IRIS AperTO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino

Vitrificazione dell’ovocita equino: esperienze preliminary

This is the author's manuscript

Original Citation:

Availability:

This version is available http://hdl.handle.net/2318/26687 since

Terms of use:

Open Access

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available under a Creative Commons license can be used according to the terms and conditions of said license. Use of all other works requires consent of the right holder (author or publisher) if not exempted from copyright protection by the applicable law.

(Article begins on next page)

04 May 2024

VITRIFICAZIONE DELL'OVOCITA EQUINO: ESPERIENZE PRELIMINARI

VITRIFICATION OF EQUINE OOCYTE: FIRST TRIALS

TIZIANA NERVO*, *Med Vet, PhD* **- CARLO SEMITA*,** *Med Vet, PhD*
ROBERTA BRACHET COTA^, *Med Vet* **- DANIELA LOCONTE§**
** Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino, Grugliasco (TO)*
^Libero professionista, Torino
§ Dottore in Produzioni Animali, Gestione e Conservazione della Fauna, Torino

Riassunto

La possibilità di crioconservare il gamete equino femminile aprirebbe nuove frontiere alla fecondazione assistita in tale specie. Lo scopo di questo lavoro è stato sottoporre a vitrificazione ovociti equini immaturi con cumulo ooforo compatto, prelevati da ovaie di cavalle sottoposte a macellazione commerciale, e di verificarne, al successivo scongelamento, la sopravvivenza e la reazione alla maturazione *in vitro* (IVM). A tal fine 119 ovociti compatti sono stati vitrificati in Open Pulled Straw (OPS) da 0,25 ml, secondo la metodica di Hochi et al[4,5]. Dopo scongelamento, i 113 (94,96%) gameti che non presentavano danni evidenti allo stereomicroscopio sono stati sottoposti a IVM e in 18 casi (15,93%) è stata osservata l'estrusione del globulo polare (GP), considerato segno di maturazione nucleare avvenuta. Il 43,65% degli ovociti di controllo aveva estruso il GP dopo IVM. Sottoponendo le percentuali di IVM dei due gruppi a *t*-Test per il confronto delle medie, si è osservata una differenza statisticamente significativa con un valore di p<0,001. I dati ottenuti non si discostano molto da quelli descritti in bibliografia[6]. Si tratta comunque di un traguardo confortante, dal momento che, per quanto la percentuale di ovociti maturi post scongelamento non sia elevata, testimonia l'effettiva possibilità di sottoporre il gamete femminile equino a questa manipolazione.

Summary

The cryopreservation of equine oocytes could represent an alternative technique in assisted reproduction in horses. Aim of this work is to determine post-thawing survival and in vitro *maturation (IVM) rates of immature equine oocytes that were collected from slaughterhouse ovaries and either vitrified. 119 immature oocytes enclosed by compact-cumulus cells were subjected to vitrification in Open Pulled Straws (OPS) (0.25 ml), according to Hochi et al. technique[4, 5]. After thawing, 113 (94.96%) gametes without any structural injury visible at stereomicroscopy were submitted to IVM. After IVM, 18 (15.93%) oocytes presented extrusion of the polar body (PB), considered symptom of nuclear maturation. In the control group, 43.65% of the oocytes showed PB extrusion after IVM. Differences within the means of the percentages of oocytes reaching maturation in the two groups were evaluated by* t*-Test and it was found a statistically significant difference (p<0.001) between them. Obtained data are similar to those reported in literature[6]. Although the post-thawing maturation rate is not so high, the results are encouraging and demonstrate the possibility to apply this technique to the equine oocyte.*

INTRODUZIONE

Un valido protocollo di crioconservazione dei gameti e degli embrioni è di fondamentale importanza per preservare a tempo indeterminato il materiale genetico di soggetti di pregio. Il congelamento degli ovociti è stato utilizzato con successo in diverse specie di mammiferi, quali il topo, il bovino, l'uomo, nonché il cavallo, specie nella quale gli studi sono al momento piuttosto limitati[11].

I protocolli tradizionali di crioconservazione si fondano su di un abbassamento lento e graduale della temperatura che sottoponga la cellula, caricata all'interno di una *paillette* da 0,25 ml, al minore stress possibile. A –6°C la *paillette* viene toccata con una pinza pre-raffreddata (*seeding*), il che permette di ottenere un abbassamento della temperatura controllato che eviti la formazione di cristalli di ghiaccio potenzialmente dannosi per le strutture cellulari. La vitrificazione è il processo fisico che porta alla solidificazione di una soluzione senza formazione di cristalli di ghiaccio. Ciò richiede sia un abbassamento ultra rapido della temperatura, sia un incremento della viscosità del mezzo, oltre che l'impiego di sostanze crioprotettrici che deprimano la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula. La vitrificazione presenta il vantaggio di ridurre i danni da freddo in quanto il passaggio da +15°C a -5°C, range di temperatura di particolare delicatezza, avviene con molta rapidità, con minor compromissione dell'organizzazione dei lipidi di membrana, delle gocce lipidiche e del cito-

scheletro[11]. D'altra parte, aumenta il rischio di danni osmotici e da tossicità dei crioprotettori; la riduzione di tale effetto è uno dei campi a cui i ricercatori pongono maggiore attenzione proponendo sostanze e combinazioni diverse[11].

I fattori che incidono sulla vitrificazione sono quindi la velocità di abbassamento della temperatura, la viscosità ed il volume. Aumentando la viscosità o la velocità di raffreddamento, o riducendo il volume, si ha un incremento delle probabilità di riuscita della vitrificazione[1].

I supporti maggiormente utilizzati per la vitrificazione degli ovociti sono le OPS (Open Pulled Straw), paillettes da 0,25 ml riscaldate e tirate sulla fiamma, in modo da ottenere un restringimento del loro diametro. Tali supporti, come dimostrato in uno studio effettuato sugli ovociti di topo, permettono, rispetto alle paillettes classiche, di ottenere post-vitrificazione una maggiore percentuale di ovociti con un fuso meiotico normale, dato che i microtubuli sono tra le strutture maggiormente soggette ai danni da freddo[5].

Nel corso degli ultimi anni, la ricerca più importante sulla vitrificazione dell'ovocita equino è da riferirsi al lavoro di Mclellan et al.[7] che, sottoponendo a vitrificazione e scongelamento ovociti recuperati da cavalle stimolate o meno farmacologicamente, li trasferirono in riceventi ed ottennero l'8% di gravidanza e la nascita di due puledri vivi e vitali.

MATERIALI E METODI

Sono state utilizzate 107 ovaie di cavalle con anamnesi riproduttiva sconosciuta sottoposte a macellazione commerciale nel corso di un anno solare. Immediatamente dopo l'eviscerazione, le gonadi sono state separate da utero e salpingi, lavate con soluzione fisiologica tiepida (25°C circa) e trasportate in laboratorio immerse nella medesima soluzione in un contenitore termostatato. La lavorazione ha avuto inizio entro 3 ore dalla macellazione. I follicoli presenti sulle gonadi sono stati incisi e la parete interna delicatamente "grattata" tramite curette da ossa (*scraping*) per liberare l'ovocita eventualmente presente, quindi sono stati lavati a pressione con soluzione fisiologica. I 341 complessi ovociti-cumulo (COCs) recuperati sono stati suddivisi secondo la morfologia del cumulo. I COCs espansi sono stati maturati *in vitro* (IVM) come descritto in precedenti lavori[8,9] (gruppo di controllo); mentre i compatti sono stati vitrificati in Open Pulled Straw (OPS) da 0,25 ml, secondo la metodica di Hochi et al.[4,5] parzialmente modificata. Quelli nudi sono stati eliminati.

Per la vitrificazione sono state utilizzate due soluzioni a concentrazione crescente di crioprotettore: EFS_A (10% FCS, 2,5 M Glicole Etilenico, 18% Ficoll, 0,5 M Saccarosio in TCM-199) ed EFS_B (10% FCS, 5M Glicole Etilenico, 18% Ficoll, 0,5 M Saccarosio in TCM-199). I COCs, in gruppi di tre al massimo, sono stati esposti alle due soluzioni per 30", quindi sono stati caricati, insieme con una quantità minima di EFS_B, in OPS da 0,25 ml tirate alla fiamma ed immerse direttamente in azoto liquido.

Per lo scongelamento, sono state utilizzate tre soluzioni a concentrazione decrescente di zucchero: S_A (10% FCS, 0,25 M Saccarosio in TCM-199), S_B (10% FCS, 0,15 M Saccarosio in TCM-199) ed S_C (10% FCS in TCM-199). Le OPS sono state immerse rapidamente nella soluzione S_A, e i COCs, fatti fuoriuscire per capillarità, sono stati lasciati in S_A per 1 minuto.

Quindi sono stati trasferiti in S_B per 5 minuti e poi lavati per due volte in S_C. Infine sono stati posti in terreno di IVM ed incubati a 38,5°C e 5% di CO_2 per 42h, tempo necessario per ottenere la maturazione di COCs con cumulo compatto "a fresco". Trascorso questo intervallo di tempo, i COCs sono stati privati dei cumuli, chimicamente (con Ialuronidasi e Tripsina) e meccanicamente, utilizzando capillari di vetro di diametro decrescente, poi sono stati osservati morfologicamente allo stereomicroscopio, per valutare l'organizzazione citoplasmatica e l'eventuale estrusione del globulo polare (GP), considerato segno di maturazione nucleare avvenuta.

Un certo numero di COCs vitrificati è stato sottoposto a colorazione con Tripan Bleu per valutare la vitalità degli ovociti e delle cellule del cumulo dopo la vitrificazione.

RISULTATI

Sono stati sottoposti alla procedura di *scraping* 530 follicoli presenti sulle 107 gonadi di cavalle utilizzate (4,95 follicoli/ovaia) e sono stati recuperati 341 COCs (0,64 COCs/follicolo; 3,19 COCs/ovaia). Tra questi, 211 (61,88%) COCs sono stati classificati come espansi, 119 (34,90%) compatti e 11 (3,23%) nudi (Tab. 1).

Dopo vitrificazione e scongelamento, i 113 (94,96%) COCs compatti immaturi che non presentavano danni evidenti allo stereomicroscopio sono stati sottoposti a loro volta ad IVM per 42h e in 18 (15,93%) è stata osservata l'estrusione del globulo polare (GP), considerato segno di maturazione avvenuta (Tab. 2).

Osservando i 181 ovociti di controllo rimasti integri dopo IVM (88,73%), l'estrusione del GP era avvenuta in 79 (43,65%) di essi. Sottoponendo le percentuali di IVM dei due gruppi a *t*-Test per il confronto delle medie, si è osservato un valore di $p<0,001$, pertanto la differenza è risultata statisticamente significativa.

Tabella 1
Recupero di COCs da ovaie equine sottoposte a *scraping*

N° ovaie	*N° Foll (F/ov)*	*N° COCs (COCs/ov)*	*COCs comp (%)*	*COCs esp (%)*	*COCs nudi (%)*
107	**530**	**341**	**119**	**211**	**11**
		(3,19)	**(34,90)**	**(61,88)**	**(3,23)**

Tabella 2
Risultati di IVM di COCs compatti sottoposti a vitrificazione

N° COCs vitrificati	*N° COCs scongelati (%)*	*N° COCs maturi (%)*
119	**113 (94,96)**	**18 (15,93)**

DISCUSSIONE

Nel torinese la macellazione commerciale equina non è pratica frequente il che ha fatto sì che non sempre sia stato possibile ottenere un numero sufficiente di ovociti compatti da destinare alla vitrificazione. Infatti si è osservato, anche nel corso di altre sperimentazioni effettuate presso il nostro laboratorio[10] così come da altri Autori[2,3], che durante la stagione riproduttiva è più facile recuperare ovociti espansi piuttosto che compatti, quale indice di maggior competenza meiotica degli stessi.

La scelta di sottoporre a vitrificazione esclusivamente gli ovociti compatti è stata dettata dalla ricerca bibliografica, dal momento che pressoché tutti gli Autori[4,6] si trovano concordi su questa scelta, giustificata da una certa protezione che le cellule del cumulo sono in grado di offrire al gamete nel momento in cui viene sottoposto ad un forte stress termico.

La metodica di vitrificazione utilizzata ha presentato diversi problemi di ordine pratico, a partire dalla produzione di OPS tirate alla fiamma, fino alla vera e propria procedura di vitrificazione e scongelamento. La percentuale di maturazione post scongelamento è risultata ancora inferiore rispetto ai dati osservati in bibliografia[6] o al massimo in media con essi[4], ma ciò è senz'altro da imputare ad una metodica non ancora perfettamente affinata. Ci si è infatti resi conto che pochi secondi di incertezza nelle procedure possono influenzare notevolmente la possibilità di una successiva IVM post scongelamento, in parte perché i crioprotettori hanno un potere tossico sulla cellula e quindi i gameti vanno esposti ad essi con gradualità e per brevissimi periodi di tempo, e poi perché l'abbassamento della temperatura, per non causare danni al citoscheletro, deve essere estremamente rapido per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio che scompaginerebbero l'organizzazione cellulare. Allo stesso modo, lo scongelamento deve essere rapido e gli ovociti vanno immediatamente reidratati in soluzioni a concentrazioni decrescenti di crioprotettore che deve essere eliminato del tutto con lavaggi sequenziali.

Il *t-test* per il confronto delle medie ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i parametri esaminati.

Nella maggior parte (73,45%) degli ovociti che sono stati scongelati e sottoposti ad IVM è stata osservata degenerazione citoplasmatica. Non sono però state osservate alterazioni della membrana citoplasmatica e della zona pellucida se non in rari casi.

Ci è sembrato interessante sottoporre a colorazione vitale con Tripan Bleu un campione di prova, non compreso in questi dati, al fine di valutare la vitalità cellulare subito dopo lo scongelamento e prima che gli ovociti venissero sottoposti a IVM (Figg. 1, 2). Visto che, nella maggior parte dei casi, la colorazione ha mostrato citoplasmi vitali e cellule del cumulo solo in percentuale minima disvitali, si può affermare che gli ovociti sopravvivono alla vitrificazione, ma non alla successiva IVM. Purtroppo il Tripan Bleu risulta estremamente tossico per gli ovociti che degenerano in pochi minuti e pertanto non è possibile effettuare un controllo crociato sottoponendo gli stessi gameti ad IVM, ma senz'altro la vitalità post scongelamento è un dato interessante.

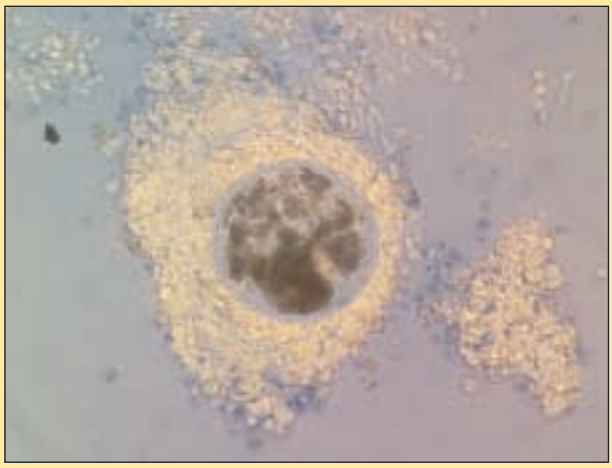

FIGURA 1 - Colorazione vitale Tripan Bleu: ovocita e cumulo ooforo vitali dopo vitrificazione e scongelamento.

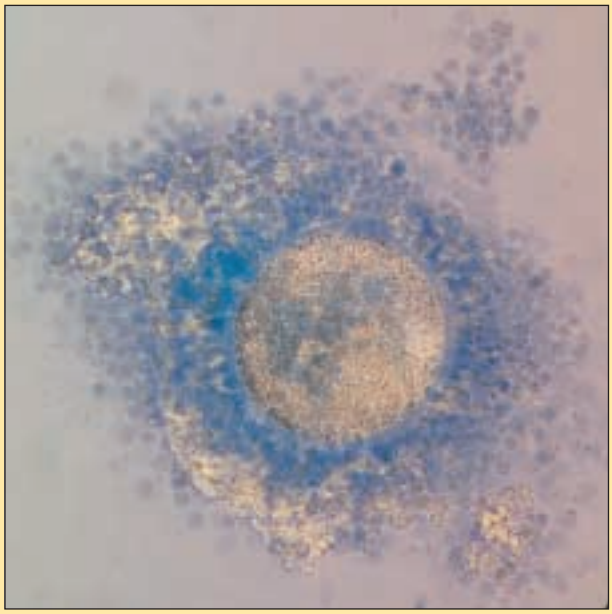

FIGURA 2 - Colorazione vitale Tripan Bleu: ovocita e cumulo ooforo parzialmente disvitali (blu) dopo vitrificazione e scongelamento.

La crioconservazione dell'ovocita equino è un capitolo delle biotecnologie ancora totalmente in fase sperimentale. I lavori effettuati in merito sono scarsissimi, così come i risultati pubblicati. La sperimentazione descritta si è inserita in questo ambito quale minimo contributo alla ricerca della possibilità di utilizzare questa pratica in futuro nell'ippiatria.

Oggi il cavallo è considerato spesso molto importante commercialmente dal punto di vista sportivo o genetico e le tecnologie della riproduzione si sono incredibilmente

sviluppate, tanto da poter essere paragonate, per quantità e qualità, solo a quelle utilizzate in medicina umana. Purtroppo molto di quel che concerne la biologia cellulare dei gameti e dell'embrione equino è ancora poco conosciuto, ma senz'altro rappresenta una sfida per la ricerca.

Dai risultati esposti, si può concludere che la vitrificazione dell'ovocita equino è possibile, tuttavia, i risultati non sono ancora buoni e pertanto sarà necessario affinare le metodiche, probabilmente utilizzando anche dei crioprotettori differenti che causino uno stress minore ai gameti. La metodica dovrà essere in qualche modo semplificata per cercare di ridurre al minimo la possibilità di errore o di imprecisione che talvolta si è rivelata fatale per gli ovociti utilizzati in questo lavoro.

Va infine considerato che le OPS, per quanto in grado di fornire dei buoni risultati, non sono comunque un supporto idoneo alla conservazione commerciale delle cellule, dal momento che, essendo aperte su entrambi i lati non possono assicurare una corretta igiene del contenuto, per quanto conservato in azoto liquido.

La possibilità di crioconservare il gamete femminile permetterebbe di creare delle banche di germoplasma di fattrici di pregio alle quali attingere per ovviare a svariati problemi di ipofertilità. In particolare, la possibilità di recuperare gli ovociti dalla cavalla in vita attraverso l'Ovum Pick-up permetterebbe di creare uno stock non "a termine" come avviene utilizzando ovaie espiantate dopo macellazione o ovariectomia.

Parole chiave

Fattrice, ovocita, crioconservazione, vitrificazione.

Key words

Mare, oocyte, cryoconservation, vitrification.

Bibliografia

1. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H (2002). New trends in gamete's cryopreservation. Molecular and Cellular Endocrinology. 187, 77-81.
2. Hinrichs K, Schmidt AL (2000) Meiotic competence in horse oocytes interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology and season. Biol. Reprod. 62, 1402-1408.
3. Hochi S, Choi Yh, Braun JW, Sato K, Oguri N (1993). Factors affecting the recovery of follicular oocytes from horses and their in vitro maturation. Jap.J.Eq. Sci. 4,145-150
4. Hochi S, Fujimoto T, Oguri N (1995). Viability of immature horse oocytes cryopreserved by vitrification. Theriogenology. 43 (1), 236.
5. Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N (1996). In vitro maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. Cryobiology. 33, 300-310.
6. Hurtt AE, Landim Alvarenga F, Seidel Jr GE, Squires EL (2000). Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, Ficoll and sucrose solution using OPS. Theriogenology. 54, 119-128.
7. Maclellan LJ, Carnevale EM, Countinho da Silva MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL (2002). Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from superstimulated and non stimulated mares. Theriogenology. 58, 911-919.
8. Nervo T, Ponzio P, Vincenti L (2004). Recupero e maturazione in vitro di ovociti equini in due diversi momenti dell'anno: esperienza preliminare. Atti del II Congresso della Società Italiana di Riproduzione Animale. 102-104.
9. Nervo T, Pillitteri C (2005). Esperienze di Maturazione in vitro (IVM) degli ovociti nella specie equina. Atti 7° Convegno Nuove acquisizioni in materia di ippologia. 192-197.
10. Pillitteri C. Tesi di Laurea: Fecondazione "in vitro" nella specie equina: maturazione degli ovociti (Anno Accademico 2003-2004). Università degli Studi di Torino, Facoltà di Medicina Veterinaria. 96.
11. Vajta G, Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals (2000). Anim Reprod Science. 60-61, 357-364.