

**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**  
**XXIII CICLO**

*Analisi di alcuni fattori che influenzano lo sviluppo, la distribuzione dei sessi e la resistenza alla crioconservazione di embrioni bovini e bufalini.*

**Tutor:**

**Chiar.mo Prof.**  
**Luigi Zicarelli**

**Co-tutor**

**Chiar.ma Prof.ssa**  
**Bianca Gasparrini**

**Coordinatore:**

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

**Candidato**

**Dott. Marcello Rubessa**

**NOVEMBRE 2010**

*La grandezza dell'uomo si misura in base a quel che cerca e all'insistenza con cui egli resta alla ricerca. (Heidegger)*

## **Indice**

### **Capitolo 1**

<b>Introduzione</b>	pag. 1
<b>1.1</b> Inseminazione Strumentale	pag. 2
<b>1.2</b> Superovulazione e Trasferimento Embrionale	pag 3
<b>1.3</b> Stato dell'arte: IVEP nel bufalo	pag 5
<b>1.4</b> Recupero Oociti e Valutazione	pag 5
<b>1.5</b> Maturazione in vitro (IVM)	pag. 10
<b>1.6</b> Fecondazione in vitro (IVF)	pag. 14
<b>1.7</b> Coltura in vitro (IVC)	pag 18
<b>1.8</b> Crioconservazione	pag. 27
<b>1.9</b> Predeterminazione del Sesso	pag 31
<b>1.10</b> Introduzione Tesi	pag 34

<b>Parte sperimentale</b>	pag. 41
---------------------------	---------

<b>Capitolo 2</b>	Pag 42
-------------------	--------

Esperimento 1 : Valutazione della correlazione tra alcuni parametri di fertilità del seme e le rese embrionali in vitro – Effetto della durata di co-incubazione dei gameti in funzione della cinetica di penetrazione dei tori sullo sviluppo e sulla sex ratio degli embrioni prodotti in vitro nel bovino

Esperimento 2 Valutazione della cinetica di penetrazione e delle rese embrionali di diversi tori bufalini

<b>Capitolo 3</b>	Pag 83
-------------------	--------

Esperimento 3 : Valutazione di diversi substrati energetici durante la coltura embrionale in vitro nel bovino.

Esperimento 4 : -Valutazione dei substrati energetici durante la coltura embrionali in vitro nel bufalo

pag. 115

### **Conclusioni**

<b>Bibliografia</b>	pag 122
---------------------	---------

## **CAP. 1.**

### **INTRODUZIONE**

Con il termine biotecnologia (*tecnologia biologica*) si indicano tutte le applicazioni che utilizzano la biologia al fine di ottenere beni o servizi. Tra le definizioni disponibili, la più completa è senza dubbio quella stesa dalla Convenzione sulla Diversità Biologica delle Nazioni Unite ( UN ) :

*"La biotecnologia è l'applicazione tecnologica che si serve dei sistemi biologici, degli organismi viventi o di derivati di questi per produrre o modificare prodotti o processi per un fine specifico".*

Al giorno d'oggi la competitività nel settore zootecnico è data dalla capacità di rispondere nel minor tempo e con il minor esborso possibile alle esigenze del consumatore, sempre più attento e sensibile alla qualità del prodotto. Da ciò si capisce quanto in questo settore sia importante l'utilizzo delle biotecnologie veterinarie che si propongono di sfruttare a proprio vantaggio i sistemi biologici. Negli ultimi anni sempre più aziende zootecniche hanno iniziato ad avvalersi delle biotecnologie veterinarie ed in particolare delle biotecnologie riproduttive, perché così facendo, gli allevatori possono incrementare le performance produttive e indirizzare la produzione verso una qualità spesso impensabile, ottenendo nel contempo la riduzione dei rischi di trasmissione di malattie, tutto nell'ottica di una risposta più adeguata alle richieste di un mercato sempre più specifico. Quando parliamo di biotecnologie riproduttive intendiamo tutta una serie di tecniche che vanno dalla più semplice, l'inseminazione strumentale (IS), fino alla più complessa come la clonazione di animali; non bisogna dimenticare però la super-ovulazione (SO), l'embryo transfer (ET), l'ovum pick-up (OPU) combinato alla produzione embrionale in vitro (IVEP), la crioconservazione di materiale genetico (gameti ed embrioni) e il sessaggio del seme e degli spermatozoi. Tutte queste tecniche possono essere utilizzate singolarmente o in maniera congiunta, in quanto nessuna esclude l'altra e, comunque tutte queste tecnologie

senza nessuna esclusione presentano dei limiti. Fin qui abbiamo parlato delle biotecnologie riproduttive come un mezzo per poter incrementare e migliorare la produzione in campo agro-alimentare, ma esse vengono utilizzate anche per migliorare la qualità della vita dell'uomo, per il mantenimento della biodiversità e per la salvaguardia delle numerose specie animali in via di estinzione o, comunque, a rischio. Inoltre, poiché sono state affiancate nella loro applicazione da tecniche di biologia cellulare e molecolare, da tecniche di genomica, sono diventate validi strumenti di ricerca per la caratterizzazione genica e la produzione di animali transgenici. In campo umano, hanno permesso di fronteggiare con successo quadri d'infertilità e risultano dei validi strumenti nella lotta contro il cancro, l'invecchiamento cellulare, patologie pre e post natali. Infatti, grazie alle numerose acquisizioni scientifiche che caratterizzano il loro studio, sono in grado di fornire preziose informazioni su processi biologici e patologici dell'organismo.

### ***Inseminazione Strumentale (I.S.)***

L'inseminazione strumentale è stata una delle prime tecniche, nell'ambito delle biotecnologie riproduttive, ad essere utilizzata negli allevamenti animali; quando parliamo di I.S. intendiamo la deposizione meccanica del seme nell'apparato riproduttore femminile. L'inseminazione strumentale per la specie bovina rappresenta il principale strumento operativo per la selezione genetica. In poco più di mezzo secolo questa procedura è diventata una tecnica di routine per quasi la totalità degli allevamenti, da quelli di bestiame a quelli di animali d'affezione. I vantaggi di questa tecnica vanno dalla prevenzione di malattie veneree alla possibilità di generare multiple generazioni filiarie per toro, in poco tempo. Ciò permette una rapida valutazione genetica dell'animale attraverso le prestazioni delle figlie. La svolta che ha portato al grande utilizzo di questa tecnica è avvenuta tra gli anni 60-70, decenni in cui si è migliorata la tecnica di crioconservazione del seme, con il vantaggio di poter conservare il seme per anni e la possibilità di poter fecondare animali che si trovavano a diverse migliaia di chilometri di distanza dal toro. Al giorno d'oggi le tecniche per la crioconservazione del seme sono talmente ben standardizzate che la qualità di quest'ultimo rispetto al fresco è diventato un problema secondario. L'inseminazione strumentale, utilizzata in oltre il 70% della popolazione bovina italiana, sarebbe auspicabile

anche nell'ambito dei programmi di miglioramento genetico della bufala, specie dalle potenzialità produttive notevoli, nonostante lo scarso impegno profuso nei piani di selezione genetica, finora perseguita per via materna. Nella bufala, però, alcuni fattori fisiologici, quali l'ampia variabilità della durata delle manifestazioni estrali, l'alta incidenza di calori silenti ed il riscontro di doppie manifestazioni estrali, hanno reso gli interventi di IS difficilmente programmabili, anche quando si ricorre alla sincronizzazione dei calori (Zicarelli , 2002).

Allo stato attuale nella bovina da latte si arriva ad ottenere il 40% di gravidanze portate a termine (Diskin et al 2006) mentre nella bufala, specie stagionale, ritroviamo un'alta incidenza di mortalità embrionale nei periodi sfavorevoli, fino al 40% (Campanile et al. 2007; Vecchio et al. 2008) che penalizza le percentuali dell'inseminazione strumentale. Va detto però che nel periodo favorevole le percentuali di gravidanze a 70 giorni oscillano tra il 50 e il 60% (Campanile 2008).

### ***Superovulazione (SO) e trasferimento embrionale (ET).***

La MOET (multiple ovulation and Embryo transfer) è la tecnologia attualmente utilizzata per ottenere più dell'80 % degli embrioni prodotti a scopo commerciale nel mondo. Tale tecnica consiste nella somministrazione di ormoni esogeni, al fine di ottenere ovulazioni multiple, invece dello scoppio di un solo follicolo, come avviene usualmente in animali monovulanti. La superovulazione viene effettuata tra il 9° e l'11° giorno del ciclo estrale, tra la fine della prima ondata follicolare e l'inizio della seconda. Successivamente, si esegue il recupero degli embrioni ottenuti, mediante lavaggio con una soluzione isotonica tamponata delle corna uterine, al 6°-7° giorno, delle donatrici che sono state coperte o inseminate al momento dell'ovulazione multipla. Gli embrioni possono essere trasferiti (ET) nelle riceventi sincronizzate oppure essere congelati e trasferiti in un secondo momento. Il trasferimento embrionale può essere considerato la controparte femminile dell'inseminazione strumentale (Jainudeen et al.1993). I programmi MOET oltre che aumentare l'intensità di selezione genetica, riducendo gli intervalli generazionali (Smith, 1988), oggi sono anche comunemente usati per selezionare i tori da utilizzare per l' IS (Bondoc et al., 1989; Teepker et al., 1989). In questo caso le donatrici scelte vengono

fecondate con il seme di tori miglioratori e le femmine della progenie che ne deriva vengono messe in produzione, mentre i fratelli vengono messi in attesa dei risultati di produzione delle sorelle (Smith e Ruane, 1987). I maschi vengono quindi testati e scelti in base alle prestazioni delle sorelle, invece che della loro prole, come accadeva con la sola IS. In questo modo è possibile testare geneticamente un toro in tre anni e mezzo invece che in cinque anni e mezzo usando i tradizionali test di progenie. Tutto questo non è sempre vero, perché nella quotidianità esistono diversi fattori limitanti che influenzano la risposta degli animali alla superovulazione: questi possono essere intrinseci, quali età e razza, e fattori estrinseci, quali la stagione, l'ambiente in cui si trovano gli animali, la nutrizione delle donatrici e delle riceventi, la quantità dei trattamenti ripetuti, senza dimenticare le condizioni sanitarie del tratto genitale, con pervietà delle tube, con cicli regolari e non gravidi. Un altro fattore che non va dimenticato è la possibilità di eventuali effetti collaterali dovuti ai trattamenti ripetuti, quali sindromi cistiche, possibili difficoltà ad ingravidarsi ed il rilassamento dei legamenti mammari.

Nella bufala, invece, diverse esperienze hanno dimostrato che esistono forti limitazioni all'utilizzo dei programmi di MOET, specie in cui il recupero medio di embrioni è molto inferiore a quello che si osserva nella specie bovina: meno di 2 embrioni nella bufala (Zicarelli, 2001) e tra 7 e 10 nella bovina a seconda della razza e del trattamento di SO impiegato (Halser et al., 2003; Baruselli et al., 2006). In aggiunta al basso recupero medio di embrioni, si osserva, peraltro, una minore risposta alla SO (Misra., 1997; Zicarelli, 1997); infatti, mentre nella bovina l'88% degli animali risponde ai trattamenti ormonali, nella bufala questo valore scende al 55%. Il minore recupero embrionale è dovuto alle caratteristiche fisiologiche intrinseche di questa specie quali ad esempio l'esigua popolazione di follicoli primordiali presenti nell'ovaio alla nascita, 20.000 vs 100.000 della vacca (Samad e Nasser, 1979; Danell, 1987; Le Van et al., 1989) e alla scadente qualità degli oociti; nella bufala, infatti, rispetto alla vacca, si osserva una più bassa incidenza di oociti di buona qualità (Boni et al., 1996) ed una minore adesione delle cellule della granulosa. Ci sono, inoltre, molti casi in cui al momento del flushing si osservano vari corpi lutei (CL), ma il numero di embrioni recuperato risulta inferiore al numero di CL. In altri termini, ci sono molti casi in cui gli animali rispondono alla stimolazione ormonale con ovulazioni multiple, come attestato dalla formazione di vari CL a livello ovarico, ma danno comunque un recupero di embrioni basso. Questo fenomeno è più difficilmente

interpretabile: varie ipotesi sono state formulate, tra cui la mancata captazione da parte della fimbria degli oociti ovulati, che trova conferma nel mancato rilevamento degli oociti/embrioni a livello tubarico in animali sacrificati a tempi diversi dalla SO, e che potrebbe essere imputabile alla minore espansione del cumulo ooforo osservata nella specie bufalina.

### ***Produzione embrionale in vitro (IVEP)***

Nelle prime esperienze la produzione embrionale in vitro (IVEP) era limitata al cosiddetto salvataggio genetico di animali di pregio morti o destinati alla macellazione perché giunti alla fine della propria carriera produttiva. Attualmente il recupero degli oociti può essere effettuato da materiale reperito da macello (ovaie da animali morti o macellati) o da animali vivi tramite la tecnica OPU. Gli oociti così recuperati vengono introdotti nel sistema IVEP che comporta una fase di maturazione in vitro (IVM), una fase di fecondazione in vitro (IVF) ed una fase di coltura in vitro (IVC) fino allo stadio di embrioni trasferibili. Queste fasi verranno di seguito trattate separatamente.

### ***Recupero degli oociti***

La raccolta dei complessi cumulo-oocita (COC) da materiale da macello può essere eseguita con diversi metodi quali la dissezione follicolare, lo “slicing” (tagliuzzamento), la “Transillumination-aspiration ovary” (TAO) (Arav, 2001) e l’aspirazione follicolare. La dissezione follicolare è una tecnica che permette l’isolamento di singoli follicoli, consentendo il recupero di un considerevole numero di oociti di buona qualità, ma presenta l’inconveniente di essere una tecnica lunga e non praticabile in quegli animali che hanno follicoli profondi nello stroma, come ad esempio nella specie bufalina. Lo slicing (tagliuzzamento) di tessuto ovarico offre un numero più alto di oociti che però risultano estremamente eterogenei per qualità; è anch’essa una tecnica lunga e per di più poco

pratica in quanto bisogna usare lame da bisturi; questa tecnica è generalmente utilizzata per quegli animali in cui la dimensione dei follicoli ovarici è talmente piccola da non consentire l'ago-aspirato, come ad esempio nei roditori. L'aspirazione follicolare consente di poter recuperare tutti quegli oociti che si trovano nei follicoli superficiali e di questi si può fare una selezione visiva e una discriminazione per quelli troppo piccoli o emorragici. Per quanto riguarda la TAO i tempi di recupero non sono così lunghi e la tecnica permette di recuperare circa il 50% di oociti in più rispetto all'aspirazione, grazie alla diretta visualizzazione, tramite transilluminazione, dei follicoli corticali da aspirare. Tuttavia, la TAO non è ancora così diffusa e la metodica più frequentemente utilizzata attualmente risulta l'aspirazione perché più pratica e più efficiente in termini di rapporto numerico oociti/tempo. La dissezione follicolare, lo slicing e la TAO permettono di ottenere il recupero di un maggiore numero di oociti rispetto all'aspirazione follicolare (Vajta et al., 1996; Mantovani et al. 1999). I primi due metodi, rispetto all'aspirazione, sono meno pratici e per questo necessitano di un tempo maggiore che può compromettere la vitalità degli oociti. Con l'aspirazione follicolare nella routine si possono recuperare dai 6 ai 10 oociti di buona qualità per vacca. Nella bufala, invece, il recupero è inferiore, attestandosi su valori medi di oociti di buona qualità di 2.4 per ovaia (Gasparrini et al., 2000). Gli oociti dopo essere stati prelevati vengono lavati in PBS

(Phosphate buffered saline) o in un terreno contenente come sostanza tamponante l' HEPES e introdotti nel sistema IVEP.

Attualmente, in aggiunta a limitati casi di salvataggio genetico, le ovaie prelevate da animali al macello rappresentano una fonte di oociti da destinare principalmente alle ricerche volte ad ottimizzare l'efficienza del sistema IVEP. Il limite principale di questa tecnologia è infatti proprio la mancanza di ripetibilità.

### ***Ovum pick-up (OPU).***

Nel tentativo di superare gli svantaggi legati ai programmi MOET, nel 1987, la tecnica OPU, utilizzata in campo umano, venne adattata alla specie bovina. Essa infatti, può essere utilizzata in animali che non rispondono ai trattamenti di stimolazione ormonale, con

patologie del tratto riproduttivo, in animali aciclici, prepuberi, gravidi e in quelli a fine carriera (di età avanzata). Un altro vantaggio di questa tecnica è che non presenta alcuna ripercussione negativa sull'animale trattato, anzi può anche avere un effetto terapeutico in animali con cisti ovariche o simili patologie; non interferisce con i normali cicli riproduttivi e produttivi dell'animale e non necessita di un pretrattamento con gonadotropine. Quest'ultimo è un importante vantaggio specialmente per gli animali giovani, nei quali, la stimolazione con le gonadotropine può causare edema mammario e cisti ovariche. L' OPU consiste nel recupero di oociti immaturi da animali vivi per via transvaginale attraverso puntura follicolare eco guidata; di conseguenza può essere considerata una tecnica non invasiva e ripetibile. Il prelievo degli oociti immaturi può essere effettuato una o due volte alla settimana, per tempi anche medio-lunghi, senza effetti negativi sulla fertilità degli animali (Chastant-Maillard et al., 2003). Inoltre è stato osservato che un prelievo effettuato 2 volte a settimana fa sì che la qualità degli oociti migliori dopo i primi trattamenti, perché in questo modo si azzerà il ciclo follicolare, si evita il fenomeno della dominanza e, quindi, si elimina l'impatto negativo del follicolo dominante sulla competenza allo sviluppo degli oociti dei follicoli subordinati. Quindi un altro fattore che incide in positivo sulla qualità delle cellule uovo è l'intervallo tra sedute. Ripetere l'operazione 2 volte a settimana (ogni 3-4 giorni) migliora la qualità rispetto ad un prelievo fatto una volta a settimana (Merton et al., 2003, Hanenberg et al 1997). In quest'ultimo caso, infatti, c'è un maggiore numero di oociti che presentano espansione del cumulo e atresia (Garcia et al., 1998). Gli oociti di buona qualità recuperati verranno poi lavorati nel sistema di produzione embrionale in vitro (IVEP) e gli embrioni così prodotti potranno essere trasferiti oppure sottoposti a sessaggio e o congelamento.

Attualmente, il numero di oociti ricavati in un programma OPU, nella specie bovina, con due prelievi a settimana varia da 0.5 a 15 per animale con circa il 20% di oociti nudi o degenerati (Hasler et al., 1995).

Galli et al., nel 2000 riportano nella specie bufalina un minor numero di oociti recuperati mediante OPU se paragonata alla specie bovina (4.5 vs 10 rispettivamente). Prove condotte su bufale a differenti giorni di lattazione (Boni et al., 1995;1996;1997) suggeriscono che all'aumentare del periodo post-partum (>500g) diminuiscono sia il numero dei follicoli che gli oociti. È stato anche dimostrato che in India la stagione influisce sulla percentuale di recupero degli oociti di bufalo, con valori più bassi di COC registrati durante l'estate

(Manjunatha et al., 2009; Misra, 2005). Al contrario, alle latitudini italiane, la percentuale di recupero degli oociti non cambia durante l'anno (dati non pubblicati).

Questa tecnica risulta competitiva rispetto alla MOET particolarmente nella specie bufalina. Infatti, se da un lato per ogni OPU effettuato si producono in media nella bovina 0.8 e nella bufala 0.2 embrioni da donatrici adulte rispetto ai 4.4 ed 1.7 ottenibili nell'ambito di un programma di MOET (Zicarelli, 2001), dall'altro, quest'ultimo non può essere ripetuto prima che siano trascorsi almeno 75 giorni per la bovina e 100 per la bufala. Ovviamente, non va dimenticato che sebbene l'efficienza di recupero nella bufala sia simile a quella che si riscontra nella bovina, il numero di oociti recuperati risulta nettamente inferiore per la diversa entità della popolazione follicolare che contraddistingue le due specie. Conseguentemente, con l'OPU la produzione media di embrioni prodotti ad esempio nell'arco di sei mesi aumenta significativamente (41 vs 15 nella bovina e 11 vs 5 nella bufala, rispettivamente con le tecniche OPU e SO). Inoltre, se si considera che la bufala è una specie stagionale, è estremamente improbabile che l'animale possa rimanere ciclico per 6 mesi consecutivi e che quindi si possa raggiungere il numero di 5. In più, va sottolineato che esiste un'elevata variabilità individuale nel reclutamento follicolare e che la ripetibilità di tale parametro consente di poter effettuare una selezione delle migliori donatrici sulla base dei primi 4 prelievi OPU (Gasparrini et al., 2002), rendendo la tecnica maggiormente competitiva in termini di resa embrionale. La tecnica OPU, quindi, apre nuove prospettive consentendo di incrementare ulteriormente l'efficienza riproduttiva della specie. Inoltre, la possibilità di utilizzare tale tecnica su animali di elevato valore produttivo, si traduce in una notevole riduzione dell'intervallo generazionale e, conseguentemente, in un'ulteriore accelerazione del progresso genetico.

### ***Qualità degli oociti.***

I COC recuperati vengono classificati e divisi in base alla morfologia del citoplasma e del cumulo, perché esiste una precisa correlazione tra l'aspetto morfologico e la competenza, questa intesa come capacità dell'oocita di essere fecondato e di svilupparsi fino allo stadio di blastocisti. In base all'omogeneità del citoplasma e al numero di strati di cellule del cumulo gli oociti sono stati classificati in diverse categorie (Wurth et al. 1992; Wurth et al.

1994; Boni et al. 2002). Tuttavia, dagli studi di Blondin et al. (1995) e Fukuda et al. (1993) si evince che sia la maturazione che la competenza allo sviluppo in vitro di oociti bovini con citoplasma eterogeneo sono superiori rispetto a quelle di oociti con citoplasma omogeneo. Questo è stato ulteriormente confermato, nel 1999, da Nagano et al. che hanno osservato che oociti con citoplasma eterogeneo mostrano una maggiore capacità ad andare incontro ad una normale fecondazione, ipotizzando che una certa eterogeneità del citoplasma sia ascrivibile ad una migliore distribuzione dei granuli corticali che, a sua volta, determina una ridotta incidenza di polispermia. Un altro fattore importante nella classificazione degli oociti è la presenza delle cellule del cumulo che svolgono, infatti, un ruolo fondamentale nella maturazione perché su queste ci sono i recettori degli ormoni che permetteranno la maturazione del gamete. Queste cellule sono importanti anche durante la fecondazione perché svolgono le funzioni di attrarre e selezionare gli spermatozoi (Chian et al., 1996; Cox et al., 1993), di facilitare i processi di capacitazione spermatica, reazione acrosomiale e penetrazione della cellula uovo (Cox et al., 1993; Fukui, 1990) e di prevenire un precoce indurimento della zona pellucida (Katska et al., 1989).

Fig. 1 Oociti di Bufalo di grado A e B

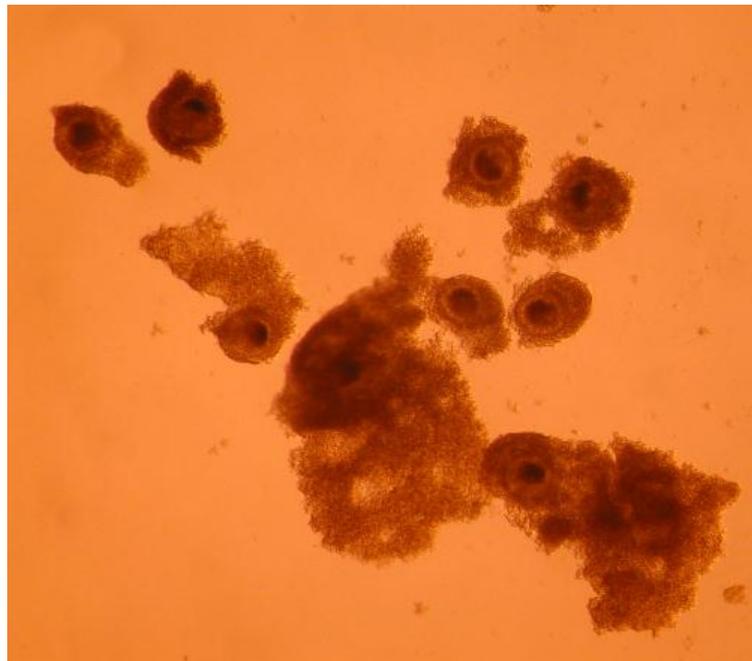


Fig. 2 Oocita di Bovino grado A

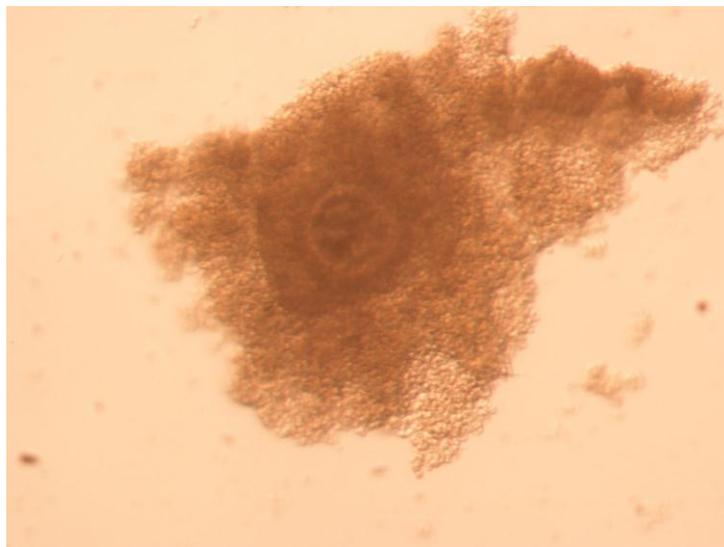
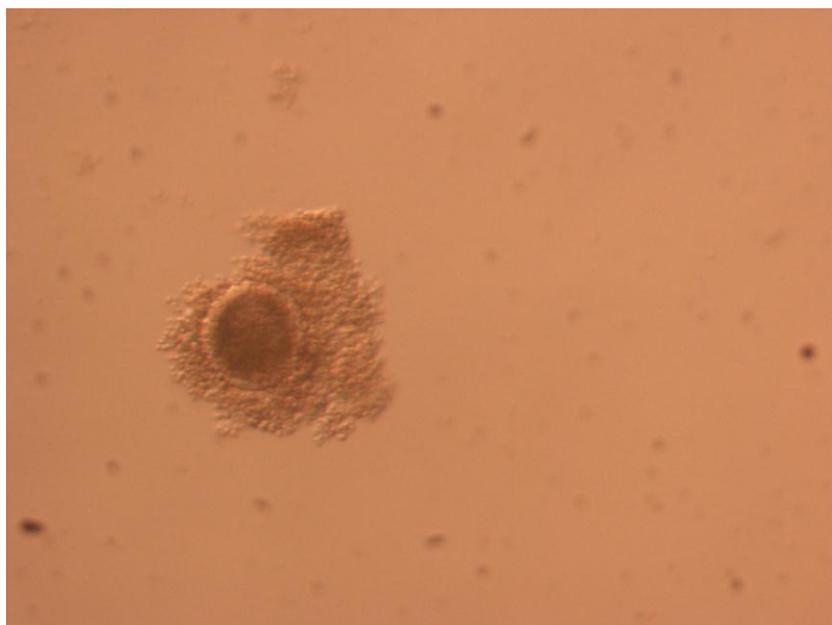


Fig. 3 Oocita di bovino grado B



***Maturazione in vitro (IVM).***

Durante la maturazione dell'oocita si verificano una serie di eventi a livello del compartimento nucleare (maturazione nucleare), che si accompagnano a modificazioni

citoplasmatiche e di membrana (maturazione citoplasmatica). Gli oociti di mammifero contengono trascritti di origine materna necessari per la maturazione e l'embriogenesi precoce che si verifica in assenza di una trascrizione *de novo* di genoma parentale (Nothias et al. 1995). Durante l'oogenesi, gli oociti accumulano trascrizioni di geni coinvolti nella maturazione, fecondazione e primo sviluppo embrionale (Bachvarova 1992). La maturazione è un processo importante che prepara l'uovo alla fecondazione da parte di uno spermatozoo. Durante l'oogenesi, l'oocita di mammifero entra nella profase della prima divisione meiotica e progredisce fino allo stadio di diplotene della profase I, anche definito come vescicola germinale (GV), per il tipico aspetto del nucleo in profase. Gli oociti recuperati mediante OPU o da ovaie da macello sono appunto oociti immaturi, fermi in questo stadio della profase. Il picco preovulatorio di LH in vivo determina l'innescamento del processo di maturazione che, a livello del compartimento nucleare, comporta la ripresa della meiosi fino al raggiungimento della metafase II. Durante la maturazione nucleare si assiste alla ripresa della meiosi con, in primo luogo, la rottura della vescicola germinale, fenomeno comunemente riportato con il termine anglosassone germinal vesicle breakdown (GVBD), seguita dalla condensazione della cromatina e dalla formazione del fuso ovvero dal raggiungimento della metafase (M) I che culmina con l'estrusione del primo corpo polare. Subito dopo, gli oociti cominciano la seconda fase della meiosi (II) e si arrestano in Metafase II (MII). La maggior parte del mRNA trascritto in questa fase persiste nell'ooplasma in una forma stabile, ma inattiva. A seguito dell'attivazione dovuta agli stimoli dello spermatozoo o partenogenetici, l'oocita riprende la MII e completa la maturazione, con l'estrusione del secondo globulo polare. In vivo, la maturazione è innescata dal picco preovulatorio di LH. Nel 1972 Hunter et al. hanno riportato la maturazione in vitro (IVM) di oociti bovini, e da allora si è sempre cercato di creare un terreno che mimasse le condizioni naturali per lo sviluppo della cellula uovo. I media per l'IVM, che devono cercare di simulare l'ambiente follicolare, sono generalmente composti da un terreno commerciale complesso, il Tissue Culture Medium 199 (TCM 199), addizionato con una percentuale variabile di siero fetale di vitello (FCS), che apporta proteine, fattori di crescita e previene l'indurimento della zona pellucida (ZP), cosa che potrebbe ostacolare la fecondazione. Tra i vari fattori del siero vi è il glucosio, che ha un ruolo molto importante nella maturazione, dato che in sua assenza gli oociti riprendono la meiosi ma non riescono a raggiungere la metafase II (Kimura et al., 2008). Altri elementi

che devono rientrare nella costituzione del terreno di maturazione sono gli ormoni quali l'FSH, l'LH e l'estradiolo 17- $\beta$ ; a volte vengono aggiunti anche dei fattori di crescita come, ad esempio, il fattore di crescita epidermale (EGF) (Majerus et al., 1999; Mermillod et al., 1993). L'EGF, addizionato al medium di coltura, permette di utilizzare per l'IVM anche oociti di animali giovani (3-4 mesi di età) che hanno una più bassa competenza allo sviluppo embrionale in vitro (Khatir et al., 1998). Il mix finale deve essere un terreno che permetta agli oociti di raggiungere la maturazione nucleare e citoplasmatica, considerando che si aspirano oociti immaturi, da follicoli con un diametro compreso tra i 2 e gli 8 mm. Bisogna tenere presente che l'oocita risente molto dell'ambiente in cui si sviluppa; quindi la maturazione degli oociti in vitro è condizionata da specifiche condizioni fisiche dell'ambiente di coltura e da altre condizioni non ben definite (Holm e Callesen 1998). L'osmolarità (Yamauchi et al., 1999), la composizione ionica, la temperatura (Lenz et al., 1983), il pH, la CO<sub>2</sub> (Geshi et al., 1999), e la tensione di ossigeno, così come, il rapporto tra il numero di oociti e il volume di medium, sono importanti parametri facenti parte della prima categoria, mentre il siero e le cellule somatiche sono esempi appartenenti alla seconda categoria (Gordon, 1994). Tuttavia, in coltura gli oociti sono mantenuti a concentrazioni più elevate di ossigeno rispetto al contesto in cui si trovano in vivo, e questo in parte causa un aumento del livello dei reattivi dell'ossigeno (ROS) (Zheng-guang Wang et al., 2006). La produzione di ROS, come l'anione superossido, il radicale ossidrilico, il perossido di idrogeno e i perossidi lipidici, è un processo normale che si verifica nella cellula quando c'è una deviazione di elettroni all'ossigeno durante le reazioni di trasferimento elettronico nella catena respiratoria mitocondriale e nei sistemi di trasferimento intracellulare di altri elettroni (Guille e Joenje, 1991; Ho et al., 1996). In vivo, gli effetti dannosi dei radicali dell'ossigeno sono solitamente bloccati o limitati da antiossidanti endogeni (spazzini dei radicali liberi), tra cui ricordiamo la superossido dismutasi (SOD), la catalasi e la glutatione perossidasi selenio-dipendente (SeGPX), così come da antiossidanti e lipidi solubili in acqua come le vitamine C, E e l'acido urico (Knapen et al., 1999). Di conseguenza, l'aggiunta di un antiossidante può essere importante. Tuttavia, una prima ricerca concernente l'aggiunta di agenti antiossidanti quali il  $\beta$ -mercaptoetanolo, l'acido ascorbico o la superossido dismutasi nei media di maturazione non ha mostrato alcun effetto sulla percentuale di embrioni di bovini prodotti in vitro (Blondin et al., 1997). In seguito, però, De Matos e Furnus (2000) hanno dimostrato

l'effetto positivo di alcuni composti tiolici, quali:  $\beta$ -mercaptoetanolo, cistina e cisteina; queste sostanze, aumentando la quantità di glutatione (GSH) intracellulare sintetizzato durante la maturazione, portano effetti benefici alla fecondazione e alle prime fasi di sviluppo embrionale (fino alla divisione di 8 cellule). Il risultato positivo del GSH sulla fecondazione è la naturale conseguenza dell'effetto che i composti tiolici hanno sullo spermatozoo, una volta penetrato, in quanto è noto che il GSH facilita il processo di decondensazione della testa e, quindi, la formazione del pronucleo maschile (Perreault et al., 1988). L'effetto positivo sullo sviluppo embrionale è, invece, imputabile al potenziamento della capacità antiossidante dell'oocita, che protegge l'embrione in via di sviluppo dagli effetti dello stress ossidativo fino a quando non si verifica l'attivazione del genoma embrionale, ovvero quando l'embrione non dipende più dalle riserve materne in quanto acquisisce autonome capacità di sintesi. A questo punto si è pensato di utilizzare il glutatione (GSH), che è il principale composto sulfidrilico noto per proteggere la cellula dal danno ossidativo (Meister, 1976). Diversi studi hanno anche suggerito che il GSH può giocare un ruolo importante in molti processi biologici tra cui la sintesi di proteine e di DNA, la protezione cellulare durante lo stress ossidativo, e la proliferazione cellulare durante gli eventi embrionali (Del Corso et al, 1994;. Lafleur et al, 1994;. Yu , 1994). Il glutatione è anche un marker biochimico potenzialmente molto rilevante della avvenuta maturazione citoplasmatica (Furnus et al., 1998) e della capacità di sviluppo degli oociti di mammiferi (Zuelke et al., 2003). Inoltre è stato dimostrato che durante l' IVM gli oociti di bovino (Miyamura et al, 1995) e di bufalo (Gasparrini et al., 2003) sintetizzano GSH. Da ciò si è ritenuto di aggiungere nel medium di maturazione la cisteamina, composto tiolico di basso peso molecolare, che incrementa la sintesi di glutatione (De Matos et al., 1996; De Matos et al., 2000). Questo effetto positivo della cisteamina, sulla produzione embrionale, si è riscontrato anche in altre specie come quella ovina ( de Matos et al., 2002) e bufalina (Gasparrini et al., 2000). In più, negli oociti di bufalo, a causa del loro alto contenuto di lipidi (Boni et al., 1992) che li rende particolarmente sensibili ai danni ossidativi, si è reso necessario incrementare la quantità di glutatione intracitoplasmatica. L'aggiunta di cistina, in presenza di cisteamina, al mezzo di IVM (Gasparrini et al., 2006) ha ulteriormente aumentato il serbatoio GSH degli oociti e ha migliorato significativamente la percentuale di oociti che mostrano normale fecondazione (81%), cleavage (78%) e la resa blastocisti (30%).

Un altro fattore che non va dimenticato è la tempistica della maturazione e, quindi il tempo che i COC devono permanere nel medium di IVM. La durata della maturazione in vitro può giocare un ruolo critico per lo sviluppo successivo; infatti un inappropriato tempo di maturazione può determinare l'invecchiamento degli oociti (Hunter, 1989; Hunter e Greve, 1997) e può causare una riduzione dello sviluppo (Marston e Chang, 1964). Sebbene gli spermatozoi possono penetrare gli oociti prima del completamento della maturazione (Chian et al, 1992; Niwa et al, 1991), il successivo sviluppo è generalmente ridotto e, quindi, sembra che il momento ottimale per la fecondazione in vitro (IVF) sia a maturazione ultimata. E' noto che il tempo necessario per il completamento della maturazione in vitro varia tra le specie, dalle 18-24 ore dei bovini (Sirard et al, 1989;. Neglia et al, 2001) alle 36-48 h in suino (Prather e Day, 1998). Nella bufala, ci sono discrepanze relative alla tempistica necessaria ai COC per completare la maturazione, con la più alta percentuale di oociti in MII osservate tra 15 (Neglia et al., 2001) e 24 ore (Yadav et al., 1997). Tuttavia, nonostante questi dati contrastanti, la maggior parte degli autori preferisce fecondare gli oociti di bufala 24 h dopo l'inizio della IVM. Allo scopo di chiarire questo aspetto, recentemente è stato eseguito un ulteriore studio sulla cinetica di maturazione in vitro nel bufalo, utilizzando un maggior numero di oociti, ed è stato dimostrato che il più elevato tasso di maturazione si registra tra le 20 e le 24 ore e mentre il momento migliore per eseguire la fecondazione è dopo 18 ore di IVM o, in ogni caso, non più tardi delle 24 h, perché a tempi successivi si appalesano gli effetti deleteri dell'invecchiamento cellulare (Gasparrini et al., 2008).

In condizioni ottimali di coltura più del 90% degli oociti raggiunge la metafase II.

### ***Fecondazione in vitro (IVF)***

Il passo successivo alla maturazione è la fecondazione in vitro (IVF) che consiste nell'incontro, ovvero nella co-incubazione dei due gameti, maschile e femminile. La fecondazione è un processo complesso, che porta all'unione dei due gameti, con il ritorno al numero dei cromosomi somatici, cui segue l'inizio dello sviluppo embrionale. In natura il rapporto oocita spermatozoo è 1:1 mentre in vitro il rapporto è almeno di 1: 10000 (Ward et al.,2002) e questo porta un incremento della polispermia rispetto al fisiologico. Va

sottolineato che gli spermatozoi di mammifero non sono in grado di fecondare gli oociti immediatamente dopo l'eiaculazione. In vivo lo spermatozoo prima di entrare in contatto con la cellula uovo subisce una serie di modificazioni biochimiche che lo preparano alla fecondazione. Tutte queste trasformazioni biologiche avvengono a livello del tratto riproduttivo femminile, dove, mediante il processo di capacitazione, gli spermatozoi acquisiscono la capacità fecondante (Yanagimachi 1994). Il seme appena eiaculato, quindi, non è in grado di fecondare gli oociti nonostante gli spermatozoi abbiano subito delle modificazioni durante la maturazione, nel tratto epididimale, che conferiscono loro la motilità progressiva. La capacitazione è associata alla fosforilazione di alcune proteine tirosiniche (Visconti et al 1995; Visconti et al 1998), che è regolata in molte specie, compreso il bovino (Galantino-Homer et al 1997), dall'AMP ciclico, ed è condizionata da diversi elementi di trasduzione del segnale che coinvolgono la proteina chinasi A (PKA) (Leclerc et al 1996), la proteina chinasi C (PKC) (Thundathil et al 2002), e la proteina tirosin chinasi (PTK) (Leclerc et al 1996). L'AMP ciclico è generato dall'enzima adenilato ciclasi (AC). Come è facile intuire non potendo utilizzare in vitro il tratto genitale femminile, si è cercato nel tempo di individuare degli *escamotage*, chimici e fisici per poter sopperire a questa mancanza e per indurre la capacitazione in vitro. Dagli anni 80' ad oggi diversi approcci sono stati tentati in questa direzione in numerosi centri di ricerca, dall'utilizzo di agenti chimici fino a quelli biologici quali l'alta forza ionica (Brackett et al 1982), il fluido follicolare bovino (Fukui et al 1983), l'eparina (Parrish et al., 1984) ed altri ancora sono stati testati come la caffeina, il bicarbonato e l'adenosina (Breininger et al 2010). Il metodo d'elezione rimane, ancora oggi, l'impiego di eparina in presenza di  $Ca^{++}$  extracellulare. Inoltre, affinché si inneschi la capacitazione spermatica, è necessario l'efflusso di colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo. A questo proposito, l'albumina sierica bovina (BSA) può essere aggiunta con successo al terreno di fecondazione perché funge da accettore di colesterolo. Per la fecondazione si può utilizzare sia seme fresco che seme congelato a seconda dell'esperimento e delle possibilità del centro; il seme congelato però deve essere lavorato prima di entrare a contatto con i gameti femminili (Galli et al., 1996; Henkel et al. 2003). Questa manipolazione del seme congelato è fondamentale almeno per due motivi: l'eliminazione dei crioprotettori, importanti per la crioconservazione ma allo stesso tempo tossici a temperatura ambiente, e la separazione degli spermatozoi vivi da quelli morti. Le tecniche attualmente in uso nei laboratori di

produzione embrionale per la preparazione del seme sono molte e tra queste possiamo includere lo swim-up, i gradienti percoll e il semplice lavaggio in centrifuga (Machado Et al. 2009); tra queste non c'è una sostanziale differenza nella percentuale di oociti fecondati (Dode et al. 2002) e nella successiva resa embrionale, intesa come quantità e qualità degli embrioni prodotti (Avery et al. 1995). Di questi tre il più utilizzato a livello mondiale, data la sua praticità e perché risente in minor misura dell'effetto toro, è il protocollo dei gradienti percoll (Cesari et al. 2006). Quest'ultimo è però meno selettivo dello swim-up, perché non in grado di selezionare gli spermatozoi vivi mobili da quelli non mobili. A questo inconveniente si può facilmente ovviare aumentando il numero di spermatozoi da aggiungere al terreno IVF al momento della fecondazione. Il numero di spermatozoi da utilizzare è normalmente nella specie bovina di  $10^6$  per ml, ma la concentrazione può variare in base alla qualità del seme utilizzato, quindi prima di poter utilizzare un nuovo toro è necessario testare diverse concentrazioni del seme e scegliere quella che ha dato le percentuali più alte di fecondazione con il più basso grado di polispermia. Al terreno di fecondazione oltre ad aggiungere l'agente capacitante vengono aggiunte delle sostanze che hanno la capacità di migliorare la motilità e la capacità fecondante del seme come, ad esempio, il complesso penicillamina, ipotaurina ed epinefrina (PHE). La penicillamina, è in grado di aumentare la percentuale di spermatozoi che vanno incontro alla reazione acrosomiale quando usata in presenza di epinefrina (Monaco 2007). L'ipotaurina, aumenta la motilità spermatica ed, in combinazione con l'adrenalina, è responsabile di un aumento della percentuale di penetrazione oocitaria (Monaco 2007). Negli ultimi anni per cercare sempre di più di mimare l'ambiente tubarico, si è iniziato a produrre dei media che possiamo definire continui, perché la base del terreno dalla fecondazione alla fine della coltura è uguale ma le proteine e gli ioni cambiano man mano che l'embrione si sviluppa. Da qui si sono create due linee di pensiero diverse: quelli che prediligono i terreni continui ed invece coloro che preferiscono utilizzare terreni diversi per le diverse fasi. Il terreno più comunemente utilizzato, nei protocolli che utilizzano terreni diversi, per l'IVF è il "Tyrode's modified medium" (TALP), con l'aggiunta di bicarbonato di sodio e substrati energetici mentre il SOFm (Synthetic Oviductal fluid) è quello utilizzato in quei protocolli che utilizzano la stessa base per fecondazione e coltura nei protocolli dinamici. Lazzari et al (1999) hanno messo a confronto il TALP con il SOF ed è risultato che la qualità degli embrioni al giorno 7 era significativamente superiore per gli oociti che erano stati fecondati

in SOF supplementato con aminoacidi essenziali (EAA) e non (NEAA), glutammina e glicina.

Tra i fattori che possono condizionare l'IVF ricordiamo la competenza degli oociti, la presenza delle cellule del cumulo, il tempismo nell'intervento fecondativo, la durata di co-incubazione dei gameti e, ovviamente la qualità del seme utilizzato. A quest'ultimo riguardo, è noto che i tori differiscono tra loro per la capacità di fecondare gli oociti in vitro (Hillery et al, 1990;. Shi et al., 1990); è stato osservato che una certa percentuale di tori (<5%) ha delle performance veramente molto basse anche dopo iniezione intracitoplasmatica di sperma (Wei e Fukui, 1999). L'effetto maschio è ancora più manifesto nella specie bufalina, in cui in generale solo il 10% dei tori testati risulta idoneo alla IVF (Gasparrini, 2002).

Il tempo necessario per la fecondazione varia da specie a specie e dalla capacità fecondante del seme, comunque, non si superano mai le 20 ore di co-incubazione. Ward nel 2002 ha riportato che nel bovino l'optimum, inteso come il tempo sufficiente di co-incubazione dei gameti per la massima resa embrionale, è di 10 h e simili risultati sono stati ottenuti poi da altri autori (Long et al.,1994; Rehman et al, 1994). Nel bufalo uno studio eseguito utilizzando un toro testato per IVF ha dimostrato che la durata ottimale di co-incubazione dei gameti, per ottimizzare le rese embrionali, è di 16 ore (Gasparrini et al., 2008). Tuttavia, è stato poi rilevato che esistono delle differenze marcate nella cinetica di penetrazione tra diversi tori bufalini, la qual cosa suggerisce che il tempo di co-incubazione dei gameti debba essere adattato al toro impiegato.

Un altro parametro che influisce sull'efficienza di fecondazione e che può variare in funzione della capacità fecondante del toro è la concentrazione spermatica: normalmente nel bovino si utilizza una concentrazione finale di  $1 \times 10^6$ , mentre nel bufalo è necessario una concentrazione doppia  $2 \times 10^6$  (Ward et al.,2001). Nella specie bovina, le variazioni di fertilità tra i singoli tori nonché tra i diversi eiaculati del toro stesso sono stati segnalati sia per le inseminazioni strumentali che per la fecondazione in vitro (Hillery et al, 1990;. Shi et al, 1991;. Otoi et al, 1993;. Kreysing et al, 1997; Zhang et al, 1999; Palma e Sinowatz, 2004; Alomar et al, 2006). Non è detto che un toro che presenti i migliori requisiti morfologici e genetici abbia un seme altamente fertile, o che la sua fertilità sia uguale in campo come in vitro. Questo problema è fortemente limitante nei rapporti tra laboratori di produzione embrionale ed i privati; normalmente l'allevatore sceglie il seme su cataloghi

che presentano tutte le caratteristiche della progenie ma difficilmente sono riportate le percentuali di fertilità in vitro. Questa differenza di fertilità tra i tori è maggiormente visibile nella specie bufalina che in quella bovina. Per cercare di attenuare l'effetto del seme, meglio noto come effetto toro, molti laboratori cambiano la concentrazione spermatica e la concentrazione dell'agente capacitante. L'effetto toro incide anche sulle metodiche utilizzate per la selezione del seme.

### ***Coltura in vitro (IVC).***

Dopo la fecondazione l'oocita fecondato inizia, a livello tubarico, lo sviluppo embrionale che si completa nell'ambiente uterino. Nell'ambito dello sviluppo embrionale pre-impianto è pertanto possibile individuare una fase precoce, che corrisponde alla presenza degli embrioni nell'ovidutto, ed una tardiva che coincide con il passaggio nell'utero. Nella prima fase di sviluppo gli embrioni sono entità indifferenziate, non vascolarizzate, che si dividono ripetutamente senza, però, mostrare accrescimento (Turner et al., 1992). Il controllo genetico dell'embriogenesi è inizialmente di derivazione materna laddove, in un successivo momento, comincia ad esprimersi il genoma embrionale (Tesarik, 1993). Gli embrioni a questo stadio di sviluppo non sono sensibili ad ormoni ed a fattori di crescita e possono essere coltivati in vitro in media relativamente semplici attraverso tutti gli stadi di sviluppo che in vivo hanno luogo a livello tubarico. Al contrario, nella fase tardiva di sviluppo, gli embrioni non sono più elementi indifferenziati, in quanto si osserva la formazione del primo epitelio embrionale, il trofotoderma, e del nodo embrionale. In questo momento dell'embriogenesi si osserva che l'accrescimento e la responsività ad ormoni ed a fattori di crescita risultano incrementati in misura rilevante. Il controllo genetico dello sviluppo è ascrivibile al genoma embrionale e l'attività metabolica si intensifica notevolmente con il progredire fino allo stadio di blastocisti. Il controllo metabolico durante la fase del pre-impianto può essere intrinseco ed estrinseco, ovvero mediato dall'ambiente, nella fattispecie dalle vie genitali femminili. Il controllo intrinseco all'embrione, dovuto ad attività enzimatiche, mediatori intracellulari e sistemi di trasporto di membrana, prevale negli stadi precoci di sviluppo, laddove gli embrioni sono indifferenziati, relativamente autonomi e non mostrano accrescimento. Il passaggio ad un

controllo estrinseco si verifica, invece, negli stadi più tardivi, quando si osserva accrescimento, la differenziazione nelle due diverse linee cellulari e gli embrioni si preparano all'impianto. Se ne deduce, pertanto, che l'ambiente tubarico provvede a rilasciare fattori favorevoli mentre quello uterino fornisce fattori determinanti per lo sviluppo embrionale.

Nonostante gli innumerevoli studi condotti allo scopo di ottimizzare il sistema di coltura in vitro e i sensibili miglioramenti delle rese embrionali ottenuti, allo stato attuale l'ambiente materno rimane insostituibile. Ci sono indicazioni che la composizione del mezzo può influenzare la qualità dell'embrione (Abe et al. 2002; Rizos et al 2002). In realtà, diversi studi hanno dimostrato che, mentre la qualità innata dell'ovocita è il fattore principale che determina la resa in blastocisti, l'ambiente di coltura in vitro, in cui sono esposti gli embrioni dopo la fecondazione, è il fattore determinante della qualità delle blastocisti (Abe et al. 2002; Rizos et al 2003 ). Gli embrioni prodotti in vitro sono, infatti, meno vitali e meno resistenti alla crioconservazione e mostrano differenze sia a livello cellulare (Boni et al., 1999) sia a livello di espressione genica (Miles et al., 2008) rispetto a quelli che si sviluppano in vivo. Ne consegue che l'ottimizzazione del sistema di coltura in vitro è di fondamentale importanza perché condizioni inadeguate di coltura si ripercuotono negativamente anche sugli eventi post-impianto. Un fattore imprescindibile che determina lo sviluppo e la vita successiva dell'embrione è il genotipo embrionale. Questo dipende, a sua volta, dal genotipo paterno e materno (Hasler et al., 1995; Holm et al., 1998; Looney et al., 1994). Lo sviluppo embrionale in vitro è soggetto all'espressione di specifici alleli che caratterizzano lo sviluppo durante la coltura (Wu et al., 1998) e/o le capacità metaboliche dell'embrione (Niemann et al., 2000). Miglioramenti nella formulazione dei media colturali hanno portato ad un aumento della capacità di sostenere l'embrione di mammifero in tutto il periodo pre-impianto e pre- attecchimento. Le tecnologie per la coltura embrionale di mammifero sono state stabilite 50 anni fa (Whitten 1956, 1957). Nei successivi cinque decenni, non solo si è imparato molto sulla fisiologia e la genetica dell'embrione, ma si è anche giunti ad una comprensione migliore dei fattori ambientali, di laboratorio, che incidono sullo sviluppo dell'embrione. Numerosi protocolli sono stati sviluppati ed applicati nel corso degli anni. Essi includono vari tipi di co-culture così come sistemi privi di cellule e anche procedure di coltura in vivo nell'ovidotto di pecora (Galli et al., 1996; Eyestone et al., 1987). In quest'ultimo caso, la qualità degli embrioni è comparabile a

quella dei programmi MOET, specialmente quando si parla di embrioni che saranno congelati/scongelati prima del trasferimento in riceventi. Gli embrioni vengono coltivati in vitro fino a 48 ore dopo la fecondazione e poi sono trasferiti nell'ovidutto dell'ospite intermedio. La coltura in vivo richiede un esperto in chirurgia e delle strutture adeguate che, se pure giustificate dalla qualità degli embrioni che si ricavano, rendono comunque l'uso di ospiti intermedi una procedura poco pratica, soprattutto se la produzione embrionale è su larga scala. Naturalmente la via più pratica ed economica è quella di continuare la coltura in vitro degli zigoti dopo la fecondazione. È con questo obiettivo in mente e tenendo presente gli effetti benefici della precedente coltura in vivo degli zigoti che, nel 1987, si giunse, ad opera di Gandolfi et al., all'impiego dei sistemi di co-cultura. Monostrati di cellule oviduttali vennero impiegate per la prima volta con successo nell'IVC ovina e suina. È diventato più tardi evidente che non solo cellule oviduttali, ma anche altre linee cellulari, come cellule di fegato di ratto bufalino (BRL; Hasler et al., 1995) e cellule renali di scimmia (VERO; Carnegie et al., 1997) sono capaci di fornire un ambiente idoneo alla crescita dell'embrione. L'introduzione delle co-culture di embrioni con cellule somatiche è stata una tappa importante perché ha permesso di superare il problema dell'arresto dello sviluppo embrionale bovino a 8-16 cellule (Eyestone et al., 1989). Tuttavia, questo sistema presenta diversi svantaggi perché richiede la gestione di cellule soggette a variazioni biologiche ed implica l'uso di terreni complessi, come il TCM addizionato di siero, che non permettono ai ricercatori di avere un sistema di coltura definito che faciliti lo studio della fisiologia embrionale. Inoltre il siero sembra essere implicato nel determinismo di diverse anomalie embrionali, prima fra tutte la sindrome della macrosomia fetale o large-offspring syndrome (LOS) (Lazzari et al., 2002). Un evento importante, nel campo della produzione embrionale *in vitro*, è stato la formulazione del primo medium di coltura semi-definito, il Synthetic Oviductal fluid (SOF) (Keskintepe et al., 1995; Tervit et al., 1972). E' ormai diventato evidente che per migliorare il sistema di coltura in vitro, è necessario basarsi sulle caratteristiche dell'ambiente tubarico per formulare dei sistemi di coltura in vitro definiti.

Un aspetto interessante è che non tutti i componenti presenti in un terreno di coltura sono obbligatori perché lo sviluppo si compia: in altri termini lo sviluppo embrionale si può verificare anche nella loro completa assenza, grazie alla nota plasticità embrionale, ma a scapito della vitalità. Se consideriamo gli aminoacidi notiamo che, in loro mancanza, è

possibile ottenere lo sviluppo completo dell'embrione dallo zigote alla blastocisti e, di fatto, ottenere dei nuovi nascituri dopo il trasferimento dell'embrione (Whitten e Biggers 1968; Whittingham, 1971; Fissore et al 1989). Pertanto, gli amminoacidi non possono essere classificati come componenti assoluti di un terreno di coltura degli embrioni. Tuttavia, in presenza di amminoacidi, lo sviluppo embrionale in coltura è temporalmente lo stesso di quello osservato in vivo e da un punto di vista morfologico si può notare che le cellule del nodo embrionale (ICM) sono più compatte, il metabolismo energetico è meglio supportato, vi è un'apoptosi ridotta e, soprattutto, una migliore vitalità dell'embrione, valutata dall' impianto allo sviluppo del feto (Gwatkin 1966; mandrino e Pedersen 1973; Bavister e Arlotto 1990, Gardner e Lane 1993; Lane e Gardner 1994). All'interno del tratto femminile, gli embrioni sono esposti a una varietà di macromolecole, come l'albumina e i glicosaminoglicani. L'albumina è la proteina più abbondante nel tratto femminile (Leese 1988) e svolge un ruolo fondamentale per annullare gli effetti delle tossine ed è importante anche per la pressione osmotica colloidale (Palasz et al. 2000). Altri componenti importanti dei liquidi oviduttale ed uterino sono i glicosaminoglicani e i proteoglicani. E' stato, infatti, osservato che i glicosaminoglicani ialuronidati (acido ialuronico) possono sostituire l'albumina nel mezzo di coltura (Gardner et al. 1999). Inoltre, l'inclusione di acido ialuronico nel terreno di coltura è stata associata con il mantenimento della struttura embrionale e con un aumento della criotolleranza degli embrioni in varie specie, quali la pecora, la vacca, il topo e l' uomo (Gardner et al 1999;. Stojkovic et al 2002;. Lane et al 2003;. Balaban e Urman 2005; Palasz et al 2006). Di ulteriore interesse è la constatazione che l'aggiunta di acido ialuronico al mezzo di coltura aumenta in modo significativo l'impianto della blastocisti e lo sviluppo del feto dopo il trasferimento nel topo e nella pecora (Gardner et al 1999;. Dattena et al 2007). Un aumento delle gravidanze è stato visto anche quando lo ialuronato è presente solo nel mezzo utilizzato per il trasferimento (Gardner et al. 1999).

Riassumendo, amminoacidi e macromolecole sono componenti importanti di un terreno di coltura embrionale per migliorare la qualità e la quantità degli embrioni prodotti, ma la loro assenza non pregiudica del tutto la crescita embrionale.

Altri componenti, quali gli ioni, sono obbligatori nel medium e una variazione (per eccesso o per difetto) delle concentrazioni non viene avvertita come tossica, al contrario sbagliare la concentrazione delle macromolecole può essere fatale per lo sviluppo embrionale.

All'interno del tratto riproduttivo femminile, l'embrione è in contatto con le cellule epiteliali del ovidotto e dell'utero. Queste cellule epiteliali modificano costantemente l'ambiente in cui l'embrione è esposto e sono anche in grado di rimuovere le tossine e i cataboliti prodotti dall'embrione, come lo ione ammonio, attraverso la circolazione materna e la disintossicazione successive. Da qui l'enfasi sul rinnovo del medium, soprattutto se il terreno contiene aminoacidi, i quali durante il metabolismo embrionale sono i principali produttori di ammonio, notoriamente tossico per le colture embrionali (McEvoy et al. 1997; Gardner et al. 2004; He et al. 2007). Insieme con la possibilità di rimuovere sostanze potenzialmente nocive per l'ambiente attorno all'embrione, il tratto femminile fornisce gradienti di nutrienti, sia carboidrati (Gardner et al 1996; Harris et al 2005) che aminoacidi (Harris et al 2005; Hugentobler et al. 2007), che sono coinvolti nella regolazione e nella produzione di energia da parte dell'embrione in via di sviluppo. Un aspetto fondamentale è che i fabbisogni dell'embrione variano in funzione dello stadio di sviluppo. A titolo esemplificativo, per dimostrare quanto sia importante il dinamismo nelle colture embrionali basti pensare al rapporto controverso che gli embrioni hanno con il glucosio. Questo zucchero è una fonte energetica molto importante per le cellule somatiche di mammifero, ma la presenza del glucosio alle concentrazioni ritrovate nel siero (5.6 mM) è dannosa per gli embrioni di diverse specie durante le fasi di scissione precoce (Schini e Bavister, 1988; Seshagiri e Bavister, 1989; Thompson et al, 1992. Kim et al, 1993; Gutierrez-Ad'an et al, 2001; Larson et al, 2001; Peippo et al, 2001; Scott e Whittingham, 2002; Kwun et al, 2003), mentre è necessario nella fase tardiva. Dallo stadio di 8 cellule fino a quello di 16 cellule, il piruvato e il lattato sono le principali fonti di energia (Leese e Barton, 1984), mentre dalla attivazione del genoma embrionale allo stadio di blastocisti, gli embrioni preferiscono il glucosio come fonte di energia per la compattazione e blastulazione (Gardner, 1998; Khurana e Niemann, 2000). Questi dati supportano l'ipotesi che la fisiologia dello zigote in via di sviluppo è temporalmente regolata dalla concentrazione delle sostanze nutrienti disponibili (Lane e Gardner 2000). Di qui la necessità di rendere dinamici i sistemi statici. Sebbene tale dinamica temporale in un sistema di coltura può essere raggiunta muovendo gli embrioni in gocce fresche di media a specifici intervalli di tempo, un approccio alternativo è l'uso di una camera di cultura dinamica (Gardner 1994; Suh et al 2003; Wheeler et al. 2007). Quest'ultimo approccio ha il vantaggio di essere in grado di esporre gli embrioni a gradienti di numerosi mezzi freschi

per tutto lo sviluppo. Inoltre, i campioni di terreno possono essere prelevati e analizzati per i carboidrati (Lane e Gardner 1996), amminoacidi (Brison et al. 2004) e altri fattori legati al potenziale impianto post-transfer (Gardner e Sakkas 2003).

Un altro fattore, che incide sulla resa embrionale, è il numero di embrioni presenti nella goccia di cultura. Lo sviluppo embrionale va decisamente meglio quando gli embrioni sono coltivati in gruppi rispetto a quando sono lasciati crescere in colture individuali (Hendriksen et al 1999; Gardner e Lane 2000). L'effetto di gruppo in fase di sviluppo embrionale è probabilmente dovuto alla secrezione di fattori embriotrofici, che agiscono in modo autocrino-paracrino (Gardner e Lane 2000). Ci sono, tuttavia, alcune situazioni in cui è necessario utilizzare delle colture singole, come ad esempio nel caso in cui si voglia mantenere l'identità dell'embrione o, comunque, quando si ricorra a manipolazioni aggiuntive quali la rimozione della zona pellucida. Per superare questo problema Vajta et al. (Vajta et al 2000) hanno sviluppato una nuova tecnica denominata "*Well of the Well*" (WOW), in cui gli embrioni vengono coltivati all'interno di piccoli pozzetti fatti all'interno di un pozzetto più grande, in modo che nello stesso pozzetto di una piastra ci sono più embrioni, che condividono l'ambiente, pur rimanendo ognuno separato dagli altri. Questo sistema permette il mantenimento della coltura individuale di ogni struttura senza perdere gli effetti positivi della coltura di gruppo. Inoltre ci sono altri fattori che non devono essere dimenticati, quali l'utilizzo di una ridotta tensione di ossigeno, un sistema di incubazione adeguato, nonché una preselezione adeguata di tutto il materiale di consumo, come piastre, puntali, provette etc..

Ancora oggi rimane una chiara differenza di qualità tra gli embrioni prodotti in vitro e quelli prodotti in vivo. È noto che tra le due categorie esistono diversità a livello cellulare, in termini di profilo metabolico, morfologico (Betteridge et al., 1988; Hyttel et al., 1989; Lindner et al., 1983; Plante et al., 1994; Shamsuddin et al., 1992) e dell'espressione genica. È stato dimostrato che la crescita degli embrioni prodotti in vitro avviene con ritardo rispetto a quelli in vivo (Grisart et al., 1994; Hyttel et al., 1989), e ciò risulta particolarmente evidente per gli embrioni di sesso femminile (Avery et al., 1991; Carvalho et al., 1996; King et al., 1991; Xu et al., 1992). Le morule prodotte in vitro presentano un minore grado di compattazione (Van Soom et al., 1992), un aspetto granuloso ed un ridotto spazio perivitellino (Van Soom et al., 1992). Le blastocisti coltivate in presenza di siero

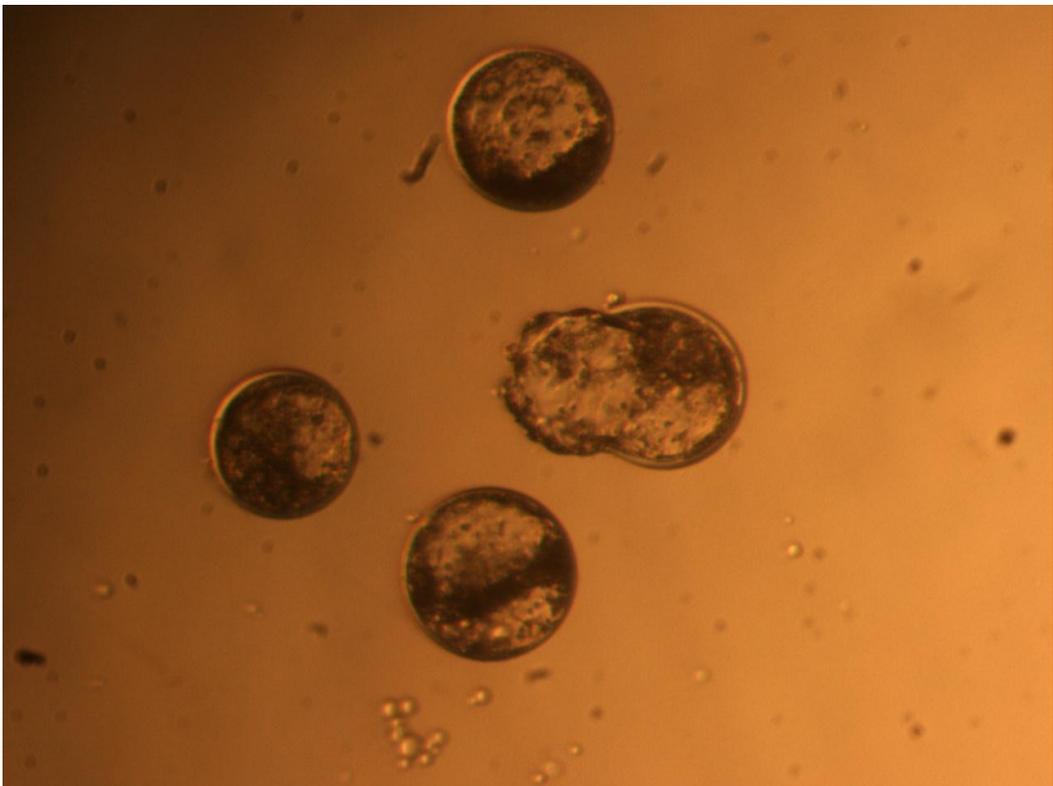
appaiono più scure e posseggono più granuli e gocce lipidiche. L'accumulo dei lipidi è probabilmente imputabile ad un'insufficiente funzione mitocondriale. Sembra, infatti, che l'attività mitocondriale sia parzialmente compromessa negli embrioni IVP (Monaco 2007). Oltretutto, poichè la funzione mitocondriale è di fondamentale importanza per lo sviluppo embrionale, è possibile che le più basse percentuali di gravidanza, che si hanno con embrioni IVP, siano dovute ad alterazioni a carico di tali organuli. Embrioni IVP hanno una minore resistenza al congelamento/scongelo rispetto quelli prodotti in vivo. Studi approfonditi hanno dimostrato che gli embrioni prodotti in vivo sono caratterizzati da un sottile spazio perivitellino (PvS), da un rivestimento di microvilli (MV) continuo e compatto lungo tutta la membrana plasmatica, da un sistema ben definito di interazioni cellula-cellula e da un'ampia popolazione mitocondriale con numerose creste trasverse (Attanasio, 2007). La sola esposizione di questi embrioni alle soluzioni contenenti i CP causa una profonda disidratazione cellulare ed un rigonfiamento dei mitocondri. E' stato osservato, inoltre, che la crioconservazione induce ulteriori danni a carico dei MV e l'accumulo di detriti cellulari. Per quanto riguarda gli embrioni prodotti in vitro, questi sono caratterizzati da un PvS più ampio, da pochi MV, dalla presenza di detriti cellulari nel PvS, da un numero ridotto di contatti tra le cellule del trofoblasto e da una maggiore presenza di gocce lipidiche citoplasmatiche. Quando esposti a soluzioni contenenti i CP, gli embrioni prodotti in vitro reagiscono allo stesso modo di quelli prodotti in vivo, ma risulta evidente una maggiore sensibilità dei primi rispetto a questi ultimi. Infatti, quelli prodotti in vitro, quando crioconservati, perdono la loro struttura organizzativa e, rispetto a quelli prodotti in vivo, si riorganizzano più difficilmente dopo lo scongelamento. E' stato ampiamente dimostrato che queste profonde differenze sono da imputare alle modalità di coltura in vitro; infatti, migliorando i sistemi di coltura si potrebbe aumentare la criotolleranza degli embrioni. Nonostante i progressi ottenuti in questo campo, le percentuali di gravidanza dopo trasferimento di questi embrioni sono inferiori (Hasler et al., 1995; Looney et al., 1994). Farin et al. (1999) hanno osservato che al giorno 17 di gravidanza circa il 19% degli embrioni IVP era degenerato, mentre nessun embrione presentava degenerazione nel gruppo di controllo prodotto in vivo. Questa differenza tra embrioni prodotti in vivo ed in vitro è molto più evidente nella specie bufalina, laddove il principale problema è quello di una scarsa resistenza al congelamento degli embrioni, imputabile all'elevato contenuto lipidico (Boni R. et al., 1992).

Inoltre, una percentuale di feti derivanti da embrioni prodotti in coltura presentano delle peculiari anomalie di sviluppo che rientrano nel quadro della sindrome della LOS (Behboodi et al., 1995; Farin et al., 1999; Farin et al., 1995; Kruijff et al., 1997; McEvoy et al., 1998; Sinclair et al., 1995; Van Wagtenonk-de Leeuw et al., 1998; 2000; Walker et al., 1996). Le anomalie più frequentemente associate alla LOS includono un peso maggiore dei vitelli alla nascita, mortalità embrionale, fetale, neonatale e perinatale, idroallantoide, allungamento della gestazione, nonché una serie di malformazioni congenite a carico di diversi apparati. I feti di dimensioni più grandi sono responsabili, a loro volta, di un aumento nell'incidenza di distocie e di morte perinatale o, comunque, comportano la necessità di intervenire con il parto cesareo. Alcuni autori considerano l'aggiunta del siero nel medium e l'uso delle co-culture cellulari le principali cause della LOS (Sinclair et al., 1999; Thompson et al., 1995). L'uso del siero nel terreno di coltura, rimane una questione fortemente dibattuta tra gli scienziati. Non è chiaro se escludendo il siero dall'IVC si possa eliminare completamente la comparsa della LOS (McEvoy et al., 1999; Sinclair et al., 1999; Thompson et al., 1995; McMillan et al., 1999; Van Wagtenonk-de Leeuw et al., 2000). Ad ogni modo, è evidente che la minore vitalità degli embrioni IVP e, conseguentemente, la peggiore resistenza al congelamento degli stessi, l'elevata incidenza di riassorbimenti embrionali e morte fetale, le anomalie che si osservano nelle diverse fasi dello sviluppo sono imputabili a condizioni sub-ottimali di coltura in vitro. Una delle principali cause dello sviluppo differente tra gli embrioni in vivo e quelli in vitro va imputato alla mancanza di sistemi colturali che riescano a mimare l'ambiente tubarico/uterino. Come precedentemente detto, in natura l'ambiente in cui si sviluppa l'embrione è in continua trasformazione e si adatta e risponde ai mutamenti creati dall'embrione; c'è un rapporto diretto tra l'ambiente e l'embrione nello scambio di nutrienti e cataboliti e questo fa sì che non ci sia un accumulo di entrambi. Quindi il futuro della coltura embrionale sarà probabilmente basato su chip in grado di fornire dinamiche temporali, facilitando in tempo reale analisi della fisiologia dell'embrione.

Fig 4 Embrioni di Bovino



Fig 5 Embrioni di Bufalo



## *Crioconservazione Embrionale*

Una volta prodotti gli embrioni possono essere trasferiti direttamente o crioconservati e stoccati in azoto liquido ( $LN_2$ ), per poi essere trasferiti. La tecnologia della crioconservazione consente di interferire con la fisiologia cellulare e di arrestare il tempo biologico. Quando una cellula viene congelata e stoccata ad una temperatura di  $-196^\circ C$ , che corrisponde alla temperatura dell'azoto liquido, i processi metabolici sono bloccati e la vitalità cellulare è totalmente indipendente dal tempo di conservazione. Esistono molteplici fattori che influenzano la congelabilità degli embrioni, quali la velocità di congelamento/scongelo, la tossicità dei crioprotettori (CP) ed i tempi di esposizione ad essi; vanno ricordati anche la specie, lo stadio di sviluppo embrionale, il contenuto lipidico intracellulare, l'origine degli embrioni (prodotti in vivo o in vitro). I primi esperimenti di crioconservazione coronati da successo sono stati effettuati su embrioni umani (Van der Elst J et al. 1997). Nel tentativo di migliorare l'efficienza, rendere più economico e semplificare la procedura di crioconservazione, negli ultimi anni si è dato spazio alla tecnica della vitrificazione. Con il termine vitrificazione si intende un processo fisico con il quale una soluzione passa dallo stato liquido a quello vetroso a basse temperature, bypassando la formazione di cristalli di ghiaccio e mantenendo le proprietà di un liquido in forma solidificata. Il protocollo standard di questa tecnica prevede una prima fase in cui gli embrioni sono esposti a soluzioni contenenti basse concentrazioni di CP per un breve periodo (al massimo 3 minuti), la qual cosa consente di ridurre il tempo di esposizione alla soluzione vitrificante vera e propria, che risulta tossica per l'elevata concentrazione dei CP. Il rispetto dei tempi nelle procedure di vitrificazione è determinante ai fini dei risultati, ed anche trenta secondi in più o in meno possono avere un grande effetto sulle percentuali di sopravvivenza. Così come nel raffreddamento, anche nella fase di reidratazione post-riscaldamento, è fondamentale il rispetto dei tempi, visto che gli embrioni sono a contatto con elevate concentrazioni di CP. A questo scopo, per limitare l'effetto tossico dell'alta concentrazione di CP, la soluzione di riscaldamento, generalmente con un CP non permeabile, viene caricata all'estremità della paillette stessa (Saha S. et al., 1996). Nel caso delle OPS, o di altri metodi in cui non si ricorre all'uso di paillette tradizionali, questa fase avviene immergendo direttamente la parte contenente l'embrione nell'apposita soluzione di riscaldamento (Attanasio, 2007).

Per cercare di incrementare la sopravvivenza post-riscaldamento di oociti ed embrioni crioconservati con la tecnica della vitrificazione, molti autori hanno concentrato i propri studi su metodi che cercano di incrementare la velocità di raffreddamento, visto che questo consentirebbe di usare una minore concentrazione di CP e, quindi, di ridurre i danni da tossicità. Fin dai primi esperimenti di vitrificazione era facilmente intuibile che il metodo più semplice per aumentare la velocità di raffreddamento era sicuramente quello di ridurre il volume della soluzione da vitrificare e cercare di stabilire un contatto diretto tra questa e l' $\text{LN}_2$ . Il primo metodo che ha cercato di rendere concreto e di sfruttare i vantaggi dell'approccio con volume minimo di soluzione e diretto contatto del campione con  $\text{LN}_2$  è stato quello che utilizzava la griglia del microscopio elettronico come carrier (Steponkus et al., 1990; Martino et al., 1996b; Choi et al., 2000; Cho et al., 2002). Successivamente, si è invece imposta la metodica delle Open Pulled Straw (OPS) grazie alla sua facilità di esecuzione ed ai costi contenuti. Questo nuovo strumento è stato ideato da Vajta et al. nel 1998 (Vajta et al., 1998), basandosi su un'idea semplice e facile da realizzare: riducendo il diametro di una normale paillette da inseminazione si può diminuire il volume di soluzione contenente il campione da vitrificare. Per cercare di migliorare i risultati ottenuti, sono state, quindi, sperimentate ancora nuove metodiche che sfruttano lo stesso principio. Lane et al. (Lane Et al., 1999) hanno riportato risultati soddisfacenti utilizzando il metodo "cryoloop vitrification" (CLV) per la vitrificazione di blastocisti umane e di topo. L'ultima versione di queste procedure con volume minimo di soluzione di vitrificazione è il Cryotop, dove lo strumento su cui vengono messi gli oociti o gli embrioni è rappresentato da una sottile linguetta di polipropilene legata ad un manico di plastica, fornito di un cappuccio protettivo per la conservazione del campione vitrificato in  $\text{LN}_2$  (Kuwayama and Kato, 2000; Kuwayama et al., 2005 a; b). Il metodo è semplice da eseguire e le velocità di raffreddamento e riscaldamento sono molto più alte di quelle raggiungibili con le OPS.

I primi esperimenti di vitrificazione di embrioni bovini risalgono al 1997 (Van Wagendonk-de Leeuw Et al., 1997). Da questo studio è emersa la possibilità di vitrificare con successo embrioni bovini prodotti in vivo senza avere una significativa riduzione della percentuale di gravidanza rispetto agli embrioni trasferiti freschi (44.5% vs 45.1% rispettivamente). Al contrario gli embrioni bovini prodotti in vitro hanno subito mostrato una maggiore sensibilità alla crioconservazione; ciò sembrerebbe causato dal diverso rapporto tra lipidi e proteine (Leibo and Loskutoff, 1993; Pollard and Leibo, 1993). Queste

osservazioni, se non tutte, sembrano strettamente connesse al contenuto lipidico citoplasmatico che si riscontra negli embrioni; questo ha indotto molti ricercatori a focalizzare la propria attenzione su questo aspetto e, come conseguenza di ciò, si è riusciti ad ottenere dei risultati migliori anche in quelle specie in cui i successi nel congelamento sono sempre stati limitati. Ad esempio nel maiale la delipidizzazione o la crioconservazione degli embrioni ad uno stadio in cui il contenuto lipidico è più basso ha permesso di incrementare l'efficienza del congelamento (Nagashima et al. 1994; Dobrinsky et al., 2000). Uno studio più approfondito sulla possibilità di vitrificare embrioni bovini a differenti stadi di sviluppo è stato fatto nel 1998 da Vajta et al. In questo studio è emerso che lo sviluppo di embrioni vitrificati al giorno 1 e 2 (giorno 0= fecondazione) di coltura è stato significativamente più basso rispetto al Gruppo controllo (non vitrificati), mentre la capacità di sviluppo in vitro di embrioni vitrificati dal giorno 3 al giorno 8 di coltura non è risultata statisticamente differente dai rispettivi controlli. Nello stesso lavoro è stata riportata la nascita di tre vitelli dal trasferimento di blastocisti vitrificate e riscaldate che, a loro volta, erano state ottenute dalla fecondazione di oociti vitrificati e riscaldati. Lo stesso autore aveva precedentemente riportato risultati simili vitrificando embrioni prodotti in vitro, a diversi stadi di sviluppo, utilizzando le French mini-straw. In particolare da questo studio era emerso un'alta percentuale di riespansione dopo riscaldamento di blastocisti precoci (75%), blastocisti (80%), blastocisti espanse (83%) e blastocisti sgusciate (67%), mentre la stessa percentuale risultava molto bassa per le morule compatte (10%). Inoltre, nello stesso lavoro è stato riportato una maggiore percentuale di sgusciamiento per gli embrioni allo stadio più avanzato (blastocisti, 47%; e blastocisti espanse, 63%) rispetto a quello precoce (blastocisti precoci, 34%) (Vajta et al., 1996). Nel 2006, Vieira et al. hanno utilizzato la metodica delle OPS apportando alcune modifiche; hanno sostituito le OPS con micropipette di vetro tirate al calore, vitrificando con successo blastocisti espanse di bovino (Vieira et al., in press). Recentemente, è stato dimostrato che embrioni bovini allo stadio di blastocisti sgusciate, prodotte dopo nuclear transfer, sono relativamente resistenti quando sottoposti a procedure di vitrificazione che utilizzano come strumento il cryotop (Laowtammathron et al, 2005).

Nel 1998 Galli et al. (Galli. et al., 1998) sono riusciti ad ottenere tre vitelli, di specie bufalina, dal trasferimento di nove embrioni crioconservati mediante congelamento lento. In questo studio si è fatto ricorso alla coltura in vivo, nelle tube di pecora, di presunti

zigoti, dimostrando che la permanenza nell'ovidutto incrementa la resistenza al congelamento: in particolare gli oociti prelevati mediante OPU sono stati fecondati in vitro ed a due giorni dall'IVF sono stati trasferiti in ovidutto di pecora, e, dopo 5 giorni sono stati recuperati e sottoposti a congelamento lento. Embrioni bufalini interamente prodotti in vitro sono stati vitrificati con risultati soddisfacenti per la prima volta nel 1996 (Gasparrini ET val., 2001) con una metodica previamente utilizzata nella specie ovina (Naitana S. et al., 1996). La nascita di vitelli bufalini dal trasferimento di embrioni interamente prodotti in vitro e vitrificati con le tradizionali paillette è stata riportata nel 2004 da due gruppi di ricerca ((Neglia et al., 2004; Duran DH. et al., 2004). In entrambi gli studi le percentuali di sopravvivenza post-riscaldamento non sono risultate differenti nei diversi stadi di sviluppo embrionale. Al contrario, la cronologia di sviluppo ha influenzato fortemente l'efficienza, con embrioni che raggiungevano lo stadio di blastocisti a 6 giorni più resistenti rispetto a quelli che arrivavano allo stesso stadio a 7 ed a 8 giorni (Neglia ET al., 2001). Per quanto riguarda i risultati finali Duran et al. (2004) hanno riportato il 10.91% di nati a termine dopo ET, cioè 6 femmine riceventi su 55 hanno dato prole vitale, mentre Neglia et al. (2004), hanno ottenuto 2 vitelli a termine dal trasferimento di 8 embrioni (25%).

Le tecniche di vitrificazione, che sfruttano volumi minimi di soluzione vitrificante, sono state utilizzate per la prima volta nel 2005 (De Rosa et al., 2005), quando embrioni di bufalo prodotti in vitro sono stati vitrificati mediante le OPS, con una combinazione di CP già precedentemente utilizzata da Naitana et al. (Naitana et al., 1996). Nello stesso anno Laowtammathron C. et al. (Laowtammathron et al. nel 2005) hanno utilizzato la metodica Cryotop applicandola unicamente a blastocisti sgusciate, prodotte dopo nuclear transfer, ottenendo una discreta resistenza di queste alla vitrificazione. Nel 2007, De Rosa et al. (De Rosa et al., 2007) hanno valutato le percentuali di sopravvivenza dopo 24 h dal riscaldamento di embrioni IVP di bufalo, vitrificati con due differenti combinazioni di crioprotettori già utilizzati precedentemente nella specie ovina (Naitana et al., 1996) ed in quella bovina (Vajta et al., 1998). È stato utilizzato il cryotop come strumento di vitrificazione ed è stata osservata l'influenza dello stadio di sviluppo sulla criotolleranza. Tra le due differenti combinazioni non sono state osservate differenze di sopravvivenza (70% della prima combinazione vs 73% della seconda). Nonostante ciò elevate percentuali di sopravvivenza sono state osservate per lo stadio di xB1 vitrificate con la prima combinazione di crioprotettori.

## *Predeterminazione Del Sesso: Sessaggio Degli Embrioni E Degli Spermatozoi*

Il primo vitello nato con una tecnica di preselezione del sesso nacque in Canada nel 1975 (Gordon, 2003): le tecniche utilizzate allora prevedevano una biopsia piuttosto invasiva perché la tecnica di sessaggio necessitava di molto materiale biologico. Queste tecniche tendevano a danneggiare molto gli embrioni ed erano del tutto anti economiche al punto che Lange, nel 1996, fece notare che in Germania dai primi anni '90 in poi la percentuale di vitelli nati, da embrioni precedentemente sessati, era diminuita drasticamente a causa dei costi e dei risultati irrealizzabili. Con il tempo si è cercato di mettere a punto tecniche di biopsia affidabili che al tempo stesso associassero caratteristiche di praticità e scarsa invasività: tra queste le più diffuse sono la tecnica di sezione con micro bisturi e quella mediante microaspirazione (Chrenek et al., 2001). Tra le due la seconda è quella sicuramente meno invasiva (asportazione di 1 blastomero) e, data la piccola apertura effettuata nella zona pellucida, è maggiormente compatibile con le tecniche di congelamento standard; la prima asporta un numero di blastomeri superiore (4-8) e prevede la perdita della zona pellucida ma consente di effettuare la biopsia in tempi più brevi ed a costi inferiori, con un'efficienza diagnostica superiore grazie al numero di blastomeri prelevati. Va detto comunque che la biopsia deve asportare al massimo il 10% delle cellule dell'embrione; nel caso di una blastocisti esse devono assolutamente provenire dal trofoblasto in modo da lasciare intatto il nodo embrionale. Il blastocite collassato si riformerà in poche ore (Herr et al., 1991). L'asportazione di un numero limitato di blastomeri è una condizione auspicabile per salvaguardare le future capacità di sviluppo dell'embrione, così come la rapidità nell'effettuare la biopsia per ridurre al minimo i tempi di contatto tra embrione e medium; in questo modo si evitano stress che potrebbero essere fatali al successivo sviluppo dell'embrione. È stato osservato che il prelievo di cellule non riduce le potenzialità dell'embrione (Shea, 1999) e che pure l'assenza della zona pellucida non è un fattore essenziale per la sopravvivenza al congelamento (Herr et al., 1991). Per quanto riguarda l'individuazione del cromosoma Y sono stati sperimentati diversi metodi come l'utilizzo di anticorpi per la ricerca di specifici antigeni maschili, il cariotipo, e l'analisi del DNA. È proprio quest'ultimo tipo di analisi, in particolare la reazione di polimerizzazione a catena (PCR), l'unico metodo che fino ad oggi garantisce un sessaggio

affidabile e tempi di applicazione ridotti, compatibili con il trapianto dell'embrione fresco o il suo congelamento. Grazie alle tecniche di biologia molecolare sempre più moderne e precise anche un blastomero è sufficiente per il sessaggio. Un protocollo standard di PCR prevede due amplificazioni consecutive: una pre-amplificazione per aumentare il materiale genetico di partenza, visto che parliamo massimo di 8 cellule, e successivamente un'altra PCR per processare il template ottenuto dalla prima PCR. Un protocollo standard di PCR prevede una denaturazione a 95 °C per 15 minuti, seguita da 39 cicli di denaturazione a 96 °C per 30 s, annealing a 52 °C per 30 s, ed estensione a 72 °C per 45 s. Dopo l'ultimo ciclo, tutti i campioni sono incubati per altri 5 minuti per assicurare completa estensione (Alomar et al., 2008). Dopodiché i template verranno fatti migrare su un gel di agarosio al 2% per la lettura. Attualmente il sessaggio embrionale è effettuabile a costi relativamente contenuti, consente di risparmiare il costo di trasferimento di un embrione maschio non desiderato e di evitare di impegnare una ricevente che potrebbe essere utilizzata invece per un embrione femmina oppure destinata all'IS. D'altra parte questa metodica porta alla perdita del 50% degli embrioni ottenuti normalmente in coltura (calcolando sempre che il rapporto tra maschi e femmine è 1:1). Per di più il sessaggio presenta alcuni punti critici che concorrono ad una riduzione delle percentuali di gravidanza: la pressione esercitata dai microbisturi durante la biopsia si ripercuote negativamente sulla coesione della massa cellulare e l'assenza della zona pellucida; tutte queste manipolazioni rendono l'embrione più sensibile all'esposizione dei crioprotettori ed alle basse temperature. (Ambrosi et al. 2001).

E' evidente che per poter ottenere vantaggi maggiori è necessario lavorare sui gameti, cioè prima della formazione dell'embrione. Il sessaggio degli spermatozoi rende possibile la produzione di embrioni a sesso predeterminato in quanto nei mammiferi è lo spermatozoo a determinare il sesso dell'embrione. Fino ad oggi sono state proposte differenti metodiche per ottenere seme sessato, molte delle quali non hanno dato risultati tali da poterle utilizzare in campo. Queste metodologie cercavano di dividere gli spermatozoi dei due sessi in base alle diverse caratteristiche fisiche o chimiche dei cromosomi sessuali.

Una di queste metodiche è basata sull'identificazione dell'antigene H-Y, presente sugli spermatozoi che portano il cromosoma Y. Tale antigene è così chiamato poiché il suo gene codificante è sul braccio lungo del cromosoma maschile, e perché si comporta come un fattore di istocompatibilità; quindi, con determinati anticorpi specifici è possibile, mediante

tecniche di immunofluorescenza, evidenziare gli spermatozoi che presentano queste proteine di membrana. Da un punto di vista operativo questa metodica non dà risultati soddisfacenti nè nel settore analitico, perché dà molte reazioni di cross-reaction, nè in quello preparativo.

Kaneko nel 1983 verificò che era possibile separare gli spermatozoi X e Y utilizzando una particolare tecnica di elettroforesi a flusso: in particolare, venivano ottenuti spermatozoi Y all'anodo (polo negativo) ed X al catodo. Questi autori ipotizzarono che la separazione suddetta fosse dovuta alle diverse cariche di superficie presenti sugli spermatozoi. Il più grande limite di questa tecnica è che comporta l'immobilizzazione degli spermatozoi, per cui l'utilizzo del seme così sessato è limitato alle tecniche di iniezione del gamete maschile in quello femminile.

E' noto che i cromosomi X e Y sono morfologicamente differenti, e che differiscono per grandezza e dimensione del materiale genetico (Parilla et al. 2004). La differenza di massa tra i due tipi di spermatozoi porta ad un differente peso e ad una diversa densità, il che dovrebbe permettere una loro separazione con dei gradienti continui o discontinui, mediante centrifugazione e/o filtrazione. Queste differenze però non sono sufficienti per la separazione delle popolazioni spermatiche: si è ormai visto che la centrifugazione non dà nessuno spostamento della sex-ratio (Machado et al., 2009), mentre la filtrazione ha dato risultati sufficienti solo con seme umano ma i risultati ottenuti sul seme bovino non sono accettabili (Ericsson et al., 1973).

Al giorno d'oggi la tecnica che si usa convenzionalmente per sessare il seme è la citofluorimetria a flusso, che permette di distinguere il corredo cromosomico aploide in base al contenuto di DNA delle cellule spermatiche; spermatozoi sessati freschi e crioconservati sono stati utilizzati per la produzione di prole in diverse specie (Seidel et al. 1999, Johnson 2000, Hollinshead et al. 2004). Il citofluorimetro a flusso è un sistema composto da uno o più raggi laser, da un sistema fluidico che immette le cellule da analizzare in un flusso di liquido isosmotico con il campione da analizzare, da una serie di rilevatori (fotodiodi e/o fotomoltiplicatori) e da un computer per l'analisi dei dati in tempo reale. L'analisi si basa sulla valutazione della luce emessa dalle cellule in esame, una volta che incontrano sul loro percorso il raggio laser. E' possibile misurare la diversa quantità di DNA presente negli spermatozoi X ed Y usando coloranti come il Bisbenzimidide Hoechst 33342, un agente che si lega alle basi A-T del doppio filamento di DNA. Successivamente

è possibile spezzare il flusso in piccole gocce, contenenti ognuna una particella, che vengono caricate positivamente o negativamente a seconda delle caratteristiche possedute dalla particella stessa. Due placche elettricamente cariche attirano le gocce a seconda della loro polarità e le deviano in due raccoglitori.

Attualmente i protocolli di sessaggio con il citofluorimetro sono pressoché standardizzati, al punto che molti Centri Tori hanno iniziato a vendere paillettes di seme sessato, se pur a costi molto elevati. In aggiunta al fattore costo, che non è trascurabile, l'accuratezza della metodica è di circa il 90% (intermizoo spa) e, quindi il margine di errore è ancora alto, ed infine il seme sessato ha una fertilità inferiore rispetto a quello non sessato sia in vivo che in vitro: la riduzione della fertilità e delle gravidanze è generalmente attribuita agli effetti deleteri della procedura del citofluorimetro. Va detto però che ancora oggi non è chiaro quali danni subiscono gli spermatozoi che passano nel citofluorimetro e quale è la percentuale degli spermatozoi sessati che risultano danneggiati (Maxwell et al 2004).

In vivo, può capitare che i risultati dell'inseminazione strumentale, possa non dare i risultati attesi, quando si utilizza il seme sessato. Una delle possibili cause della non ottimale riuscita del seme sessato, in vivo, escludendo per un attimo i danni che subiscono gli spermatozoi, potrebbe risiedere nella madre (controllo secondario del sesso) (Roche et al., 2006) e, quindi, nell'ambiente in cui l'oocita matura, viene fecondato e si sviluppa come embrione.

Un'altra importante applicazione riguarda l'utilizzo del seme sessato nel sistema IVEP. Ne consegue che in prospettiva futura il sistema IVEP dovrà essere adattato alle nuove problematiche del seme sessato: dalle concentrazioni degli agenti capacitanti durante la fecondazione, fino ad arrivare ai metaboliti necessari per gli embrioni di un determinato sesso (Xu Et al., 2009). Tutto questo senza dimenticare che sarà necessario studiare le differenze che ci sono tra i sessi da un punto di vista trascrizionale (Gene Expression).

### ***Introduzione alla parte sperimentale***

Da molto tempo l'uomo è interessato alla preselezione dei sessi; basti pensare che già nel lontano Medioevo si suggeriva alla futura madre di bere vino e sangue di leone durante il periodo di luna piena, per avere un figlio maschio. Ancora oggi girano alcune dicerie

popolari basate sull'uso di determinate diete per ottenere figli del sesso desiderato. Tutte queste credenze testimoniano quanto interesse abbia destato nei secoli la possibilità di preselezione dei sessi da parte dell'uomo. La preselezione dei sessi non può prescindere dal semplice meccanismo di determinazione dei sessi nei mammiferi: dal momento che gli oociti sono portatori del solo cromosoma X, il sesso del nascituro è determinato dallo spermatozoo che penetrerà la cellula uovo. Negli ultimi anni anche il mondo zootecnico si è buttato a capofitto nella ricerca di metodi che dessero una possibile predilezione per un sesso rispetto ad un altro. La capacità di determinare anticipatamente il sesso della prole rappresenterebbe un indubbio progresso verso lo sfruttamento ottimale delle risorse di un allevamento; basti pensare che nelle aziende di bovini da latte solo gli animali di sesso femminile sono produttivi mentre molti maschi (il cui utilizzo è strettamente riproduttivo) vengono mandati al macello con un piccolo ritorno economico, che non copre tutte le spese di gestione. Di conseguenza in ambito zootecnico poter indirizzare un sesso rispetto ad un altro porta a notevoli vantaggi economici, permette di ridurre i costi aziendali, aumenta la selezione sulla linea femminile e consente il controllo di quei difetti genetici legati al sesso. In natura, normalmente, il rapporto tra maschi e femmine, inteso come possibilità di avere figli di uno dei due sessi è 1:1 (*sex ratio*); questo vuol dire che in condizioni standard la possibilità di avere figli di uno dei due sessi è del 50%. Molti mammiferi, tra cui alcuni ruminanti, sono in grado di sbilanciare il rapporto sessuale della prole nata, in base alle condizioni sociali e ambientali (Kruuk et al., 1999); questo spostamento del rapporto tra maschi e femmine, in determinate condizioni ambientali, è stato visto anche in molte specie di rettili (Lance, 2008). Un altro fattore che indica l'ambiente materno come parte attiva nella selezione dei sessi, è la concentrazione di testosterone. Grant et al. (2008) hanno visto che livelli alti di questo ormone nel sangue della madre portano ad uno spostamento della *sex ratio* a favore dei maschi. Non è ancora ben chiaro, comunque, se sia l'alta concentrazione di testosterone o il ridursi dell'estradiolo (come risultato di una minore aromatizzazione del progesterone) o entrambe le condizioni a causare questa deviazione del rapporto maschio/femmina. Va detto che i risultati osservati da Grant sono veri quando parliamo di fecondazione artificiale mentre in vitro la variazione della concentrazione di testosterone non porta a nessuno spostamento della *ratio* (Diez et al. 2009). Ancora, alcuni ricercatori hanno descritto un certo numero di modi in cui l' influenza materna può esprimersi sul sesso della prole, sia prima che dopo il

concepimento ( Eberhard, 1996). Per esempio, i tempi di inseminazione all'interno dell' utero ( James, 2005), la lunghezza della fase follicolare ( Weinberg et al., 1995), e il potenziale di controllo materno nel differenziare l'accesso attraverso la zona pellucida ( Saling, 1991). Se questo concetto è vero, allora non importa solo quanto sia buona la metodologia per il sessaggio degli spermatozoi, perché i tassi di fertilità potrebbero rimanere bassi. Arrivati a queste conclusioni è logico puntare il nostro sguardo verso un altro approccio, non più sessare gli spermatozoi, ma bensì individuare quali siano i fattori all'interno della madre che facilitano un sesso piuttosto che l'altro.

I primi studi per cercare di sbilanciare la sex-ratio hanno puntato tutto sulla tempistica: ridurre i tempi di co- incubazione dei gameti o cambiare il tempo di maturazione dei COC, tutto questo per cercare di sfruttare le differenze morfologiche degli spermatozoi. Nagai et al. hanno dimostrato che variando il tempo di maturazione degli oociti si modifica la sex-ratio. I loro risultati mostrano che gli oociti subito dopo l'estrusione del primo corpo polare vengono fecondati più facilmente da spermatozoi con il cromosoma X; mentre con il passare del tempo aumenta la penetrazione degli spermatozoi Y( Nagai et al, 2006). Alomar, invece, ha provato a cambiare il tempo di co-incubazione per vedere se una ridotta interazione tra i gameti influisce sulla distribuzione dei sessi. I risultati di questa ricerca hanno dimostrato che già a partire dalle 6 ore di co-incubazione, la sex ratio è sbilanciata a favore dei maschi, in quanto gli spermatozoi con l'eterocromosoma Y sono più veloci, mentre al protrarsi dell'interazione il rapporto si riequilibra (Alomar et al.,2003). Questo tipo di ricerche hanno cercato di trovare una strategia per ri-equilibrare la ratio durante il processo di fecondazione, altri autori invece hanno cercato di intervenire e sbilanciare il rapporto tra i sessi durante la fase di coltura embrionale, quindi una fase successiva alla penetrazione degli oociti.

È stato dimostrato che tra gli embrioni di sesso diverso ci sono differenze nei tassi di crescita e di conseguenza nel metabolismo; queste anomalie tra i sessi vengono riscontrate già prima della differenziazione delle gonadi e, quindi, non sono spiegabili con un differente rapporto ormonale tra i sessi (Burgoyne et al 1995; Mittwoch, 1993). Grazie alla genomica sono state scoperte circa 600 differenti espressioni geniche tra blastocisti di topo maschio e femmina (Kobayashi et al., 2006 ). Le prove raccolte indicano che, in diverse specie, gli embrioni di sesso maschile prodotti in vitro raggiungono lo stadio di blastocisti prima rispetto alle femmine: ciò è stato dimostrato nel topo (Valdivia et al., 1993), nel

bovino (Avery et al., 1992, Gutierrez-Adan et al., 1996), nell'uomo (Pergament et al., 1994), nel maiale (Cassar et al., 1994), e nella pecora (Bernardi et al., 1996). Tuttavia, è stato anche riportato che alcune condizioni sfavorevoli come, ad esempio, le temperature climatiche incidono sulla sex-ratio (Roche et al., 2006); è stato osservato, infatti, che embrioni di sesso femminile sono più resistenti di embrioni di sesso maschile agli shock termici (Perez-Crespo et al., 2005). Questo suggerisce che alcune differenze tra embrioni maschi e femmine si manifestano in determinate condizioni ambientali (Gutierrez-Adan et al., 2001), e sono collegate al controllo secondario del rapporto tra i sessi che si verifica nei mammiferi (Ingemarsson et al., 2003). Inoltre, durante il periodo pre-impianto, vi è un rapporto tra genetica e riprogrammazione epigenetica (Fleming et al., 2004), e per questo motivo i cambiamenti osservati nella espressione genica tra embrione di sesso maschile e femminile possono essere una causa o una conseguenza di cambiamenti negli eventi epigenetici. Poiché la coltura in vitro potrebbe essere responsabile o, quanto meno, potrebbe esacerbare le differenze di sesso osservate negli embrioni, questa potrebbe rappresentare un ottimo modello per analizzare le differenze genetiche ed epigenetiche tra gli embrioni, perché l'embrione si sviluppa per 7 giorni in questo sistema, tempo abbastanza lungo a contribuire ad amplificare queste differenze (Gutierrez-Adan et al., 2006). È stato osservato che in embrioni bovini nella fase del pre-impianto la via del pentoso fosfato è quattro volte maggiore in blastocisti di sesso femminile rispetto a quelle di sesso maschile (Tiffin et al., 1991), e questa sproporzione è stata ritrovata anche in embrioni umani, nella medesima fase (Ray et al., 1995). Il differente metabolismo e i diversi tassi di crescita possono essere attribuiti alla differente espressione dei geni X-linked tra i sessi, durante determinate fasi dello sviluppo pre-impianto, in particolare nella fase precoce, in cui entrambi i cromosomi X sono ancora attivi (Mak et al., 2004; Okamoto et al., 2004). Bermejo-Álvarez et al. (2008) hanno dimostrato l'abbondanza di mRNA di tre geni X-linked: questi sono espressi a livelli più alti negli embrioni bovini di sesso femminile che in embrioni di sesso maschile, nella fase di blastocisti precoce. Due di questi, la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e la ipoxantina fosforibosil transferasi (HPRT), sono molto importanti nel metabolismo energetico, e hanno anche il compito di controllare la quantità di radicali dell'ossigeno; mentre il terzo, un inibitore X-linked della proteina dell'apoptosi (XIAP), è una proteina di mammifero che controlla l'apoptosi attraverso la modulazione dell'attività delle caspasi (19, 24). Questa espressione

differenziale è stata confermata anche in altre specie (53, 58). Il riscontro che gli embrioni di sesso maschile si sviluppano più velocemente in vitro (Tsunoda et al, 1985; Avery et al, 1989; Gutiérrez et al, 1995), suggerisce che alcuni elementi promuovono lo sviluppo di embrioni di sesso maschile rispetto a quelli di sesso femminile. Uno degli elementi, che nella coltura in vitro, potrebbe essere altamente selettivo per il sesso dell'embrione, è il glucosio, visto che ci sono degli enzimi fondamentali per il metabolismo (G6PD) e per il controllo dell'apoptosi cellulare (XIAP) che hanno i loro locus sul cromosoma X. Il ruolo del glucosio durante lo sviluppo embrionale in vivo non è stato completamente determinato ma può essere coinvolto nell'alterazione del rapporto tra i sessi. In condizioni fisiologiche, nel liquido tubarico il glucosio ha una concentrazione compresa tra 0.05 e 0.2 mM (Parrish et al., 1998), notevolmente inferiore a quella del sangue (5.6 mM) . L'espressione sbilanciata di geni X-linked tra i sessi, potrebbe spiegare le differenze di sviluppo che ci sono tra gli embrioni di sesso maschile e femminile. Condizioni materne e ambientali possono influenzare il rapporto tra i sessi nei mammiferi (Kruuk et al., 1999). Queste condizioni possono modificare il livello di glucosio nell'ovidutto e, quindi, ci si può spiegare come vi sia un controllo del rapporto sessuale in natura; negli animali da esperimento la concentrazione plasmatica di glucosio osservata in seguito a situazione di stress è superiore a 5.56 mM (Pinter et al., 2001). Questa osservazione consente di ipotizzare che la deviazione del rapporto tra sessi a favore dei maschi, che si verifica in natura in alcune condizioni ambientali avverse, utile ai fini della perpetuazione della specie, si avvalga di questo meccanismo. Ora dobbiamo pensare che in vitro, come precedentemente detto, il sistema non è dinamico come in natura e, quindi una sostanza permane a contatto con l'embrione per un tempo maggiore rispetto alle condizioni naturali; di conseguenza se il glucosio in natura può rappresentare una molecola che indirettamente controlla i sessi, in vitro la sua concentrazione è del tutto a sfavore del sesso femminile. Questa tossicità selettiva è particolarmente importante durante lo sviluppo iniziale, quando entrambi i cromosomi X sono attivi, mentre soltanto allo stadio di blastocisti uno dei due cromosomi sessuali viene inattivato (Kratzer e Gartler, 1978; de la Fuente et al, 1993). Per questo motivo negli ultimi anni si è cercato di trovare altri substrati energetici che potessero sostituire completamente il glucosio o comunque in parte, in modo da attenuare gli effetti collaterali di questo zucchero. Le prime prove hanno cercato la soluzione nella stessa classe del glucosio, monosaccaridi esosi, in grado di entrare nella via glicolitica:

galattosio, fruttosio e mio-inositolo. Il galattosio è stato usato per la produzione di embrioni in vitro con scarsi risultati sullo sviluppo embrionale di suini (Wongsrikeao et al., 2005), bovini (Kwun et al., 2003), e criceti (Ludwig et al., 2001).

Il fruttosio è la principale fonte di energia esogena per gli spermatozoi nel tratto riproduttivo maschile (Mann, 1964). Inoltre è presente anche nel tratto riproduttivo femminile di molte specie, tra cui conigli (Gregorie e Gibbon, 1965), suini (Haynes e Lamming, 1967), bovini (Suga e Masaki, 1973), ovini (Spilman et al. 1970), caprioli (Aitken, 1976), salamandre (Greven e Baldus, 1984), e uomo (Sucha et al., 2002). La presenza di fruttosio e del suo trasportatore GLUT-5, nei bovini (Agostino et al., 2001) suggerisce un ruolo importante per questo esoso. Il fruttosio è stato usato come fonte di energia per la coltura in vitro di embrioni di molte specie, tra cui bovini (Chung et al, 1996;. Guyader-Joly et al, 1996. Kwun et al, 2003;. Kimura et al, 2005), criceti (Ludwig et al., 2001), uomo (Hwang et al., 2004), suini (Wongsrikeao et al., 2005), e topi (Sakkas et al. 1993),. Invece si è visto che il mio-inositolo, usato in associazione con il citrato trisodico, dà degli ottimi risultati, al punto che in alcuni protocolli questo zucchero sostituisce in toto il glucosio come substrato energetico ( Holm et al.,1999).

Da quanto finora enunciato emerge che la tecnologia IVEP, grazie alla grande competitività in termini di rese embrionali, assurge come il più valido strumento per accelerare il progresso genetico per via materna e per facilitare gli scambi di germoplasma superiore tra diversi Paesi.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare alcuni fattori che influenzano l'efficienza IVEP, valutando sia la produzione quali-quantitativa di embrioni che la distribuzione dei sessi degli embrioni ottenuti. La sperimentazione è stata condotta principalmente nella specie bovina, traslando quando possibile le esperienze a quella bufalina, per un confronto volto ad evidenziare eventuali differenze specie-specifiche.

Il lavoro è stato articolato in due parti: nella prima l'attenzione è stata focalizzata a fattori inerenti la fase di fecondazione, mentre nella seconda è stata rivolta alla fase della coltura embrionale.

In particolare, nel corso della prima fase gli obiettivi sono stati quelli di caratterizzare la problematica dell'effetto maschio, ovvero la variabilità nella capacità fecondante in vitro di tori diversi, e di individuare parametri predittivi della stessa, che consentano una affidabile valutazione a priori di un toro prima che esso venga inserito nella routine del sistema

IVEP. Nell'ambito dei diversi parametri testati ci si è proposti in particolare di verificare se la cinetica di penetrazione è correlata alla fertilità in vitro dei tori e se variando la durata di co-incubazione dei gameti in funzione della cinetica del toro impiegato è possibile ottimizzarne le relative performance. Inoltre l'effetto del tempo di co-incubazione è stato anche valutato sulla distribuzione dei sessi.

La seconda parte della ricerca è stata indirizzata all'ottimizzazione dei sistemi di coltura embrionale, mettendo a confronto diversi substrati energetici alternativi al glucosio, e valutandone gli effetti sia sulle rese embrionali che sulla sex ratio.

## **PARTE SPERIMENTALE**

## CAPITOLO. 2

### **ESPERIMENTO 1 – Valutazione della correlazione tra alcuni parametri di fertilità del seme e le rese embrionali in vitro – Effetto della durata di co-incubazione dei gameti in funzione della cinetica di penetrazione dei tori sullo sviluppo e sulla sex ratio degli embrioni prodotti in vitro nel bovino**

#### INTRODUZIONE

Come detto in precedenza il seme di ogni singolo toro differisce nella capacità di fecondare sia in vivo che in vitro (Marquant-Le Guienna et al 1990;. Otoi et al 1993;. Zhang et al 1999;. Alomar et al 2006). Questa differenza che si riscontra tra i singoli tori è un fattore limitante; di conseguenza è necessario eseguire uno screening accurato per ogni singolo campione di sperma prima di poterlo utilizzare nei programmi di fecondazione in vitro. A questo va aggiunto che spesso i tori ad alto valore genetico hanno una scarsa fertilità in vitro. Un altro fattore importante che può influenzare lo sviluppo embrionale è la durata della co-incubazione dei gameti durante la fecondazione in vitro. Infatti, è noto che in caso di prolungata co-incubazione durante la fecondazione, gli oociti e gli embrioni sono esposti ad elevate concentrazioni di reattivi dell'ossigeno prodotti dagli spermatozoi, i quali possono avere ripercussioni negative sullo sviluppo dell'embrione (Gianaroli et al. 1996). Inoltre, è stato riportato che con co-incubazioni più lunghe dei gameti durante la IVF vi è un aumento dell'incidenza di polispermia (Sumantri et al. 1997). In studi precedenti era stato segnalato che il tasso di blastocisti non è influenzato dal tempo di incubazione spermatozoo-oocita e che, pertanto, il tempo ottimale di co-incubazione per massimizzare la resa in blastocisti nei bovini è di 18-24 ore (Long et al 1993;. Rehman et al 1994). Successivamente, invece, è stato dimostrato che il cleavage si riduce significativamente diminuendo il tempo di co-incubazione a 5-6 ore (Ward et al 2002;. Sumantri et al 1997;. Kochhar et al 2003.), mentre un periodo di 9-10 h di co-incubazione è sufficiente a garantire la massima divisione e resa in blastocisti (Ward et al. 2002).

Kochhar et al. (2003) ha anche osservato che la durata della co-incubazione influenza il cleavage, il tasso di crescita e la distribuzione del sesso degli embrioni prodotti in vitro. Benché il cleavage è significativamente più basso al più breve tempo co-incubazione (6 h), le percentuali di blastocisti non sono state diverse. Infatti, rispetto ai tempi successivi alle 6 ore di co-incubazione, una percentuale maggiore di oociti divisi raggiunge lo stadio di blastocisti, confermando l'ipotesi che il tempo ottimale dovrebbe essere il più breve possibile dopo la penetrazione degli oociti. È interessante notare che in questo studio è stato osservato uno squilibrio del rapporto tra i sessi verso i maschi riducendo la co-incubazione a 6 ore. Questo è un punto importante da considerare in quanto la deviazione del rapporto tra i sessi a favore dei maschi sugli embrioni prodotti (Xu et al 1992; Gutierrez-Adan et al 1996; Lonergan et al 1999) è un altro problema che riguarda la tecnologia IVEP. In letteratura ci sono dati contrastanti per quel che riguarda il rapporto tra la cinetica di penetrazione e la fertilità in campo. Ward et al. (2002) ha evidenziato che vi sono notevoli differenze nella cinetica di penetrazione spermatica tra i tori, e che questo può essere un utile marker di previsione della fertilità campo. Tuttavia, questa ipotesi è stata contestata da Puglisi et al. (2004) che non ha trovato alcuna correlazione tra la velocità di penetrazione in vitro e la fertilità in vivo. In un lavoro recente la cinetica di penetrazione degli spermatozoi è stata correlata al momento della prima divisione cellulare e alla cinetica di sviluppo dell'embrione (Alomar et al. 2008). Questa scoperta è importante perché si è visto che gli embrioni precoci hanno uno sviluppo migliore rispetto a quelli tardivi (Lonergan et al. 1999). Come detto in precedenza gli embrioni di sesso maschile si sviluppano con un ritmo superiore rispetto alla loro controparte femminile (Yadav et al 1993; Gutierrez-Adan et al 1996; Carvalho et al 1995). Pertanto, il toro influenza la cinetica di fecondazione (formazione di pronuclei) e lo sviluppo embrionale (primo ciclo cellulare embrionale), così come il rapporto tra i sessi (Alomar et al. 2008).

Nonostante le prove schiaccianti di un effetto toro, l'unica strategia che è stato finora descritta per migliorare la capacità fecondante dei tori con una lenta cinetica di penetrazione è stata quella di effettuare la fecondazione in vitro in un momento precedente a quello canonico, al fine di dare al seme più tempo per penetrare gli oociti (Ward et al. 2002).

Fino ad oggi, nei bovini non è stato valutato se esiste una correlazione tra la cinetica di penetrazione degli spermatozoi e la fertilità in vitro. Inoltre, dato che sono state dimostrate

differenze nella cinetica di penetrazione tra i tori (Ward et al. 2002), si può ipotizzare che il tempo di co-incubazione dei gameti debba essere adattato al singolo toro impiegato nel programma, al fine di ottimizzarne l'efficienza.

Di conseguenza lo scopo di questo studio è stato quello di valutare se: 1) tori bovini diversi esibiscono diversa fertilità in vitro e se le relative rese embrionali possano essere previste dall'analisi di alcuni parametri di laboratorio; 2) la cinetica di penetrazione degli spermatozoi in vitro può essere usata per prevedere la fertilità in vitro dei tori bovini; 3) variare la lunghezza della co-incubazione dei gameti durante IVF in relazione alla cinetica del toro può ottimizzarne il potenziale di fecondazione ed influire sul rapporto tra i sessi.

## DISEGNO SPERIMENTALE

Nell'esperimento 1.1 il seme congelato di 8 tori è stato scongelato a 37° C per 40 secondi, la motilità post-scongelo è stata valutata su una goccia di seme, pochi microlitri sono stati utilizzati per valutare la vitalità e lo stato dell'acrosoma e gli spermatozoi restanti sono stati separati mediante gradienti di Percoll, come verrà poi descritto nei Materiali e Metodi. La concentrazione del seme è stata valutata al termine della procedura di Percoll in modo da poter portare il seme ad una concentrazione finale  $1 \times 10^6$  spermatozoi/mL. La motilità degli spermatozoi è stata valutata anche dopo la separazione con il Percoll, dopo aver eseguito la diluizione del seme. Un numero totale di 2.886 oociti, ottenuto con 4 repliche, sono stati fecondati in vitro con gli spermatozoi degli 8 tori.

Nell'esperimento 1.2, a seguito della IVM, gli oociti (n = 3448) sono stati assegnati in modo casuale a 4 gruppi di fecondazione in vitro e sono stati inseminati con il seme di 4 tori, marcati con MitoTracker. I 4 tori sono stati scelti sulla base dei risultati dell'esperimento 1. In particolare sono stati selezionati: un toro con un alto tasso di fertilità (H), un toro con bassa fertilità (L), uno con fertilità medio-bassa (ML) e un altro con fertilità medio-alta (MH). I presunti zigoti sono stati rimossi dalla IVF a 4, 8, 12, 16 e 20 ore dopo la fecondazione (PI). Ad ogni tempo, i presunti zigoti (in media 42 oociti per volta per toro) sono stati denudati, fissati e colorati per determinare il tasso di penetrazione, mentre i rimanenti (in media 130 per volta per toro) sono stati trasferiti nel mezzo di coltura per valutare lo sviluppo in blastocisti. La progressione dei pronuclei è

stata valutata solo sugli oociti che hanno mostrato una fecondazione normale (n = 328), per ogni tempo di co-incubazione (28, 46, 93, 82 e 79, rispettivamente a 4, 8, 12, 16 e 20 pi h) e per i diversi tori (n = 85, 75, 101 e 67, rispettivamente per i tori MH, ML, H e L). Gli embrioni ottenuti alla fine della coltura (giorno 7) sono stati valutati sulla base di criteri morfologici (Robertson and Nelson, 1998) e della cronologia di sviluppo, cioè in base allo stadio raggiunto, segue come segue: morula compatta (TM), blastocisti precoce (EBI), blastocisti (BI), blastocisti espansa (XBI) e blastocisti sgusciata (HBI). Quindi gli embrioni sono stati stoccati per poi essere sessati come descritto in precedenza. L'esperimento è stato ripetuto 4 volte.

## MATERIALI E METODI

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

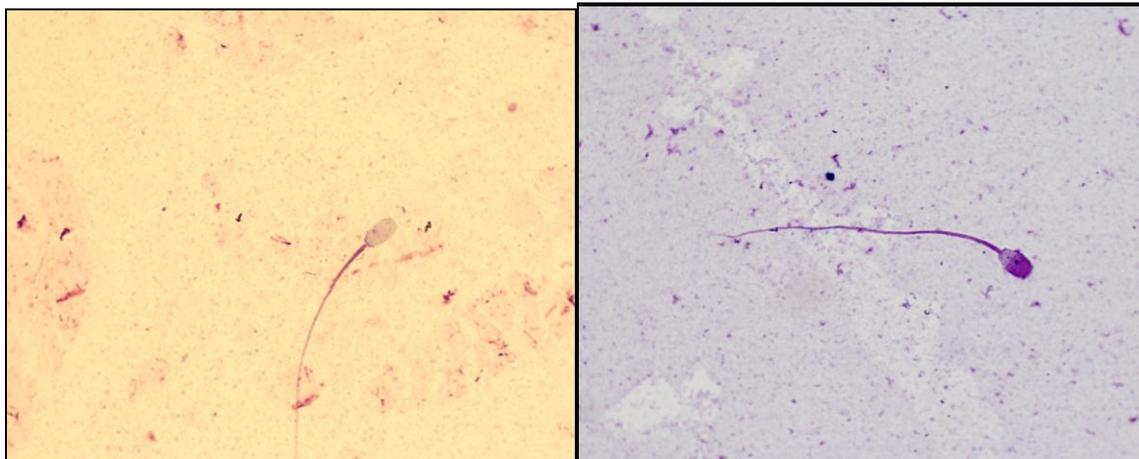
### **ESPERIMENTO 1.1**

#### *Valutazione Dei Parametri Di Fertilità*

Il seme congelato è stato scongelato in acqua a 37° C per 40 secondi, dopo di che il campione è stato diluito 1:10 in soluzione fisiologica, per poi essere fissato e colorato con Trypan blu-Giemsa (Kovacs et al. 1992). La valutazione microscopica delle cellule spermatiche (N = 3.298) è stata eseguita a 40x e 100x (con l'utilizzo di olio di immersione). Sulla base delle caratteristiche della colorazione le cellule spermatiche sono state divise in quattro categorie: vivi con acrosoma-intatto, morti con acrosoma-intatto, vivi senza acrosoma e morti senza acrosoma. Comunque per l'analisi dei dati abbiamo considerato la vitalità spermatica, come la percentuale di spermatozoi sia con la testa che con la coda vitali e con acrosoma integro. Sono stati valutati almeno 200 spermatozoi per ogni vetrino per gruppo. La motilità degli spermatozoi è stata valutata, dopo lo

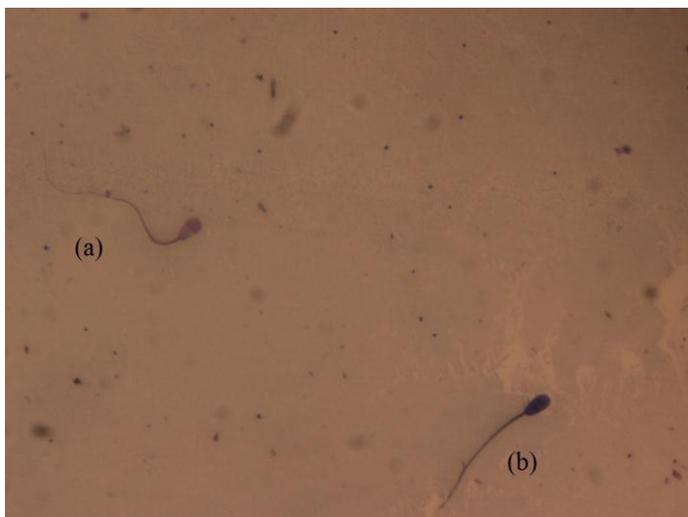
scongelamento e dopo la separazione Percoll, attraverso l'osservazione di una goccia di seme messa su un vetrino mantenuto a 37°C a basso ingrandimento (10 x). La motilità degli spermatozoi è sempre stata valutata dallo stesso operatore ed è stata espressa come la percentuale di spermatozoi mobili sul totale. La concentrazione è stata valutata dopo la separazione Percoll utilizzando una camera di Burker.

Fig 6 Spermatozoi fissati e colorati con Trypan blu-Giemsa



(a) Spermatozoo vivo senza acrosoma (b) Spermatozoo vivo con acrosoma

Fig.7 Spermatozoi fissati e colorati con Trypan blu-Giemsa



(a) Spermatozoo vivo (b) Spermatozoo morto

*Produzione Embrionale In Vitro*

Le ovaia di bovino sono state prelevate al macello in soluzione fisiologica antibiotata con 150 mg/ml di kanamicina alla temperatura compresa tra i 30-35° C e trasportate in laboratorio entro un tempo massimo di 6 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 collegato ad una pompa di aspirazione, alla pressione negativa controllata di 40-50 mm/Hg. In seguito, una valutazione morfologica dei COC raccolti ha consentito di selezionare, per la parte sperimentale, solo quelli che presentavano un citoplasma uniforme e un cumulo multi stratificato e compatto. Questi, in seguito, sono stati lavati due volte in TCM aspiration (Medium 199 addizionato di 25 mM di Hepes, 2 mM di bicarbonato di sodio, 2 mM di acido piruvico, 1 mM di L-glutammina, 10 µl/ml di amfotericina B, e 540 µg/ml eparina) e sono stati posti nel medium di maturazione, mediumIVM (Medium 199, il 15% di siero bovino (BS), 0.5 µg/ml di FSH, 5 µg/ml di LH, 0.8 mM L-glutammina, e 50 µg/ml di gentamicina). Per la maturazione sono state utilizzate delle piastre a quattro pozzetti (Nunclon<sup>TM</sup>, Nunc, Roskilde, Denmark), e i COC sono stati messi a gruppi di 25 per ogni pozzetto, che conteneva 400 µl TCM-IVM ricoperto di olio minerale. Le piastre con i COC così preparate sono state poste in un incubatore con il 5% di CO<sub>2</sub> in aria, alla temperatura di 39°C per un tempo di 22-24 h. Gli oociti maturati sono stati lavati in una soluzione Tyrode's modificata (Parrish et al 1986) senza glucosio e albumina sierica (BSA), ma con l'aggiunta di 30 µg/ml di eparina, 30 µM di penicillamina, 15 µM di ipotaurina, 0.15 µM di epinefrina e 1% di BS (IVF-TALP). Successivamente sono stati trasferiti, 25 per pozzetto, in 300 µl di IVF-TALP, coperto da olio minerale. Gli spermatozoi congelati sono stati scongelati a 37°C per 40 secondi e stratificati con cura in una provetta da 15 ml contenente 2 mL di soluzione di Percoll al 80% nella parte inferiore e 2 mL di soluzione di Percoll al 45% su di essa. Le soluzioni di Percoll sono state preparate a partire dal Tyrode modificato senza glucosio e BSA (Sperm-TALP). Il seme è stato centrifugato per 25 min a 300 x g. Dopo la centrifugazione il pellet è stato ricostituito in 2 ml di sperm-TALP e centrifugato per due volte, a 160 e 108 x g. Il pellet è stato diluito con IVF-TALP modificato e aggiunto nei pozzetti di fecondazione alla concentrazione di 1 x 10<sup>6</sup> spermatozoi/mL. I gameti sono stati co-incubati per 20 ore a 39°C, in presenza del 5% di CO<sub>2</sub> in aria, dopo di ché i presunti zigoti sono stati vortexati per 2 minuti per rimuovere le cellule del cumulo in Medium 199 integrato con 25 mM

Hepes, 2 bicarbonato di sodio mM, 2 mM di sodio piruvato, 1 mM L-glutammina (TCM-Hepes) e il 5% BSA. A questo punto i presunti zigoti sono stati lavati due volte nello stesso medium e trasferiti, 30-50 per pozzetto, in 400 microlitri di Synthetic Oviduct Fluid (SOF; Tervit et al. 1972), modificato per l'aggiunta di 30  $\mu$ l/mL di amminoacidi essenziali, 10  $\mu$ l/mL di aminoacidi non essenziali, 0,34 mM di tri-citrato di sodio, 2,77 mM mio-inositolo e del 5% BS. Gli zigoti sono stati incubati in una miscela umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>, 7% di O<sub>2</sub> e 88% di N<sub>2</sub> alla temperatura di 39°C. Le percentuali di cleavage e di resa embrionale sono state valutate al giorno 7 di coltura (giorno 0 = giorno della IVF).

## **ESPERIMENTO 1.2**

La selezione e la maturazione degli oociti è stata eseguita seguendo i protocolli precedentemente esposti.

### *Valutazione Della Penetrazione Degli Spermatozoi*

Al fine di distinguere gli oociti penetrati dai non penetrati, e quelli monospermici dai polispermici, questi sono stati fecondati con seme marcato con MitoTracker (Ward et al. 2002). Il MitoTracker Green FM liofilizzato è un colorante a fluorescenza che si lega ai mitocondri della porzione intermedia della coda degli spermatozoi. Una soluzione 1 mM di stock MitoTracker green FM (Invitrogen) è stata preparata e diluita con Sperm-TALP per ottenere una soluzione finale di 250 nM. Gli spermatozoi mobili sono stati selezionati tramite centrifugazioni in gradienti di percoll, come precedentemente descritto. Il surnatante è stato rimosso, il pellet è stato risospeso nella soluzione di 250 nM di MitoTracker e poi incubato a 37 C per 30 min. Dopo l'incubazione, il MitoTracker è stato rimosso con un lavaggio in TALP tramite centrifugazione. Il pellet così ottenuto è stato sospeso in TALP e utilizzato per la fecondazione in vitro.

Ad ogni tempo, gli oociti sono stati denudati (vortex per 2 minuti) e privati della zona pellucida mediante digestione enzimatica in pronase (2 mg/ml). Gli oociti dezonati sono stati posti su un vetrino, lasciati asciugare all'aria e fissati in etanolo durante la notte. Successivamente, sono stati colorati con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Vectashield® by Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010 USA) per l'esame dei nuclei con un microscopio a fluorescenza, per valutare la penetrazione da parte degli spermatozoi. In questo modo è stato possibile distinguere gli oociti non penetrati da quelli penetrati (penetrazione totale) ed inoltre, nell'ambito di questi ultimi quelli penetrati da un singolo spermatozoo (fecondazione normale) e quelli penetrati da più spermatozoi (polispermia). Infine è stata valutata la cinetica di formazione dei pronuclei (PN) solo sugli oociti che mostravano fecondazione normale.

La coltura embrionale e la valutazione degli embrioni prodotti sono state effettuate seguendo i protocolli precedentemente esposti.

#### *Sessaggio Degli Embrioni.*

Gli embrioni dopo la valutazione sono stati stoccati e congelati individualmente a  $-80^{\circ}\text{C}$  in 10  $\mu\text{l}$  di PBS. Per l'estrazione del DNA sono stati aggiunti, per ogni provetta, contenente un singolo embrione, 20  $\mu\text{l}$  di un buffer di lisi, composto da: 15mM Tris-HCl a pH 8.9, 50mM KCl, 2.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% Triton X-100 and 150 $\mu\text{g/ml}$  proteinasi K. I campioni sono stati incubati a  $55^{\circ}\text{C}$  per 1 h; dopodiché per inattivare la proteinasi K i campioni sono stati posti ad incubare a  $90^{\circ}\text{C}$  per 10 min. Per ogni replica di PCR è stato utilizzato un controllo positivo, DNA maschile estratto dal sangue di toro (Wizard genomic DNA Purification Kit) ed un controllo negativo nel quale non è stato aggiunto alcun campione di DNA. L'amplificazione è stata ottenuta aggiungendo ad ogni provetta di PCR: 12,5  $\mu\text{l}$  di PCR mix (HotStarTaq Master Mix, Quiagen), due coppie di primer (1  $\mu\text{l}$  per ogni coppia), 1  $\mu\text{l}$  di DNA estratto e 10,5  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  per un volume totale di 25  $\mu\text{l}$ . Ogni coppia di primer è stata amplificata individualmente. Le sequenze e le quantità dei primer sono segnalate nella tabella 1: la prima coppia è specifica per una regione del cromosoma Y di bovino (SRY, Daneau et al., 1995), mentre la seconda coppia è specifica per un gene autosomiale (Alomar et al., 2008). La routine di PCR prevedeva 15 minuti a  $95^{\circ}\text{C}$  per la denaturazione, seguita da 39 cicli di denaturazione a  $96^{\circ}\text{C}$  per 30 secondi, l'appaiamento a  $52^{\circ}\text{C}$  per 30

secondi, e l'estensione a 72°C per 45 secondi. Dopo l'ultimo ciclo, si lasciava incubare per altri 5 minuti per completare l'estensione.

Fig.8 Gel di Agarosio dopo la migrazione di template di PCR per il sesso di embrioni

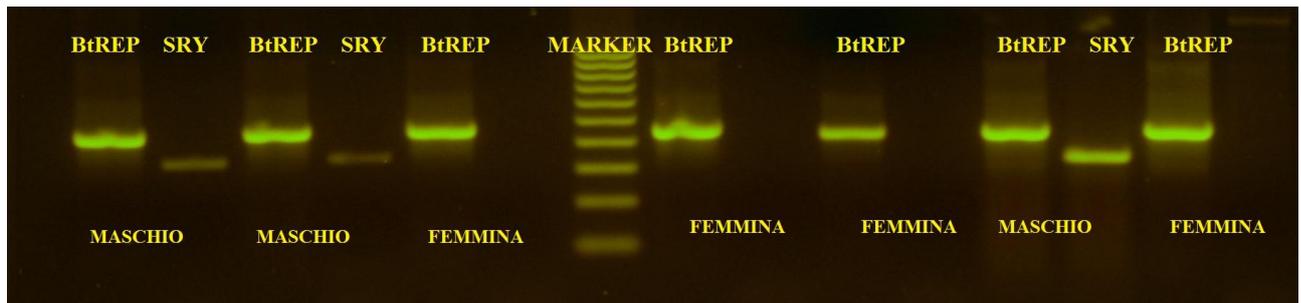


Tabella 1 Sequenze dei Primers utilizzati per la PCR

Gene	Sequenza	Quantità (mM)	Prodotti di PCR (bp)
bSRY A	ACAGTCATAGCGCAAATGATCAGTG	250	342
bSRY 1	GGGTTGCATAGTATTGAAGAGTCTGC	250	
BtRep-137 C1	TATTTTCGGAACGCGGGAGAGAAGAG-3	220	450
BtRep-137 C2	TATTTTGTGATCCCTCCGTGCGGCGCTTA-3	220	

### Analisi Statistica

Nell'esperimento 1.1 le differenze nei parametri di fertilità valutate dopo lo scongelamento/separazione Percoll, nonché nei tassi di cleavage e resa in blastocisti tra gli 8 i tori sono state analizzate con l' ANOVA ad una via. L'analisi di correlazione è stata utilizzata per valutare le relazioni tra la i vari parametri di fertilità e la resa embrionale finale.

Nell'esperimento 1.2 i dati sui tassi di penetrazione (penetrazione totale, la fecondazione normale e fecondazione poli spermica ), nonché sui tassi di cleavage e blastocisti sono stati analizzati mediante ANOVA utilizzando un modello fattoriale completo, che includeva l'effetto

toro (4 livelli), l'effetto del tempo di co-incubazione (5 livelli) e la loro interazione. L'ANOVA ad una via è stata effettuata anche per le stesse variabili all'interno di ogni fattore (toro e ora di co-incubazione). Le differenze tra le medie sono state analizzate mediante il test di Duncan.

Poiché la distribuzione delle varianze non è stata omogenea, i tassi di progressione dei pronuclei sono stati analizzati con il test di Kruskal-Wallis.

Il rapporto tra i sessi degli embrioni prodotti in ogni gruppo è stato confrontato con il rapporto atteso(1:1) mediante il test del chi-quadro. Il chi-quadro è stato utilizzato anche per analizzare i dati sul rapporto tra i sessi e lo stadio di sviluppo. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il programma SPSS statistica 18,0, 2009 (18,0 SPSS, 2009. SPSS Inc. 233 South Wacker Drive, 11th Floor Chicago, IL 60.606-64.122.010).

## RISULTATI

### ESPERIMENTO 1.1.

Tra i parametri presi in considerazione per i test di fertilità, sono state evidenziate differenze significative ( $P < 0.01$ ) tra i tori nella concentrazione spermatica e nella vitalità degli spermatozoi, ossia la percentuale di cellule vive con un acrosoma intatto, come illustrato nella tabella 2. Nessuna differenza è emersa nella motilità post-scongelo, mentre la motilità post-Percoll è risultata differente ( $P < 0,05$ ) tra tori (Tabella 2). In nessun caso sono state osservate cellule spermatiche vive con perdita acrosomiale, e le percentuali di spermatozoi vivi ma con coda danneggiata sono state trascurabili (0,5-3%).

Sebbene la percentuale di cleavage dopo l'IVF sia stata simile tra gli 8 tori, alcune differenze sono state evidenziate sulle rese embrionali, come mostrato in tabella 3. In particolare il toro 5 ha dato una percentuale di blastocisti inferiore ( $P < 0.01$ ) rispetto agli altri 7 tori. Inoltre il toro 1 ha fornito rese in blastocisti superiori anche rispetto al toro 6, mentre gli altri hanno fatto registrare valori intermedi. Quando la resa in blastocisti è stata calcolata in relazione al numero di oociti divisi il toro 5, ha fornito comunque i peggiori risultati; inoltre, le percentuali di blastocisti sui divisi sono risultate superiori con il toro 1 rispetto al toro 5 e al toro 6, mentre gli altri hanno dato valori intermedi(Tabella 3).

Tabella 2 Parametri considerati per i test di fertilità

Tori	Concentrazione	Post-scongelo Motilità (%)	Post-Percoll Motilità (%)	Vivi con acrosoma intatto (%)
	media ± SD	media ± SD	media ± SD	media ± SD
1	37.4 ± 5.9 <sup>ABC</sup>	87.5 ± 5.0	83.8 ± 7.5 <sup>a</sup>	81.2 ± 9.6 <sup>C</sup>
2	54.1 ± 17.4 <sup>C</sup>	75.0 ± 10.0	82.5 ± 9.6 <sup>a</sup>	81.1 ± 7.9 <sup>C</sup>
3	27.2 ± 8.7 <sup>AB</sup>	72.5 ± 15.0	65.0 ± 17.3 <sup>ab</sup>	56.4 ± 8.5 <sup>A</sup>
4	45.4 ± 8.6 <sup>BC</sup>	80.0 ± 8.1	76.3 ± 4.8 <sup>ab</sup>	75.5 ± 16.2 <sup>B</sup>
5	18.2 ± 15.3 <sup>A</sup>	78.8 ± 10.3	55.0 ± 17.3 <sup>b</sup>	68.0 ± 2.1 <sup>AB</sup>
6	24.8 ± 13.7 <sup>AB</sup>	81.3 ± 8.5	67.5 ± 18.5 <sup>ab</sup>	62.8 ± 8.6 <sup>AB</sup>
7	30.5 ± 16.2 <sup>AB</sup>	81.3 ± 6.3	66.3 ± 14.9 <sup>ab</sup>	76.7 ± 3.9 <sup>B</sup>
8	21.2 ± 13.0 <sup>A</sup>	80.0 ± 0.0	62.5 ± 17.1 <sup>ab</sup>	64.0 ± 5.8 <sup>AB</sup>

<sup>A,B,C</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza P<0.01

<sup>a,b,c</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza; P<0.05

Tabella 3 Cleavage e Resa Embrionale ottenuti dai vari tori

Tori	n°	Cleavage (%)	BI/Totale Oociti (%)	BI/divisi (%)
		media ± SD	media ± SD	media ± SD
1	330	72.4 ± 4.1	40.9 ± 3.8 <sup>A</sup>	74.4 ± 14.7 <sup>A</sup>
2	423	71.5 ± 9.4	36.1 ± 5.4 <sup>AB</sup>	58.5 ± 3.8 <sup>AB</sup>
3	420	73.7 ± 3.2	34.4 ± 3.5 <sup>AB</sup>	52.3 ± 9.4 <sup>AB</sup>
4	427	72.7 ± 3.0	36.8 ± 4.0 <sup>AB</sup>	48.2 ± 3.1 <sup>B</sup>
5	316	57.7 ± 2.7	5.2 ± 1.4 <sup>C</sup>	9.2 ± 3.1 <sup>C</sup>
6	320	70.1 ± 4.5	25.5 ± 4.9 <sup>B</sup>	44.2 ± 3.1 <sup>B</sup>
7	344	64.8 ± 4.2	28.7 ± 3.3 <sup>AB</sup>	54.2 ± 7.9 <sup>AB</sup>
8	306	67.0 ± 2.7	31.5 ± 5.8 <sup>AB</sup>	60.0 ± 1.7 <sup>AB</sup>

<sup>A,B,C</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza P<0.01

<sup>a,b,c</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza; P<0.05

L'analisi statistica ha evidenziato che la concentrazione spermatica post-separazione era correlata positivamente con la percentuale di spermatozoi vivi allo scongelamento ( $P < 0.01$ ) e con la motilità post-separazione ( $P < 0.01$ ) e Un'altra correlazione emersa è stata tra la percentuale di cleavage e il tasso di blastocisti ( $P < 0.01$ ). Infine è interessante notare che la concentrazione spermatica è stata correlata sia al cleavage ( $P < 0,05$ ) che al tasso di blastocisti ( $P < 0,01$ ). Anche la motilità post-Percoll è stata correlata con il cleavage ( $P = 0,78$ ) e con le rese in blastocisti ( $P < 0,01$ ). Al contrario, non è stata trovata alcuna correlazione tra la vitalità allo scongelamento e le percentuali di cleavage e di blastocisti.

## ESPERIMENTO 1.2.

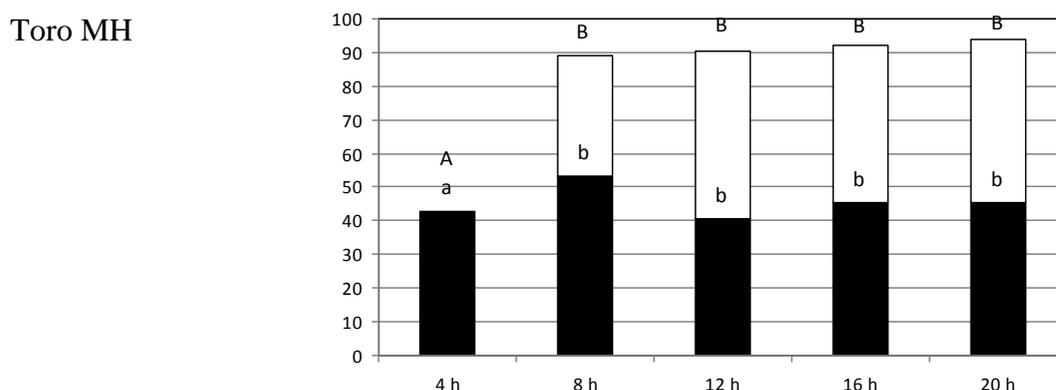
Sulla base dei risultati dell'esperimento 1.1 abbiamo scelto 4 tori per la prova della cinetica: in particolare, il toro 1 è stato scelto come toro ad alta fertilità (Toro H), il toro 5 come toro a bassa fertilità (Toro L), il toro 6 come fertilità medio-bassa (Toro ML) e il toro 7 come fertilità medio-alta (MH). I risultati sulla cinetica di penetrazione dei tori diversi sono riportati nella tabella 4.

A prescindere dei tempi di co-incubazione, il tasso di penetrazione complessivo è risultato diverso fra i tori, ma ciò è dovuto principalmente al diverso tasso di fecondazione polispermica. Infatti, nonostante i tassi di fecondazione monospermica siano stati simili, l'incidenza di polispermia è stata molto diversa tra i diversi tori ( $P < 0,01$ ): in particolare il toro MH ha dato valori più elevati ( $P < 0.01$ ) rispetto ai tori H ed L mentre il toro ML ha dato valori più alti ( $P < 0.01$ ) rispetto al toro L.

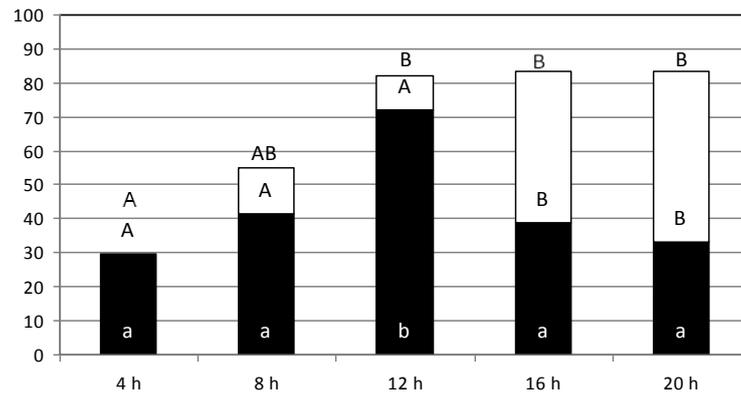
Indipendentemente dal toro, il tasso di penetrazione complessiva è aumentato ( $P < 0.01$ ) a 8 pi, per raggiungere i valori massimi tra le 12 e le 20 ore. Per nessun toro è stata osservata polispermia a 4 ore pi, mentre un aumento ( $P < 0.01$ ) è stato registrato sin dalle 8 ore pi, per raggiungere i valori più alti tra le 16 e le 20 ore. Il tasso di fecondazione normale è aumentato ( $P < 0,01$ ) a 8 ore pi e ha mantenuto livelli simili ai tempi successivi di co-incubazione. Vale la pena sottolineare che è emersa una interazione ( $P < 0.05$ ) toro x tempo di co-incubazione (ore pi) sia per la fecondazione normale sia per quella polispermica. In definitiva è stato dimostrato che tori diversi hanno una differente cinetica di penetrazione.

A 4 ore pi il tasso di penetrazione totale coincideva con quello della fecondazione normale, dato che non c'era polispermia. A questo tempo, quindi sia la penetrazione totale che la fecondazione monospermica sono risultati maggiori significativamente ( $P < 0.01$ ) per i tori MH e ML rispetto ai tori H e L. A 8 ore pi il toro MH ha dato una maggiore ( $P < 0.01$ ) penetrazione totale rispetto agli altri tori . Tuttavia, poiché la fecondazione monospermica non variava tra tori, tale differenza era essenzialmente dovuta all'incidenza della polispermia che è aumentata ( $P < 0.05$ ) con il toro MH rispetto al toro L, con valori intermedi per i tori ML e H. A 12 ore pi non sono state osservate più differenze nella penetrazione totale tra tori. Tuttavia, l'incidenza di polispermia è aumentata significativamente ( $P < 0.01$ ) nel toro MH rispetto agli altri. Pertanto, un tasso di fecondazione normale più alto ( $P < 0.05$ ) è stato registrato con il toro ML rispetto ai tori MH e L. Inoltre il toro H ha raggiunto valori simili a quelli del toro ML, che sono risultati diversi statisticamente ( $P < 0.05$ ) da quelli ottenuti con il toro L. A 16 ore il tasso di penetrazione complessiva, così come la fecondazione monospermica sono stati simili per tutti i tori, mentre la polispermia era più alta ( $P < 0.01$ ) nei tori MH e ML rispetto ai tori H e L. Anche a 20 ore non sono state trovate differenze significative nel tasso di penetrazione totale e di fecondazione normale. Al contrario l'incidenza di polispermia è stata più alta nei tori MH e ML rispetto al toro L, con il toro H che ha raggiunto valori intermedi. L'andamento della penetrazione in relazione alle ore di co-incubazione all'interno di ogni toro è mostrato nella Figura 9

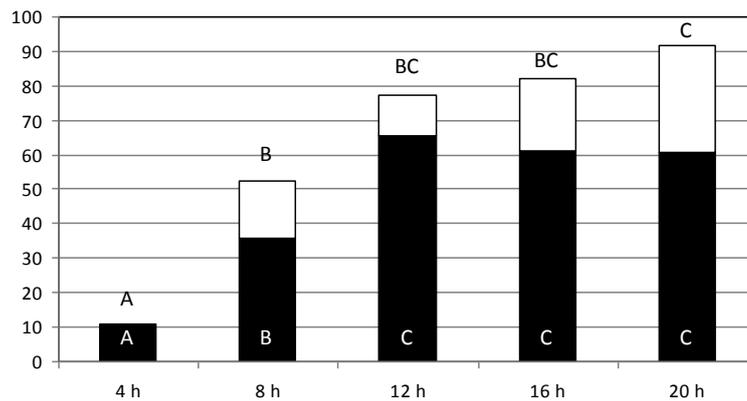
Fig. 9 Percentuali di penetrazione monospermica (■), polispermica (□) e penetrazione totale (■+□) ai vari tempi di co-incubazione h per ogni toro



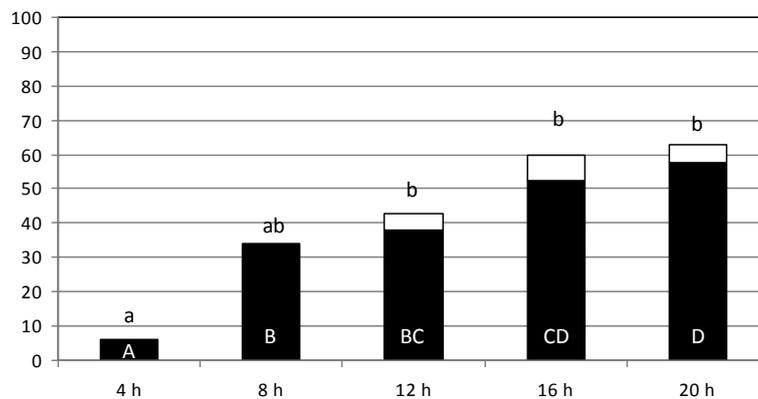
### Toro ML



### Toro H



### Toro L



Il toro MH ha raggiunto il massimo tasso di penetrazione già a 8 ore ed ha mantenuto livelli alti ai tempi seguenti. Tuttavia, per questo toro non sono state osservate differenze, in termini di fecondazione normale tra i tempi di co-incubazione. Questo è essenzialmente dovuto all'aumento evidente di polispermia registrato a partire dalle 8 ore pi.

Per il toro ML i tassi di penetrazione più elevati sono stati registrati a 12, 16 e 20 h rispetto a 4 ore pi, con valori intermedi a 8 ore. Tuttavia, la più alta fecondazione monospermica è

stata ottenuta a 12 ore mentre è diminuita con il passare del tempo, a seguito di un aumento ( $P < 0,01$ ) della polispermia.

Nel caso del toro H un incremento significativo della penetrazione totale è stato riportato già a 8 ore pi, ma i valori più elevati sono stati trovati a 20 ore, con valori intermedi a 12 e 16 ore. Per questo toro la polispermia non è aumentata in modo significativo all' aumentare dei tempi di co-incubazione mentre la fecondazione monospermica è aumentata ( $P < 0,01$ ) a 8 ore, e un ulteriore incremento è stato registrato alle ore 12, 16 e 20 ore. Per quanto riguarda il toro L, il tasso di penetrazione è stato superiore a 12, 16 e 20 ore rispetto a 4 ore pi, con valori intermedi a 8 pi h. Questo toro ha dato un basso tasso di polispermia in qualsiasi momento. In questo caso è stato chiaramente osservato, un aumento lineare del tasso di fecondazione normale all' aumentare dei tempi di co-incubazione, con i valori più elevati a 20 pi h.

Un altro aspetto che abbiamo valutato, sugli oociti che mostravano una fecondazione normale (monospermici), è stata la cinetica di formazione dei PN che ha mostrato una progressione lineare con il tempo, senza differenze significative tra i tori. A 4 ore pi la maggior parte degli zigoti avevano una testa condensata (52.2%) o una testa decondensata (46.3%) mentre la percentuale degli oociti che mostravano due pronuclei sincroni (PN) è stata trascurabile (1.6%). Ad 8 ore pi è stato osservato un aumento significativo della formazione dei PN (21.6%,  $P < 0,01$ ), con percentuali analoghe di oociti con la testa dello spermatozoo condensata e decondensata (37.3 e 41.4%, rispettivamente). Un ulteriore aumento della formazione di PN è stato registrato a 12 ore (71.7%,  $p < 0,01$ ) che è stato accompagnato da una ridotta incidenza delle altre due categorie (12.9 e 15.5%, rispettivamente con testa condensata e decondensata). Tra le 12 ore e i tempi successivi non è stata riscontrata, invece, nessuna differenza nella formazione dei PN. A 16 e 20 ore la maggior parte degli oociti mostravano due PN sincroni (88.4 e 85.4%, rispettivamente), con basse percentuali di oociti ancora con una testa dello spermatozoo condensata (4.8 e 4.4%, rispettivamente a 16 e 20 ore) o decondensata (6.9 e del 10.3%, rispettivamente). Anche se le differenze tra i tori non sono risultate statisticamente significative, a causa del numero limitato di casi, vale la pena notare che a 8 ore solo nel toro L non è stata osservata affatto la formazione dei PN (39.7, 33.3, 125 e 0, rispettivamente per i tori MH, ML, H ed L ). A 12 ore la percentuale di oociti con PN sincroni è stata 77.5, 80.2, 80.4 e 48.6%, rispettivamente per MH, ML, H e L. A 16 ore le percentuali di PN sono state 100, 89.2,

90.2 e 74.1% e a 20 ore 92.9, 83.3, 84.7 e 80.6%, rispettivamente per i tori MH, ML, H e L.

I risultati di cleavage e resa embrionale dei diversi tori in ciascun momento di co-incubazione sono riportati nella tabella 5. A prescindere dai tempi di co-incubazione, è emerso un effetto toro sia sul cleavage che sulla resa in blastocisti. I tori MH e ML hanno dato un più alto ( $P < 0.01$ ) tasso di cleavage rispetto al toro H e quest'ultimo ha fatto registrare valori superiori a quelli del toro L. Anche per quanto riguarda la resa in blastocisti il toro L è stato basso quello con la minore efficienza mentre tra gli altri tre tori, il toro MH ha dato percentuali di blastocisti superiori al toro H, con risultati intermedi registrati per il toro ML.

Indipendentemente dal toro, sia la percentuale di cleavage che quella di blastocisti sono risultate significativamente inferiori a 4 ore pi rispetto ai tempi successivi. Non sono emerse, invece, differenze tra le 8 e le 20 ore per entrambi i parametri.

Le differenze nei tassi di cleavage e blastocisti tra i tori sono state osservate ai primi tempi di co-incubazione (4 e 8 ore pi), quindi i risultati si sono stabilizzati a 12 e 16 h, mentre sono state di nuovo riscontrate delle differenze a 20 ore pi. In particolare, a 4 ore il toro MH ha dato un cleavage superiore rispetto ai tori H ed L, con il toro ML che ha mostrato un valore intermedio. Inoltre, il tasso di blastocisti dopo 4 ore di co-incubazione è stato significativamente ( $P < 0.05$ ) più alto per il toro MH rispetto a tutti gli altri. Ad 8 ore un incremento ( $P < 0.01$ ) sia del cleavage che delle blastocisti è stato rilevato con il toro MH rispetto ai tori H ed L, con valori simili registrati con il toro ML. A 20 ore di co-incubazione è stata osservata una riduzione sia del cleavage ( $P < 0.05$ ) che della percentuale di blastocisti ( $P = 0,08$ ) con il toro L rispetto agli altri.

Se consideriamo i tassi di cleavage e di blastocisti in relazione ai tempi di co-incubazione all'interno di ogni toro, per i tori MH e ML sia il tasso di divisione che di blastocisti sono aumentati significativamente, raggiungendo i valori massimi, già ad 8 ore pi. Un diverso andamento è stato osservato con il toro H, per il quale è stato registrato un incremento di cleavage a partire dalle 8 ore pi, ma il valore massimo è stato raggiunto a 16 ore pi. La resa embrionale ha avuto un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) a 8 ore, ma nessun miglioramento significativo è stato trovato ai tempi successivi. Il toro L, infine, ha mostrato un incremento lineare del cleavage all'aumentare del tempo di co-incubazione, raggiungendo i valori massimi a 16 ore. Tuttavia, anche in questo caso il tasso di

blastocisti è aumentato ad 8 ore, e ai tempi successivi non si è riscontrato un miglioramento suffragato da significatività statistica.

Infine, quando la resa embrionale è stata calcolata in relazione agli oociti divisi, non è stata riscontrata nessuna differenza tra i tori ai diversi tempi di incubazione e, all'interno di ciascun toro, tra i diversi tempi di co-incubazione (Tabella 5).

Un totale di 360 blastocisti, prodotte dai 4 tori, sono state sessuate (88, 112, 62 e 98, rispettivamente per i tori MH, ML, H e L). In questo esperimento non vi è stato alcun effetto toro sulla distribuzione sesso: le percentuali degli embrioni di sesso femminile sono state 59.1, 56.3, 61.3 e 58.2%, rispettivamente per i tori MH, ML, H e L. Non ci sono state differenze significative nelle percentuali degli embrioni di sesso femminile tra i diversi tempi di co-incubazione (Tabella 6). Tuttavia, al primo (4 pi ore) e all'ultimo tempo (20 ore pi) è stata riscontrata una variazione significativa ( $P < 0,05$ ) nel rapporto tra i sessi rispetto al rapporto atteso di 1:1, con uno spostamento a favore degli embrioni di sesso femminile.

Lo stadio di sviluppo, invece, ha influenzato in modo significativo ( $P < 0,01$ ) il rapporto tra i sessi, con una progressiva diminuzione di embrioni di sesso femminile al progredire dello sviluppo stesso. La percentuale di embrioni di sesso femminile è risultata, infatti, significativamente maggiore ( $P < 0,01$ ) nelle morule ( $n = 12$ ; 91.7%), nelle blastocisti precoci ( $n = 67$ ; 67.2%) e nelle blastocisti ( $n = 99$ ; 68.7%) piuttosto che nelle blastocisti espanse ( $N = 127$ ; 49.6%) e nelle blastocisti sgusciate ( $N = 55$ ; 41.8%). Vale la pena notare che la maggioranza delle morule era di sesso femminile (91.7%), con un rapporto femmina : maschio (F: M) 11 volte superiore a quello previsto. Nonostante il numero limitato di morule prodotte, la percentuale di embrioni di sesso femminile è risultata statisticamente differente ( $P < 0,01$ ) da quella attesa del 50%. Allo stesso modo, il rapporto F:M nelle blastocisti precoci e nelle blastocisti differiva in modo significativo ( $P < 0,01$ ) dal rapporto previsto 1:1 ( il rapporto F: M è stato rispettivamente di 2 e 2.2). Quando gli embrioni avevano raggiunto stati più avanzati di sviluppo il rapporto tra i sessi tornava alla normalità come nel caso delle blastocisti espanse (F:M = 0.98), per scendere a valori inferiori all'unità nel caso delle blastocisti sgusciate (F: M = 0.7); tuttavia, l'analisi non ha evidenziato in quest'ultimo caso nessuna differenza significativa rispetto alla frequenza attesa.

Per vedere se la distribuzione degli stadi di sviluppo differiva tra i differenti tempi di co-incubazione, influenzando l'effetto sulla distribuzione dei sessi, abbiamo raggruppato gli embrioni in due categorie di sviluppo: "ritardati" (TM, EBL e BL) ed avanzati (XBL e HBL). Tuttavia, non è stata osservata nessuna differenza nelle percentuali degli embrioni a differenti stadi (ritardati vs avanzati) tra i tempi di co-incubazione: le percentuali degli embrioni ritardati sono state 50, 52.6, 47.8, 45.5 e 52.6, rispettivamente a 4, 8, 12, 16 e 20 ore pi.

Tabella 4 Cinetica di Penetrazione (media  $\pm$  errore standard) dei differenti tori ai differenti tempi di co-incubazione (pi)

Tori	% Penetrati monospermici ad ogni tempi di co-incubazione (h pi)					Total
	4	8	12	16	20	
MH	42.8 $\pm$ 7.7 <sup>A</sup>	53.4 $\pm$ 8.3	40.6 $\pm$ 10.0 <sup>ac</sup>	45.6 $\pm$ 10.0	45.4 $\pm$ 11.5	45.5 $\pm$ 3.9
ML	29.9 $\pm$ 5.6 <sup>Ax</sup>	41.7 $\pm$ 10.5 <sup>x</sup>	71.9 $\pm$ 7.3 <sup>by</sup>	39.0 $\pm$ 13.5 <sup>x</sup>	33.0 $\pm$ 6.3 <sup>x</sup>	43.1 $\pm$ 5.0
H	10.7 $\pm$ 6.6 <sup>BX</sup>	35.9 $\pm$ 5.7 <sup>Y</sup>	65.6 $\pm$ 8.7 <sup>bcZ</sup>	61.0 $\pm$ 8.5 <sup>Z</sup>	60.5 $\pm$ 3.6 <sup>Z</sup>	46.7 $\pm$ 5.5
L	6.3 $\pm$ 4.0 <sup>BX</sup>	34.2 $\pm$ 4.9 <sup>Y</sup>	38.2 $\pm$ 7.2 <sup>aYZ</sup>	52.4 $\pm$ 4.9 <sup>ZW</sup>	57.5 $\pm$ 6.0 <sup>W</sup>	37.7 $\pm$ 4.7
Totale	22.4 $\pm$ 4.7 <sup>X</sup>	41.3 $\pm$ 3.9 <sup>Y</sup>	54.1 $\pm$ 5.4 <sup>Y</sup>	49.5 $\pm$ 4.8 <sup>Y</sup>	49.1 $\pm$ 4.4 <sup>Y</sup>	
	% Polispermia ad ogni tempi di co-incubazione (h pi)					
MH	0,00 <sup>x</sup>	35.7 $\pm$ 12.3 <sup>ay</sup>	49.9 $\pm$ 12.0 <sup>Ay</sup>	46.4 $\pm$ 6.9 <sup>Ay</sup>	48.5 $\pm$ 12.1 <sup>ay</sup>	36.1 $\pm$ 5.8 <sup>A</sup>
ML	0,00 <sup>X</sup>	13.3 $\pm$ 5.1 <sup>abX</sup>	10.3 $\pm$ 4.1 <sup>BX</sup>	44.6 $\pm$ 7.5 <sup>AY</sup>	50.2 $\pm$ 12.8 <sup>aY</sup>	23.7 $\pm$ 5.4 <sup>AB</sup>
H	0	16.5 $\pm$ 8.9 <sup>ab</sup>	11.6 $\pm$ 9.6 <sup>B</sup>	21.3 $\pm$ 7.9 <sup>B</sup>	31.2 $\pm$ 8.4 <sup>ab</sup>	16.1 $\pm$ 3.9 <sup>B</sup>
L	0	0,00 <sup>b</sup>	4.7 $\pm$ 4.7 <sup>B</sup>	7.3 $\pm$ 4.3 <sup>B</sup>	5.3 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>	3.5 $\pm$ 1.4 <sup>C</sup>
Totale	0,00 <sup>X</sup>	16.4 $\pm$ 4.9 <sup>Y</sup>	19.1 $\pm$ 5.9 <sup>ZY</sup>	29.9 $\pm$ 5.2 <sup>ZY</sup>	33.8 $\pm$ 6.4 <sup>Z</sup>	
	Penetrazione totale ad ogni tempi di co-incubazione (h pi)					
	4	8	12	16	20	
MH	42.8 $\pm$ 7.7 <sup>AX</sup>	89.0 $\pm$ 4.6 <sup>AY</sup>	90.5 $\pm$ 5.5 <sup>Y</sup>	91.9 $\pm$ 5.3 <sup>Y</sup>	93.9 $\pm$ 3.6 <sup>Y</sup>	81.6 $\pm$ 5.0 <sup>A</sup>
ML	29.9 $\pm$ 5.6 <sup>AX</sup>	55.0 $\pm$ 8.4 <sup>BXY</sup>	82.2 $\pm$ 11.2 <sup>Y</sup>	83.6 $\pm$ 7.3 <sup>Y</sup>	83.2 $\pm$ 13.7 <sup>Y</sup>	66.8 $\pm$ 6.2 <sup>AB</sup>
H	10.7 $\pm$ 6.6 <sup>BX</sup>	52.4 $\pm$ 14.1 <sup>BY</sup>	77.1 $\pm$ 10.4 <sup>YZ</sup>	79.5 $\pm$ 14.2 <sup>YZ</sup>	91.7 $\pm$ 4.8 <sup>Z</sup>	62.3 $\pm$ 7.9 <sup>B</sup>
L	6.3 $\pm$ 4.0 <sup>Bx</sup>	34.2 $\pm$ 5.0 <sup>B<sup>xy</sup></sup>	42.7 $\pm$ 19.0 <sup>y</sup>	54.7 $\pm$ 12.1 <sup>y</sup>	62.7 $\pm$ 8.1 <sup>y</sup>	40.1 $\pm$ 6.3 <sup>C</sup>
Totale	22.4 $\pm$ 4.7 <sup>X</sup>	57.7 $\pm$ 6.5 <sup>Y</sup>	73.1 $\pm$ 7.3 <sup>YZ</sup>	77.4 $\pm$ 5.9 <sup>Z</sup>	82.9 $\pm$ 5.0 <sup>Z</sup>	

I valori con differenti lettere all'interno delle colonne sono differenti; <sup>A,B,C</sup> P<0.01; <sup>a,b,c</sup> P<0.05

I valori con differenti lettere all'interno delle righe sono differenti; <sup>X,Y,Z</sup> P<0.01; <sup>x,y,z</sup> P<0.05

Tabella 5. Percentuali di Cleavage, Blastocisti e le percentuali delle Blastocisti sugli oociti divisi

Tori	n°	% cleavage ad ogni tempi di co-incubazione (h pi)					
		4	8	12	16	20	Total
		N. 481	N. 498	N. 485	N. 571	N. 572	2607
MH	655	45.7±3.7 <sup>ax</sup>	78.6±1.1 <sup>AY</sup>	69.6±6.4 <sup>Y</sup>	67.1±7.1 <sup>Y</sup>	76.1±5.0 <sup>ay</sup>	67.4±3.4 <sup>A</sup>
ML	590	31.4±5.4 <sup>abX</sup>	66.7±4.0 <sup>ABY</sup>	69.1±8.2 <sup>Y</sup>	75.9±3.6 <sup>Y</sup>	70.0±3.9 <sup>ay</sup>	62.6±4.2 <sup>A</sup>
H	687	19.8±6.8 <sup>bx</sup>	51.8±5.9 <sup>BCY</sup>	61.5±6.9 <sup>YZ</sup>	74.5±4.9 <sup>Z</sup>	70.6±2.8 <sup>az</sup>	55.6±5.0 <sup>B</sup>
L	675	16.7±5.9 <sup>bx</sup>	42.2±8.4 <sup>CY</sup>	56.1±5.3 <sup>YZ</sup>	62.3±4.8 <sup>Z</sup>	57.1±3.5 <sup>bYZ</sup>	46.9±4.4 <sup>C</sup>
Total	2607	28.4±3.9 <sup>X</sup>	59.8±4.4 <sup>Y</sup>	64.1±3.4 <sup>Y</sup>	70.0±2.7 <sup>Y</sup>	68.4±2.5 <sup>Y</sup>	
		% blastocisti (n) ad ogni tempi di co-incubazione (h pi)					
		N. 481	N. 498	N. 485	N. 571	N. 572	2607
MH	655	23.2±2.9 <sup>ax</sup>	48.0±4.8 <sup>ay</sup>	37.6±5.4 <sup>xy</sup>	29.7±4.1 <sup>x</sup>	37.8±7.8 <sup>axy</sup>	35.2±2.8 <sup>A</sup>
ML	590	11.2±4.2 <sup>bx</sup>	37.5±7.7 <sup>abY</sup>	36.4±3.2 <sup>Y</sup>	30.3±1.6 <sup>Y</sup>	38.7±3.5 <sup>ay</sup>	30.8±3.0 <sup>AB</sup>
H	687	6.1±5.2 <sup>bx</sup>	24.8±4.9 <sup>by</sup>	32.1±7.5 <sup>y</sup>	38.5±8.5 <sup>y</sup>	37.6±3.0 <sup>ay</sup>	27.5±3.6 <sup>B</sup>
L	675	3.7±2.1 <sup>bx</sup>	21.3±3.1 <sup>by</sup>	21.8±6.8 <sup>y</sup>	26.8±3.6 <sup>y</sup>	22.2±2.0 <sup>by</sup>	18.6±2.3 <sup>C</sup>
total	2607	11.0±2.6 <sup>X</sup>	32.9±3.6 <sup>Y</sup>	32.0±3.1 <sup>Y</sup>	30.6±2.6 <sup>Y</sup>	33.7±2.7 <sup>Y</sup>	
		% blastocisti/oociti penetrati ad ogni tempi di co-incubazione (h pi)					
		N. 147	N. 299	N. 313	N. 404	N. 295	1458
MH	340	52.4±9.2	62.2±5.5	53.6±4.1	44.1±3.9	49.1±9.4	52.3±3.1
ML	378	32.4±9.0	55.7±9.9	54.5±6.6	40.3±3.3	55.5±4.9	47.7±3.6
H	399	18.2±14.3	46.8±5.6	50.2±7.6	50.7±9.6	51.7±5.9	43.5±4.7
L	341	22.6±12.4	43.6±9.8	36.5±6.9	34.8±13.1	39.6±1.7	36.1±4.0
total	1458	32.0±6.2	52.0±4.0	48.7±3.4	42.4±4.1	49.0±3.1	

I valori con differenti lettere all'interno delle colonne sono differenti; <sup>A,B,C</sup> P<0.01; <sup>a,b,c</sup> P<0.05  
 I valori con differenti lettere all'interno delle righe sono differenti; <sup>X,Y,Z</sup> P<0.01; <sup>x,y,z</sup> P<0.05

Tabella 6. Distribuzione dei sessi, espresso come percentuale di femmine (F) e rapporto tra femmine : maschi (F:M), negli embrioni prodotti ai vari tempi di co-incubazione.

Co-incubation time h pi	n. blastocysts	n. F	% F embryos <sup>f</sup>	F:M ratio <sup>f</sup>
<b>4</b>	28	19	(67.9) <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>
<b>8</b>	78	46	(59.0)	1.4
<b>12</b>	90	49	(54.4)	1.2
<b>16</b>	88	49	(55.7)	1.3
<b>20</b>	76	47	(61.8) <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	360	210	(58.3)	1.4

<sup>f</sup> Valori con la lettera "a" differiscono statisticamente dal rapport atteso 50:50 dei sessi

## DISCUSSIONE

Il primo esperimento è stato condotto per selezionare 4 tori con fertilità diversa sui quali valutare la cinetica di penetrazione e una possibile correlazione con la resa embrionale.

I risultati dell'esperimento 1.1 hanno dimostrato che vi è una variazione della fertilità in vitro tra tori, confermando osservazioni precedenti (Otoi et al 1993;. Alomar et al 2006). Vale la pena sottolineare che gli otto tori appartenevano ad un Centro autorizzato di raccolta del seme, e che, quindi il loro sperma era stato preliminarmente sottoposto a screening per la maggior parte dei parametri di fertilità (CASA); inoltre, tutti i tori erano caratterizzati da elevata fertilità in campo (dati non presentati). Tuttavia, è stato osservato che un toro ha dato il 40% di blastocisti, un altro ha dato una resa molto bassa (circa il 5%), mentre gli altri hanno mostrato una fertilità intermedia (25.5-36.8%). E' noto che i test di laboratorio, eseguiti di routine nei centri di raccolta, non consentono la determinazione a priori della fertilità del seme, in particolare dopo la IVF. In questo studio abbiamo valutato, sullo stesso seme utilizzato per la IVF, una serie di parametri come la motilità, la vitalità e l'integrità acrosomiale dopo lo scongelamento; inoltre, dopo la separazione del seme, è stata calcolata la concentrazione spermatica e rivalutata la motilità degli spermatozoi.

Differenze tra i tori sono state trovate anche nella vitalità degli spermatozoi post-scongelamento (percentuale di spermatozoi vivi con acrosoma intatto), così come per la concentrazione spermatica e la motilità post-Percoll. Inoltre, è stato osservato che la concentrazione e la motilità post-separazione sono altamente correlate alla fertilità in vitro, intesa sia come percentuale di cleavage che di blastocisti. Vale la pena ricordare che dopo la separazione degli spermatozoi il pellet ottenuto viene diluito in modo da avere la concentrazione ottimale durante la fecondazione in vitro per tutti i tori di  $1 \times 10^6$ /ml. Se ne desume che, visto che la concentrazione è strettamente correlata con la motilità degli spermatozoi, il fattore che gioca il ruolo più importante è la motilità dopo la separazione Percoll. Un'altra correlazione è emersa tra il tasso di cleavage e la resa embrionale, come precedentemente riportato da Alomar et al. (2006).

Gli obiettivi principali del presente studio sono stati di verificare se la velocità di penetrazione è correlata alla fertilità in vitro, e se variando la lunghezza della co-

incubazione dei gameti in relazione alla cinetica dei tori si ottiene un miglioramento delle fecondazione relative performance.

I risultati dell'esperimento 1.2 hanno dimostrato che la velocità di penetrazione non è correlata alla fertilità in vitro. In un lavoro precedente era stato dimostrato che la velocità di penetrazione è correlata alla fertilità in campo dei tori (Ward et al. 2002), mentre un altro studio non aveva evidenziato alcuna correlazione tra questi parametri (Puglisi et al. 2004). Con l'eccezione del toro a bassa fertilità, il toro L, che è stato anche quello con una velocità di penetrazione più lenta, le differenze nella cinetica tra i tori non riflettono la loro fertilità in vitro. A questo proposito vale la pena sottolineare che in questo esperimento le differenze di fertilità in vitro (cleavage e resa embrionale) tra i quattro tori non sono state così evidenti come nell'esperimento 1. In particolare, il toro ML, che aveva mostrato una fertilità medio-bassa (tasso di blastocisti di circa il 25%) nell'esperimento 1.1), in questo esperimento, ha invece raggiunto la resa embrionale dei due tori selezionati per l'alta fertilità (MH e H). Inoltre, sebbene il toro L, che era stato selezionato per la bassa fertilità, abbia dato il rendimento più basso in blastocisti anche nell'esperimento 2, questo è comunque migliorato rispetto a quello registrato nell'Esperimento 1 (circa il 20 % vs 5%). I due esperimenti sono stati condotti nello stesso laboratorio, esattamente nelle stesse condizioni operative e, pertanto, si può ipotizzare che tali differenze possano essere legate in parte alla variabilità dei diversi lotti di oociti utilizzati e in parte alla nota variabilità tra paillette. I risultati dell'esperimento 1.2 hanno evidenziato differenze nella velocità di penetrazione tra i tori, confermando precedenti osservazioni (Ward et al 2002.). Nel presente studio due tori (MH e ML) hanno avuto una cinetica più veloce rispetto agli altri due (H e L), come dimostrato dai tassi di penetrazione più elevati registrati a 4 ore pi. Inaspettatamente, però, il toro selezionato per l'alta fertilità (H) ha mostrato una velocità di penetrazione più lenta rispetto ai tori MH e ML. Tuttavia, se si considera il tasso di penetrazione normale, cioè normospermica, il toro H ,ha raggiunto il massimo valore a 12 ore, esattamente come il toro ML, mentre il toro L ha avuto bisogno di un tempo di co-incubazione maggiore. Un altro aspetto interessante che è stato osservato è che, quando gli oociti sono stati fecondati dal toro più lento (L), anche i primi eventi della fecondazione, come la decondensazione della testa dello spermatozoo e la formazione dei pronuclei, sono avvenuti più tardi.

È interessante notare che il toro più veloce (MH) ha raggiunto alti tassi di penetrazione normale già a 4 ore, dopodiché non c'è stato un ulteriore incremento, a causa di un'alta incidenza di polispermia. In generale, i risultati ottenuti suggeriscono che l'incidenza della polispermia è più elevata per i tori con alta velocità di penetrazione e all'aumentare del tempo di co-incubazione. Un aumento dell'incidenza della polispermia all'aumentare dei tempi di co-incubazione era stato osservato anche in precedenza da Sumantri et al. (1997). Nel nostro lavoro, il toro MH ha dato un elevato tasso di polispermia già a 8 ore pi (357%), che ha raggiunto 50% a 12 ore pi; vale la pena sottolineare che questi valori sono molto superiori a quelli precedentemente riportati in altri studi di IVF nel bovino (Eid et al 1994;. Alomar et al 2006;. 2008). Tuttavia, una incidenza di polispermia simile è stata riportata da altri autori quando la durata della co-incubazione era di 18 ore (Iwata et al. 2008). L'incidenza di polispermia nel toro ML è rimasta contenuta a valori (10-13%) paragonabile a studi precedenti (Eid et al 1994;. Alomar et al 2006;. 2008) fino a 12 ore pi, per aumentare, invece, drammaticamente tra le 16 e le 20 ore pi (45-50%). Per quanto riguarda i tori che hanno mostrato una penetrazione più lenta, è stato registrato che con il toro H un incremento della polispermia si è avuto solo all'ultimo tempo (30% a 20 ore), mentre nel caso del toro a bassa fertilità, che aveva anche la velocità più lenta di penetrazione, la polispermia è stata bassa a qualsiasi tempo di co-incubazione (4.7-7.3%). I risultati da noi ottenuti sono in disaccordo con quelli di un altro lavoro in cui è dimostrato che l'incidenza della polispermia varia tra i tori, ma in questo caso il tasso di polispermia non è correlato alla velocità di penetrazione (Alomar et al 2008).

L'altro obiettivo di questo esperimento era quello di valutare se la fertilità in vitro, di tori con differenti cinetica, potesse essere migliorata variando la lunghezza della co-incubazione dei gameti. Diversi autori hanno suggerito di ridurre la durata della co-incubazione dei gameti, ma questo non è sempre pratico in un laboratorio di produzione embrionale e può penalizzare l'efficienza dei tori che hanno una penetrazione lenta. Sulla base dei risultati sulla cinetica di penetrazione, ci si aspetterebbe che, al fine di ottimizzare l'efficienza IVEP di ogni toro, il tempo ottimale co-incubazione dei gameti dovrebbero essere 4-8 h, 12 h, 12-16 h e 16 -20 ore pi rispettivamente per i tori MH, ML, H e L. In realtà il tempo ottimale di co-incubazione non corrisponde in tutti i casi al tempo in cui si registra il maggior tasso di penetrazione monospermica. Tuttavia è stato osservato che una durata di 8 ore di co-incubazione spermatozoo-oocita è stata sufficiente a garantire le rese

maggiori per i due tori più veloci. Al contrario, sono state necessarie 16 ore di co-incubazione per aumentare in modo significativo il cleavage dei due tori più lenti; inoltre, anche se le differenze non sono state significative, le rese in blastocisti, sono comunque migliorate allo stesso tempo. Sebbene non siano state registrate differenze nelle percentuali di fecondazione normale per il toro MH tra le 4 e 8 ore pi, il cleavage è aumentato a 8 ore (79%) ed è stato molto superiore al tasso di fecondazione normale (53%); è interessante notare che il tasso di blastocisti a 8 h (48%) è stato simile al tasso di penetrazione monospermica. Poiché l'incidenza di polispermia per questo toro è già alta (36%) a 8 ore, si può quindi ipotizzare che una parte degli embrioni sviluppati sia polispermici.

Comunque, indipendentemente dai tori, le maggiori percentuali di cleavage e blastocisti sono state raggiunte a 8 ore, senza ulteriore incremento con il passare del tempo di co-incubazione. Ciò è in accordo con altri studi che hanno riportato che 9-10 ore era un tempo di co-incubazione dei gameti ottimale nei bovini (Ward et al. 2002) e 9 h (Kochhar et al. 2003). In questo studio, tuttavia la percentuale di oociti fecondati che si è sviluppato in blastocisti non è stata influenzata dal tempo di co-incubazione, in disaccordo con Kochhar et al. (2003). Questo autore ha riferito infatti che, sebbene il cleavage sia ridotto a 6 ore di co-incubazione, la percentuale di oociti fecondati che diventano blastocisti è maggiore rispetto ai tempi più lunghi. Tuttavia, la resa embrionale in relazione con i COC è stata simile in ogni momento della co-incubazione. Anche in altri studi, sebbene un aumento delle rese in blastocisti è stata ottenuta a 10 h (rispetto a tempi inferiori), non sono state riscontrate differenze ai tempi successivi (tra il 10 e 20 h). Allo stesso modo, nel nostro studio non ci sono state differenze tra le 8 e le 20 h. In altri termini un allungamento della durata di co-incubazione dei gameti non sembra esercitare un effetto deleterio sullo sviluppo embrionale, inteso in termini quantitativi. Non possiamo, però escludere che un'influenza negativa si espliciti sulla qualità e, quindi, sulla vitalità degli embrioni prodotti.

Pertanto, poiché è noto che, a causa dell'elevato rapporto tra numero di spermatozoi e oocita durante la fecondazione in vitro, gli oociti e gli embrioni sono esposti agli effetti negativi dei radicali liberi (Aitken et al. 1994), degli enzimi idrolitici (Rehman et al. 1994) e della polispermia (Sumantri et al. 1997) è consigliabile di ridurre la lunghezza di co-incubazione.

L'alta incidenza di polispermia registrata per i tori ad alta velocità di penetrazione in questo studio è allarmante; ne consegue che prima di utilizzare i tori per la routine di IVF, è opportuno che questi siano sottoposti ad appropriati screening. Infatti, nel caso di tori che danno alti tassi di polispermia diviene innanzitutto obbligatorio ridurre la durata della co-incubazione; inoltre, al fine di contenere il fenomeno, è possibile utilizzare alcuni espedienti, come la modificazione della concentrazione finale del seme, o della concentrazione dell'eparina, ecc..

Poiché non sono state eseguite analisi citogenetica sulle blastocisti prodotte non si può escludere che ai tempi più lunghi di co-incubazione ci sia un aumento delle anomalie cromosomiche come la poliploidia e la mixoploidia, a seguito della polispermia. È noto che la polispermia non interferisce con lo sviluppo in blastocisti, anche se la crescita dell'embrione è ritardato (Han et al 1999;. Kawarsky et al. 1996).

Un altro aspetto che abbiamo studiato è stato l'effetto della cinetica di penetrazione sul rapporto tra i sessi sugli embrioni. È noto che nel sistema in vitro il rapporto tra i sessi è alterato verso i maschi (Xu et al 1992;. Gutierrez-Adan et al 1996; Lonergan et al 1999) e che gli embrioni di sesso maschile prodotti in vitro si sviluppano più velocemente degli embrioni di sesso femminile (Yadav et al 1993;. Gutierrez-Adan et al 1996;. Carvalho et al 1995). Tuttavia, altri studi non hanno trovato una deviazione significativa rispetto al rapporto atteso di 1:1 (Berg et al. 1992, Grisart et al. 1995, King et al. 1991). È stato ipotizzato che il differente tasso di crescita tra gli embrioni di sesso diverso può essere collegato alla capacità degli spermatozoi Y di penetrare gli oociti prima della loro controparte X (Kochhar et al. 2003) o alla facilità degli zigoti XY di avviare o accelerare lo sviluppo post-fecondazione a causa di geni sesso-specifici (Yadav et al. 1993) o alla maggiore vulnerabilità degli zigoti XX in vitro, a causa dell'espressione squilibrato di alcuni geni X-linked (Rieger, 1992). In seguito è stato dimostrato che la velocità di penetrazione è correlata con la cinetica dello sviluppo embrionale (Alomar et al 2008), ed è stato ipotizzato che i tori con una penetrazione più veloce possano alterare il rapporto F:M verso i maschi. I risultati del presente studio non hanno confermato questa ipotesi; infatti, non sono state riscontrate differenze nel rapporto tra i sessi tra i vari tori a qualsiasi tempo. Questi risultati sono in contrasto con quelli riportati da Alomar et al. (2008) che ha riportato una preponderanza di embrioni maschi solo quando è stato utilizzato un toro con un tasso di penetrazione più veloce.

Nel nostro studio è stato osservato che lo stadio di sviluppo degli embrioni influenza il rapporto tra i sessi, con una prevalenza di femmine tra gli embrioni caratterizzati da uno sviluppo più lento, confermando esperienze precedenti (Avery et al 1991; Carvalho et al 1995; Yadav et al 1993). In questo studio la maggior parte delle morule era di sesso femminile (91.7%), con un rapporto F: M 11 volte superiore a quello previsto. Allo stesso modo, la percentuale di femmine sugli embrioni allo stadio di blastocisti precoci e blastocisti differiva significativamente dal rapporto atteso, con un rapporto F: M di 2 e 2.2, rispettivamente. Tuttavia, quando gli embrioni raggiungevano uno stadio più avanzato di sviluppo il rapporto tra i sessi è tornato alla normalità nel caso delle blastocisti espanse (F:M =0.98), per diminuire leggermente al di sotto dell'unità nella fase più avanzata, cioè quella di blastocisti sgusciate (F: M = 0.7). Questi risultati sono in accordo con precedenti studi che hanno dimostrato che gli embrioni di sesso femminile si sviluppano più lentamente in vitro (Yadav et al 1993; Gutierrez-Adan et al 1996; Carvalho et al 1995). Tuttavia, alcune differenze sono emerse rispetto agli altri studi; ad uno stadio più avanzato di sviluppo embrionale il rapporto tra i sessi non era diverso da 1:1, mentre in altri studi la percentuale di maschi sugli embrioni avanzati era molto superiore: Carvalho et al. hanno riferito che il 68% degli embrioni espansi e il 100% delle blastocisti sgusciate erano maschi e Avery et al. ha rilevato che il 95% delle blastocisti che sgusciate erano di sesso maschile.

Quindi, in definitiva i risultati del presente studio hanno confermato che gli embrioni più lenti tendono a essere femmine, mentre, al contrario di altri report, non si è osservato un disequilibrio tra i sessi nel caso degli embrioni più veloci. In generale si è osservata una tendenza a favore delle femmine nel sistema da noi utilizzato.

È interessante notare che, sebbene non siano state evidenziate differenze nella percentuale di embrioni di un sesso tra i diversi tempi di co-incubazione considerati, il rapporto tra i sessi è stato differente rispetto al rapporto previsto 1:1, a favore delle femmine al più breve tempo di co-incubazione (4 h pi ), e al tempo più lungo (20 pi h). Questi risultati sono in disaccordo con lavori precedenti in cui è stata osservata una preponderanza di embrioni di sesso maschile ai tempi più corti di co-incubazione (1-6 h), mentre a tempi più lunghi il rapporto tra i sessi non era diverso dal previsto 1:1 (Kochhar et al. 2003; Iwata et al 2008). È stato precedentemente ipotizzato che gli spermatozoi Y hanno un vantaggio selettivo per

un breve periodo, dopodiché questo vantaggio si perde a causa della morte degli spermatozoi Y o per un' accelerata attività degli spermatozoi che portano la X.

I risultati da noi ottenuti non erano quelli attesi e, per quanto molto interessanti, sono difficili da spiegare; in realtà il denominatore comune ad entrambi gli studi è che una deviazione nel rapporto tra sessi è stata osservata al più breve tempo co-incubazione, ma non è chiaro perché in questo studio siano state favorite le femmine .

Al fine di analizzare meglio il fenomeno abbiamo valutato se la distribuzione degli stadi di sviluppo embrionale è stata diversa ai differenti tempi di co-incubazione, poiché ciò avrebbe potuto mascherare l'effetto del tempo sul rapporto tra i sessi; tuttavia, abbiamo osservato che in qualsiasi momento, circa la metà degli embrioni erano ritardati (TM-EBL-BI) e l'altra metà avanzati (XBL e HBL). Ciò conferma che il tempo di co-incubazione influenza il rapporto tra i sessi, senza influenzare il tasso di sviluppo. Possiamo ipotizzare che la maggiore percentuale di femmine registrata in questo studio sia dovuta alla differenza dei sistemi di IVF e di IVC rispetto agli studi precedenti che riportavano una preponderanza di maschi, dato che è noto che le condizioni di coltura possono influenzare il rapporto tra i sessi. E' stato, infatti, dimostrato che la presenza di glucosio durante la IVC inibisce lo sviluppo di embrioni di sesso femminile (Gutierrez-Adan et al. 2001a) e che l'aggiunta di siero è associata ad uno sbilanciamento verso il sesso maschile (Gutierrez-Adan et al . 2001b). Nella maggior parte degli studi che hanno riportato differenze tra i sessi nel bovino, i terreni di coltura contenevano un'alta concentrazione (5.56-6.7 mm) di glucosio (Carvalho et al 1995;. Gutierrez-Adan et al 1996;. Avery et al 1992;. Xu et al. 1991; Marchant-Le Guenna et al 1992;. Yadav et al 1993). Al contrario, il nostro terreno di coltura è stato il SOF glucosio-free integrato con il 5% di siero bovino. Risulta quindi che il nostro medium di IVC ha una concentrazione minore di glucosio rispetto ai sistemi basati sull'impiego di TCM199 o Menezo B2 o, comunque, rispetto ai terreni con una maggiore concentrazione di siero. É interessante notare che nell'unico altro caso in cui è stata riportata una prevalenza di embrioni femmine il medium di IVC era il SOF (Wenigerkind et al. 1999).

Tuttavia, ciò che è difficile da spiegare è la predominanza di embrioni di sesso femminile a 4 e 20 ore di co-incubazione; ne consegue che sono necessari ulteriori studi per chiarire questo fenomeno.

In conclusione, è stato dimostrato che, tra i parametri di fertilità, la motilità post-Percoll e il cleavage potrebbero essere marker utili per prevedere la fertilità in vitro dei tori, come attestato dalla elevata correlazione tra questi parametri e le rese embrionali. La cinetica di penetrazione dei tori, invece, non è risultata correlata alla fertilità in vitro. Un risultato interessante è quello di aver dimostrato che la capacità fecondante dei tori può essere migliorata adattando la lunghezza di co-incubazione alla loro velocità di penetrazione. È stato, inoltre, accertato che i tori più veloci danno tassi di polispermia più elevati, suggerendo, per questi tori, di ridurre la durata di co-incubazione a 8 ore. Infine è stato dimostrato che i tori con una cinetica di penetrazione più veloce non alterano il rapporto del sesso dell'embrione a favore dei maschi.

## **ESPERIMENTO 2 Valutazione della cinetica di penetrazione e delle rese embrionali di diversi tori bufalini**

### INTRODUZIONE

Le basse percentuali di cleavage riportate nella specie bufalina (Gasparrini, 2002; 2004a; Neglia 2003) indicano che la fecondazione è un momento critico della procedura IVEP in questa specie. In uno studio precedente, la minore efficienza IVEP, intesa come resa in blastocisti (embrioni trasferibili), riscontrata nella specie bufalina rispetto alla bovina era principalmente riferibile alla inferiore percentuale di cleavage (Neglia et al., 2003). Infatti, le percentuali di blastocisti, calcolate sugli embrioni divisi, erano comparabili nelle due specie. Una successiva esperienza ha, inoltre, evidenziato una migliore produzione embrionale in vitro dopo attivazione chimica degli oociti piuttosto che dopo fecondazione in vitro (Gasparrini et al., 2004b), suggerendo che nel sistema di maturazione oggi in uso, gli oociti acquisiscono la competenza allo sviluppo e che, quindi, la più bassa percentuale di cleavage sia riferibile a deficienze del sistema di fecondazione in vitro. In passato si pensava che la scadente qualità del seme congelato di bufalo, dimostrata ampiamente nel corso di diversi studi (Meur et al., 1988; Gasparrini, 2002), fosse il principale fattore inficiante la efficienza della IVF. Attualmente la qualità del seme congelato, almeno nel nostro Paese è migliorata, come indicato dall'esame di alcuni parametri associati alla fertilità che sono risultati simili nel seme fresco e in quello congelato (Wilding et al., 2003). Come precedentemente detto un sensibile miglioramento dell'efficienza del cleavage è stato ottenuto utilizzando un sistema di IVM arricchito con composti tiolici (Gasparrini et al., 2006). Una problematica irrisolta è rappresentata, invece, dall'estrema variabilità della capacità fecondante 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 o IVF. E' 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 con l' 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. E' 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. Ne consegue un'obiettiva difficoltà nella 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.

E' 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).

In questo scenario si rendono necessari studi finalizzati all'individuazione dei fattori associati alla fertilità maschile nel bufalo, valutata sia in vivo con i programmi di IS sia in vitro, allo scopo di poter modificare, a lungo termine, l'indirizzo selettivo dei riproduttori in modo che assumano in sé caratteristiche sia produttive sia riproduttive superiori.

Come visto in precedenza, esistono vari studi che suggeriscono una correlazione tra la velocità di penetrazione degli spermatozoi negli oociti e la percentuale di cleavage, la percentuale di blastocisti e la fertilità in campo nel bovino (Marquant-Le Guienne et al., 1992; Shamsuddin and Larsson, 1993). Questa osservazione è in accordo con quanto emerso in una precedente esperienza che aveva dimostrato una correlazione tra il tempo in cui si verifica la prima divisione cellulare dopo l'IVF e lo sviluppo embrionale (Ward F. et al 2002). Infatti, è verosimile ipotizzare che gli oociti che vengono penetrati prima vadano anche incontro anticipatamente al primo cleavage.

I risultati ottenuti nel corso dell'esperimento precedente (N) nella specie bovina hanno disatteso tale ipotesi, in quanto nessuna correlazione è emersa tra cinetica e fertilità in vitro. E' opportuno, però, sottolineare che il toro più lento era effettivamente quello a bassa fertilità, mentre gli altri tori testati davano rese embrionali sovrapponibili. Ciò può essere conseguenza del fatto che l'effetto maschio è meno evidente nella specie bovina e che i tori testati appartenevano ad una popolazione selezionata. L'estrema variabilità riscontrata nella fertilità in vitro di tori bufalini ha suggerito di estendere lo studio a questa specie, in cui la scelta del seme assume un'importanza rilevante ai fini della riuscita stessa dei programmi di IVF. Appare evidente, quindi, che riveste grande importanza conoscere il momento in cui avviene l'effettiva penetrazione dello spermatozoo nell'oocita. La conoscenza di tale aspetto potrebbe permettere innanzitutto di effettuare una selezione dei tori migliori, nel caso si evidenziasse una correlazione tra cinetica di penetrazione e attitudine in vitro. Inoltre, consentirebbe di migliorare la capacità fecondante in vitro dei diversi tori, variando il protocollo di IVF in funzione della cinetica espressa dal toro che si intende utilizzare.

Alla luce di quanto detto, si è ritenuto interessante indagare su uno degli aspetti più problematici del sistema IVEP della specie bufalina, ovvero la cinetica di penetrazione

spermatICA di diversi tori bufalini, per verificare le eventuali relazioni tra questa e l'attitudine alla IVF degli stessi. Per cui lo scopo di questo studio è stato valutare la cinetica di penetrazione spermatICA in vitro di differenti tori bufalini e verificare se tale parametro può essere impiegato come marker di previsione della fertilità in vitro dei diversi soggetti.

## DISEGNO SPERIMENTALE

Nell'esperimento 2.1, a seguito della IVM, gli oociti (n = 1340) sono stati assegnati in modo casuale a 6 gruppi di fecondazione in vitro e sono stati inseminati con il seme di 6 tori. Gli embrioni ottenuti alla fine della coltura (giorno 7) sono stati valutati sulla base di criteri morfologici, e in base allo stadio di sviluppo come segue: morula compatta (TM), blastocisti precoce (EBI), blastocisti (BI), blastocisti espansa (XBL) e blastocisti sgusciata (HBL). La valutazione delle blastocisti è stata ripetuta anche al giorno 8, per assicurarsi che gli embrioni che erano allo stadio di TM al giorno 7 si fossero sviluppati a BL nelle 24 ore di coltura successiva. L'esperimento è stato ripetuto per ogni toro più di 4 volte.

Nell'esperimento 2.2, a seguito della IVM, gli oociti (n = 1465) sono stati assegnati in modo casuale a 6 gruppi di fecondazione in vitro e sono stati inseminati con il seme di 6 tori, marcato con il MitoTracker. Il seme utilizzato in questa prova è degli stessi tori, e stesso eiaculato, utilizzati nell'esperimento 1. I presunti zigoti sono stati rimossi dalla IVF a 3, 6, 9, 12, 15, 18 ore dopo la fecondazione (PI). Ad ogni tempo, i presunti zigoti (in media 20 oociti per volta per toro) sono stati denudati, fissati e colorati per determinare il tasso di penetrazione. La progressione dei pronuclei è stata valutata su quegli oociti che hanno mostrato una fecondazione normale (n = 590) per ogni tempo di co-incubazione (35, 69, 93, 111, 135,147), rispettivamente a 3, 6, 9, 12, 15, 18 pi h.

## MATERIALI E METODI

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

## Esperimento 2.1

### PRODUZIONE EMBRIONALE IN VITRO BUFALI

#### *Maturazione in vitro (IVM)*

Il recupero degli oociti di bufalo da ovaia di animali macellati è stato eseguito con la metodica precedentemente indicata per gli oociti bovini.

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, 0.3 mM di cistina 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 CO<sub>2</sub> in aria umidificata, per una durata di 22 ore.

#### *Fecondazione in vitro (IVF)*

Gli spermatozoi utilizzati per la fecondazione in vitro sono stati ottenuti da seme congelato/scongelato secondo la procedura precedentemente descritta. Il terreno di fecondazione utilizzato è stato il medium Tyrode's Albumine Lactate Pyruvate (TALP; Lu KH. et al., 1987), addizionato di 0.2 mM di penicillamina, 0.1 mM di ipotaurina e 0.01 mM di eparina. La procedura per la lavorazione e la selezione del seme è la stessa utilizzata per la specie bovina. Il pellet ottenuto dopo centrifugazione è stato diluito con il medium IVF-TALP in modo da ottenere una concentrazione finale nelle gocce di fecondazione di  $2 \times 10^6$  spermatozoi/ml. L'inseminazione è stata eseguita in gocce di 50 µl sotto olio (5 oociti/goccia) a 38.5°C, in presenza del 5 % di CO<sub>2</sub>.

#### *Coltura Embrionale (IVC)*

Dopo circa 22 ore dalla IVF i presunti zigoti sono stati rimossi dal medium di fecondazione, denudati delle cellule del cumulo mediante spipettamento, lavati due volte in H-SOF e coltivati in gocce (10/goccia) da 20µl 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% CO<sub>2</sub>, 7% O<sub>2</sub> e 88% N<sub>2</sub>. 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, intesa come percentuale di blastocisti, è stata valutata al giorno 7.

## Esperimento 2.2

### *Valutazione Della Penetrazione Degli Spermatozoi*

Per il recupero e la maturazione degli oociti si è seguito il protocollo precedentemente riportato. Per la fecondazione si è seguito il protocollo precedentemente spiegato con un'unica variabile : per distinguere gli oociti penetrati da quelli non penetrati è stato utilizzato il MitoTracker Green FM liofilizzato (Invitrogen) come precedentemente descritto (vedi esperimento 1.2).

La valutazione della penetrazione è stata eseguita su un campione rappresentativo di oociti a tempi diversi dalla fecondazione intervallati di 3 ore e precisamente a 3, 6, 9, 12, 15, 18 ore post-IVF. Gli oociti/zigoti di ciascun tempo sono stati denudati delle cellule del cumulo con ripetuto spipettamento in medium SOF Hapes-tamponato (H-SOF) e privati della zona pellucida mediante digestione enzimatica in pronase (2 mg/ml). Anche in questo caso la procedura è la stessa che è stata applicata alla specie bovina. Per ciascun toro sono state valutate, ad ogni tempo post-IVF considerato, le percentuali di penetrazione monospermica e polispermica.

Fig.10 Oocita penetrato Nuclei colorati con D.A.P.I. e spermatozoo colorato con Mitotracker



(a) Zigote con pronuclei sincroni

(b) Coda dello spermatozoo penetrato

## ANALISI STATISTICA

Nell'esperimento 1., Per valutare le differenze tra tori nelle percentuali di cleavage e di blastocisti dopo l'IVF è stato utilizzato il Chi quadro.

Nell'Esperimento 2. lo stesso test statistico è stato utilizzato per valutare le differenze nelle percentuali di penetrazione spermatica tra tori ai tempi post-inseminazione considerati

Inoltre sono state eseguite analisi di correlazione e di regressione multipla tra la velocità di penetrazione spermatica e la resa in blastocisti.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando SPSS statistica 18,0, 2009 (18,0 SPSS, 2009. SPSS Inc. 233 South Wacker Drive, 11th Floor Chicago, IL 60.606-64.122.010).

## RISULTATI

### Esperimento 2.1

Tabella 7. Percentuale Cleavage e Resa Embrionale

TORO	OOCITI	CLEAV	TM_BI	% CLEAV	%TM-BI/tot
A	179	56	13	33,3 <sup>A</sup>	7,4 <sup>A</sup>
B	203	126	51	64,8 <sup>Ba</sup>	26,4 <sup>B</sup>
C	181	116	36	67,4 <sup>B</sup>	23,5 <sup>Bb</sup>
D	282	199	58	70,6 <sup>Bb</sup>	20,6 <sup>Bb</sup>
E	210	138	25	64,4 <sup>B</sup>	10,9 <sup>Aa</sup>
F	285	198	63	70,5 <sup>B</sup>	23,2 <sup>B</sup>

<sup>A,B,C</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

<sup>a,b,c</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

L'Esperimento 2.1 ha dimostrato che nella specie bufalina esiste una variabilità nella capacità fecondante tra i differenti tori utilizzati. Il toro A ha dato la più bassa percentuale di cleavage, ( $P < 0.01$ ) rispetto agli altri tori. I tori C, D, E, F non presentano differenze statistiche mentre il toro B risulta sì molto superiore ( $P < 0.01$ ) al toro A ma ha una variazione, verso il basso, rispetto al toro D. Quando andiamo, invece, a confrontare le rese in blastocisti notiamo una maggiore variabilità. In particolare i tori A ed E hanno dato minori percentuali di blastocisti rispetto agli altri. Questo risultato è molto interessante in quanto questi due tori erano proprio quelli caratterizzati da una più lenta cinetica di penetrazione nell'esperimento 2.1. La resa embrionale del toro A è statisticamente inferiore ( $P < 0.01$ ) rispetto ai 4 tori (B,C,D,F) mentre non risulta effetto se confrontiamo le rese dei tori A ed E. La resa embrionale del toro E risulta meno distante ( $P < 0.05$ ) se confrontata con le rese dei tori C e D se invece confrontiamo le rese dei tori E e F troviamo una differenza significativa ( $P < 0.01$ ).

## ESPERIMENTO 2.2

I risultati dell' esperimento 2.2 sono riportati nella tabella 8

Tabella 8.

TORO	n° COC	Percentuale degli oociti penetrate ad ogni tempo (ore pi)					
		3	6	9	12	15	18
A	217	0 <sup>B</sup>	2.8 <sup>C</sup>	7.7 <sup>B</sup>	16.2 <sup>B</sup>	24.2 <sup>Cc</sup>	25.6 <sup>B</sup>
B	243	10.3 <sup>B</sup>	23.1 <sup>B</sup>	33.3 <sup>C</sup>	40.0 <sup>A<sup>b</sup></sup>	40.5 <sup>Bbc</sup>	69.0 <sup>A</sup>
C	247	6.1 <sup>B</sup>	27.7 <sup>B</sup>	52.4 <sup>AC</sup>	61.4 <sup>Aa</sup>	80.5 <sup>A</sup>	71.8 <sup>A</sup>
D	262	64.1 <sup>A</sup>	72.1 <sup>A</sup>	76.7 <sup>A</sup>	63.4 <sup>Aa</sup>	70.7 <sup>ABa</sup>	57.5 <sup>A</sup>
E	252	0 <sup>B</sup>	0 <sup>C</sup>	18.4 <sup>B</sup>	20.0 <sup>B</sup>	43.2 <sup>Bbc</sup>	69.8 <sup>A</sup>
F	244	7.7 <sup>B</sup>	36.6 <sup>B</sup>	39.0 <sup>C</sup>	64.1 <sup>Aa</sup>	63.0 <sup>ABab</sup>	71.1 <sup>A</sup>

<sup>A,B,C</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

<sup>a,b,c</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

I risultati hanno confermato l'esistenza di una variabilità nella capacità di penetrazione del seme nei diversi tori bufalini.

A 3 ore post-inseminazione si è osservata una evidente differenza nel tasso di penetrazione tra i tori testati; in particolare il toro D ha dato valori statisticamente più elevati ( $P < 0.01$ ) rispetto agli altri cinque tori testati, con i tori A ed E che non penetravano affatto. Anche a 6 ore la percentuale di penetrazione del toro D è risultata superiore rispetto a quelle degli altri tori testati; a questo tempo, però, si cominciano ad evidenziare altre differenze: infatti le percentuali di penetrazione dei tori B, C, ed F risultavano maggiori ( $P < 0.01$ ) rispetto a quelle dei tori A ed E. A 6 ore non si osservava nessun oocita penetrato solo nel caso del toro E. A 9 ore di co-incubazione si è osservato un incremento del tasso di penetrazione con il toro C che ha, quindi, raggiunto valori non diversi statisticamente da quelli rilevati con il toro più veloce, cioè il toro D. Il tasso di penetrazione, inoltre, è aumentato anche per i tori B ed F che hanno dato tassi non diversi dal toro C, mentre i tori A ed E sono rimasti indietro rispetto agli altri.

A 12 ore pi sia il toro C che il toro F raggiungevano le stesse percentuali di penetrazione del toro D, il toro B dava valori inferiori ( $P < 0.05$ ) rispetto ai tori C, D ed F, mentre i tori A

ed E non raggiungevano i valori di penetrazione degli altri 4 tori. A 15 ore il toro C è diventato il toro con la maggiore percentuale di penetrazione rispetto ai tori A, B ed E mentre non si sono osservate differenze statisticamente significative rispetto ai tori D ed F. Inoltre, a questo tempo pi i tori B ed E hanno raggiunto i valori di penetrazione del toro F, che non risultavano, però, statisticamente diversi da quelli registrati con il toro A, pur mantenendosi quest'ultimo su livelli bassi di penetrazione. Infine a 18 ore cinque dei sei tori hanno dato tassi di penetrazione simili, mentre una percentuale bassa di penetrazione è stata osservata solo nel toro A, che non ha raggiunto il 50% di oociti fecondati.

Tabella 9. Percentuali degli oociti polispermici sugli oociti penetrati

TORO	% oociti polispermici/oociti penetrati ad ogni tempo (ore pi)					
	3	6	9	12	15	18
A	Non Penetrato	Non Penetrato	0	0	9.5 b	9.1 <sup>Aa</sup>
B	0	16.2	13.2	21.2 <sup>A</sup>	21.6 a	39.5 <sup>Bc</sup>
C	25	18.8	12	25 <sup>A</sup>	19.5 <sup>ab</sup>	15.2 <sup>Aab</sup>
D	0	0	7.7	14.3 <sup>ABa</sup>	22.7 a	17.1 <sup>Aab</sup>
E	Non Penetrato	0	0	0	20 <sup>ab</sup>	23.1 <sup>ABb</sup>
F	0	0	15.8	3.8 <sup>Bb</sup>	14.7 <sup>ab</sup>	20.6 <sup>Ab</sup>

<sup>A,B,C</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

<sup>a,b,c</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

Se invece andiamo ad osservare le percentuali di oociti polispermici rispetto a tutti gli oociti fecondati vediamo che solo i tori B e C già alla sesta ora di co-incubazione hanno presentato polispermia, con nessuna differenza statistica. I tori A ed E non presentano oociti polispermici fino a 12 ore. Nei primi tre tempi presi in esame (3-6-9-h pi) non si riscontrano differenze statistiche tra i tori che hanno dato polispermia. A 12 ore il divario tra i tori B e C ed il toro F aumenta portando ad una differenza statisticamente rilevante ( $P < 0.01$ ); mentre tra i tori D ed F le differenze statistiche sono minori ( $P < 0.05$ ). A 15 ore le differenze statistiche si riducono : i tori B ed D che hanno il maggiore tasso di polispermia sono statisticamente differenti ( $P < 0.05$ ) solo con il toro A, che è il toro con il minor tasso di polispermia, mentre non risultano differenti se confrontati con i tori C, E ed F. A 15 ore

il toro A non presenta differenze statistiche se confrontato con i tori C, E ed F. All'ultimo tempo di co-incubazione il toro B presenta una differenza statistica ( $P < 0.01$ ) se confrontato con i tori A, C, D ed F mentre presenta una minore differenza ( $P < 0.05$ ) con il toro E. Il toro A presenta differenze ( $P < 0.05$ ) con i tori E ed F. Mentre i tori C e D presentano valori intermedi.

## DISCUSSIONE

Una problematica che penalizza fortemente la diffusione in campo della inseminazione strumentale e della tecnologia della produzione embrionale in vitro nella specie bufalina è rappresentata dall'elevata variabilità della capacità fertilizzante che si riscontra tra i diversi tori. Questo effetto toro è noto nella specie bovina, in cui è stato dimostrato che spermatozoi di tori diversi hanno una diversa attitudine alla fertilizzazione in vitro (Ward et al., 2001). Nella specie bufalina è stato osservato che solo il 10 % circa dei tori testati risulta idoneo per l'IVF (Gasparrini, 2002). Questa limitazione si traduce nella necessità di effettuare uno screening accurato dei tori in laboratorio prima di poterne scegliere uno per l'IVF. Inoltre non è infrequente che un seme, valutato come positivo in seguito ai risultati ottenuti con i vari test di fertilità, dia successivamente basse percentuali di cleavage e di blastocisti dopo l'IVF.

Lo studio è stato eseguito su 6 tori, 4 dei quali hanno mostrato, nel corso dell'Esperimento 2.1, un'elevata attitudine all'IVF; mentre gli altri 2 sono risultati scadenti nella produzione embrionale in vitro, quindi non idonei alla routine di IVEP. In accordo con un precedente lavoro (Alomar et al., 2006), anche in questa prova si è avuta una correlazione diretta tra il cleavage e la resa embrionale. Possiamo quindi affermare che questa relazione vale sia per la specie bufalina che per quella bovina (esperimento 1.2).

I risultati dell'esperimento 2.2 hanno evidenziato che, anche nella specie bufalina, esiste una marcata differenza nella velocità di penetrazione spermatica in vitro tra i diversi tori che, almeno in parte, può spiegare le differenze nelle percentuali di cleavage e di blastocisti dopo IVF.

Una evidente correlazione tra la cinetica di penetrazione e la capacità fecondante è stata trovata, questo è in accordo con un precedente lavoro (Ward et al., 2002) ma in contrasto con il nostro esperimento 1.2 e un lavoro precedentemente pubblicato (Puglisi et al., 2004). Infatti, se andiamo a vedere i risultati ottenuti con il toro A, notiamo che il basso cleavage e la bassissima resa embrionale corrispondono ad un andamento di penetrazione molto lento. Solo a 15 h supera il 20 % di oociti penetrati e a 18 ore non riesce a superare il 25 % di oociti penetrati, questo si ritrova tutto nella scarsa resa embrionale. I tori B e C hanno avuto un comportamento simile nei primi tempi di co-incubazione andando poi diversificandosi con l'aumentare del tempo, fino ri-equilibrarsi alla diciottesima ora di co-incubazione dove 5 tori su 6 non hanno presentato differenze significative nelle percentuali di penetrazione. Questo annullamento delle differenze nella penetrazione a 18 h trova conferma nella valutazione del cleavage del secondo esperimento dove le differenze si annullano per tutti i tori tranne per il toro A. In questo caso per il toro A si potrebbe pensare persino di aumentare il tempo di co-incubazione, data la lentezza che contraddistingue il seme di questo toro. I tori B e C presentano una velocità di penetrazione elevata, già alla 3 h presentano oociti penetrati (10.3-6.1), presentano anche un aumento costante della polispermia. Quando invece andiamo ad analizzare i loro dati di cleavage e resa embrionale notiamo le loro ottime produzioni (cleavage 64,8-67,4%; resa embrionale 26,4-23,5%). Questo dato ci porterebbe a pensare di utilizzarli per le nostre routine di IVP, ma bisogna tener conto che una piccola percentuale di embrioni prodotti sia polispermica e quindi nelle loro seppur alte percentuali di produzione embrionale sono presenti embrioni con aberrazioni cromosomiche che non si svilupperanno in vitelli. Al contrario il toro D presenta una cinetica interessante, questo è il toro più veloce dei 6 raggiungendo percentuali di penetrazione superiori al 50% anche dopo 3 ore, allo stesso tempo i livelli di polispermia si mantengono bassi, fino a 12 ore non si presentano casi di oociti polispermici, dopo di che la polispermia risulta comunque uguale o più bassa rispetto ai tori B e C. La resa embrionale di questo toro è comunque molto buona pari ai tori B e C.

Il toro E come il toro A è molto lento nelle prime ore di co-incubazione (fino a 6 ore non c'è penetrazione degli oociti) ma dalla 15esima ora di co-incubazione questo toro raggiunge gli stessi livelli degli altri tori arrivando a tassi di polispermia del 20% e una penetrazione del 69.8% alla 18esima ora. Questa sua lentezza si ritrova tutta nella resa

embrionale dell'esperimento 2.2 dove si arriva ad una resa del 10% questa resa così bassa potrebbe essere associata alla degenerazione degli oociti (Gasparrini et al., 2008). Di conseguenza una possibile soluzione per non dover scartare a priori questo toro, ed altri maschi con la stessa cinetica, potrebbe essere diminuire di qualche ora la maturazione, in modo da poter tenere più tempo i gameti a co-incubare (Nagai et al., 2006). Questa soluzione potrebbe portare le rese di questo toro agli stessi livelli degli altri tori. Infine il toro F ha una cinetica di penetrazione regolare (7.7; 36.6; 39; 64.1; 63; 71.1) con un aumento regolare degli oociti penetrati, il dato interessante, di difficile spiegazione è l'andamento della polispermia che aumenta a 12 ore, diminuisce drasticamente a 15 e ritorna ai livelli degli altri tori a 18 ore di co-incubazione. In questo caso si conferma una buona resa embrionale. Un dato interessante di non facile spiegazione è l'andamento della polispermia, che a differenza di ciò che accade con la specie bovina (esperimento 1.2; Sumantri et al., 1997), non ha un andamento regolare che tende ad aumentare con il tempo di co-incubazione. Solo i tori B ed E hanno un andamento lineare.

Di conseguenza è importante enfatizzare che tramite la conoscenza dei tempi di penetrazione spermatica, di ciascun toro, è possibile fare una correlazione tra la resa embrionale e la percentuale di oociti penetrati. Questa analisi di regressione ci indica che il tempo ottimale di penetrazione, che bisogna osservare, per la predizione della resa in blastocisti è 12 ore post-inseminazione ( $R^2=0.6$ ). Va detto però che 12 ore è solo il tempo necessario per valutare il seme mentre il miglior tempo di co-incubazione, nella specie bufalina, è di 16 ore (Gasparrini et al., 2008). La riduzione del tempo di co-incubazione dei gameti è importante per cercare di ridurre gli insulti che ricevono gli oociti, dai radicali liberi e dagli enzimi idrolitici (Aitken and Clarkson, 1987; Aitken, 1994; Rehman et al., 1994). La produzione dei soli radicali liberi può bloccare lo sviluppo embrionale a qualsiasi stadio di sviluppo (Aitken et al., 1991). L'optimum di 16 ore di co-incubazione è anche il tempo migliore per la specie bovina (esperimento 1.2) quando prendiamo in esame i tori più lenti quando invece andiamo a vedere il comportamento dei tori più veloci si osserva che 8 ore sono sufficienti. Ciò è in accordo con altri studi che hanno riportato che 9-10 ore era un tempo di co-incubazione dei gameti ottimale nei bovini (Ward et al. 2002) e 9 h (Kochhar et al. 2003).

I risultati di questo lavoro sono interessanti e suggeriscono di approfondire la ricerca testando un maggior numero di tori per poter evidenziare una correlazione tra velocità di penetrazione e fertilità in vitro. E' doveroso ricordare che molti fattori influenzano l'efficienza IVEP, tra cui, ad esempio, l'origine degli oociti utilizzati, la qualità degli stessi, i tempi tra prelievo e recupero, la stagione e la temperatura. Ne consegue che, per poter dimostrare un possibile utilizzo dei test di cinetica di penetrazione come marker di previsione della fertilità in vitro di tori bufalini diversi, è necessario estendere lo studio ad un maggior numero di tori e ripetere i test su un maggior numero di oociti. Infatti, se considerassimo solo i dati della cinetica, saremmo portati a scartare per la IVF il toro B che invece si è dimostrato un ottimo toro quanto a rese embrionali. Si ritiene opportuno segnalare che il toro in questione ha mostrato un andamento completamente diverso nell'ambito delle tre repliche sperimentali, con valori sovrapponibili a quelli del toro A sin dalla terza ora in una prima replica, mentre, nelle successive due repliche, ha mostrato un comportamento differente. Una ampia variabilità tra le repliche è stata riscontrata anche con il toro C. In altri termini una più elevata variabilità tra repliche è stata osservata proprio per i due tori che hanno mostrato velocità intermedie. Vale la pena di ricordare che questo era solo uno degli obiettivi prefissati. Questa analisi in futuro potrà essere usata come analisi al fine di valutare l'effettivo valore, parlando di produzione embrionale in vitro, e il tempo necessario di co-incubazione dei gameti, affinché si abbia il miglior risultato, come qualità e quantità di embrioni prodotti.

**ESPERIMENTI 3.1 e 3.2. Valutazione di diversi substrati energetici durante la coltura embrionale in vitro nel bovino.**

## INTRODUZIONE

Negli ultimi dieci anni, notevoli miglioramenti sono stati apportati alle tecniche di produzione embrionale in vitro (IVP) (Bavister, 1995; Biggers, 1998; Thompson e Peterson, 2000; Gardner e Lane, 2002; De La Torre-Sanchez et al., 2006). Tuttavia gli embrioni prodotti in vitro sono diversi rispetto agli embrioni ottenuti in vivo per morfologia, metabolismo (Khurana e Niemann, 2000), espressione genica (Lazzari et al., 2002), diversa resistenza al congelamento (Leibo e Loskutoff, 1993), e per la vitalità post-trasferimento (Hasler, 2000). Uno dei fattori che accentua le differenze tra gli embrioni prodotti in vitro e quelli in vivo è il sistema di coltura embrionale che, sebbene ottimizzato rispetto al passato, ancora oggi presenta alcuni limiti. In molti protocolli, nella fase di coltura embrionale viene aggiunto, come substrato energetico principale, il glucosio, normalmente alla concentrazione di 5.6 mM (concentrazione presente nel siero umano) (Biggers, 1998). Tuttavia, la concentrazione di glucosio nell'apparato riproduttivo femminile, durante lo sviluppo embrionale, è inferiore a quella plasmatica (Parrish et al, 1989; Gardner et al, 1996. Leese et al, 2001; Kenny et al, 2002); per di più, la concentrazione normalmente impiegata nei media colturali risulta inadeguata per gli embrioni di ruminanti, dato che in questi la concentrazione di questo esoso è molto più bassa rispetto a quella ritrovata nei monogastrici, come uomo, maiale, e topo (Lee et al, 1978;. McDonald, 1980). Diversi autori hanno dimostrato che gli embrioni bovini e ovini metabolizzano il glucosio dallo stadio di zigote a quello di blastocisti (Rieger et al., 1992a,b; Gardner et al.,1993; Donnay and Leese, 1999; Khurana and Niemann, 2000). Molti sistemi di produzione embrionale utilizzano ancora il glucosio come fonte energetica nonostante i noti effetti tossici(Schini and Bavister, 1988;Takahashi and First, 1992). Negli

embrioni, sviluppati in sistemi in cui era presente il glucosio alle concentrazioni del sangue, spesso presentano disturbi metabolici (Kim et al., 1993). L'alta produzione di lattato (Khurana and Niemann, 2000) associata alla respirazione glicolitica riduce la vitalità e lo sviluppo dell'embrione (Gardner, 1999). Tuttavia non possiamo dimenticare gli effetti positivi del glucosio, in quanto fonte diretta ed indiretta di energia, come glicogeno (Rieger, 1992) e come molecola biosintetica (Khurana e Galles, 1989; Galles e Hunter, 1990, Galles e Du, 1993). Il glucosio quando viene metabolizzato attraverso la via dei pentoso fosfati (PPP) genera triacilgliceroli, glicoproteine (Galles e Hunter, 1990), ribosio-5 fosfato, necessario per la sintesi degli acidi nucleici (Khurana e Wales, 1989) e NADPH, che è coinvolto nella biosintesi dei lipidi (Wales e Du, 1993).

E' stato osservato che gli embrioni di sesso femminile sono particolarmente sensibili agli effetti negativi del glucosio, che può determinare uno squilibrio tra i sessi. Il differente metabolismo e la diversa velocità di crescita, osservati tra embrioni maschi e femmine, possono essere attribuiti alla diversa espressione dei geni X-linked durante determinate fasi dello sviluppo pre-impianto, in particolare nella fase precoce, dove entrambi i cromosomi X sono ancora attivi (Mak et al., 2004; Okamoto et al., 2004). Bermejo-Álvarez et al. (2008) hanno dimostrato l'abbondanza di mRNA di tre geni X-linked: questi sono espressi a livelli più alti negli embrioni bovini di sesso femminile, allo stadio di blastocisti precoce. Due di questi, la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e la ipoxantina fosforibosil transferasi (HPRT), sono molto importanti nel metabolismo energetico, e hanno anche il compito di controllare la quantità di radicali dell'ossigeno. Invece, il terzo, un inibitore X-linked della proteina dell'apoptosi (XIAP), controlla l'apoptosi attraverso la modulazione di attivazione e l'attività delle caspasi (Gutierrez-Adan et al., 2006; Jimenez et al., 2003). Questa espressione differenziale è stata confermata anche in altre specie (Taylor et al., 2001; Wrenzycki et al., 2002). Gli embrioni di sesso maschile si sviluppano più velocemente degli embrioni di sesso femminile (Tsunoda et al, 1985;. Avery et al, 1989; Gutiérrez et al, 1995), suggerendo che alcuni elementi promuovono lo sviluppo di embrioni di un sesso rispetto a quelli dell'altro. Uno degli elementi che, nella coltura in vitro, potrebbe essere altamente selettivo per il sesso dell'embrione, è il glucosio, visto che ci sono degli enzimi fondamentali per il metabolismo (G6PD) e per il controllo dell'apoptosi cellulare (XIAP) che hanno i loro locus sul cromosoma X. L'espressione sbilanciata di geni X-linked tra i sessi, potrebbe spiegare le differenze di sviluppo che ci

sono tra gli embrioni di sesso maschile e femminile. E' opportuno sottolineare che in vitro il sistema non è dinamico come in natura e, quindi, il glucosio rimane a contatto con l'embrione per un tempo maggiore rispetto alle condizioni naturali. Questa sua tossicità, maggiormente percepita dagli embrioni di sesso femminile, è particolarmente importante durante lo sviluppo iniziale, quando entrambi i cromosomi X sono attivi (Kratzer e Gartler, 1978; de la Fuente et al, 1993). E' noto, infatti che soltanto allo stadio di blastocisti uno dei due cromosomi sessuali viene inattivato.

Alla luce di quanto detto, ci siamo proposti di individuare un nuovo substrato energetico che potesse sostituire, completamente o in parte il glucosio nei media di coltura embrionale. Il nostro studio ha preso in esame la possibilità di sostituire il glucosio, con la gliceraldeide-3-fosfato (G3P), un intermedio metabolico della glicolisi, composto di tre atomi di carbonio. Fisiologicamente la G3P viene prodotta a partire da varie molecole, come il fruttosio 1,6-bisfosfato, il diidrossiacetone fosfato e l'1,3 bisfosfoglicerato, in seguito ad alcune reazioni reversibili delle due vie metaboliche, glicolisi e gluconeogenesi. Questa molecola è molto importante anche per l'ingresso del glicerolo di origine lipidica (proveniente dai trigliceridi) nelle vie glicolitica e gluconeogenetica. La G3P entra nella glicolisi nella fase di recupero energetico: di conseguenza, utilizzando 2 molecole di G3P dovremmo avere un guadagno di due molecole di ATP rispetto ad una molecola di glucosio, che per trasformarsi in G3P necessita di due molecole di ATP. Quindi utilizzando la G3P si potrebbero avere due vantaggi: 1) superare l'ostacolo della (G6PD) e 2) avere una maggiore quantità di energia a disposizione.

Di conseguenza, lo scopo del nostro lavoro è stato in prima battuta quello di valutare l'effetto della G3P sulla coltura embrionale, testando diverse concentrazioni. Dopodiché abbiamo confrontato 4 diversi substrati energetici durante la coltura embrionale: 1.5 mM di glucosio (Glu 1.5 mM), che è la concentrazione standard nei media di coltura; 0.15 mM di glucosio (Glu 0.15 mM), 1/10 della concentrazione standard; 0.125 mM di gliceraldeide-3-fosfato (G3P), e 0,34 mM acido citrico + 2,77 mM mio-inositolo (Mio-citrato). Si ricorda che tre dei quattro substrati utilizzati vengono metabolizzati durante le prime fasi della glicolisi: il glucosio è la prima molecola della glicolisi, la gliceraldeide-3-fosfato entra nella glicolisi nella seconda fase, anche nota come fase di produzione energetica, mentre l'acido citrico viene metabolizzato durante il ciclo di Krebs.

## MATERIALI E METODI

### DISEGNO SPERIMENTALE

Nell'esperimento 3.1 dopo IVM e IVF i presunti zigoti (n=892) sono stati assegnati in modo casuale ai 6 gruppi per la coltura embrionale: 5 con differenti concentrazioni di G3P (N=162, 160, 161, 121, 121 per 0.125, 0.25, 0.5, 1 e 2 mM) ed un gruppo di controllo con il glucosio, alla concentrazione di 1.5mM (N=167). Gli embrioni sono stati valutati al giorno 7 della coltura. Ogni esperimento è stato ripetuto almeno 3 volte.

Nell'esperimento 3.2, a seguito dell'IVM e dell'IVF i presunti zigoti (n=2148) sono stati assegnati in modo casuale a 4 gruppi: 1.5 mM di glucosio; 0.15 mM di glucosio; 0.125mM di G3P addizionato con 0.15 mM di glucosio e 0,34 mM acido citrico + 2,77 mM mio-inositolo (N=546, 354, 673, 575 rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P, Mio-citrico). L'esperimento è stato ripetuto 6 volte. Gli embrioni prodotti (N=161, 139, 251, 215 rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P, Mio-citrico; per un totale di N=726) sono stati in seguito vitrificati/scongelati per valutare la resistenza alla crioconservazione. A tale scopo la sopravvivenza degli stessi è stata valutata dopo 24 ore di coltura post-scongelo, sulla base del ripristino della normale morfologia e sulla ripresa dello sviluppo e, pertanto le percentuali di sopravvivenza si riferiscono agli embrioni che hanno raggiunto lo stadio di sviluppo più avanzato. Dopo la valutazione gli embrioni sono stati stoccati per essere sessati.

## MATERIALI E METODI

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

Per quanto concerne i materiali e metodi che si riferiscono al prelievo degli oociti, alla selezione, maturazione, fecondazione e coltura in vitro si rimanda a quanto descritto dettagliatamente nell'esperimento 1.1.

### Esperimento 3.1

#### *Dosaggio Della Gliceraldeide-3-Fosfato (G3p)*

In un esperimento preliminare sono state testate 3 concentrazioni (0.5, 5 e 10 mM) di G3P per poter trovare la dose tossica e quella inefficace. Le concentrazioni 5 e 10 mM sono risultate molto tossiche, come attestato dalle basse percentuali di cleavage (22.5% e 37.5%, rispettivamente) e dalla mancata produzione di blastocisti ,per cui successivamente sono state prese in esame concentrazioni a scalare a partire dalla concentrazione di 2 mM. I presunti zigoti sono stati divisi in terreni che avevano differenti concentrazioni di G3P, a partire dalla concentrazione di 2mM fino ad arrivare alla concentrazione più bassa di 0.125 mM (2; 1; 0.5; 0.25; 0.125 mM). Si specifica che la G3P è stata aggiunta in medium SOF in cui era presente 1/10 della concentrazione standard di glucosio; mentre come controllo è stato utilizzato il medium SOF con una concentrazione di 1.5 mM di glucosio. Gli embrioni ottenuti alla fine della coltura (giorno 7) sono stati valutati sulla base di criteri morfologici (Robertson and Nelson, 1998), e in base allo stadio di sviluppo raggiunto alla fine della coltura: morula compatta (TM), blastocisti precoce (EBI), blastocisti (BI), blastocisti espansa (XBI) e blastocisti sgusciata (HBI).

### Esperimento 3.2

#### *Confronto Substrati Energetici*

La procedura per il trasferimento dei presunti zigoti nel terreno di coltura è stata precedentemente descritta. I presunti zigoti sono stati trasferiti in uno stesso medium di coltura in cui l'unica variabile è stata il substrato energetico utilizzato: 1.5 mM di glucosio; 0.15 mM di glucosio; 0.125mM di G3P; e 0,34 mM acido citrico + 2,77 mM mio-inositolo. Gli embrioni ottenuti alla fine della coltura (giorno 7) sono stati valutati sulla base di criteri morfologici (Robertson and Nelson, 1998), e in base allo stadio di sviluppo come segue:

morula compatta (TM), blastocisti precoce (EBI), blastocisti (BI), blastocisti espansa (XBI) e blastocisti sgusciata (HBI). Dopo la valutazione gli embrioni sono stati vitrificati e poi stoccati per il sessaggio.

### *Vitrificazione*

Al giorno 7 di coltura sono stati selezionati per la vitrificazione gli embrioni di qualità morfologica superiore. Tutti i media di vitrificazione sono stati preparati a partire da una soluzione base (SB) di TCM-199 HEPES-tamponato supplementato con il 20 % di FCS; i media sono stati tenuti almeno 1 ora a temperatura ambiente prima di essere utilizzati, mentre tutta la procedura di vitrificazione è stata fatta usando un tavolino riscaldato a 37°C. È stato utilizzato come protocollo di vitrificazione e riscaldamento quello precedentemente impiegato da Vajta per vitrificare embrioni di bovino (Vajta G. et al., 1998).

### *Fase di vitrificazione*

Dopo lavaggio in un terreno tamponato, per eliminare i residui di olio minerale derivanti dalle gocce di coltura, gli embrioni sono stati incubati singolarmente in gocce da 200 µl di SB contenente 7.5 % di DMSO e 7.5 % di GE (SV1) per 3 minuti. Successivamente, gli embrioni sono stati trasferiti, mediante una pipetta a bocca, nel minor volume possibile, in gocce da 20 µl di una soluzione 0.5 M di saccarosio in SB contenente 16.5 % di DMSO e 16.5 % di GE (SV2) per pochi secondi. Quindi gli embrioni sono stati presi, mediante una pipetta a bocca, nel minor volume possibile di SV2 (<0,1 µl), messi sull'estremità di un cryotop, che entro 20 sec è stato immerso in LN<sub>2</sub>.

### *Fase di riscaldamento*

Il cryotop è stato prelevato dall'LN<sub>2</sub> e la linguetta sottile su cui era stato precedentemente posto l'embrione è stata immediatamente immersa in circa 1 ml di una soluzione di TCM-199 HEPES-tamponato supplementato con il 20 % di FCS e 0.25 M di saccarosio per 1 minuto; gli embrioni recuperati sono stati incubati poi per 5 minuti in una seconda soluzione di riscaldamento costituita da TCM-199 HEPES-tamponato supplementato con il 20% di FCS e 0.15 M di saccarosio; successivamente, gli embrioni sono stati lavati due volte nel medium tamponato con HEPES, e trasferiti, singolarmente, in gocce di 20 µl del medium finale di coltura, cioè SOF tamponato con bicarbonato di sodio e addizionato di aminoacidi e BSA. Le piastrine con le gocce contenenti gli embrioni sono state poi messe

in camere modulari a tenuta, nelle quali è stata insufflata una miscela gassosa con il 5 % di CO<sub>2</sub>, il 7 % di O<sub>2</sub> e l' 88 % di N<sub>2</sub>, alla temperatura di 39°C.

### *Sessaggio Degli Embrioni*

Il sessaggio degli embrioni è stato eseguito secondo la procedura precedentemente descritta (esperimento 1.2).

## RISULTATI

### Esperimento 3.1

I risultati dell'esperimento 3.1 sono riportati in tabella n. 10

Tabella n.10

<b>GRUPPO</b>	<b>n°COC</b>	<b>CLEA %</b>	<b>TM-BL/tot %</b>	<b>BL/tot %</b>
Controllo (1.5mM Glu)	167	73.1	25.1 <sup>Aa</sup>	24.6 <sup>Aa</sup>
2 mM G3P	121	73.6	0.8 <sup>C</sup>	0.0 <sup>C</sup>
1 mM G3P	121	76.9	8.3 <sup>B</sup>	5.8 <sup>B</sup>
0.5 mM G3P	161	78.9	26.1 <sup>Aa</sup>	25.5 <sup>Aab</sup>
0.25 mM G3P	160	75.6	35.0 <sup>Ab</sup>	35.0 <sup>Ab</sup>
0.125 mM G3P	162	80.2	37.0 <sup>Ab</sup>	35.2 <sup>Ab</sup>

<sup>A,B,C</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza P<0.01

<sup>a,b,c</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza; P<0.05

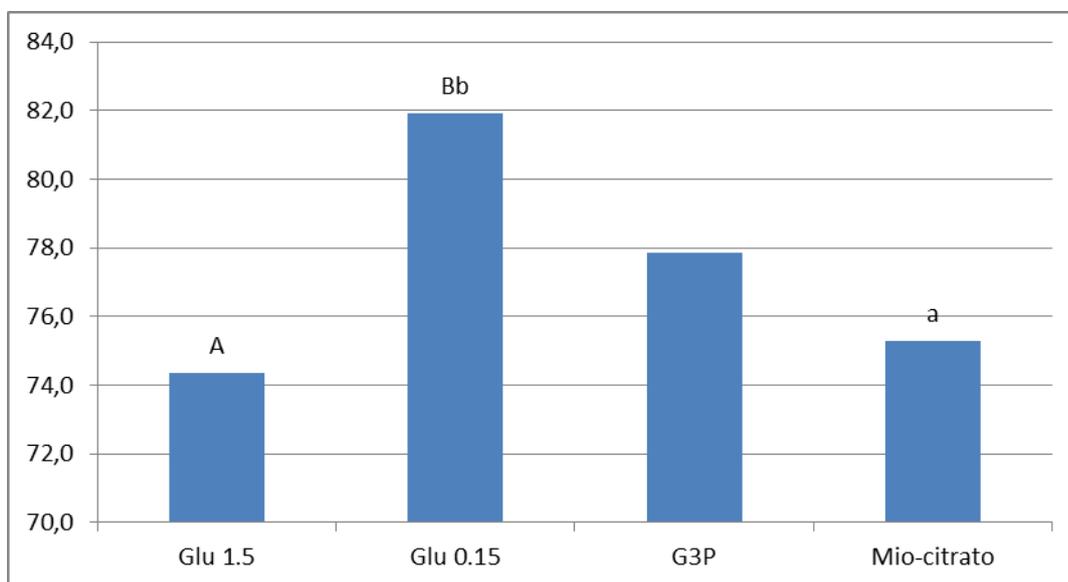
Dalla tabella n.10 si nota come il cleavage non subisce effetti rilevanti a queste concentrazioni di G3P; si ricorda che alle concentrazioni di 5 e 10 mM, testate in uno studio preliminare, il cleavage risultava compromesso, non arrivando neanche al 50% di oociti divisi. Quando si confrontano le rese embrionali sul totale degli oociti si nota subito che le concentrazioni 1 e 2 mM di G3P sono state tossiche, come indicato dalle percentuali

di TM-BL e di BL inferiori ( $P < 0.01$ ) rispetto a quelle registrate negli altri gruppi. La concentrazione intermedia, cioè 0.5 mM, ha dato, invece, rese embrionali sovrapponibili a quelle del gruppo controllo. Un dato interessante emerso nel corso dello studio è stato il miglioramento significativo delle rese embrionali, sia delle TM-BL che delle sole BL, che è stato osservato alle due concentrazioni più basse di G3P (0.125 e 0.25 mM) rispetto al controllo.

### Esperimento 3.2

I risultati del cleavage dei differenti gruppi sperimentali sono riportati in figura n.11

Fig n.11 Percentuale di cleavage nei media con diversi substrati energetici.



<sup>A,B,C</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

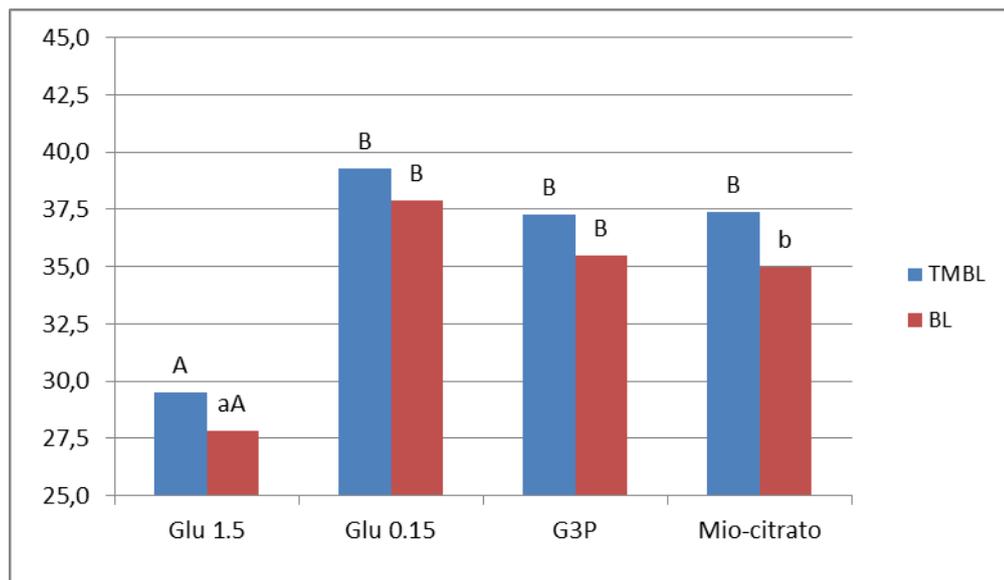
<sup>a,b,c</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

Come si vede dalla figura n.1 il substrato energetico incide sulla prima divisione cellulare ( 74.4, 81.9, 77.9, 75.3 % rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P e Mio-citrato):

infatti, la percentuale di cleavage nel gruppo con glucosio alla concentrazione 1.5 mM è risultata inferiore ( $P < 0.01$ ) rispetto a quella osservata nel gruppo con glucosio 0.15mM, ma sovrapponibile a quelle riscontrate negli altri due gruppi. Quando la concentrazione di glucosio nel terreno è stata ridotta di 1/10 è stato osservato un incremento significativo del cleavage sia rispetto al gruppo controllo ( $P < 0.01$ ), che rispetto al gruppo con mio-inositolo ( $P < 0.05$ ), mentre la G3P ha dato risultati intermedi.

Nella figura n.12 si possono vedere le percentuali di blastocisti ottenute nei diversi terreni di coltura

Fig n.12 Percentuali di morule compatte e blastocisti (TM-BI) e di BL, calcolate sul totale degli oociti, nei media con diversi substrati energetici.



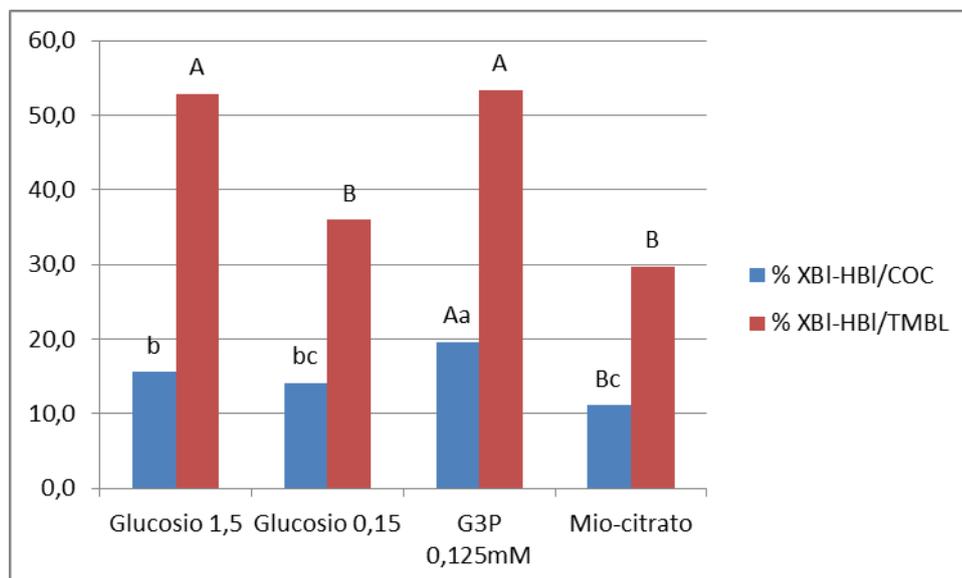
<sup>A,B,C</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

<sup>a,b,c</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

Nella figura n.2 si nota che la riduzione della concentrazione del glucosio e la sua sostituzione con G3P e con mio-citrato durante la coltura in vitro hanno determinato un incremento significativo ( $P < 0.01$ ) delle rese in embrioni trasferibili, cioè delle TM-BL ( 29.5, 39.3, 37.3, 37.4 rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P e Mio-citrato). Analogamente, le percentuali di blastocisti ( 27.8, 37.9, 35.5, 35 rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P e Mio-citrato) sono risultate inferiori nel gruppo controllo

rispetto ai gruppi con glucosio 0.15 mM, G3P ( $P<0.01$ ) e mio-inositolo ( $P<0.05$ ). E' opportuno sottolineare che tra i gruppi trattati non è emersa nessuna differenza sulle rese embrionali, sia in termini di TM-BI che di sole BI. Dato che la quantità di embrioni prodotti non variava nei 3 media confrontati, abbiamo ritenuto interessante investigare sulla qualità degli embrioni stessi, mediante un confronto delle percentuali degli embrioni di stadio più avanzato, cioè blastocisti espanse (XBI) e sgusciate (HBI).

Fig n.13 Percentuali di embrioni avanzati (XBI e HBI) calcolate sul totale degli oociti e sul totale degli embrioni nei media con diversi substrati energetici.



<sup>A,B,C</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza  $P<0.01$

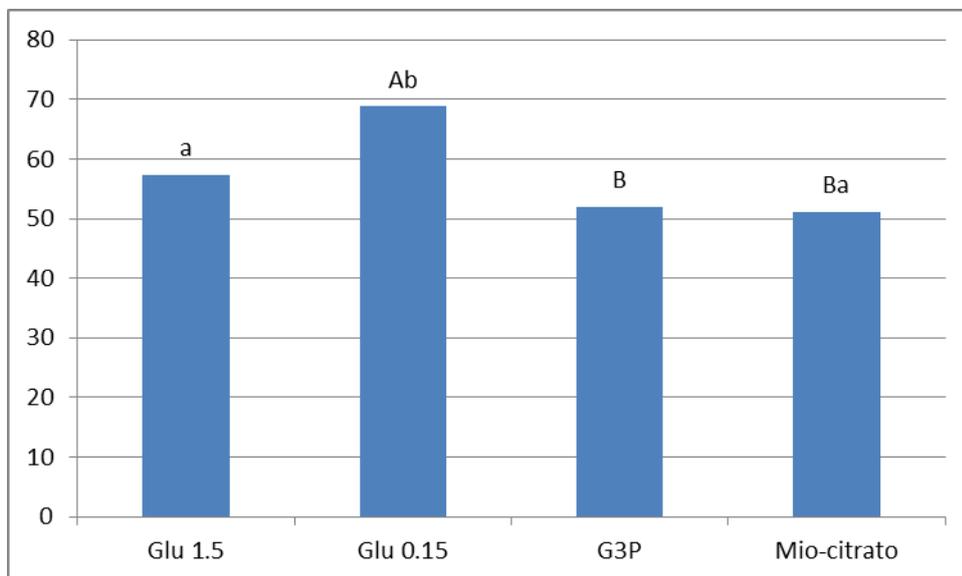
<sup>a,b,c</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza;  $P<0.05$

Come si può vedere dalla figura 13 la G3P ha determinato un incremento significativo delle percentuali degli embrioni avanzati sul totale degli oociti( 15.6, 14.1, 19.6, 11.1 rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P e Mio-citrato )rispetto ai gruppi con glucosio 1.5 mM, glucosio 0.15 mM ( $P<0.05$ ) e al gruppo con mio-inositolo ed acido citrico ( $P<0.01$ ). Inoltre la percentuale di embrioni avanzati sul totale dei COC è stata inferiore nel gruppo con mio-inositolo e acido citrico rispetto al gruppo controllo.

Se invece andiamo a vedere le percentuali degli embrioni avanzati sul totale degli embrioni si nota che i gruppi con glucosio 1.5 mM e G3P hanno dato valori uguali tra loro ma superiori ( $P < 0.01$ ) rispetto agli altri due gruppi.

I risultati sulla vitrificazione sono riportati nella figura n.4

Fig n.14 Percentuale di sopravvivenza dopo vitrificazione-riscaldamento di embrioni prodotti nei media con diversi substrati energetici.



A,B,C Le lettere sulle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

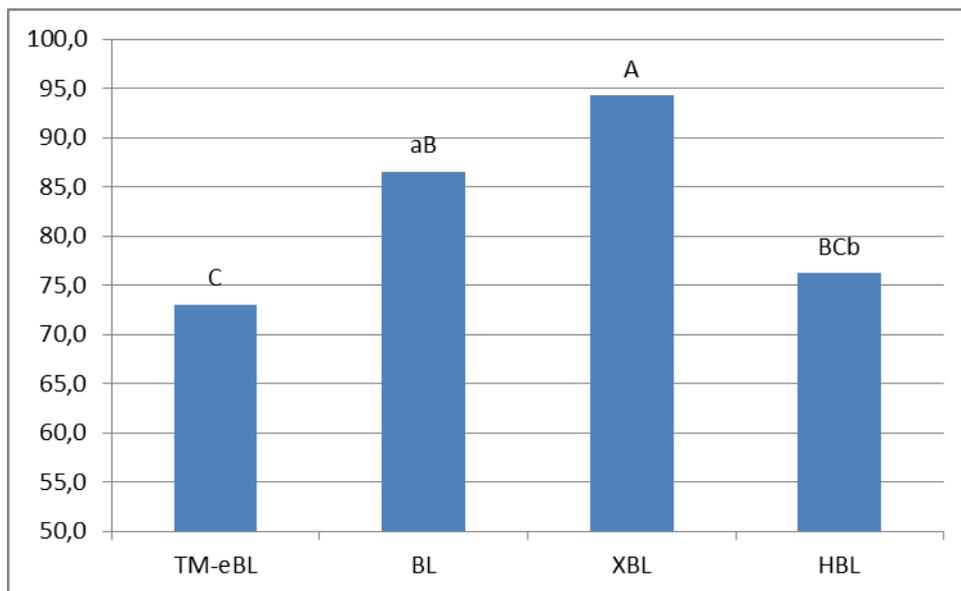
a,b,c Le lettere sulle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

Come si evince dalla figura n.14, gli embrioni prodotti nel terreno con glucosio 0.15 mM hanno mostrato valori di sopravvivenza maggiori rispetto agli altri substrati testati (57.4, 68.8, 52, 51.1 % rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P e Mio-citrato), cioè rispetto a G3P e mio-inositolo + acido citrico ( $P < 0.01$ ) e rispetto al glucosio 1.5 mM ( $P < 0.05$ ). Tra questi ultimi tre gruppi, invece, non ci sono differenze statisticamente significative.

Per confermare questi risultati siamo andati ad osservare l'andamento della sopravvivenza in base allo stadio di sviluppo. Nella figura n.15 sottostante sono illustrati i risultati della

sopravvivenza alla vitrificazione in funzione dello stadio e indipendentemente dal substrato.

Fig n.15 Percentuale di sopravvivenza degli embrioni di stadio diverso.



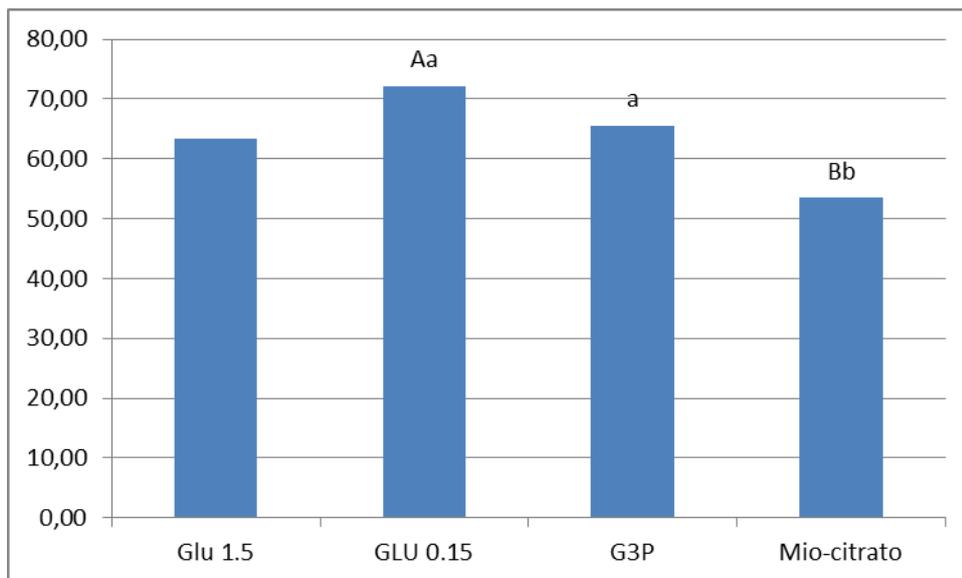
<sup>A,B,C</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

<sup>a,b,c</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

Come si evince dalla stessa, gli stadi più precoci, cioè le TM-eBL, hanno mostrato una peggiore ( $P < 0.01$ ) resistenza alla vitrificazione rispetto ai due stadi intermedi (73, 86.5, 94.3, 76.2 % rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P e Mio-citrato). Inoltre è stato osservato che anche le blastocisti sgusciate (HBL) risultano più sensibili alla crioconservazione, come indicato dalle percentuali di sopravvivenza inferiori rispetto alle BL ( $P < 0.05$ ) e alle XBL ( $P < 0.01$ ). Si segnala, infine, che tra i due stadi intermedi, quello che ha risposto meglio alla crioconservazione è stato quello di blastocisti espansa (XBL).

Pertanto, per valutare la resistenza alla crioconservazione tra i media culturali siamo andati a confrontare solo gli stadi migliori (BL e XBL).

Fig n.16 Percentuale di sopravvivenza dopo vitrificazione-riscaldamento di blastocisti (B1) e blastocisti espanse (XB1) prodotte nei media con diversi substrati energetici.



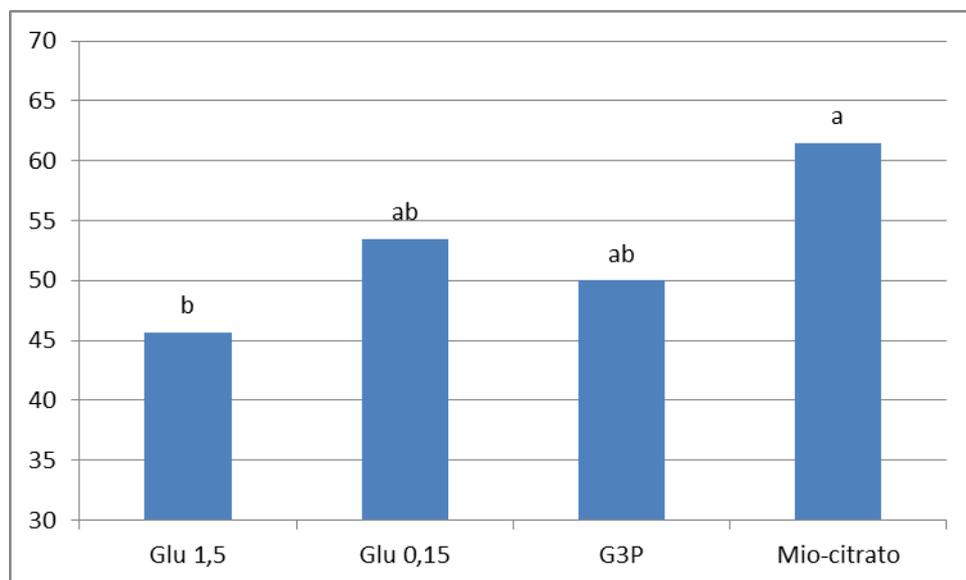
<sup>A,B,C</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

<sup>a,b,c</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

In questo modo le differenze statistiche tendono ad annullarsi (63.3, 72.2, 65.6 e 53.5 % rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P e Mio-citrato). Infatti la sopravvivenza degli embrioni prodotti nel gruppo controllo (glucosio 1.5 mM) e in presenza di G3P è stata sovrapponibile a quella del gruppo con ridotto glucosio (1/10). Inoltre una migliore sopravvivenza è stata riportata nei gruppi con ridotto glucosio ( $P < 0.01$ ) e con G3P ( $P < 0.05$ ) rispetto al terreno con mio-inositolo e acido citrico.

I risultati sulla distribuzione dei sessi negli embrioni prodotti nei media con i diversi substrati energetici sono illustrati nella figura n.17. In particolare, è stato osservato che il mio-inositolo ha dato la più alta percentuale di femmine, il glucosio 1.5 mM ha dato la più bassa percentuale, con la G3P e il glucosio 0.15 che si sono assestati su valori intermedi (45.6, 53.4, 50, 61.5 % rispettivamente per Glu 1.5mM, Glu 0.15mM, G3P e Mio-citrato).

Fig n.17 Percentuali di embrioni di sesso femminile nei media con diversi substrati energetici.



<sup>a,b,c</sup> Le lettere sulle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

## DISCUSSIONE

Il glucosio è una fonte energetica molto importante per le cellule somatiche dei mammiferi. Tuttavia, la presenza del glucosio alle concentrazioni ritrovate nel siero (5.6 mM) è dannosa per gli embrioni di diverse specie durante le fasi di scissione precoce (Schini e Bavister, 1988; Seshagiri e Bavister, 1989; Thompson et al, 1992. Kim et al, 1993;. Guti'errez-Ad'an et al, 2001;. Larson et al, 2001;. Peippo et al, 2001;. Scott e Whittingham, 2002; Kwun et al, 2003), mentre è necessaria nella fase tardiva. Inoltre è stato ipotizzato che il glucosio possa essere altamente selettivo per il sesso dell'embrione, visto che alcuni enzimi fondamentali per il metabolismo di quest'ultimo (G6PD) e per il controllo dell'apoptosi cellulare (XIAP) hanno i loro loci sul cromosoma X. L'espressione sbilanciata di geni X-linked tra i sessi potrebbe spiegare le differenze di sviluppo che si osservano tra gli embrioni di sesso maschile e femminile. Questa tossicità selettiva è

particolarmente importante durante lo sviluppo iniziale, quando entrambi i cromosomi X sono attivi, mentre soltanto allo stadio di blastocisti uno dei due cromosomi sessuali viene inattivato (Kratzer e Gartler, 1978; de la Fuente et al, 1993).

Per questo motivo negli ultimi anni si è cercato di trovare altri substrati energetici che potessero sostituire completamente, o almeno in parte, il glucosio in modo da attenuare gli effetti collaterali di questo zucchero. Nelle prime esperienze la soluzione è stata cercata nella stessa classe di zuccheri del glucosio, monosaccaridi esosi in grado di entrare nella via glicolitica: galattosio (Kwun et al., 2003), fruttosio (Chung et al, 1996;. Guyader-Joly et al, 1996. Kwun et al, 2003;. Kimura et al, 2005) e il mio-inositolo in associazione con l'acido citrico (Holm et al.,1999).

Il nostro studio, invece, è andato a valutare un metabolita del glucosio, a tre atomi di carbonio : la gliceraldeide-3-fosfato (G3P). La G3P entra nella glicolisi nella fase di recupero energetico; per cui utilizzando 2 molecole di G3P dovremmo avere un guadagno di due molecole di ATP rispetto ad una molecola di glucosio, che per trasformarsi in G3P necessita di due molecole di ATP.

Di conseguenza nel primo esperimento (esperimento 3.1) siamo andati a dosare la G3P, per identificare una concentrazione che non avesse effetti tossici e che avesse un effetto positivo sullo sviluppo embrionale in vitro. Il primo dato ottenuto da questa prova di dosaggio è che a tutte le concentrazioni di G3P testate il tasso di cleavage non presentava differenze statistiche. L'assenza di differenze sul cleavage non stupisce visto che dalla penetrazione dell'oocita fino all'embrione allo stadio di 8-16 cellule le risorse energetiche primarie sono il piruvato ed il lattato (Leese and Barton 1984). Inoltre, è stato osservato che il metabolismo degli esosi, nella via della glicolisi, ha un ruolo ridotto nei primi stadi di sviluppo (Gardner et al., 1993). Quando invece si confrontano le rese embrionali si osserva un andamento lineare: le concentrazioni più alte risultavano tossiche (resa embrionale di 10.8% e 1.1%, rispettivamente per 1 e 2 mM), mentre man mano che la quantità di G3P diminuiva le rese embrionali aumentavano. I risultati dell'esperimento 3.1 hanno dimostrato che la sostituzione del glucosio (alla concentrazione standard) con la G3P consente di migliorare sensibilmente l'efficienza di produzione embrionale in vitro nella specie bovina. In particolare, i risultati migliori sono stati ottenuti aggiungendo al terreno di coltura le due concentrazioni inferiori di G3P. Ne consegue che per lo studio successivo, finalizzato a valutare l'efficacia di tale nuovo substrato rispetto ad altri, non

solo sullo sviluppo embrionale ma anche sulla resistenza alla crioconservazione e sul rapporto tra i sessi negli embrioni prodotti, si è scelta la concentrazione di 0.125 mM.

Lo scopo dell'esperimento 3.2 è stato quello di testare diversi approcci per attenuare gli effetti potenzialmente tossici del glucosio durante la coltura. Un primo approccio è stato quello di ridurre drasticamente la concentrazione dello zucchero in questione (1/10 di quella standard). Inoltre si è voluto verificare l'efficacia di substrati alternativi al glucosio, come la G3P alla concentrazione risultata ottimale nell'esperimento 3.1, e la combinazione di mio-inositolo e acido citrico, già utilizzata in diversi laboratori per la IVEP nel bovino (Holm et al, 1999; Vajta et al., 2000).

Il primo risultato evidente è che, in questo caso, il substrato energetico ha influito anche sulle percentuali di cleavage. Infatti, la riduzione della concentrazione di glucosio ha determinato un incremento significativo del cleavage sia rispetto al controllo che rispetto al gruppo con mio-inositolo + acido citrico, mentre valori intermedi sono stati registrati con la G3P. Questi risultati possono essere spiegati considerando che, sebbene il metabolismo degli esosi abbia un ruolo marginale nelle prime fasi, è stato dimostrato che il glucosio ad alte concentrazioni può risultare dannoso nelle prime 24 ore (Kim et al., 1993).

I risultati ottenuti sulle rese embrionali sono in accordo con l'ipotesi di partenza, confermando un effetto negativo del glucosio durante la coltura. Infatti tutti gli approcci da noi testati hanno dato risultati migliori rispetto al controllo, sia in termini di TM-BI che di sole BI. Questi risultati sono in accordo con uno studio precedente in cui era stato osservato un peggioramento della resa embrionale in presenza di alte concentrazioni di glucosio (Kimura et al., 2005). In un'altra esperienza era stato dimostrato che la sostituzione del glucosio con il fruttosio migliorava le rese embrionali (Barcelò-Fimbres et al., 2007).

Nel nostro studio, se ci si limita ad osservare la produzione quantitativa di blastocisti, non si evince la superiorità di un substrato rispetto agli altri. Pertanto, un altro aspetto che è stato valutato nel presente esperimento è stato quello di investigare l'effetto dei diversi sistemi colturali sulla qualità degli embrioni prodotti. Questa è stata valutata confrontando le percentuali di embrioni a stadio più avanzato tra i gruppi, dato che la cronologia di sviluppo è un parametro indicativo di qualità, e mediante la stima della resistenza degli embrioni alla crioconservazione. Infatti, è ben noto che il fattore che maggiormente incide sulla sopravvivenza al congelamento è la qualità e, quindi, la vitalità degli embrioni.

Un risultato interessante emerso dal primo confronto è che in presenza di G3P la percentuale di embrioni avanzati, calcolata sul totale degli oociti, è risultata superiore rispetto agli altri gruppi. Tuttavia, quando la percentuale di embrioni avanzati è stata rapportata al totale degli embrioni prodotti, sia la G3P che il glucosio 1.5mM hanno dato la migliore resa; questo ci fa ipotizzare, in accordo con Donnay et al. (1999), che il glucosio nella fase tardiva aumenta lo sviluppo senza portare apoptosi cellulare.

I risultati ottenuti dopo vitrificazione-riscaldamento hanno dimostrato che la riduzione del glucosio nel medium comporta una migliore sopravvivenza alla crioconservazione rispetto a tutti gli altri gruppi. Poiché lo stadio di sviluppo può influenzare la resistenza alla crioconservazione abbiamo anche valutato questo aspetto, indipendentemente dal terreno impiegato. Da questa analisi è emerso che gli embrioni vitrificati agli stadi precoci di sviluppo, le TM e le eBL sono quelli più sensibili agli insulti meccanici e fisici inerenti la crioconservazione. Si ritiene opportuno specificare che tali embrioni erano embrioni ritardati, in quanto a parità di tempo, erano rimasti indietro nello sviluppo rispetto agli altri. Ne consegue che non si può escludere che la peggiore efficienza sia imputabile allo stadio o, semplicemente alla peggiore qualità embrionale, indicata dal ritardo nella cronologia di sviluppo. Un altro stadio embrionale che ha mostrato una minore resistenza alla crioconservazione è stato quello di blastocisti sgusciata, che in vitro rappresenta lo stadio più avanzato di sviluppo. In questo caso, quindi, è ipotizzabile che il fenomeno sia riferibile a caratteristiche intrinseche allo stadio e, verosimilmente, all'assenza della protezione meccanica della zona pellucida.

In definitiva gli embrioni che hanno esibito una maggiore resistenza alla vitrificazione sono stati quelli allo stadio di blastocisti e blastocisti espansa, confermando esperienze precedenti (Carvalho et al, 1995; De Rosa, 2007)

Alla luce di questi risultati, abbiamo ritenuto interessante valutare la resistenza degli embrioni prodotti nei 4 sistemi colturali differenti, eliminando dal confronto gli embrioni degli stadi precoci (TM e eBl) e le blastocisti sgusciate (HB1). Questo perché i primi normalmente non vengono congelati e le seconde mostravano una distribuzione diseguale nei 4 gruppi sperimentali. Così facendo è stato osservato che le blastocisti e le blastocisti espanse prodotte in vitro in presenza di mio-inositolo e acido citrico presentavano una peggiore sopravvivenza al freddo sia rispetto al glucosio 0.15 che rispetto alla G3P.

Infine abbiamo voluto verificare se i diversi substrati energetici impiegati durante la coltura abbiano un'influenza sulla distribuzione dei sessi negli embrioni prodotti.

In natura il rapporto tra i sessi atteso è 1:1 ma è noto da precedenti lavori che in vitro la percentuale dei maschi è maggiore rispetto a quella delle femmine (Tshimangadzo et al., 2004; Harpreet et al., 2002). Quando siamo andati a confrontare il rapporto tra i sessi nei 4 gruppi con diversi substrati è parso evidente che la più alta concentrazione di glucosio favorisce lo sviluppo di embrioni maschi. Questo risultato è in accordo con il lavoro di Gutierrez et al. (2001) in cui è stato osservato che il glucosio sfavorisce lo sviluppo degli embrioni di sesso femminile. Invece il binomio mio-inositolo ed acido citrico ha mostrato una ratio favorevole agli embrioni di sesso femminile, mentre i gruppi glucosio 0.15 e G3P hanno fornito valori molto vicini alla ratio naturale 1:1. In altri termini in presenza di glucosio è stata osservata una deviazione dei sessi a favore dei maschi solo alla concentrazione più alta, in quanto il rapporto femmina: maschio si è normalizzato riducendone la concentrazione. La G3P ha dato il 50% di maschi e il 50% di femmine mentre uno spostamento a favore delle femmine è stato rilevato solo con mio-inositolo e acido citrico.

E' ipotizzabile che il diverso effetto dei substrati testati sul rapporto tra i sessi sia imputabile alla diversa posizione occupata da questi nella produzione energetica : infatti, il glucosio e la G3P vengono utilizzati e scissi durante la glicolisi, seppure a livelli diversi, mentre l'acido citrico entra nel ciclo della produzione energetica durante il ciclo di Krebs. E' opportuno, inoltre, sottolineare che nel terreno di coltura in cui è stata aggiunta la G3P era comunque presente una piccola concentrazione di glucosio, necessaria per la sintesi degli acidi nucleici (Thompson, 2000), che potrebbe aver favorito lo sviluppo dei maschi. Lo sbilanciamento del rapporto a favore dei maschi, descritto nel gruppo con glucosio 1.5 mM, potrebbe spiegare anche le minori rese embrionali registrate; non è possibile escludere, infatti, che una parte degli embrioni di sesso femminile abbia subito un arresto di sviluppo, a causa della tossicità selettiva del glucosio.

Tutti e 3 gli approcci hanno determinato un miglioramento dell'efficienza IVEP in termini di blastocisti prodotte, confermando che alte concentrazioni di glucosio sono potenzialmente tossiche per gli embrioni.

I risultati del sessaggio consentono più facilmente di interpretare i dati ottenuti sulla resistenza alla vitrificazione nei diversi gruppi. La peggiore sopravvivenza e il più lento

sviluppo degli embrioni prodotti in presenza di mio-inositolo + acido citrico si accorda con i risultati di precedenti lavori in cui era stato dimostrato che gli embrioni di sesso femminile sono più lenti (Carvalho et al, 1995) e più suscettibili alla vitrificazione (Tshimangadzo et al.,2004). In altre parole, la peggiore qualità registrata in questo gruppo potrebbe essere riferita alla maggior incidenza di embrioni di sesso femminile.

Al contrario, nel gruppo controllo, con il glucosio alla concentrazione più alta, si è osservata una minore resa embrionale in termini quantitativi, ma una buona qualità degli embrioni, come indicato dalla elevata percentuale di embrioni avanzati, e dalla discreta resistenza al congelamento. Questi risultati sono facilmente spiegabili alla luce della deviazione del rapporto tra i sessi a favore dei maschi.

Vale la pena enfatizzare che nella maggioranza dei lavori che hanno riportato uno squilibrio tra i sessi a favore dei maschi i media di coltura contenevano alte concentrazioni (5.56-6.7 mM) di glucosio (Carvalho et al., 1995; Gutierrez-Adan et al. 1996; Avery et al. 1992; Xu et al., 1991; Marchant-Le Guienne et al. 1992; Yadav et al., 1993). Al contrario, il terreno di base da noi impiegato era il SOF addizionato di glucosio 1.5 mM (controllo), di glucosio 0.15 mM, di G3P in presenza di 0.15 mM di glucosio e di mio-inositolo + acido citrico, rispettivamente nei 4 gruppi. Inoltre, è opportuno ricordare che in tutti i media di coltura è stato aggiunto il 5% di BS, che equivale ad una concentrazione base di 0.16 mM. Ne consegue che anche il terreno da noi impiegato come controllo conteneva una minore concentrazione dello zucchero rispetto ai media come il TCM 199 (5.56 mM) e il Menezo's B2 (6.7 mM) o, comunque, rispetto ai sistemi che impiegano più elevate concentrazioni di siero.

Ne deriva che i nostri risultati hanno dimostrato che il glucosio esercita un effetto tossico sesso-selettivo anche ad una concentrazione relativamente contenuta, cioè inferiore a 2 mM.

La G3P aumenta la resa embrionale e migliora la qualità, come indicato dalla maggiore percentuale di embrioni avanzati e dalla buona resistenza alla crioconservazione, senza al contempo alterare il rapporto tra i sessi.

La riduzione del glucosio, infine, incrementa la produzione embrionale e non ha effetti sul rapporto tra i sessi. Un dato interessante difficile da interpretare riguarda la qualità degli embrioni prodotti in questo sistema che erano meno avanzati nello sviluppo ma più resistenti alla crioconservazione.

In conclusione sia la riduzione della concentrazione di glucosio che la sua sostituzione con altri substrati energetici, nella fattispecie G3P e mio-inositolo+citrato, incrementano la produzione di embrioni in vitro nel bovino. Le differenze nella qualità degli embrioni da noi descritte sembrano essere principalmente riconducibili al rapporto tra i sessi. Infatti la minore vitalità, intesa come velocità di sviluppo e resistenza alla crioconservazione è stata riportata nell'unico gruppo in cui è stata registrata una preponderanza di embrioni di sesso femminile, cioè quando il glucosio è stato sostituito con mio-inositolo + acido citrico durante la coltura in vitro. Ne consegue che il mio-inositolo+acido citrico può essere considerato un substrato energetico sesso-specifico, che favorisce lo sviluppo delle femmine. Questo dato è particolarmente importante non solo perché la produzione di un maggior numero di embrioni di sesso femminile incontra il favore degli allevatori ma anche perché, allo stato attuale, non sono ancora stati identificati protocolli specifici per un utilizzo ottimale del seme sessato per la IVF. I risultati di questo esperimento suggeriscono di inserire il mio-inositolo + acido citrico nei media colturali quando il target è quello di ottenere più embrioni di sesso femminile o, comunque, quando per la IVF si utilizza il seme sessato XX. Non va però dimenticato che gli embrioni di sesso femminile sono più lenti nello sviluppo e più sensibili alla crioconservazione.

## **ESPERIMENTO N 4-Valutazione dei substrati energetici durante la coltura embrionali in vitro nel bufalo.**

### INTRODUZIONE

Lo sviluppo dei sistemi di coltura in vitro per gli embrioni di bufalo ha prevalentemente imitato quello degli altri ruminanti più studiati. Infatti nelle prime esperienze gli embrioni bufalini sono stati coltivati con successo in vivo, nelle tube di coniglio (Chantareprateep et al., 1989) e di pecora (Galli et al., 1998); l'uso di ospiti intermedi, tuttavia, rappresenta una procedura poco pratica, antieconomica ed antietica, soprattutto se la produzione embrionale è su larga scala. Il sistema di coltura in vivo è stato poi sostituito dalla co-coltura che, in tempi più recenti ha lasciato il passo ai sistemi definiti.

Gli embrioni di bufalo sono stati coltivati in co-coltura con cellule del cumulo e cellule oviduttali (Chuangsoongneon et al. 1999; Madan et al. 1994) o con linee cellulari stabili, disponibili in forma pathogen-free, come ad esempio le cellule BRL (Boni et al., 1999). Sebbene alcuni autori preferiscano ancora i sistemi di co-coltura per la IVEP in questa specie, l'uso dei terreni definiti risulta necessario poiché l'interazione tra il medium e le cellule somatiche non consente di identificare con esattezza i fattori embriotrofici e le caratteristiche fisiche dell'ambiente colturale che si delinea. Una migliore comprensione dei fabbisogni metabolici degli embrioni di questa specie è fondamentale perché si giunga alla formulazione di un sistema colturale specie-specifico. La minore efficienza IVEP riportata in questa specie particolarmente nel passato era essenzialmente dovuta al fatto che il sistema fosse stato semplicemente traslato dalla specie bovina, senza tener in alcun conto differenze specie-specifiche.

Il più noto terreno definito, il SOF, è stato utilizzato per la coltura di embrioni bufalini sin dal 1999 (Boni et al., 1999), ottenendo percentuali di blastocisti maggiori rispetto alla co-coltura con BRL (13.5 % vs 7 %). Successivamente gli embrioni sono stati coltivati in due terreni definiti, il SOF e il KSOM, con rese embrionali sovrapponibili (Caracciolo di Brienza et al., 2001). Il notevole miglioramento dell'efficienza IVEP registrato nel corso degli anni (35-40% di blastocisti), a nostro avviso, è principalmente dovuto

all'ottimizzazione dei sistemi di IVM e di IVF piuttosto che della coltura. Infatti, nonostante siano stati effettuati diversi tentativi per modificarne la composizione originale, il medium SOF rimane il terreno più adatto per la IVC. In questo medium, lo stesso da noi impiegato come controllo negli esperimenti 3.1 e 3.2 nella specie bovina, si utilizza, come fonte energetica, il glucosio alla concentrazione di 1.5 mM.

Alla luce delle attuali conoscenze concernenti il metabolismo e particolarmente l'utilizzazione del glucosio da parte di embrioni bovini ed ovini, ampiamente trattate nell'introduzione dell'esperimento 3, e dei risultati ottenuti nel corso degli esperimenti 3.1 e 3.2, l'obiettivo di questo esperimento è stato quello di valutare gli effetti di una variazione dei substrati energetici durante la coltura in vitro nel bufalo.

In particolare, è stata investigata l'influenza di:

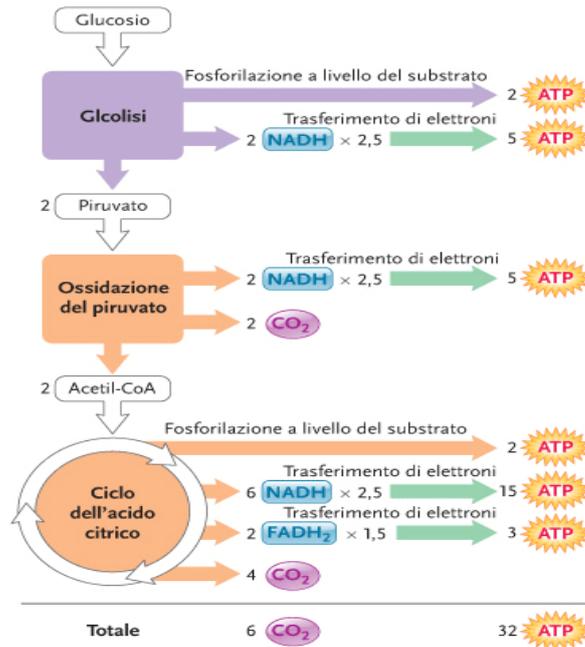
Esperimento 4.1) rimozione totale del glucosio nelle diverse fasi della coltura;

Esperimento 4.2) riduzione di 1/10 della concentrazione standard nelle diverse fasi della coltura;

Esperimento 4.3) riduzione di 1/3 della concentrazione standard nelle diverse fasi della coltura;

Esperimento 4.4) varie concentrazioni di G3P.

Fig 18 Respirazione Cellulare



**Figura 8.15**  
 Riassunto della produzione di ATP a seguito dell'ossidazione completa di una molecola di glucosio. Il totale di 32 molecole di ATP si basa sull'assunzione che gli elettroni portati dalla glicolisi mediante il NADH siano trasferiti al NAD<sup>+</sup> all'interno dei mitocondri. Se gli elettroni provenienti dalla glicolisi sono invece ceduti al FAD all'interno dei mitocondri, la produzione totale sarà di 30 molecole di ATP.

 Wolfe, Russell  
**Elementi di biologia cellulare**  
 Edises

## MATERIALI E METODI

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

Il prelievo degli ovociti, la selezione, la maturazione e la fecondazione in vitro sono state effettuate secondo i protocolli precedentemente descritti per la specie bufalina (esperimento 2.1). Gli embrioni ottenuti alla fine della coltura (giorno 7) sono stati valutati sulla base di criteri morfologici, ed in base allo stadio di sviluppo (Robertson and Nelson, 1998). In particolare sono state confrontate tra i gruppi le percentuali di embrioni trasferibili totali, cioè morule compatte (TM) e blastocisti (B1) e le sole blastocisti di qualità superiore (B1 G 1&2).

## DISEGNO SPERIMENTALE

### ESPERIMENTO 4.1

Al primo giorno di coltura i presunti zigoti (n=1199) sono stati trasferiti in due media di coltura differenti: 1 contenente 1.5mM di glucosio (n=605) ed un altro caratterizzato dall'assenza di glucosio (n=594). Al quarto giorno, quando si esegue il cambio del medium, ogni gruppo è stato nuovamente diviso in altri 2 gruppi, con e senza glucosio, rispettivamente. Così facendo sono stati confrontati 4 sistemi di coltura caratterizzati da: 1) presenza di 1.5 mM glucosio per l'intera durata della coltura in vitro (1.5/1.5; n=155); 2) presenza di 1.5 mM glucosio limitata alla fase precoce di coltura (1.5/0; n=157); 3) assenza di glucosio per l'intera durata della coltura in vitro (0/0; n=161) e 4) presenza di glucosio solo nella fase tardiva della coltura in vitro (0/1.5; n=165). Gli embrioni ottenuti alla fine della coltura (giorno 7) sono stati valutati sulla base di criteri morfologici, ed in base allo stadio di sviluppo (Robertson and Nelson, 1998) come segue: morula compatta (TM), blastocisti precoce (EBI), blastocisti (BI), blastocisti espansa (XBI) e blastocisti sgusciata (HBI).

### ESPERIMENTO 4.2

Al primo giorno di coltura i presunti zigoti (n=665) sono stati trasferiti in due media di coltura differenti: 1 contenente 1.5mM di glucosio (n=351) ed un altro 0.15 mM (n=314). Al quarto giorno, quando si esegue il cambio del medium, ogni gruppo è stato nuovamente diviso in altri 2 gruppi, con le differenti concentrazioni di glucosio, rispettivamente. Così facendo sono stati confrontati 4 sistemi di coltura caratterizzati da: 1) presenza di 1.5 mM glucosio per l'intera durata della coltura in vitro (1.5/1.5; n=130); 2) presenza di 1.5 mM glucosio limitata alla fase precoce di coltura e 0.15 mM nella fase tardiva (1.5/0.15; n=130); 3) ridotta concentrazione di glucosio per l'intera durata della coltura in vitro (0.15/0.15; n=100) e 4) ridotta concentrazione di glucosio solo nella fase precoce di coltura (0.15/1.5; n=102). Gli embrioni ottenuti alla fine della coltura (giorno 7) sono stati valutati sulla base di criteri morfologici, ed in base allo stadio di sviluppo.

### ESPERIMENTO 4.3

Al primo giorno di coltura i presunti zigoti (n=694) sono stati trasferiti in due media di coltura differenti: 1 contenente 1.5mM di glucosio (n=351) ed un altro 0.5 mM (n=347). Al

quarto giorno, quando si esegue il cambio del medium, ogni gruppo è stato nuovamente diviso in altri 2 gruppi, con le differenti concentrazioni di glucosio, rispettivamente. Così facendo sono stati confrontati 4 sistemi di coltura caratterizzati da: 1) presenza di 1.5 mM glucosio per l'intera durata della coltura in vitro (1.5/1.5; n=120); 2) presenza di 1.5 mM glucosio limitata alla fase precoce di coltura e 0.5 mM nella fase tardiva (1.5/0.5; n=118); 3) ridotta concentrazione di glucosio per l'intera durata della coltura in vitro (0.5/0.5; n=123) e 4) ridotta concentrazione di glucosio solo nella fase precoce di coltura (0.5/1.5; n=124). Gli embrioni ottenuti alla fine della coltura (giorno 7) sono stati valutati sulla base di criteri morfologici, ed in base allo stadio di sviluppo.

#### ESPERIMENTO 4.4

Ventidue ore dopo la fecondazione i presunti zigoti (n=197) sono stati divisi in maniera casuale in 4 gruppi: un gruppo controllo, con 1.5 mM di glucosio (n=50), e tre gruppi caratterizzati da concentrazioni crescenti di G3P (n=48; 50; 49 rispettivamente per i gruppi; 0.125mM G3P; 0.25mM G3P; 0.5mM G3P). In una prova preliminare si era provato ad utilizzare la G3P con una base di glucosio di 0.15mM (1/10 della concentrazione standard) ma i risultati molto limitati (6.5; 9.2; 15.6; 27.3 % di embrioni rispettivamente per 0.125; 0.25; 0.5 mM di G3P; controllo), ci hanno spinto ad aumentare la dose basale di glucosio ad 0.5 mM.

Al giorno 4 della coltura i presunti zigoti sono stati trasferiti in gocce di coltura nuove, contenenti le stesse concentrazioni di substrato. Al giorno 7 della coltura si è valutata la resa embrionale, sulla base di criteri morfologici e sulla fase di sviluppo.

#### ANALISI STATISTICA

Le differenze nelle percentuali di cleavage e di resa embrionale tra i differenti gruppi sono state analizzate mediante test del Chi quadro.

## RISULTATI

### Esperimento 4.1

I risultati dell'esperimento 4.1 sono riportati in tabella n.11

Tabella n.11 Percentuali di Cleavage e Resa Embrionale

<b>GRUPPO</b>	<b>% Cleavage</b>	<b>%TMBLG1&amp;2</b>	<b>% BL G1&amp;2</b>
<b>1.5/1.5</b>	59.4	35.6 <sup>A</sup>	31.6 <sup>A</sup>
<b>1.5/0</b>	59.4	24 <sup>A</sup>	24 <sup>A</sup>
<b>0/0</b>	52.7	2.2 <sup>B</sup>	2.2 <sup>B</sup>
<b>0/1.5</b>	52.7	4.6 <sup>B</sup>	4.5 <sup>B</sup>

<sup>A,B,C</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

I risultati dell'esperimento 4.1 dimostrano che la rimozione del glucosio dal medium non ha influenzato i valori del cleavage. Si precisa che la percentuale di cleavage è stata calcolata al 4 giorno per cui i gruppi con e senza glucosio nella prima fase di coltura hanno lo stesso valore di cleavage. Se andiamo a vedere invece i risultati delle rese embrionali notiamo subito l'importanza del glucosio nella fase precoce: i gruppi che avevano la concentrazione standard (1.5 mM di glucosio) nella fase di precompattazione hanno dato una maggiore ( $P < 0.01$ ) percentuale rispetto ai gruppi che erano stati privati del glucosio. Un analogo risultato è stato riportato sulle percentuali di blastocisti di qualità superiore.

## Esperimento 4.2

I risultati dell'esperimento 4.2 sono riportati in tabella n. 12

Tabella n.12 Percentuale di Cleavage e Percentuali di Resa Embrionali

<b>GRUPPO</b>	<b>n°</b>	<b>% CLEA</b>	<b>% TM-BL G1&amp;2</b>	<b>% BL G1&amp;2G2/cl</b>
<b>1.5 G / 1.5 G</b>	130	73.7	38.5 <sup>A</sup>	31.8 <sup>Aa</sup>
<b>1.5 G / 0.15 G</b>	107	73.7	35.2 <sup>Aa</sup>	29.6 <sup>Aa</sup>
<b>0,15 G / 1.5 G</b>	102	65.1	21.1 <sup>Bb</sup>	17.2 <sup>Ab</sup>
<b>0.15 G /0. 15 G</b>	89	65.1	8.1 <sup>C</sup>	4.9 <sup>B</sup>

<sup>A,B,C</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza P<0.01

<sup>a,b,c</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza; P<0.05

I risultati di questo esperimento confermano l'andamento descritto nell'esperimento 4.1. Infatti, come si evince dalla tabella, anche in questo caso il cleavage non risente in maniera significativa della diversa concentrazione di glucosio nel terreno. Inoltre le maggiori (P<0.05) rese embrionali, in termini di TM-BLG1&2 e di BL G1&2, sono state riscontrate nei due gruppi in cui la più alta concentrazione di glucosio era presente nella fase precoce di coltura rispetto agli altri due gruppi. E' interessante rilevare che quando il glucosio è stato ridotto solo nella fase tardiva i risultati sono stati sovrapponibili a quelli registrati nel gruppo controllo. Inoltre l'assenza di glucosio per tutta la durata della coltura ha determinato una riduzione significativa delle percentuali di TM-BLG1&2 e di BL G1&2 rispetto a tutti gli altri gruppi.

### Esperimento 4.3

I risultati dell'esperimento 4.3 sono riportati in tabella n. 13

Tabella n.13 Percentuale di Cleavage e Percentuali di Resa Embrionali sul totale

<b>GRUPPO</b>	<b>% CLEA</b>	<b>% TM-BL G1&amp;2</b>	<b>% BL G1&amp;2G2</b>
<b>1.5 G / 1.5 G</b>	68.4	34.4	27
<b>1.5 G / 0.5 G</b>	68.4	27.5	24.1
<b>0.5 G / 0.5 G</b>	71.3	28	21.5
<b>0.5 G / 1.5 G</b>	71.3	26	20.9

Anche in questa prova i risultati dimostrano che il cleavage è poco influenzato dal terreno di coltura, in quanto non vi è una differenza statisticamente significativa tra i gruppi. Inoltre in questo caso non sono emerse differenze statisticamente significative tra i differenti media neanche sulla resa embrionale.

### Esperimento 4.4

I risultati dell'esperimento 4.4 sono riportati in tabella n. 14

Tabella n.14 Percentuale di Cleavage e Percentuali di Resa Embrionali sul totale e sui divisi

<b>GRUPPI</b>	<b>% CLEA</b>	<b>% TM-BL/tot</b>	<b>% BL/tot</b>	<b>% TM-BL/cl</b>	<b>% BL/cl</b>
<b>Controllo</b>	82.2	40.5 <sup>A</sup>	20 <sup>Aa</sup>	48.5 <sup>A</sup>	24.4 <sup>A</sup>
<b>0.5 mM G3P</b>	71.8	20.0 <sup>B</sup>	9.9 <sup>b</sup>	28.9 <sup>B</sup>	14.5 <sup>A</sup>
<b>0.25 mM G3P</b>	74.2	17.8 <sup>B</sup>	11.7 <sup>A</sup>	24.6 <sup>B</sup>	16.5 <sup>A</sup>
<b>0.125 mM G3P</b>	79.2	16.7 <sup>B</sup>	2.1 <sup>Bc</sup>	21.1 <sup>B</sup>	2.5 <sup>B</sup>

<sup>A,B,C</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza  $P < 0.01$

<sup>a,b,c</sup> Le lettere all'interno delle colonne indicano una differenza;  $P < 0.05$

Osservando la tabella si nota che il cleavage non risente della sostituzione del glucosio con la G3P.

Quando, invece, andiamo a confrontare i dati delle rese embrionali, le migliori ( $P < 0.01$ ) percentuali di TM-BI, calcolate sia sui COC che sui divisi, sono state riportate nel gruppo controllo, quello con il glucosio, rispetto ai tre gruppi che contengono la G3P. Inoltre non sono emerse differenze statistiche tra i gruppi trattati con le diverse concentrazioni di G3P. D'altra parte se non consideriamo le morule nel computo della resa embrionale, vediamo che le differenze statistiche tra il gruppo controllo e il gruppo 0.25 mM di G3P si annullano, così come si riducono ( $P < 0.05$ ) rispetto al gruppo 0.5mM. Tuttavia tra questi due gruppi non sono state osservate differenze nelle percentuali di BL, mentre il gruppo trattato con la concentrazione 0.125 mM ha dato i peggiori risultati. Infine, quando le percentuali di BL sono state calcolate sui divisi è emerso che il gruppo con la minore concentrazione di G3P dava valori inferiori ( $P < 0.01$ ) agli altri tre gruppi.

## DISCUSSIONE

Come detto in precedenza, la presenza del glucosio nei terreni di coltura influisce negativamente sulla produzione di embrioni in molte specie (Schini and Bavister, 1988; Seshagiri and Bavister, 1989; Thompson et al., 1992; Kim et al., 1993; Gutiérrez-Adán et al., 2001; Larson et al., 2001; Peippo et al., 2001; Scott and Whittingham, 2002; Kwunet al., 2003). Le alte concentrazioni di glucosio, solitamente utilizzate nei terreni di coltura, risultano essere particolarmente inappropriate per gli embrioni dei ruminanti (Lee et al., 1978; McDonald, 1980). Partendo da questa tesi siamo andati a valutare la possibilità di eliminare o ridurre la concentrazione del glucosio dal terreno di coltura per gli embrioni bufalini.

Una prima osservazione riguarda la percentuale di cleavage che non ha subito alcuna variazione in funzione dei substrati energetici in tutti gli esperimenti (esperimento 4.1, 4.2, 4.3, 4.4). Questo dato non è sorprendente se si considera che in tutti i casi gli oociti maturi

venivano inseminati nello stesso sistema di IVF mentre le condizioni colturali venivano modificate a partire dal primo giorno di coltura.

Nel primo esperimento (4.1) siamo andati a vedere la variazione della resa embrionale eliminando completamente il glucosio in una delle due fasi di sviluppo. I risultati di questa prova hanno dimostrato che il glucosio è assolutamente necessario per lo sviluppo degli embrioni di bufalo in vitro nella fase di pre-compattazione, come indicato dalla netta differenza nella produzione embrionale tra i gruppi caratterizzati dalla presenza e dall'assenza di tale substrato durante la fase precoce di coltura.

Invece, la presenza del glucosio durante la fase tardiva di coltura ha rivestito un ruolo secondario: infatti l'assenza di substrato nella seconda fase non ha avuto effetti negativi sulle rese embrionali. Questi risultati sono in contrasto con i precedenti lavori che hanno dimostrato che in molte specie il glucosio nella fase di pre-compattazione è dannoso (Schini and Bavister, 1988; Menezes e Khatchadourian, 1990; Downs e Dow, 1991; Kim et al., 1993; Schini and Bavister, 1988; Quinn, 1995). Sono inoltre in disaccordo con gli studi di Leese e Barton (1984), che asseriscono che nelle prime fasi di sviluppo gli embrioni utilizzano come substrati energetici piruvato e lattato, iniziando a metabolizzare il glucosio solo nella fase post-compattazione. Un incremento del consumo dei substrati energetici e, in particolare, del glucosio è stato riportato nella fase post-compattazione negli embrioni bovini ed ovini (Thompson, 2000). Non va dimenticato, però, che il glucosio svolge un ruolo importante per la sintesi degli acidi nucleici e, pertanto, la sua eliminazione completa dal medium può essere dannosa per lo sviluppo successivo. I nostri dati, pertanto, sono intriganti perché il momento in cui l'attività biosintetica dell'embrione aumenta notevolmente è proprio durante la fase di post-compattazione, mentre nel nostro studio l'effetto negativo è stato osservato quando il substrato mancava nella fase precoce.

Nello studio successivo si è pensato di non eliminare tutto il glucosio ma di ridurlo a 0.15 mM (1/10 della concentrazione standard). Anche in questo caso si è visto che il glucosio nelle fasi di pre-compattazione svolge un ruolo importante per il prosieguo dello sviluppo, dimostrato dalle migliori rese trovate nei due gruppi con la maggiore concentrazione durante la fase precoce. Tra i due gruppi in cui si è ridotta la concentrazione di glucosio i risultati peggiori ( $P < 0.01$ ) sono stati riportati quando la concentrazione di 0.15 mM è stata estesa a tutta la durata della coltura.

Pertanto, nell'esperimento 4.3 siamo andati a confrontare la concentrazione standard con la concentrazione 0.5 mM (equivalente ad 1/3 della concentrazione standard). In questo caso tra i differenti gruppi non sono state osservate differenze statistiche, anche se con la presenza del glucosio 1.5mM in ambo le fasi la resa è stata maggiore.

La seconda fase di questo lavoro nasce dalla lettura di questi risultati: non potendo eliminare il glucosio, si è pensato di sostituirlo con un altro substrato. Si è pensato quindi di sostituire il glucosio con un suo metabolita, prodotto durante la glicolisi : la gliceraldeide-3-fosfato, che viene prodotta durante la scissione del fruttosio 1,6 bisfosfato. Per cui da una molecola di glucosio si producono due molecole di G3P, ma il vantaggio maggiore che ci ha spinto ad utilizzare questa fonte energetica è stato che dalla gliceraldeide in poi inizia la fase di recupero della glicolisi, quindi si ha un guadagno netto di ATP maggiore (non si consumano i due fosfati necessari per la trasformazione del glucosio in fruttosio 1,6 bisfosfato).

In uno studio preliminare sono state testate varie concentrazioni di G3P in presenza di una concentrazione minima di glucosio (0.15 mM), per garantire la sintesi di acidi nucleici. I risultati ottenuti hanno, però, dimostrato che la G3P non riusciva a sopperire appieno alla carenza di glucosio e che, a concentrazioni maggiori di 1 mM, esercitava un effetto embriotossico. Di conseguenza analizzando i dati di questo studio preliminare e quelli dell'esperimento 4.3 si è provato ad aggiungere la G3P ad un medium che avesse come base 1/3 della concentrazione standard di glucosio. Ma anche in questo caso, confrontando il medium con la migliore concentrazione di G3P ed il terreno standard, si è visto che tra i due terreni c'è ancora una netta differenza statistica, tale da precludere l'utilizzo della gliceraldeide-3-fosfato nella routine di IVEP.

Questi risultati sono in contrasto con quelli da noi ottenuti nell'esperimento 3.2, in cui, invece, la G3P aveva determinato un miglioramento dell'efficienza IVEP nel bovino, sia in termini quantitativi che qualitativi. Per di più la concentrazione ottimale per gli embrioni bovini è risultata del tutto inefficace per gli embrioni bufalini.

In conclusione, i risultati di questi esperimenti hanno dimostrato che sia la rimozione di glucosio che una riduzione di 1/10 della sua concentrazione dai media colturali utilizzati nella fase precoce incidono negativamente sulla produzione embrionale in vitro nel bufalo. Al contrario, quando tali carenze vengono apportate durante la fase tardiva lo sviluppo

embrionale non è influenzato. Invece, la riduzione della concentrazione di glucosio di 1/3 nelle varie fasi non comporta una diminuzione della resa embrionale rispetto al controllo. Ne consegue che gli embrioni di bufalo necessitano del glucosio anche nella fase di pre-compattazione, a dispetto di quello che avviene in altre specie vicine, a cui spesso la bufala viene accostata.

Infine è emerso che la G3P non può essere utilizzata come substrato energetico per l'IVEP del bufalo. L'insieme di questi risultati ha dimostrato l'esistenza di evidenti differenze nei fabbisogni metabolici degli embrioni bufalini rispetto a quelli bovini, di cui bisogna tener conto per ottimizzare il sistema in questa specie.

## CONCLUSIONI

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare alcuni fattori che influenzano l'efficienza IVEP, valutando sia la produzione quali-quantitativa di embrioni che la distribuzione dei sessi degli embrioni ottenuti. La sperimentazione è stata condotta principalmente nella specie bovina, traslando quando possibile le esperienze a quella bufalina, per un confronto volto ad evidenziare eventuali differenze specie-specifiche.

Il lavoro è stato articolato in due parti: nella prima l'attenzione è stata focalizzata a fattori inerenti la fase di fecondazione, mentre nella seconda è stata rivolta alla fase della coltura embrionale.

In particolare, nel corso della prima fase gli obiettivi sono stati quelli di caratterizzare la problematica dell'effetto maschio, ovvero la variabilità nella capacità fecondante in vitro di tori diversi, e di individuare parametri predittivi della stessa, che consentano una affidabile valutazione a priori di un toro prima che esso venga inserito nella routine del sistema IVEP. Nell'ambito dei diversi parametri testati ci si è proposti, inoltre, di verificare se la cinetica di penetrazione è correlata alla fertilità in vitro dei tori e se variando la durata di co-incubazione dei gameti in funzione della cinetica del toro impiegato è possibile ottimizzarne le relative performance in vitro. Inoltre, l'effetto del tempo di co-incubazione è stato anche valutato sulla distribuzione dei sessi.

Una criticità della IVEP è, infatti, rappresentata dall'estrema variabilità della capacità fecondante che si riscontra in vitro tra diversi tori, che comporta la necessità di effettuare un appropriato screening in laboratorio prima di poter utilizzare un dato seme in un programma di IVEP. Questa problematica acquista un peso ancora maggiore nella specie bufalina, in cui solo il 10 % dei tori testati risulta idoneo alla IVF (Gasparrini, 2002).

I risultati dell'esperimento 1.1 hanno dimostrato che, tra i diversi parametri di fertilità testati in laboratorio, la motilità spermatica valutata dopo la separazione mediante gradienti di percoll, così come il tasso di cleavage, sono altamente correlati alle rese embrionali e, pertanto possono essere considerati dei marker affidabili di previsione della effettiva fertilità in vitro di tori diversi. Per meglio comprendere l'importanza di questi risultati è fondamentale ricordare che allo stato attuale, a fronte di numerosi screening eseguiti nei Centri Tori e in laboratorio, la capacità fecondante dei diversi tori può essere stimata accuratamente solo mediante valutazione della produzione embrionale dopo ripetute prove

di IVF, che comporta un notevole dispendio in termini di tempo e di costi. L'elevata correlazione emersa tra motilità post-separazione e rese embrionali si traduce nella possibilità di selezionare o escludere il seme dai programmi di IVF in tempi molto ridotti, con conseguente risparmio economico.

Un altro obiettivo che ci eravamo prefissi era quello di verificare se la velocità di penetrazione spermatica è correlata alla fertilità in vitro, e se variando la lunghezza della co-incubazione dei gameti in relazione alla cinetica dei tori è possibile migliorarne le performance riproduttive in vitro.

Nel corso dell'esperimento 1.2 è stato osservato che tori diversi hanno una diversa velocità di penetrazione ma che la cinetica di penetrazione dei tori, invece, non è correlata alla fertilità in vitro nella specie bovina. Un risultato interessante è stato, invece, quello di aver dimostrato che la capacità fecondante dei tori può essere migliorata adattando la lunghezza di co-incubazione alla loro velocità di penetrazione. Diversi autori hanno suggerito di ridurre la durata della co-incubazione dei gameti, ma questo non è sempre pratico in un laboratorio di produzione embrionale e può penalizzare l'efficienza dei tori che hanno una penetrazione lenta. Nel nostro lavoro il tempo ottimale di co-incubazione non corrispondeva in tutti i casi al tempo in cui si registrava il maggior tasso di penetrazione monospermica. Tuttavia è stato osservato che una durata di 8 ore di co-incubazione spermatozoo-ovocita è stata sufficiente a garantire le rese maggiori per i due tori più veloci, mentre sono state necessarie 16 ore di co-incubazione per aumentare l'efficienza IVEP dei due tori più lenti. È stato, inoltre, accertato che i tori più veloci danno tassi di polispermia più elevati, che diventano preoccupanti all'aumentare del tempo di co-incubazione, suggerendo che, per questi tori in particolare, diviene fondamentale ridurre la durata di co-incubazione a 8 ore.

Infatti, indipendentemente dai tori, le maggiori percentuali di cleavage e blastocisti sono state raggiunte a 8 ore, senza ulteriore incremento con il passare del tempo di co-incubazione.

Va ricordato, però, che tra le 8 e le 20 ore non si sono osservate differenze nella resa in blastocisti. Ne deriva che un allungamento della durata di co-incubazione dei gameti non sembra esercitare un effetto deleterio sullo sviluppo embrionale, inteso in termini quantitativi. Non possiamo, però escludere che un'influenza negativa si espliciti sulla qualità e, quindi, sulla vitalità degli embrioni prodotti. Poiché non sono state eseguite

analisi citogenetica sulle blastocisti prodotte non si può escludere che ai tempi più lunghi di co-incubazione ci sia un aumento delle anomalie cromosomiche come la poliploidia e la mixoploidia, a seguito della polispermia.

L'alta incidenza di polispermia registrata per i tori ad alta velocità di penetrazione in questo studio è stata allarmante; ne consegue che prima di utilizzare i tori per la routine di IVF, è opportuno che siano sottoposti ad appropriati screening. Infatti, nel caso di tori che danno alti tassi di polispermia diviene innanzitutto obbligatorio ridurre la durata della co-incubazione; inoltre, al fine di contenere il fenomeno, è possibile utilizzare alcuni espedienti, come la modificazione della concentrazione finale del seme, o della concentrazione dell'eparina, ecc..

Infine è stato dimostrato che i tori con una cinetica di penetrazione più veloce non alterano il rapporto del sesso dell'embrione a favore dei maschi. E' stato, invece, confermato che lo stadio di sviluppo è associato al sesso: gli embrioni che si sviluppano più lentamente sono stati in prevalenza di sesso femminile, mentre, al contrario di altri report, non si è osservato un disequilibrio tra i sessi nel caso degli embrioni che si sviluppano più velocemente. Un dato interessante emerso nel corso di questo studio riguarda la predominanza di embrioni di sesso femminile a 4 e 20 ore di co-incubazione. Questo risultato inatteso non può essere riconducibile ad una diversa distribuzione degli embrioni di stadio diverso che era sovrapponibile a tutti i tempi considerati. Ne consegue che sono necessari ulteriori studi per chiarire perché nel sistema da noi impiegato si verifica questo fenomeno. In generale si è osservata una tendenza a favore delle femmine nel sistema da noi utilizzato che potrebbe essere imputabile a differenze nei sistemi di IVF e IVC impiegati rispetto ai lavori precedenti, dato che è stato osservato che le condizioni di coltura possono alterare il rapporto tra i sessi.

I risultati dell'esperimento 2.2 hanno evidenziato che, anche nella specie bufalina, esiste una marcata differenza nella velocità di penetrazione spermatica in vitro tra i diversi tori che, almeno in parte, può spiegare le differenze nelle percentuali di cleavage e di blastocisti dopo IVF. In questa specie, infatti, è emersa una evidente correlazione tra la cinetica di penetrazione e la capacità fecondante dei tori diversi. L'analisi di regressione ha indicato che il tempo ottimale di penetrazione per la predizione della resa in blastocisti è 12 ore post-inseminazione ( $R^2=0.6$ ). In altri termini, in questa specie il tasso di penetrazione normospermica a 12 ore consente di individuare i tori che daranno una migliore resa

embrionale dopo IVF e di escludere quelli inidonei.

I risultati ottenuti nel corso di questo esperimento confermano che nella specie bufalina l'effetto maschio è molto più accentuato. Ciò potrebbe anche spiegare perché in questa specie è stata riscontrata una correlazione tra la cinetica di penetrazione e le rese embrionali dopo IVF che non è stata osservata nella specie bovina. A tale proposito è opportuno ricordare che tra i tori testati nella specie bovina solo uno era ipofertile mentre gli altri davano rese sovrapponibili: pur non essendo il dato suffragato da una significatività statistica, il toro ipofertile era effettivamente quello con il più lento pattern di penetrazione e quello che dava un tasso di polispermia trascurabile.

Nella specie bufalina, in cui si registra una maggiore variabilità della capacità fecondante in vitro di tori diversi, la cinetica di penetrazione può essere usata come marker predittivo. Inoltre è ipotizzabile che, anche in questa specie, un aumento della durata di co-incubazione dei gameti può rappresentare una strategia efficace per ottimizzare le performance in vitro dei tori caratterizzati da una lenta cinetica. Questo aspetto non è stato ancora valutato, solo a causa della minore disponibilità di materiale sperimentale in questa specie.

La seconda parte della ricerca è stata indirizzata all'ottimizzazione dei sistemi di coltura embrionale, mettendo a confronto diversi substrati energetici alternativi al glucosio, e valutandone gli effetti sia sulle rese embrionali che sulla sex ratio.

Nonostante sia stato ampiamente riportato che il glucosio abbia una azione embriotossica, che si esprime maggiormente sugli embrioni di sesso femminile, questo zucchero rimane un costituente integrante dei media utilizzati per la IVEP nella maggior parte delle specie domestiche. La maggiore sensibilità degli embrioni di sesso femminile al glucosio è stata messa in relazione ad un'espressione sbilanciata di alcuni geni X-linked; infatti alcuni enzimi fondamentali per il metabolismo del glucosio (G6PD) e per il controllo dell'apoptosi cellulare (XIAP) hanno i loro loci sul cromosoma X.

Uno degli obiettivi di questa ricerca è stato quello di individuare altri substrati energetici che potessero sostituire completamente, o almeno in parte, il glucosio durante la coltura embrionale in vitro in modo da attenuarne gli effetti collaterali. Nell'esperimento 3.1 abbiamo valutato l'effetto dell'aggiunta al medium colturale di un metabolita del glucosio, la gliceraldeide-3-fosfato (G3P), che entra nella glicolisi nella fase di recupero energetico.

A tale scopo sono state testate diverse concentrazioni di G3P ed è stato dimostrato che, a basse concentrazioni (0.125-0.25 mM), questo substrato consente di incrementare in maniera significativa le rese embrionali rispetto al controllo in cui il substrato energetico era glucosio alla concentrazione standard di 1.5 mM.

Lo scopo dell'esperimento 3.2 è stato quello di testare diversi approcci per attenuare gli effetti potenzialmente tossici del glucosio durante la coltura. Un primo approccio è stato quello di ridurre drasticamente la concentrazione dello zucchero in questione (1/10 di quella standard). Inoltre si è voluto verificare l'efficacia di substrati alternativi al glucosio, come la G3P alla concentrazione risultata ottimale nell'esperimento 3.1, e la combinazione di mio-inositolo e acido citrico, già utilizzata in diversi laboratori per la IVEP nel bovino.

I risultati ottenuti sulle rese embrionali hanno confermato l'ipotesi di partenza, cioè che il glucosio durante la coltura ha un effetto negativo sullo sviluppo. Infatti, sia la riduzione della concentrazione di glucosio che la sua sostituzione con altri substrati energetici, nella fattispecie G3P e mio-inositolo+citrato, hanno incrementato la produzione di embrioni in vitro nel bovino. Nel nostro studio, se ci si limita ad osservare la produzione quantitativa di blastocisti, non si evince la superiorità di un substrato rispetto agli altri. Al contrario, alcune differenze sono emerse sulla qualità degli embrioni prodotti, valutata in base alla cronologia di sviluppo e alla resistenza alla crioconservazione, e sul rapporto tra i sessi. I dati sulla qualità embrionale non sono stati sempre lineari. Nel gruppo controllo, con il glucosio alla concentrazione più alta, si è osservata una minore resa embrionale in termini quantitativi, ma una buona qualità degli embrioni, come indicato dalla elevata percentuale di embrioni avanzati, e dalla discreta resistenza al congelamento. La G3P ha avuto un effetto positivo sulla qualità embrionale, come si evince dalla elevata velocità di sviluppo e dalla buona resistenza alla crioconservazione. Nel gruppo in cui si è ridotta la concentrazione di glucosio la migliore congelabilità degli embrioni si è contrapposta al più lento sviluppo in vitro. Infine, quando si è utilizzato il mio-inositolo + acido citrico, si è descritto un certo peggioramento della qualità embrionale, caratterizzata dal più lento sviluppo e dalla maggiore sensibilità alla crioconservazione.

Per quanto riguarda gli effetti sulla distribuzione dei sessi, in presenza di glucosio è stata osservata una deviazione a favore dei maschi solo alla concentrazione più alta, in quanto il rapporto femmina: maschio si è normalizzato riducendone la concentrazione di 10 volte.

La G3P ha dato il 50% di maschi e il 50% di femmine mentre uno spostamento a favore delle femmine è stato rilevato solo con mio-inositolo e acido citrico.

E' ipotizzabile che il diverso effetto dei substrati testati sul rapporto tra i sessi sia imputabile alla diversa posizione occupata da questi nella produzione energetica: infatti, il glucosio e la G3P vengono utilizzati e scissi durante la glicolisi, seppure a livelli diversi, mentre l'acido citrico entra nel ciclo della produzione energetica durante il ciclo di Krebs.

Le differenze nella qualità degli embrioni da noi descritte sembrano essere principalmente riconducibili al rapporto tra i sessi. Infatti la minore vitalità, intesa come velocità di sviluppo e resistenza alla crioconservazione è stata riportata nell'unico gruppo in cui è stata registrata una preponderanza di embrioni di sesso femminile, cioè quando il glucosio è stato sostituito con mio-inositolo + acido citrico durante la coltura in vitro. Ne consegue che il mio-inositolo+acido citrico può essere considerato un substrato energetico sesso-specifico, che favorisce lo sviluppo delle femmine. Questo dato è particolarmente importante per le potenziali implicazioni applicative. Infatti è noto che negli allevamenti da latte la nascita di vitelli di sesso femminile è vantaggiosa da un punto di vista economico tanto è vero che gli allevatori mostrano attualmente molto interesse verso l'utilizzo di embrioni o seme sessato. Si ricorda che una delle criticità della tecnologia IVEP è rappresentata proprio dalla deviazione del rapporto tra i sessi a favore dei maschi.

Inoltre, allo stato attuale, non sono ancora stati identificati protocolli specifici per un utilizzo ottimale del seme sessato per la IVF. I risultati di questo esperimento suggeriscono di inserire il mio-inositolo + acido citrico nei media colturali quando il target è quello di ottenere più embrioni di sesso femminile o, comunque, quando per la IVF si utilizza il seme sessato XX. Non va però dimenticato che gli embrioni di sesso femminile sono più lenti nello sviluppo e più sensibili alla crioconservazione.

L'obiettivo degli esperimenti 4.1, 4.2 e 4.3 è stato quello di valutare gli effetti della eliminazione del glucosio e/o della riduzione della sua concentrazione nelle diverse fasi della coltura in vitro sullo sviluppo embrionale nel bufalo. Infine, alla luce dei risultati ottenuti con la G3P nel bovino, ci siamo proposti di investigare gli effetti dell'integrazione di questo substrato nei media colturali anche nella specie bufalina (esperimento 4.4).

I risultati di questi esperimenti hanno dimostrato che sia la rimozione di glucosio che una riduzione di 1/10 della sua concentrazione dai media colturali utilizzati nella fase precoce incidono negativamente sulla produzione embrionale in vitro nel bufalo. Al contrario,

quando tali carenze vengono apportate durante la fase tardiva lo sviluppo embrionale non è influenzato. Invece, la riduzione della concentrazione di glucosio di 1/3 nelle varie fasi non comporta una diminuzione della resa embrionale rispetto al controllo. Ne consegue che gli embrioni di bufalo necessitano del glucosio anche nella fase di pre-compattazione, a dispetto di quello che avviene in altre specie vicine, a cui spesso la bufala viene accostata. Infine è emerso che la G3P non può essere utilizzata come substrato energetico per l'IVEP del bufalo, perché a tutte le concentrazioni testate ha avuto un effetto negativo sulle rese embrionali. L'insieme di questi risultati ha dimostrato l'esistenza di evidenti differenze nei fabbisogni metabolici degli embrioni bufalini rispetto a quelli bovini, di cui bisogna tener conto per ottimizzare il sistema in questa specie.

## BIBLIOGRAFIA

- **Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H.** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum containing media. *Mol Reprod Dev* 2002;61:57–66.
- **Agca, Y., R. L. Monson, D. L. Northey, O. A. Mazni, D. M. Schaefer, and J. J. Rutledge. 1998.** Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths 23. *Theriogenology* 50:147-162.
- **Agung B, Otoi T, Wongsrikeao P, Taniguchi M, Shimizu R, Watari H, Nagai T.** Effect of maturation culture period of oocytes on the sex ratio of in vitro fertilized bovine embryos. *J Reprod Dev.* 2006 Feb;52(1):123-7. Epub 2005 Nov 7.
- **Aitken RJ.** 1976. Uterine secretion of fructose in the red deer. *J Reprod Fertil* 46:439–440.
- **Aitken, J.R., Clarkson, J.S.,** 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 81, 459–469.
- **Aitken, J.R., Irvine, D.S.,Wu, F.C.,** 1991. Prospective analysis of sperm–oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 164, 542–551.
- **Aitken, J.R.,** 1994. A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 19–24.
- **Alomar, M., Mahieu, J., Verhaeghe, B., Defoin, L., Donnay, I.,** 2006. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 395–402.
- **Alomar M, Tasiaux H, Remacle S, George F, Paul D, Donnay I.,** 2008: Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 107 48-61.

- **Ambrosi V., Morini G., Parmigiani E., Bigliardi E.** Sessaggio embrionale nella specie bovina mediante pcr e successivo congelamento e trapianto: risultati preliminari. Università degli Studi di Parma, Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Vol. XXI – 2001
- **Augustin R, Pocar P, Navarrete-Santos A, Wrenzycki C, Gandolfi F, Niemann H, Fischer B.** 2001. Glucose transporter expression is developmentally regulated in vitro derived bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 60:370–376.
- **Avery B, Schmidt M, Greve T.** 1989. Sex determination of bovine embryos based on embryonic cleavage rates. *Acta Vet Scand* 30:147–153.
- **Avery B., V. Madison, and T. Greve.** 1991. Sex and Development in Bovine Invitro Fertilized Embryos *Theriogenology* 35:953-963.
- **Avery B, Jorgensen CB, Madison V, Greve T.** Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. *Mol Reprod Dev* 32: 265–270, 1992.
- **Avery B, Greve T.** Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*. 1995 Oct 15;44(6):871-8.
- **Attanasio** 2007 “Ottimizzazione delle tecniche di crioconservazione di oociti di bufalo (*Bubalus bubalis*) maturati in vitro mediante strategie innovative di vitrificazione” . PhD Thesis Napoli Italia : Federico II
- **Bachvarova** 1992 A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. *Cell* 69, 895–897. doi:10.1016/0092-8674(92)90606-D
- **Balaban, B., and Urman, B.** (2005). Comparison of two sequential media for culturing cleavage-stage embryos and blastocysts: embryo characteristics and clinical outcome. *Reprod. Biomed. Online* 10, 485–491.
- **Baruselli PS, de Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bo GA.** (2006) Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*; 65 (1): 77-88;
- **Bavister, B. D., and Arlotto, T.** (1990). Influence of single amino acids on the development of hamster one-cell embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 25, 45–51. doi:10.1002/MRD.1080250109

- **Bavister BD.** 1995. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1:91–148.
- **Behboodi, E., G. B. Anderson, R. H. Bondurant, S. L. Cargill, B. R. Kreuzer, J. F. Medrano, and J. D. Murray.** 1995. Birth of Large Calves That Developed from in Vitro-Derived Bovine Embryos *Theriogenology* 44:227-232.
- **Bermejo-Alvarez P., D. Rizos, D. Rath, P. Lonergan, and A. Gutierrez-Adan** Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro *Physiol Genomics* 32: 264–272, 2008. First published November 6, 2007; doi:10.1152/physiolgenomics.00234.2007.
- **Bernardi ML, Delouis C.** Sex-related differences in the developmental rate of in-vitro matured/in-vitro fertilized ovine embryos. *Hum Reprod* 11: 621–626, 1996.
- **Berg U, Reichenbach HD, Liebrich J, Brem G,** 1992: Sex ratio of calves born after transfer of in vitro produced embryos. *Theriogenology* 37 191.
- **Betteridge, K. J. and J. E. Flechon.** 1988. The Anatomy and Physiology of Pre-Attachment Bovine Embryos *Theriogenology* 29:155-187.
- **Biggers JD.** 1998. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. *Int J Dev Biol* 42:879–884.
- **Brackett, B. G., D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans, and M. A. Dressel.** 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow *Biol Reprod* 27:147-158.
- **Breining E, Cetica PD, Beconi MT.** Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. *Theriogenology*. 2010 Oct 1;74(6):1036-49. Epub 2010 Jun 26.
- **Blondin, P., Coenen, K., Sirard, M.A.,** 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J. Androl.* 18, 454–460.
- **Blondin, P. and M. A. Sirard.** 1995. Oocyte and Follicular Morphology As Determining Characteristics for Developmental Competence in Bovine Oocytes 1. *Molecular Reproduction and Development* 41:54-62.

- **Bondoc, O. L., C. Smith, and J. P. Gibson. 1989.** A review of breeding strategies for genetic improvement of dairy cattle in developing countries *Animal Breeding Abstract* 57:819-829.
- **Boni R, Santella L, Dale B, Roviello S, Di Palo R, Barbieri V. M.** An ultrastructural study of maturation in buffalo oocytes. *Acta Medica Veterinaria*, 1992; 38: 153-161;
- **Boni R, Roviello S, Campanile G, Di Palo R, Zicarelli L.** Single ovum pick-up performed from the sixth to the eleventh estrous cycle day in buffalo cows. *Proc Symp on Reprod Animal Breeding: Advances and Strategies*;1995:357-358.
- **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. *Proc V World Buffalo Congress, Caserta, Italy*, 1997:787-792.
- **Boni R, Roviello S, Zicarelli L.** Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 1996;46:899-909
- **Boni R., Roviello S., Zicarelli L.** (1996) Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology*;46:899-909
- **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 et al.** Developmental Potential in Bovine Oocytes Is Related to Cumulus-Oocyte Complex Grade, Calcium Current Activity, and Calcium Stores. *Biol. Reprod.* 66, 836–842; (2002)
- **Brison, D. R., Houghton, F. D., Falconer, D., Roberts, S. A., Hawkhead, J., Humpherson, P. G., Lieberman, B. A., and Leese, H. J.** (2004). Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum. Reprod.* **19**, 2319–2324. doi:10.1093/HUMREP/DEH409
- **Burgoyne PS, Thornhill AR, Boudrean SK, Darling SM, Bishop CE, Evans EP.** The genetic basis of XX-XY differences present before gonadal sex differentiation in the mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350: 253–260, 1995.

- **Campanile G, Di Palo R, Neglia G, Vecchio D, Gasparrini B, Prandi A, Galiero G, D'Occhio MJ.** Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology*. 2007 May;67(8):1393-8..
- **Campanile G, Vecchio D, Di Palo R, Neglia G, Gasparrini B, Prandi A, Zicarelli L, D'Occhio MJ.** Delayed treatment with GnRH agonist, hCG and progesterone and reduced embryonic mortality in buffaloes. *Theriogenology*. 2008 Dec;70(9):1544-9.
- **Cassar G, King WA, King GJ.** Influence of sex on early growth of pig conceptuses. *J Reprod Fertil* 101: 317–320, 1994.
- **Caracciolo di Brienza V, Neglia G, Masola N, Gasparrini B, Di Palo R, Campanile G.** In vitro embryo production in chemically defined media. Atti 1° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, 3-5 ottobre 2001, Eboli (SA), Italy: 341-344
- **Carnegie, J. A., R. Durnford, J. Algire, and J. Morgan. 1997.** Evaluation of mitomycin-treated Vero cells as a co-culture system for IVM/IVF-derived bovine embryos *Theriogenology* 48:377-389.
- **Carvalho RV, Del Campo MR, Plante Y, Mapletoft RJ, 1995:** Effects of storage of development on sex ratio and survival after freezing of day 7 bovine IVF embryos. *Theriogenology* 43 183.
- **Carvalho, R. V., M. R. DelCampo, A. T. Palasz, Y. Plante, and R. J. Mapletoft. 1996.** Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7 *Theriogenology* 45:489-498.
- **Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, Alberio RH.** Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*. 2006 Sep 15;66(5):1185-93. Epub 2006 May 2.
- **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.
- **Chastant-Maillard, S., H. Quinton, J. Lauffenburger, N. Cordonnier-Lefort, C. Richard, J. Marchal, P. Mormede, and J. P. Renard. 2003.** Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows *Reproduction* 125:555-563.

- **Chian, R.C., Niwa, K., Nakahara, H.**, 1992. Effect of sperm penetration in vitro on completion of first meiosis by bovine oocytes arrested at various stages in culture. *J. Reprod. Fertil.* 96, 73–78.
- **Chian RC, Park CK, Sirard MA.** Cumulus cells act as a sperm trap during in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1996;45:258
- **Cho HJ, Son WY, Yoon SH Lee SW, Lim JH.** *An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts.* *Human Reproduction*, 2002; 17: 2419-2422;
- **Choi DH, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY.** *Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified blastocysts in an IVF-ET program.* *Fertility and Sterility*, 2000; 74: 838-839;
- **Chrenek, Boulanger L., Heyman Y., Uhrin P., Laurinicik J., Bulla J., Renard J.-P.** *Sexing and multiple genotype analysis from a singlecell of bovine embryo* *Theriogenology* 55: 1071-1081, 2001
- **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.
- **Chung YG, Sarkhel BE, Seidel GE, Jr.** 1996. Effects of fructose, follicle size, and cumulus oocyte quality on bovine embryo development in vitro. *Biol Reprod* 54:90 (abstract).
- **Cox JF, Hormazabal J, Santa Maria A.** Effect of the cumulus cells on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology* 1993;40:1259–67.
- **Danell B** (1987) “Oestrus behaviour, ovarian morphology and cyclic variations in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers” PhD thesis, Uppsala, Sweden: Sveriges Lantbruksuniversiter.
- **Dattena, M.,Mara, L., Bin, T. A., and Cappai, P.** (2007). Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 42–47. doi:10.1002/MRD.20576
- **Diskin M.G., Murphy J.J., Sreenan J.M.** Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal Reproduction Science* 96 (2006) 297–311

- **Del Corso, A., Cappiello, M., Mura, U., 1994.** Thiol dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int. J. Biochem.* 26, 745–750.
- **De La Torre-Sanchez JF, Gardner DK, Preis K, Gibbons J, Seidel GE Jr. 2006a.** Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. II. Effects of three metabolic regulators during post-compaction development. *Reprod Fertil Dev* 18:597–607.
- **De Matos, D. G., C. C. Furnus, D. F. Moses, A. G. Martinez, and M. Matkovic. 1996.** Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability *Molecular Reproduction and Development* 45:451-457.
- **de Matos, D. G. and C. C. Furnus. 2000.** The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53:761-771.
- **de Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG.** Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 2002;57:1443–51.
- **De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Monaco E., Vecchio D., Gasparrini B.** *Vitrificazione di embrioni di bufalo (Bubalus bubalis) mediante il metodo delle Open Pulled Straw (OPS) : effetto dello stadio di sviluppo.* Atti del 3° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, 2005; 266;
- **De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Pellerano G., Campanile G., Gasparrini B.** *Cryotop vitrification for in vitro produced buffalo (Bubalus bubalis) embryos.* *Reproduction, Fertility and Development* 2007: 174;
- **De Rosa A.** 2007 *Crioconservazione di embrioni di bufalo (Bubalus bubalis) prodotti in vitro mediante tecniche innovative di vitrificazione* PhD Thesis Napoli Italia : Federico II
- **Diez Carmen, Pablo Bermejo-Alvarez, Beatriz Trigal, José Nestor Caamano, Marta Munoz, Irene Molina, Alfonso Gutierrez-Adan, Susana Carrocera, David Martin, And Enrique Gomez 2009** Changes in

Testosterone or Temperature During the In Vitro Oocyte Culture Do not Alter the Sex Ratio of Bovine Embryos *Journal Of Experimental Zoology* 311a:448–452

- **Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR. and Johnson LA.** *Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification.* *Biol. Reprod.*, 2000; 62: 564-570;
- **Dode MA, Rodvalho NC, Ueno VG, Fernandes CE.** The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes.. *Anim Reprod Sci.* 2002 Jan 23;69(1-2):15-23.
- **Daneau I, Houde A, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW,** 1995: Bovine SRY gene locus: cloning and testicular expression. *Biol. Reprod.* 52 591-599.
- **Donnay I, Leese HJ.** 1999. Embryos metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol Reprod Dev* 53:171–178.
- **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;
- **Eberhard WG.** *Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice.* Princeton, NJ: Princeton University Press; 1996.
- **Eyestone, W. H., M. L. Leibfriedrutledge, D. L. Northey, B. G. Gilligan, and N. L. First. 1987.** Culture of One-Cell and 2-Cell Bovine Embryos to the Blastocyst Stage in the Ovine Oviduct *Theriogenology* 28:1-7.
- **Eid L, Lorton N, Parrish JS,** 1994: Paternal influence on S-phase in the first cell-cycle of the bovine embryo. *Biol. Reprod.* 51 1232-1237.
- **Ericsson R.J., Langevin C.N., Nashimo M.** Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 253: 421-424 1973
- **Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989.** Co-Culture of Early Cattle Embryos to the Blastocyst Stage with Oviducal Tissue Or in Conditioned Medium *Journal of Reproduction and Fertility* 85:715-720.

- **Farin, P. W. and C. E. Farin. 1995.** Transfer of Bovine Embryos Produced In-Vivo Or In-Vitro - Survival and Fetal Development. *Biology of Reproduction* 52:676-682.
- **Farin, P. W., C. E. Farin, A. E. Crosier, P. Blondin, and J. E. Alexander. 1999.** Effect of in vitro culture and maternal insulin-like growth factor-I on development of bovine conceptuses. *Theriogenology* 51:238.
- **Fissore, R. A., Jackson, K. V., and Kiessling, A. A. (1989).** Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid. *Biol. Reprod.* **41**, 835–841. doi:10.1095/BIOLREPROD41.5.835
- **Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller DJ, Watkins AJ, Eckert JJ.** The embryo and its future. *Biol Reprod* 71: 1046–1054, 2004.
- **Fukuda, Y. and N. Enari.** Developmental ability of in vitro matured-in vitro fertilized bovine embryos derived from oocytes with homogeneous or heterogenous ooplasm 4. Proc.7th World Conf on Anim Prod 2, 276-277. 1993. Abstract
- **Fukui, Y., Fukushima, M. and Ono, H.** Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation in vitro *J Exp Zool.* 1983 Apr;226(1):137-42.
- **Fukui Y.** Effect of follicle cells on acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 1990;26:40–6.
- **Furnus CC, de Matos DG, Moses DF.** Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998;51:76–83
- **Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS.** Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 1997;56:707–19.
- **Gandolfi, F. and R. M. Moor. 1987.** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod Fertil.* 81:23-28.

- **Galli, C. and G. Lazzari. 1996.** Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* 42:371-379.
- **Galli C, Duchi R, Crotti G. and Lazzari G.** *Embryo production by Ovum Pick-up in Water Buffalo.* *Theriogenology*, 1998; 50: 259;
- **Garcia, A. and M. Salaheddine. 1998.** Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50:575-585.
- **Gardner, D. K., and Lane, M. (1993).** Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol. Reprod.* **48**, 377–385. doi:10.1095/BIOLREPROD48.2.377
- **Gardner, D. K. (1994).** Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol. Int.* **18**, 1163–1179. doi:10.1006/CBIR.1994.1043
- **Gardner, D. K., Lane, M., Calderon, I., and Leeton, J. (1996).** Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil. Steril.* **65**, 349–353.
- **Gardner DK. 1998.** Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 49:83–102.
- **Gardner, D. K., Rodrigue-Martinez, H., and Lane, M. (1999).** Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronan for mouse embryo culture and transfer. *Hum. Reprod.* **14**, 2575–2580. doi:10.1093/HUMREP/14.10.2575
- **Gardner DK, Lane M.** Embryo culture systems. In: Trounson AO, Gardner DK, editors. *Handbook of in vitro fertilization* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2000. p. 558.
- **Gardner DK, Lane M. 2002.** Development of viable mammalian embryos in vitro: Evolution of sequential media. In: Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD, editors. *Principles of cloning.* San Diego, CA: Academic Press. pp 187–213.
- **Gardner, D. K., and Sakkas, D. (2003).** Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer. *Placenta* **24**, S5–S12.

- **Gardner, D. K., Stilley, K., and Lane, M.** (2004). High protein diet inhibits inner cell mass formation and increases apoptosis in mouse blastocysts developed *in vivo* by increasing the levels of ammonium in the reproductive tract. *Reprod. Fertil. Dev.* **16**, 190. [Abstract] doi:10.1071/RDV16N1AB136
- **Gasparrini, B., G. Neglia, R. Di Palo, G. Campanile, and L. Zicarelli.** 2000. Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology* 54:1537-1542.
- **Gasparrini 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.
- **Gasparrini B.** (2002) In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. Proc. Annual Conference International Embryo Transfer Society, Foz do Iguassu, Parana, Brasil. *Theriogenology*; 57: 237-256.
- **Gasparrini 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
- **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.** Optimizing reproduction in buffalo through application of biotechnology. In: 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR) 2004; p. 7–12.
- **Gasparrini 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.

- **Gasparrini B, De Rosa A, Attanasio L, Boccia L, Di Palo R, Campanile G, Zicarelli L.** Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci.* 2008 May;105(3-4):354-64.
- **Geshi, M., M. Yonai, M. Sakaguchi, and T. Nagai. 1999.** Improvement of in vitro co-culture systems for bovine embryos using a low concentration of carbon dioxide and medium supplemented with beta-mercaptoethanol. *Theriogenology* 51:551-558.
- **Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Tosti E, Panzella S, 1996:** Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in vitro fertilization improves the implantation rate. *Hum. Reprod.* 11 166–171.
- **Gordon, I.** In G. J. Persley [ed.], *Laboratory production of cattle embryos.* 1994. pp. 170-226.
- **Gordon I.** *Laboratory production of cattle embryos*, 2<sup>nd</sup> edition (2003),352-353
- **Grant V.J., Irwin R.I., Standley N.T., Shelling A.N., and Chamley L.W. 2008** Sex of bovine Embryos may be related to mothers' preovulatory follicular testosterone. *Biol of Reprod.* 78, 812-815
- **Gregorie AT, Gibbon R.** 1965. Glucosyl oligosaccharides of the rabbit genital tract: Effects of ovarian hormone administration. *Int J Fertil* 10:151–157.
- **Greven H, Baldus BB.** 1984. The distribution of monosaccharides and hexosamines in the oviduct of *Salamandra salamandra* (L.) (Amphibia, Urodela). *Comp Biochem Physiol B* 79:229–232.
- **Grisart, B., A. Massip, and F. Dessy. 1994.** Cinematographic Analysis of Bovine Embryo Development in Serum-Free Oviduct-Conditioned Medium. *Journal of Reproduction and Fertility* 101:257-264.
- **Grisart B, Massip A, Collette L, Dessy F, 1995:** The sex ratio of bovine embryos produced in vitro in serum-free oviduct cell-conditioned medium is not altered. *Theriogenology* 43 1907-1106.
- **Guille, J.J.P., Joenje, H., 1991.** Biological significance of oxygen toxicity: an introduction. In: Vigo-Pelfrey, C. (Ed.), *Membrane Lipid Oxidation.* CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 1–32.

- **Gutiérrez A, De La Fuente J, Fuentes S, Payas A, Ugarte C, Pintado B.** 1995. Influence of biopsy sexing and in vitro culture on losses of female mouse and bovine embryos. *Anim Biotech* 6:101–109.
- **Gutierrez-Adan A, Behboodi E, Andersen GB, Medrano JF, Murray JD.** Relationship between stage of development and sex of bovine IVMIVF embryos cultured in vitro versus in the sheep oviduct. *Theriogenology* 46: 515–525, 1996.
- **Gutierrez-Adan A, Oter M, Martínez-Madrid B, Pintado B, De La Fuente J.** Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro-produced bovine embryos at the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev* 55: 146–151, 2000.
- **Gutiérrez-Adán A, Granados J, Pintado B, De la Fuente J.** 2001. Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. *Reprod Fertil Dev* 13:361–365.
- **Gutierrez-Adan A, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, Ramirez M, Moreira P, Pintado B, Lonergan P, Rizos D.** Developmental consequences of sexual dimorphism during pre-implantation embryonic development. *Reprod Domest Anim* 41, Suppl 2: 54–62, 2006.
- **Gutiérrez-Adán A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, de la Fuente J,** 2001: Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55 1117-1126.
- **Gwatkin, R. B. L.** (1966). Amino acid requirements for attachment and outgrowth of the mouse blastocyst *in vitro*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **68**, 335–343.
- **Guyader-Joly C, Khatchadourian C, Menezo Y.** 1996. Comparative glucose and fructose incorporation and conversion by in vitro produced bovine embryos. *Zygote* 4:85–91.
- **Han YM, Abeydeera LR, Kim JH, Moon HB, Cabot RA, Day BN, Prather RS,** 1999: Growth Retardation of Inner Cell Mass Cells in Polyspermic Porcine Embryos Produced In Vitro. *Biol. Reprod.* 60 1110-1113.

- **Hanenberg, E. H. A. T. and van Wagendonk-de Leeuw A.M.** Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocytes effects of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 47, 158. 1997. Abstract
- **Harris, S. E., Gopichandran, N., Picton, H. M., Leese, H. J., and Orsi, N. M.** (2005). Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* **64**, 992–1006. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.01.004
- **Hasler, J. F., W. B. Henderson, P. J. Hurtgen, Z. Q. Jin, A. D. Mccauley, S. A. Mower, B. Neely, L. S. Shuey, J. E. Stokes, and S. A. Trimmer.** 1995. Production, Freezing and Transfer of Bovine Ivf Embryos and Subsequent Calving Results. *Theriogenology* 43:141-152.
- **Hasler, J. F.** 2000. In vitro culture of bovine embryos in Menezo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Animal Reproduction Science* 60:81-91.
- **Hasler, J.F.; Bilby, C.R.; Collier, R.J.; Denham, S.C.; Lucy, M.C.** . (2003) Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program ;59(9):1919-28.
- **Haynes NB, Lamming GE.** 1967. The carbohydrate content of sow uterine flushings. *J Reprod Fertil* 14:335–337.
- **He,Y., Hakvoort,T. B.,Vermeulen, J. L., Lamers,W. H., andVan Roon, M.A.** (2007). Glutamine synthetase is essential in early mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* **236**, 1865–1875. doi:10.1002/DVDY.21185
- **Hendriksen PJM, Bevers MM, Dieleman SJ.** Single IVP using BRL cell co-culture and serum yields a lower blastocyst rate than group culture. *Theriogenology* 1999;51:319.
- **Henkel RR, Shill WB.** 2003. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 1:108
- **Herr C.M., Reed K.C.** *Micromanipulation of bovine embryos for sex determination*  
*Theriogenology* 35(1): 45-54, 1991

- **Hillery, F.L., Parrish, J.J., First, N.L., 1990.** Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology* 33, 249 (Abstract).
- **Hyttel, P., H. Callesen, and T. Greve. 1989.** A Comparative Ultrastructural-Study of In vivo Versus In vitro Fertilization of Bovine Oocytes. *Anatomy and Embryology* 179:435-442.
- **Holm, P. and H. Callesen. 1998.** In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod Nutr. Dev.* 38:579-594.
- **Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H.** High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins *Theriogenology*. 1999 Sep;52(4):683-700.
- **Ho, Y.S., Dey, M.S., Crapo, J.D., 1996.** Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hypoxia. *Am. J. Physiol.* 270, L810–L818.
- **Hollinshead FK, Evans G, Evans KM, Catt SL, Maxwell WMC & O'Brien JK 2004** Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen–thawed sex-sorted and re-frozen–thawed ram spermatozoa. *Reproduction* 127 557–568.
- **Hugentobler, S. A., Diskin, M. G., Leese, H. J., Humpherson, P. G., Watson, T., Sreenan, J. M., and Morris, D. G. (2007).** Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 445–454. doi:10.1002/MRD.20607
- **Hunter, R. H., R. A. Lawson, and L. A. Rowson. 1972.** Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in cattle. *J. Reprod Fertil.* 30:325-328.
- **Hunter, R.H.F., 1989.** Aging of the unfertilized cow egg in vivo: how soon is fertility compromised. *Vet. Rec.* 124, 489–490.
- **Hunter, R.H.F., Greve, T., 1997.** Could artificial insemination of cattle be more fruitful? Penalties associated with aging eggs. *Reprod. Domest. Anim.* 32, 137–142.

- **Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY.** 2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 303:1669– 1674.
- **Ingemarsson I.** Gender aspects of preterm birth. *BJOG* 110, *Suppl* 20: 34–38, 2003.
- **Intermizoo spa :** <http://www.intermizoo.it/index.aspx?m=53&did=51>
- **Iwata H, Shiono H, Kon Y, Matsubara K, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y,** 2008: Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 105 234-244.
- **Jainudeen et al.,** “Ovulation Induction, Embryo Production and Transfer” , *Reproduction in animal farm VI<sup>th</sup> Ed.*
- **Johnson LA** 2000 Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science* 60-61 93–97.
- **James WH.** Are there preconceptional determinants of mammalian sex? A response to Boklage (2005). *Hum Reprod* 2006; 21:2486–2490.
- **Jimenez A, Madrid-Bury N, Fernandez R, Perez-Garnelo S, Moreira P, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A.** Hyperglycemia-induced apoptosis affects sex ratio of bovine and murine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 65: 180–187, 2003.
- **Kaneke S.M., Iizuka R., Oshiro S., Nakajima H., Oshio S., Morhi H.** 1983 Separation of human X- and Y- bearing sperm using free flow electrophoresis. *Proc Japan Acad.* 59: 276-279
- **Katska L, Kauffold P, Smorag Z, Duschinski V, Torner H, Kanitz W.** Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1989;32:767–77.
- **Kawarsky SJ, Basrur PK, Stubbings RB, Hansen PJ, King WA,** 1996: Chromosomal Abnormalities in Bovine Embryos and Their Influence on Development. *Biol. Reprod.* 54 53-59.
- **Kenny DA, Humpherson PG, Leese HJ, Morris DG, Tomos AD, Diskin MG, Sreenan JM.** 2002. Effect of elevated systematic concentrations of

ammonia and urea on the metabolite and ionic composition of oviductal fluid in cattle. *Biol Reprod* 66:1797–1804.

- **Keskintepe, L., C. L. Burnley, and B. G. Brackett. 1995.** Production of Viable Bovine Blastocysts in Defined In-Vitro Conditions. *Biology of Reproduction* 52:1410-1417.
- **Khatir, H., P. Lonergan, J. L. Touze, and P. Mermillod. 1998.** The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non surgical embryo transfer. *Theriogenology* 50:1201-1210.
- **Kim JH, Niwa K, Lim JM, Okuda K. 1993.** Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol Reprod* 48:132–135.
- **Kimura K, Spate LD, Green MP, Roberts RM. 2005.** Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 72:201–207.
- **Kimura Koji, Hisataka Iwata, Jeremy G. Thompson.** The effect of glucosamine concentration on the development and sex ratio of bovine embryos *Animal Reproduction Science* 103 (2008) 228–238
- **King, W. A., B. R. Yadav, K. P. Xu, L. Picard, M. A. Sirard, A. Verini-Supplizi, and K. J. Betteridge. 1991.** The Sex-Ratios of Bovine Embryos Produced In Vivo and In Vitro. *Theriogenology* 36:779-788.
- **Knapen, M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H., Steegers, E.A., 1999.** Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 82, 171–184.
- **Kobayashi S, Isotani A, Mise N, Yamamoto M, Fujihara Y, Kaseda K, Nakanishi T, Ikawa M, Hamada H, Abe K, Okabe M.** Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages. *Curr Biol* 16: 166–172, 2006.

- **Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA**, 2003: Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 77 33–49.
- **Kovacs A, Foote RH**, 1992: Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech. Histochem.* 67 119–24.
- **Kratzer PG, Gartler SM**. 1978. HGPRT activity changes in preimplantation mouse embryos. *Nature* 274:503–504.
- **Kreysing, U., Nagai, T., Niemann, H.**, 1997. Male-dependent variability of fertilization and embryo development in two bovine *in vitro* fertilization systems and the effects of casein phosphopeptides (CPPs). *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 465– 474.
- **Kruuk LE, Clutton-Brock TH, Albon SD, Pemberton JM, Guinness FE**. 1999. Population density affects sex ratio variation in red deer. *Nature* 399:459–461.
- **Kruip, T. A. M. and J. H. G. denDaas**. 1997. *In vitro* produced and cloned embryos: Effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47:43-52.
- **Khurana NK, Wales RG**. 1989. Effects of macromolecules recovered from uterine luminal fluid on the metabolism of [U-14C] glucose by mouse morulae and early blastocysts *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1:89–98.
- **Khurana NK, Niemann H**. 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod* 62:847–856.
- **Kwun J, Chang K, Lim J, Lee E, LeeB, Kang S, Hwang W**. 2003. Effects of exogenous hexoses on bovine *in vitro* fertilized and cloned embryo development: Improved blastocyst formation after glucose replacement with fructose in a serum-free culture medium. *Mol Reprod Dev* 65:167–174.
- **Kuwayama M and Kato O**. *All-round vitrification method for human oocytes and embryos*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2000; 17: 477;
- **Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP**. *Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes*. *Reprod Biomed Online*, 2005a; 11(3): 300-308;

- **Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O.** *Vitrification of human embryos using the CryoTip™ method.* Reproductive BioMedicine Online, 2005b; 11(5): 608-14;
- **Lafleur, M.V.M., Hoorweg, J.J., Joenje, H., Westmijze, E.J., Retel, J.,** 1994. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against single oxygen. *Free Radic. Res.* 21, 9–17.
- **Lance V.A.** 2008. Is regulation of aromatase expression in reptiles the key to understanding temperature-dependent sex determination? *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol* 309A. PMID: 18668631(pubmed-as supplied by publisher)
- **Lange H.** 1996. The euphoria over embryo sexing has subsided : technical problems have been underestimated. *Tiezuachter* 2, 36-37
- **Lane, M., and Gardner, D. K.** (1994). Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J. Reprod. Fertil.* **102**, 305–312.
- **Lane, M., and Gardner, D. K.** (1996). Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum. Reprod.* **11**, 1975–1978.
- **Lane M, Schoolcraft WB. and Gardner DK.** *Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique.* *Fertil. Steril.*, 1999; 2: 1073-1078;
- **Lane, M., and Gardner, D. K.** (2000). Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol. Reprod.* **62**,16–22. doi:10.1095/BIOLREPROD62.1.16
- **Lane, M., Maybach, J. M., Hooper, K., Hasler, J. F., and Gardner, D.K.** (2003). Cryo-survival and development of bovine blastocysts are enhanced by culture with recombinant albumin and hyaluronan. *Mol. Reprod. Dev.* **64**, 70–78. doi:10.1002/MRD.10210
- **Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S, Parnpai R.** *Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid–albumin in*

*IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution.*  
Theriogenology, 2005; 64: 1185–1196;

- **Larson MA, Kimura K, Kubisch HM, Roberts RM.** 2001. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. Proc Natl Acad Sci USA 98:9677–9682.
- **Lazzari, G., G. Crotti, P. Turini, C. Notari, and C. Galli.** Supplementation of essential and non essential aminoacids during IVF improves the quality of bovine embryos fertilised in medium SOF. Proceeding of the Assoc Eur Trans Embr , 180. 1999. Abstract
- **Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruij T, Niemann H, Galli C.** Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. Biol Reprod. 2002 Sep;67(3):767-75.
- **Lee AJ, Twardock AR, Bubar RH, Hall JE, Davis CL.** 1978. Blood metabolic profiles: Their use and relation to nutritional status of dairy cows. J Dairy Sci 61:1652–1670.
- **Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C.** Cyclic adenosine 3=5= monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. Biol Reprod 1996;55:684 – 92.
- **Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C.** Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen species derivatives. Free Rad Biol Med 1997;22: 643–56.
- **Leese HJ, Barton AM.** 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. J Reprod Fertil 72:9–13.
- **Leese, H. J.** (1988). The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod. Fertil.* **82**, 843–856.
- **Leese HJ, Tay JI, Reischl J, Downing SJ.** 2001. Formation of Fallopian tubal fluid: Role of a neglected epithelium. Reproduction 121:339– 346.
- **Leibo SP, Loskutoff NM.** 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology 39:81–94.

- **Lenz, R. W., G. D. Ball, M. L. Leibfried, R. L. Ax, and N. L. First. 1983.** In vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes Are Temperature-Dependent Processes. *Biology of Reproduction* 29:173-179.
- **Le Van T.Y., Chupin D, Draincourt DA.** (1989) Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 19: 171-178.
- **Liang XW, Lu YQ, Chen MT, Zhang XF, Lu SS, Zhang M, Pang CY, Huang FX, Lu KH.** In vitro embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. *Theriogenology*. 2008 Apr 15;69(7):822-6. Epub 2008 Mar 11.
- **Lindner, G. M. and R. W. Wright. 1983.** Bovine Embryo Morphology and Evaluation  
1. *Theriogenology* 20:407-416.
- **Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland P,** 1999: Effect of time interval from insemination to first cleavage on the development characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 117 159-167.
- **Long CR, Chase CN, Balise JJ, Duby RT, Robl JM,** 1993: Effect of sperm removal time, sperm concentration and motility enhancer on fertilization parameters and development of bovine embryos in vitro. *Theriogenology* 39 261.
- **Long CR, Damiani P, Pinto-Correira C, MacLean RA, 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; 102: 361-9
- **Looney, C. R., B. R. Lindsey, C. L. Gonseth, and D. L. Johnson. 1994.** Commercial Aspects of Oocyte Retrieval and In-Vitro Fertilization (Ivf) for Embryo Production in Problem Cows. *Theriogenology* 41:67-72.
- **Ludwig E, LaneM, Bavister BD.** 2001. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. *Biol Reprod* 64:1366–1374.
- **Machadoi GM, Carvalho JO, Siqueira Filho E, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MAN.** Effect of percoll volume, duration and force of

- centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 2009; 71, 1289-1297
- **Madan ML, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS.** In vitro production and transfer of embryos in buffaloes. *Theriogenology* 1994; 41, 139–143.
  - **Mak W, Nesterova TB, de Napoles M, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, Brockdorff N.** Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 303: 666–669, 2004.
  - **Majerus, V., R. De Roover, D. Etienne, S. Kaidi, A. Massip, F. Dessy, and I. Donnay. 1999.** Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology* 52:1169-1179.
  - **Mann T.** 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. New York: Wiley.
  - **Manjunatha B.M, .Ravindra J.P. Gupta P.S.P., Devaraj M, Nandi S.** Effect of breeding season on in vivo oocyte recovery and embryo production in non-descriptive Indian river buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science* 2009; 111:376–383
  - **Mantovani, R., Rota, A., Penzo, N., and Bittante, G.1999.** Comparison among oocytes recovery methods for bovine embryo production in vitro. pp. 235-237. Istituto di Urologia, IRCSS Ospedale Maggiore, Milano. Proceedings ASPA 13th Congress.
  - **Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Thibier M, Thibault C,** 1990: Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. *Reprod. Nutr. Dev.* 30 (2) 259-66.
  - **Marquant-Le Guienne B, Humblot P, Guillon N, Gerard O, Thibier M.** 1992. In vitro fertilization as a tool to evaluate fertility in the bovine. 12th International Congress on Animal Reproduction 2:662±664.
  - **Marchant-Le Guienne B, Nibart M, Guyader C, Kohen G, Esposito L, Thuard JM, Thibier M,** 1992: DNA probe sexing of young in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 37 253.
  - **Marston, J.H., Chang, M.C.,** 1964. The fertilizable life of ova and their morphology following delayed insemination in mature and immature mice. *J. Exp. Zool.* 15, 237–251.

- **Martino A, Songsasen N. and Leibo SP.** *Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling.* Biol. Reprod., 1996; 54: 1059-1069;
- **Maxwell WM, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, De Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK.** Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. Anim Reprod Sci 2004; 82–83: 79–95.
- **McDonald LE.** 1980. Pancreas hormones: Insulin and glucagons. In: Veterinary endocrinology and reproduction. Philadelphia, PA: Lea& Febiger. pp 131–147.
- **McEvoy, T. G., Robinson, J. J., Aitken, R. P., Findlay, P. A., and Robertson, I. S.** (1997). Dietary excesses of urea influence the viability and metabolism of preimplantation sheep embryos and may affect fetal growth among survivors. *Anim. Reprod. Sci.* **47**, 71–90. doi:10.1016/S0378-4320(96)01627-2
- **Mcevoy, T. G., K. D. Sinclair, P. J. Broadbent, K. L. Goodhand, and J. J. Robinson.** 1998. Post-natal growth and development of Simmental calves derived from in vivo or in vitro embryos. Reprod Fertil. Dev. 10:459-464.
- **McMillan, W. H., M. J. Donnison, J. G. Thompson, and S. F. Cox.** 1999. Development during mid to late pregnancy following either in vitro embryo transfer or artificial insemination in cattle. Theriogenology 51:228.
- **Meister A, Tate SS.** Glutathione and the related  $\gamma$ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. Ann Rev Biochem 1976; 45: 559-604
- **Mermillod, P., A. Vansteenbrugge, C. Wils, J. L. Mourmeaux, A. Massip, and F. Dessy.** 1993. Characterization of the Embryotrophic Activity of Exogenous Protein-Free Oviduct-Conditioned Medium Used in Culture of Cattle Embryos. Biology of Reproduction 49:582-587.
- **Merton, J. S., A. P. de Roos, E. Mullaart, L. de Ruigh, L. Kaal, P. L. Vos, and S. J. Dieleman.** 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology 59:651-674.
- **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.

- **Miles JR, Blomberg le A, Krisher RL, Everts RE, Sonstegard TS, Van Tassell CP, et al.** Comparative transcriptome analysis of invivo- and in vitro-produced porcine blastocysts by small amplified RNA-serial analysis of gene expression (SAR-SAGE). *Mol Reprod Dev* 2008;75:976–88
- **Miesel, R., Drzejczak, P.J.E., Kurpisz, M.,** 1993. Oxidative stress during the interaction of gametes. *Biol. Reprod.* 49, 918–923.
- **Misra A.K.** (1997) 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*;141-166;
- **Misra AK.** Embryo transfer technology in buffaloes. Process and developments. In: National Seminar on Recent Advances in Conservation of Biodiversity and Augmentation of Reproduction and Production in Farm Animals, Sardarkrushinagar, India, March 6–7 2005
- **Mittwoch U.** Blastocysts prepare for the race to be male. *Hum Reprod* 8: 1550–1555, 1993.
- **Miyamura, M., Yoshida, M., Hamano, S., Kuwayama, M.,** 1995. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology* 43, 282.
- **Monaco E.,** 2007 *Studio di alcune proteine del fluido oviduttale: effetto dell'osteopontina sulla produzione embrionale in vitro nella specie bovina.* PhD Thesis Napoli Italia : Federico II
- **Nagano, M., Y. Takahashi, and S. Katagiri. 1999.** In vitro fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters  
1. *Journal of Veterinary Medical Science* 61:531-535
- **Nagashima H., Kashiwazaki, N., Ashman R. J., Grupen C. G., Seamark R. F., and Nottle M. B.** *Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling.* *Biol. Reprod.*, 1994; 51: 618–622;
- **Naitana S, Ledda S, Loi P. Leoni G, Bogliolo L, Dattena M, Cappai P.** *Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming*

*solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development.* Animal Reprod Science, 1997; 48: 247-256;

- **Niemann, H. and C. Wrenzycki. 2000.** Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology* 53:21-34.
- **Niwa, K., Park, C.K., Okuda, K.,** 1991. Penetration in vitro of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 91, 329–336.
- **Neglia, G., Marino, M., Di Palo, R., Wilding, M., Caracciolo di Brienza, V., Dale, B., Gasparrini, B., Zicarelli, L.,** 2001. A comparison of in vitro maturation in buffalo (*Bubalus Bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. *Theriogenology* 55, 488.
- **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(56):1123-30.
- **Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R, Zicarelli L.** First pregnancies carried to term after transfer of vitrified buffalo embryos entirely produced in vitro. *Vet Res Commun.* 2004 Aug;28 Suppl 1:233-6.
- **Nothias, J. Y., Majumder, S., Kaneko, K. J., and DePamphilis, M. L.** (1995). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development. *J. Biol. Chem.* **270**, 22 077–22 080. doi:10.1074/JBC.270.38.22077
- **Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E.** Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303: 644–649, 2004.
- **Otoi, T., Tachikawa, S., Kondo, S., Suzuki, T.,** 1993. Effects of different lots of semen from the same bull on *in vitro* development of bovine oocytes fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 39, 713–718.

- **Palasz, A. T., Thundathil, J., Verrall, R. E., and Mapletoft, R. J.** (2000). The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. *Anim. Reprod. Sci.* **58**, 229–240. doi:10.1016/S0378- 4320(99)00090-1
- **Palasz, A. T., Rodriguez-Martinez, H., Beltran-Brena, P., Perez-Garnelo, S., Martinez, M. F., Gutierrez-Adan, A., and De la Fuente, J.** (2006). Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo *in vitro* development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 1503–1511. doi:10.1002/MRD.20516
- **Palma, G.A., Sinowatz, F.,** 2004. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. *Anat. Histol. Embryol.* **33**, 257–262.
- **Parilla I, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA.** Flow cytometry identification of X e Y chromosome-bearing goat spermatozoa. *Reprod. Domest Anim* 2004;54,93-108
- **Parrish, J. J., J. L. Parrish, and N. L. First. 1984.** Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biology of Reproduction* **11**, 2.
- **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL,** 1986: Bovine in vitro fertilization with frozen–thawed semen. *Theriogenology* **25** 591–600.
- **Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL.** 1989. Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* **41**:683–699.
- **Peippo J, Kurkilahti M, Bredbacka P.** 2001. Developmental kinetics if in vitro produced bovine embryos: The effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. *Zygote* **9**:105–113.
- **Perez-Crespo M, Ramirez MA, Fernandez-Gonzalez R, Rizos D, Lonergan P, Pintado B, Gutierrez-Adan A.** Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Mol Reprod Dev* **72**: 502–510, 2005.

- **Pergament E, Fiddler M, Cho N, Johnson D, Holmgren WJ.** Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum Reprod* 9: 1730–1732, 1994.
- **Perreault SD, Barbee RR, Slott VI.** Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988; 125: 181-186.
- **Pinter E, Haigh J, Nagy A, Madri JA.** 2001. Hyperglycemia-induced vasculopathy in the murine conceptus is mediated via reductions of VEGF-A expression and VEGF receptor activation. *Am J Pathol* 158:1199–1206.
- **Plante, L. and W. A. King. 1994.** Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. *J. Assist. Reprod Genet.* 11:515-529.
- **Pollard JW and Leibo S.** *Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos.* *Theriogenology*, 1993; 39: 287;
- **Prather, R.S., Day, B.N.,** 1998. Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology* 49 (1), 23–32.
- **Puglisi R, Balduzzi D, Galli A,** 2004: In vitro sperm penetration speed and its relationship with in vivo bull fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 39 424-428.
- **Ray PF, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH.** Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 104: 165–171, 1995.
- **Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ.** 1992a. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* 4:547–557.
- **Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ.** 1992b. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *J Reprod Fertil* 95:585–595.
- **Rehman N., Collins AR., Suh Tk., Wright Jr. 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 versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002;61:234–48.
- **Rizos D, Gutierrez-Adana A, Perez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P.** Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod* 2003;68:236–43.
- **Robertson, I., Nelson, R.E.,** 1998. *Certification and identification of the embryo.* In: Manual of the International Embryo Transfer Society, 3rd ed, Stringfellow DA, Seidel SM., editors, vol. 9, pp. 103–16
- **Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C. and Suzuki T.** *Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step dehydration.* *Theriogenology*, 1996; 46: 331-343;
- **Sakkas D, Urner F, Menezes Y, Leppens G.** 1993. Effects of glucose and fructose on fertilization, cleavage, and viability of mouse embryos in vitro. *Biol Reprod* 49:1288–1292.
- **Saling PM.** How the egg regulates sperm function during gamete interaction. *Biol Reprod* 1991; 44:246–251.
- **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.*
- **Seidel GE Jr, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD & Cran DG** 1999 Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52 1407–1420.
- **Seshagiri PB, Bavister BD.** 1989. Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol Reprod* 40:599–606.
- **Shamsuddin, M., B. Larsson, H. Gustafsson, S. Gustari, J. Bartolome, and H. Rodriguez-Martinez.** Comparative morphological evaluation of in vivo and in vitro produced bovine embryos. 12th Int Congr Anim.Reprod [3], 1333-1335.

1992.

Abstract

- **Shamsuddin M, Larsson B.** 1993. In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reprod Dom Anim* 28:77±84.
- **Shea B.F.** *Determining the sex of bovine embryos using Polymerase Chain Reaction results: a six-year retrospective study* *Theriogenology* 51: 841-854, 1999
- **Shi DS, Lu KH, Gordon I.** 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology* 33:324.
- **Shi, D.S., Lu, K.H., Gordon, I., Polge, C.,** 1991. Variation in cleavage and embryonic development of bovine oocytes *in vitro* fertilized with different bull ejaculates. *Theriogenology* 35, 271 (Abstract).
- **Schini SA, Bavister BD.** 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod* 39:1183–1192.
- **Scott L, Whittingham DG.** 2002. Role of facilitative glucose uptake in the glucose-inorganic phosphate-mediated retardation and inhibition of development in different strains of mouse embryos. *Reproduction* 123:691–700.
- **Sinclair, K. D., P. J. Broadbent, and D. F. Dolman. 1995.** In-Vitro Produced Embryos As A Means of Achieving Pregnancy and Improving Productivity in Beef-Cows. *Animal Science* 60:55-64.
- **Sinclair, K. D., T. G. Mcevoy, E. K. Maxfield, C. A. Maltin, L. E. Young, I. Wilmut, P. J. Broadbent, and J. J. Robinson. 1999.** Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes. *Journal of Reproduction and Fertility* 116:177-186.
- **Sirard, M.A., Florman, H., Leibfried-Rutledge, M.L., First, N.L.,** 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 40, 1527–1563.
- **Smith, C. 1988.** Applications of Embryo Transfer in Animal Breeding. *Theriogenology* 29:203-212.

- **Smith, C. and Ruane J. 1987.** Use of sib testing as a supplement to progeny testing to improve the genetic merit of commercial semen in dairy cattle. *Can. J. anim. Sci.* 67:985-990.
- **Spilman CH, DUBY RT, Black DL.** 1970. Effect of an intrauterine device on sheep oviduct fluids: Chemical composition and stimulation of spermatozoan respiration in vitro. *Biol Reprod* 3: 76–81.
- **Spindle, A. I., and Pedersen, R. A.** (1973). Hatching, attachment, and outgrowth of mouse blastocysts *in vitro*: fixed nitrogen requirements. *J. Exp. Zool.* **186**, 305–318. doi:10.1002/JEZ.1401860308
- **Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, Rall WF, Pitt RE, Lin TT, MacIntyre RJ.** *Cryopreservation of Drosophila melanogaster embryos.* *Nature*, 1990 May 10; 345(6271): 170-2;
- **Stojkovic, M., Kolle, S., Peinl, S., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Thompson, J. G., Wenigerkind, H., Reichenbach, H. D., Sinowatz, F., and Wolf, E.** (2002). Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen–thawed bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* **124**, 141–153. doi:10.1530/REP.0.1240141
- **Sucha R, Ulcova-Gallova Z, Pavelkova-Seifertova P, Krizanovska K, Bouse V, Svabek L, Rokyta P, Balvin M, Pecen L, Rokyta Z.** 2002. Fructose and glucose in follicular fluid and serum of women undergoing stimulation in an in vitro fertilization program. *Ceska Gynekol* 67:144–148.
- **Suga T, Masaki J.** 1973. Studies on the secretions of the cow 6. Sugar and polyol constituents in the luminal fluid of the bovine uterus. *Jpn J Anim Reprod* 18:143–147.
- **Suh, R. S., Phadke, N., Ohl, D. A., Takayama, S., and Smith, G. D.** (2003). Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidics. *Hum. Reprod. Update* **9**, 451–461. doi:10.1093/HUMUPD/DMG037
- **Sumantri C, Boediono A, Ooe M, Murakami M, Saha S, Suzuki T,** 1997: The effect of sperm-oocyte incubation time on in vitro embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. *Anim. Reprod. Sci.* **48** 187–195.

- **Takahashi T, First NL.** 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 37:963–978.
- **Taylor DM, Handyside AH, Ray PF, Dibb NJ, Winston RM, Ao A.** Quantitative measurement of transcript levels throughout human preimplantation development: analysis of hypoxanthine phosphoribosyl transferase. *Mol Hum Reprod* 7: 147–154, 2001.
- **Teepker, G. and D. S. Keller.** 1989. Selection of sires originating from a nucleus breeding unit for use in a commercial dairy population. *Can. J. anim. Sci.* 69:595-604.
- **Tesarik J.,** 1993 Metabolism of human preimplantation embryos. Preconception and preimplantation diagnosis of human genetic diseases, ed R.G. Edwards. Cambridge University Press. 43-79.
- **Tervit H. R., Whittingham D. G., Rowson L.E.** 1972 Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*; 30 (3): 493-497;
- **Thompson, J. G., N. W. Allen, L. T. McGowan, A. C. Bell, M. G. Lambert, and H. R. Tervit.** 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology* 49:1239-1249.
- **Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Tervit HR.** 1992. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 31:253–257.
- **Thompson, J. G., D. K. Gardner, P. A. Pugh, W. H. McMillan, and H. R. Tervit.** 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* 53:1385-1391.
- **Thompson JG, Peterson AJ.** 2000. Bovine embryo culture in vitro: New developments and post-transfer consequences. *Hum Reprod* 15:59–67.
- **Thundathil J, de Lamirande E, Gagnon C.** Different signal transduction pathways are involved during human sperm capacitation induced by biological and pharmacological agents. *Mol Hum Reprod* 2002;8:811– 6.

- **Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA.** Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J Reprod Fertil* 93: 125–132, 1991.
- **Tsunoda Y, Tokunaga T, Sugie T.** 1985. Altered sex ratio of live young after transfer of fast- and slow-developing mouse embryos. *Gam Res* 12:301–304.
- **Turner K., Goldstein D, and Rogers A** 1992 Variation in the dry mass of mouse embryos throughout the preimplantation period. *Hum Reprod.*: 112-116
- **Valdivia RP, Kunieda T, Azuma S, Toyoda Y.** PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured in vitro. *Mol Reprod Dev* 35: 121–126, 1993.
- **Van Blerkom, J.** (1991). Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 5031–5035. doi:10.1073/PNAS.88.11.5031
- **Van der Elst J, Verheyen G. and Van Steirtegehem A.** Cryoconservation: *Sperms and Oocytes. Manual on Assisted Reproduction*, Rabe T., Diedrich K., Runnebaum B. (ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997; 223-251;
- **Van Soom, A., Van, I, A. R. Mahmoudzadeh, H. Deluyker, and A. de Kruif.** 1992. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38:905-919.
- **van Wagtenonk-de Leeuw AM, B. J. Aerts, and J. H. den Daas.** 1998. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 49:883-894.
- **van Wagtenonk-de Leeuw AM, E. Mullaart, A. P. de Roos, J. S. Merton, J. H. den Daas, B. Kemp, and L. de Ruigh.** 2000. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53:575-597.
- **Van Wagtenonk-de Leeuw AM, Den Daas JHG. and Rall WF.** *Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: Vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution.* *Theriogenology*, 1997; 48: 1071-1084;

- **Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H.** *Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in straw-straw rehydration.* *Animal Reproduction Science*, 1996; 45: 191-200;
- **Vajta, G., P. Holm, T. Greve, and H. Callesen. 1996.** Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology* 45:683-689.
- **Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T. and Callesen H.** *Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.* *Mol. Reprod. Dev.*, 1998; 51: 53-58;
- **Vajta G, Peura TT, Holm P, Pa'ldi A, Greve T, Trounson AO, et al.** New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the well of the well (WOW) system. *Mol Reprod Dev* 2000;55:256–64.
- **Vecchio D, Neglia G, Di Palo R, Prandi A, Gasparrini B, Balestrieri A, D'Occhio MJ, Zicarelli L, Campanile G.** Is a delayed treatment with GnRH, HCG or progesterone beneficial for reducing embryonic mortality in buffaloes? *Reprod Domest Anim.* 2010 Aug;45(4):614-8.
- **Vieira AD, Forell F, Feltrin C, Rodrigues JL.** *In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes.* *Theriogenology*, 2006 in press;
- **Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS.** Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995;121:1129–37.
- **Visconti PE, Kopf GS.** Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998;59:1– 6.
- **Wales RG, Du ZF.** 1993. Contribution of the pentose phosphate pathway to glucose utilization by preimplantation sheep embryos. *Reprod Fertil Dev* 5:329–340
- **Walker, S. K., K. M. Hartwich, and R. F. Seamark. 1996.** The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology* 45:111-120.
- **Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P.** Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the

implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. *Mol Reprod Dev.* 2001 Sep;60(1):47-55.

- **Ward F, Enright B, Rizo 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 May;57(8):2105-17.
- **Wenigerkind H, Glibotic J, Diessling S, Stojkovic M, Aumuller R, Schernthaner W, Wolf E, Brem G,** 1999: Effects of different systems for IVP of bovine embryos on birth weight and sex ratio of calves - a field study. *Biol. Reprod.* 60 (1) 267.
- **Weinberg CR, Baird DD, Wilcox AJ.** The sex of the baby may be related to the length of the follicular phase in the conception cycle. *Hum Reprod* 1995; 10:304–307.
- **Wheeler, M. B., Walters, E. M., and Beebe, D. J.** (2007). Toward culture of single gametes: the development of microfluidic platforms for assisted reproduction. *Theriogenology* 68(Suppl. 1), S178–S189.doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.04.042
- **Wei, H., Fukui, Y.,** 2000. Fertilisability of ovine, bovine or minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) spermatozoa intracytoplasmic injected into bovine oocyte. *Zygote* 8, 267–274.
- **Whitten, W. K.** 1956. Culture of tubal mouse ova. *Nature* 177, 96–97. doi:10.1038/177096A0
- **Whitten, W. K.** 1957. Culture of tubal ova. *Nature* 179, 1081–1082. doi:10.1038/1791081A0
- **Whitten, W. K., and Biggers, J. D.** (1968). Complete development *in vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* 17, 399–401.
- **Whittingham, D. G.** (1971). Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 14, 7–21.
- **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.

- **Wongsrikeao P, Budiyo A, Ooki R, Teniguchi M, Otoi T.** 2005. Effects of hexoses supplemented in the maturation and pre implantation medium on the in vitro development of porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 17:226 (abstract).
- **Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Lemme E, Korsawe K, Niemann H.** In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 66: 127–134, 2002.
- **Wu, L., G. E. Exley, and C. M. Warner.** 1998. Differential expression of Ped gene candidates in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 59:941-952.
- **Wurth YA, Boni R, Hulshof SCJ, Kruip ThAM.** Bovine embryo production in vitro after selection of ovaries, follicles and oocytes. In: Wurth YA, Bovine Embryo Production In Vitro. Influencing Factors. Utrecht, The Netherlands: Utrecht University Press; 1994: 67–85. Thesis
- **Wurth YA, Kruip ThAM.** Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes. In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction (ICAR); August 23–27, 1992; The Hague, The Netherlands. 1992; 1:387–389.
- **Xu KP, Yadav BR, King WA, Betteridge KJ,** 1991: Sex related differences in the development of bovine embryos produced in vitro. *Biol. Reprod.* 44 (1) 97.
- **Xu, K. P., B. R. Yadav, W. A. King, and K. J. Betteridge.** 1992. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol. Reprod Dev.* 31:249-252.
- **Yamauchi, N., H. Sasada, E. Soloy, T. Dominko, K. Kikuchi, and T. Nagai.** 1999. Effects of hormones and osmolarity in the culture medium on germinal vesicle breakdown of porcine oocytes. *Theriogenology* 52:153-162.
- **Yanagimachi R.** Male Gamete Contributions to the Embryo. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1061: 203-207 (2005).
- **Yadav BR, King WA; Betteridge KJ,** 1993: Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex and

developmental rates of bovine embryos generated in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 36 434-439.

- **Yadav, B.R., Katiyar, P.K., Chauhan, M.S., Madan, M.L.,** 1997. Chromosome configuration during in vitro maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. *Theriogenology* 47, 943–951.
- **Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, 1994. p. 189–318.
- **Yu, B.,** 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Phys. Rev.* 74, 139–162.
- **Zhang, B.R., Larsson, B., Lundeheim, N., Haard, M.G.M., Rodriguez-Martinez, H.,** 1999. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-program. *Int. J. Androl.* 22, 253–260.
- **Zheng-guang Wang, Song-dong Yu \*, Zi-rong Xu.** Improvement in bovine embryo production in vitro by treatment with green tea polyphenols during in vitro maturation of oocytes. *Animal Reproduction Science* 100 (2007) 22–31
- **Zicarelli L.** (1997) Superovulatory response in buffaloes bred in Italy. Third Course on Biotechnology of Reproduction in buffaloes, Caserta, Italy, 167-188;
- **Zicarelli L.** Biotechnologie riproduttive nell'allevamento bufalino. Atti 1° Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, Eboli (SA), Italy, (2001) 3-5 ottobre; 163-179;
- **Zicarelli L.** Advanced reproductive technologies for improving buffalo production. Proceedings of the 1st Buffalo Symposium of Americas; (2002) September 1-8, Belèm, Parà, Brazil: 186-205.
- **Zuelke, K.A., Jeffay, S.C., Zucker, R.M., Perreault, S.D.,** 2003. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 64, 106–112.