealand, *Theriogenology* 2003; 59: 466.

Williams C.J., Schultz R.M., Kopf G.S. Role of G proteins in mouse egg activation: stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to ZP2f conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor. *Dev. Biol.* 1992;170, 350-352.

Wu H., He C.L., Fissore R.A. Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillation in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol Reprod. Dev.* 1997;46, 176-189.

Yadav BR, Katiyar PK, Chauhan MS, Madan ML. Chromosome configuration during in vitro maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. *Theriogenology* 1997;47:943-51.

Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod* 1999;61:828-33.

Yanagimachi R. In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions. *J Exp Zool.* 1969b; 170: 269-80.

Yanagimachi R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J Reprod Fertil* 1969a; 18:275-286.

Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In : Knobil E., Neill JD (eds). *The physiology of Reproduction*. New York Raven Press; 1988: 135-185.

Yoshida M., Ishigaki K., Nagai T., Chikyu M., Pursel V. G. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* 1993; 49:89-94;

Zicarelli L. Superovulatory response in buffaloes bred in Italy. *Third Course on Biotechnolgy of Reproduction in buffaloes, Caserta, Italy* 1997:167-188.

Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN, 1996. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod*. 55, 935-941.