Vitrificazione dell'ovocita di cavalla pre maturazione *in vitro*

Tiziana Nervo[1], *DMV, PhD* - **Carlo Semita**[1], *DMV, PhD* - **Roberta Leone**[2], *DMV*
Valeria Rossi[3], *DMV* - **Giuseppe Quaranta**[1], *DMV, PhD*
[1] *Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino - Via Leonardo Da Vinci, 44 10095 Grugliasco (TO), Italia*
[2] *Libero Professionista - Via Canton Clare, 52 - Rivarolo (TO), Italia*
[3] *Libero Professionista - Via Arduino, 25 - Torino, Italia*

RIASSUNTO

La criopreservazione degli ovociti rappresenta l'opzione elettiva per la salvaguardia del patrimonio genetico femminile nei mammiferi. L'ovocita equino appare particolarmente sensibile al congelamento classico, pertanto sono allo studio vari protocolli di vitrificazione. Scopo del lavoro è stato vitrificare ovociti immaturi, reperiti da ovaie di cavalle macellate, per poi maturarli ed attivarli *in vitro* per testarne la competenza meiotica. 111 complessi cumulo-ovocita (COCs) compatti sono stati vitrificati in Open Pulled Straw (OPS), quindi i 97 COCs considerati idonei dopo scongelamento sono stati sottoposti ad IVM (*In Vitro* Maturation), come descritto dagli Autori in lavori precedenti[9,10], risultando maturi nel 30,93% dei casi. Il controllo, rappresentato da 118 COCs freschi, ha fornito il 57,63% di maturazione. Gli ovociti maturi di entrambi i gruppi sono stati sottoposti ad attivazione per partenogenesi, utilizzando ionomicina e 6-dimetilaminopurina, e coltivati in Fluido Oviduttale Sintetico (SOF) per alcuni giorni a 38,5°C, 5% di O_2 e 5% di CO_2. A 72h dall'attivazione, il 24,14% degli ovociti vitrificati e l'80,00% del controllo mostravano segni di segmentazione. Il Fisher Exact Test, applicato ai due gruppi di campioni maturati ad attivati *in vitro*, ha evidenziato un grado di associazione estremamente significativo ($p<0,0001$). I risultati relativi all'IVM non si discostano da quelli descritti in bibliografia[5,15]e anche l'attivazione ha dimostrato ulteriormente la perdita di competenza meiotica dei COCs vitrificati. Avendo ottenuto buoni risultati di IVM a fresco, il nostro prossimo passo consisterà nella vitrificazione di gameti maturi, ipotizzando che mantengano una competenza meiotica superiore anche dopo scongelamento.

INTRODUZIONE

Con il termine criopreservazione s'intende l'insieme di tecniche finalizzate alla stabilizzazione di cellule o sezioni di tessuti animali e vegetali, attraverso l'esposizione a basse temperature. Esistono diversi protocolli per il trattamento criogenico dei campioni, il denominatore comune consiste nel raffreddamento progressivo del preparato al di sotto dello zero[3,10,14]. Oltre questa soglia qualsiasi attività biologica, comprese le reazioni biochimiche che porterebbero all'invecchiamento ed alla morte cellulare, si arrestano[10,14]. Con temperature inferiori a -136°C, il metabolismo cellulare è sostanzialmente inibito. Indipendentemente dalla tecnologia applicata, è sempre necessario addizionare ai terreni di coltura dei crioprotettori, per limitare il rischio di danneggiamento delle strutture citoplasmatiche durante l'abbattimento della temperatura[2,3,10]. All'inverso, al momento di scongelare il campione, le cellule vanno reidratate e gli agenti crioprotettori estratti con lavaggi seriali in soluzioni a diverse concentrazioni[3]. È legittimo supporre che la conservazione criogenica assicuri una longevità prolungata, se non infinita, alle cellule processate, sebbene sia impossibile quantificare con esattezza la reale durabilità delle colture trattate con questa tecnologia[2,3].
La tecnica consolidata per la criopreservazione, introdotta alla fine degli anni ottanta e tutt'ora in uso, consiste nel congelamento lento del campione, mentre la vitrificazione rappresenta un'alternativa, proposta in tempi recenti, che consentirebbe ottimi risultati, ovviando ai principali inconvenienti della metodica tradizionale[3]. Le variabili discriminanti riguardano il controllo preciso della quota di raffreddamento e riscaldamento che determina il destino finale dell'acqua presente dentro la cellula e la realizzazione di un equilibrio osmotico e termico durante il congelamento. Il congelamento lento o "in equilibro" richiede di sottoporre il campione alla discesa controllata della temperatura, in modo che vi sia una fase, detta per l'appunto "di equilibrio", tra la perdita di acqua intracellulare e la formazione di cristalli di ghiaccio extracellulari che potrebbero rompere le membrane se si formassero in modo eccessivamente repentino[2]. La vitrificazione è una tecnica innovativa che prevede tempi di raffreddamento e riscaldamento molto brevi e l'uso di crioprotettori ad elevata viscosità e concentrazione[3,18]. Il processo è finalizzato a disidratare e raffreddare rapidamente le cellule che acquisiscono così un aspetto simile al ve-

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 13/02/2012 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 26/06/2012".

tro, attraverso un passaggio di stato talmente rapido (non "in equilibrio") da non consentire la formazione di cristalli di ghiaccio. In generale in medicina veterinaria, tutti i protocolli attualmente utilizzati sono stati ideati e perfezionati per il bovino ed in seguito applicati alla specie equina con minime modifiche[7,14,18]. La criopreservazione degli ovociti, in particolare, rappresenta l'opzione elettiva per la salvaguardia del patrimonio genetico e del potenziale riproduttivo di qualsiasi individuo di sesso femminile, quando sussistono delle problematiche che ostacolano a vario titolo la possibilità di concepire e portare a termine una gravidanza, nell'immediato o a lungo termine. L'ovocita equino risente maggiormente dello stress termico quando sottoposto a congelamento lento: cellule processate allo stadio di vescicola germinale (GV), e sottoposte a maturazione *in vitro* dopo il congelamento, raggiungono la seconda divisione meiotica (MII) in meno del 16%[14,16] dei casi contro il 50-80% di ovociti maturati a fresco. Gli ovociti vitrificati in fase di sviluppo intrafollicolare più avanzato, reso evidente dalla presenza di cumuli oofori espansi, dimostrano invece di mantenere una competenza meiotica apparentemente superiore totalizzando una percentuale di maturazione del 28-46%[16,6]. La chiave nella stesura di un protocollo riuscito per la vitrificazione risiede nella scelta dei crioprotettori più indicati. Alcuni Autori addizionano il Glicole Etilenico (EG) ed il Dimetil Sulfossido (DMSO)[12], altri il Glicole Propilenico, il DMSO e l'acetamide[11], altri ancora propongono un'associazione di Glicerolo, 1-2 Propanediolo e DMSO[17]. Nonostante la varietà di agenti disponibili, i dati reperibili in letteratura concordano nell'indicare il Glicole Etilenico come crioprotettore di elezione per la vitrificazione di ovociti ed embrioni di mammifero[3]. Gravidanze ottenute da ovociti equini vitrificati e successivamente scongelati sono un dato documentato che giustifica la necessità di ampliare le conoscenze in materia, dal momento che la crioconservazione degli ovociti rappresenta un'opzione vantaggiosa per preservare il patrimonio genetico di fattrici di pregio[4].

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sottoporre a vitrificazione ovociti equini immaturi recuperati da ovaie di cavalle sottoposte a macellazione commerciale, per poi maturarli *in vitro* ed attivarli per partenogenesi, al fine di testarne la competenza meiotica eventualmente conservata dopo le procedure di vitrificazione e scongelamento.

MATERIALI E METODI

Tra gennaio e settembre 2011, 80 ovaie di cavalle adulte, con segnalamento ed anamnesi ignoti, sono state isolate post macellazione e trasferite in laboratorio, in soluzione fisiologica a 25°C, dove si è proceduto sterilmente al sezionamento dei follicoli. Le ovaie, liberate da eventuale tessuto esuberante, sono state risciacquate sotto acqua corrente tiepida e trattate con tre lavaggi seriali; il primo in una soluzione al 10% di Virkon® (disinfettante ad ampio spettro antimicrobico ed antifungino), i successivi in soluzione fisiologica sterile. Di seguito, si è proceduto con il sezionamento dei follicoli sotto cappa a flusso laminare, utilizzando strumentario chirurgico e guanti sterili. Dapprima è stata allontanata l'albuginea ed il tessuto interstiziale della midollare che rivestono i follicoli, in modo da esporne direttamente la parete, quindi ciascun follicolo è stato inciso con una lama da bisturi, la superficie antrale è stata dapprima raschiata con un cucchiaio di Volkmann (*scraping*) per assicurare la separazione del complesso cumulo ooforo-ovocita (COC) dalla parete, quindi il contenuto follicolare è stato lavato con terreno di dissezione (M199 addizionato con antibiotici, albumina ed eparina) ed il liquido raccolto in piastre Petri che sono poi state esaminate sotto la lente di uno stereomicroscopio ad ingrandimento 6-45x per la ricerca dei COCs. In base alle caratteristiche morfologiche del *cumulus oophorus*, i COCs sono stati classificati in quattro categorie: cellule con cumulo espanso o compatto, completo o incompleto. I 215 COCs selezionati sono stati sottoposti in parte a maturazione *in vitro* (IVM) a fresco (118 COCs, controllo), in parte (97 COCs) a vitrificazione in Open Pulled Straw (OPS) in TCM199 (Tissue Culture Medium), Ficoll e Saccarosio a concentrazioni crescenti di Glicole Etilenico (EG) utilizzando le metodiche già descritte in precedenti lavori[9,10]. I COCs vitrificati sono poi stati scongelati e reidratati in TCM199 a concentrazione decrescente di EG e a loro volta maturati *in vitro*. In base ad esperimenti effettuati in precedenza[10] e secondo quanto descritto in bibliografia[14,15], si è scelto di sottoporre a vitrificazione esclusivamente i COCs dotati di cumulo compatto completo (Fig. 1). Al termine del ciclo di IVM, tutti i COCs sono stati sottoposti a decumulazione meccanica ed enzimatica (con ialuronidasi e tripsina) e gli ovociti maturi, distinguibili per la presenza del Globulo Polare (GP) e di altri segni di maturità citoplasmatica, sono stati selezionati (Fig. 2), scartando gli elementi immaturi o degenerati, per essere attivati per partenogenesi. La procedura prevede l'incubazione a 38,5°C al 5% di CO_2, prima in ionomicina (0,037 mg in 10 ml di H-TCM al 10% di FCS, Fetal Calf Serum) per 5', poi in 6-dimetil-aminopurina (4 mg in 10 ml di H-TCM al 10% di FCS) per 4-6h. Ultimata l'attivazione, gli ovociti sono stati trasferiti in SOF (Fluido Oviduttale Sintetico), incubati a 38°C, 5% di O_2 e 5% di CO_2, fino al momento in cui hanno manifestato segni di degenerazione. Per le prime 72h sono stati tutti esaminati quotidianamente per verificare il progredire dell'eventuale segmentazione.

Nel corso della sperimentazione è stato eseguito un controllo supplementare della vitalità post-scongelamento sottoponendo a colorazione con Trypan Bleu 40 COCs a campione.
Gli ovociti sono stati trattati con il colorante immediatamente dopo lo scongelamento per testare l'integrità e la vitalità sia dei gameti sia delle cellule del cumulo. I COCs sono stati allestiti sulla superficie di un vetrino porta-oggetti sospesi in una goccia di TCM199 tra due strisce di vaselina, sulle quali è stato fatto aderire un copri-oggetto.
Esercitando una delicata pressione, gli ovociti sono stati immobilizzati per effetto dello schiacciamento (la vaselina sigilla lo spazio tra i due vetrini). Il colorante, prelevato con una pipetta, è stato lasciato scorrere per capillarità tra le due superfici affacciate.
Osservando il vetrino al microscopio ottico a 40 ingrandimenti entro un minuto è stato possibile identificare le cellule con citoplasma positivo alla colorazione, segno di disvitalità (Figg. 3 e 4).
I risultati sono stati analizzati applicando la statistica descrittiva non parametrica, confrontati con il Fisher Exact Test ed elaborati con GraphPad InStat3 (livello di significatività per $p<0,05$).

RISULTATI

Durante la sperimentazione, su 80 ovaie processate sono stati sezionati 472 follicoli con una percentuale di recupero del 56,99%: tra i 269 COCs raccolti, 81 erano espansi (30,12%), 163 compatti (60,59%), 17 presentavano la sola corona radiata (6,32%), 8 erano nudi (2,97%). Sono stati selezionati per la vitrificazione 111 COCs compatti e, come controllo, 118 COCs con aspetto variabile del cumulo sono stati sottoposti ad IVM a fresco. Dopo scongelamento, 29 dei COCs vitrificati presentavano cumulo integro (26,13%), 68 l'avevano perso in parte (61,26%), 14 mostravano segni di degenerazione e sono stati pertanto esclusi dalla sperimentazione (12,61%); 97 sono stati sottoposti ad IVM (87,35%).
I risultati relativi all'IVM sui due gruppi di COCs sono espressi in Tabella 1. Dei 30 COCs vitrificati maturi ne sono stati selezionati 29 per l'attivazione, 30 COCs maturati a fresco sono stati utilizzati come controllo.
I risultati relativi all'attivazione dopo 72h di incubazione sono espressi in Tabella 2. La colorazione con Trypan Bleu (TB) è stata effettuata su un campione di 40 ovociti scongelati ed ha mostrato una vitalità post-scongelamento del 45% per un totale di 22 cellule con citoplasma positivo alla colorazione e 18 incolori.
I valori di maturazione e attivazione a fresco e post-vitrificazione sono stati confrontati con il Fisher Exact Test che ha evidenziato un grado di associazione estremamente significativo ($p<0,0001$).

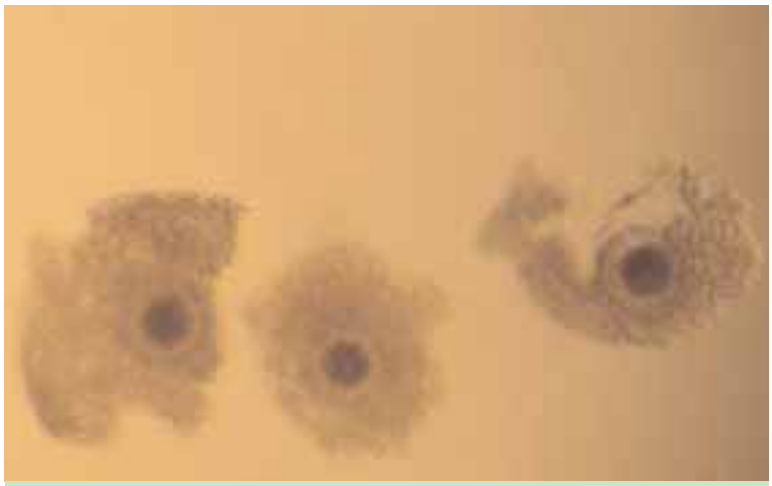

FIGURA 1 - COCs compatti dopo selezione.

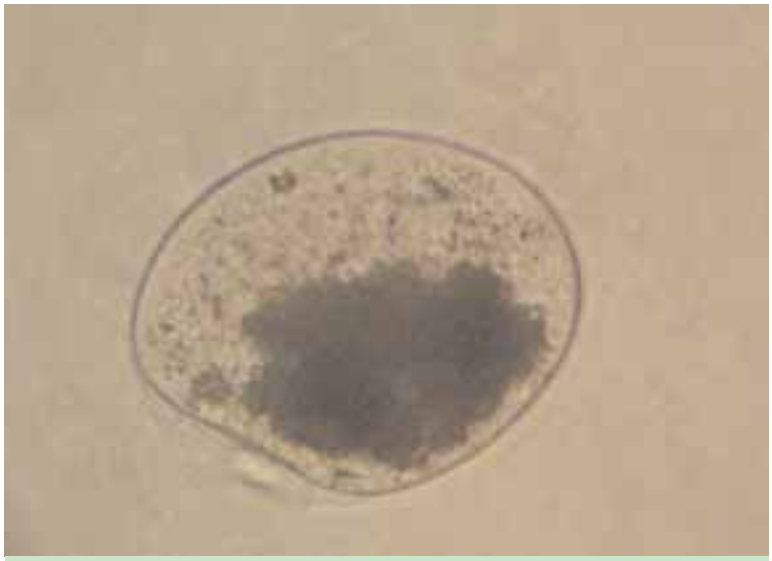

FIGURA 2 - Ovocita maturato *in vitro* con Globulo Polare estruso.

FIGURA 3 - Colorazione Trypan Blue. COC vitale con cellule del cumulo ooforo anch'esse vitali.

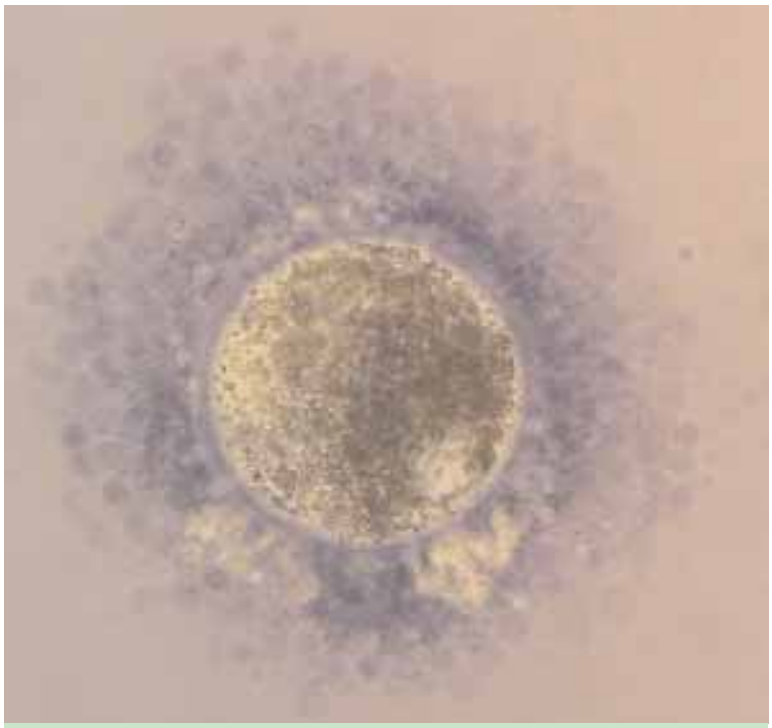

FIGURA 4 - Colorazione Trypan Blue. COC vitale con cellule del cumulo ooforo disvitali.

TABELLA 1
Risultati di IVM su COCs freschi e vitrificati dopo 42h di incubazione

	Immaturi (%)	Maturi (%)	Degenerati (%)	N
A fresco	14 (11,86)	68 (57,63)	36 (30,51)	118
Vitrificati	34 (35,05)	30 (30,93)	33 (34,02)	97

TABELLA 2
Risultati di attivazione per partenogenesi su ovociti freschi e vitrificati dopo 72h di incubazione

	Attivati (%)	Non attivati (%)	N
A fresco	24 (80,00)	6 (20,00)	30
Vitrificati	7 (24,14)	22 (75,86)	29

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti sono stati senz'altro viziati dallo stato fisiopatologico, ignoto e non sempre ottimale, delle ovaie reperite dalle cavalle macellate. In prospettiva di un'applicazione su campo della metodica di vitrificazione, la provenienza degli ovociti sarà discriminante, ma il problema verrà facilmente superato con l'utilizzo di donatrici selezionate e controllate.

La scelta di sottoporre a vitrificazione solo COCs compatti completi è legata al fatto che tutti gli Autori[14,15] concordano sulla funzione protettiva del cumulo durante la procedura. Le cellule del cumulo coadiuvano la maturazione nucleare e citoplasmatica elaborando fattori di crescita che diffondono attraverso le strutture giunzionali. Inoltre è plausibile che la presenza del cumulo ooforo costituisca una barriera protettiva in grado di isolare l'ovocita proteggendolo dagli insulti meccanici dovuti al freddo. Essendo il cumulo ooforo una struttura transitoria che esaurisce la propria funzione in fase di maturazione avanzata, in teoria sarebbe indispensabile unicamente per le cellule allo stadio di Vescicola Germinale (GV); intrapresa la MII gli ovociti acquisiscono maggiore autonomia, quindi la separazione o il danneggiamento del cumulo non dovrebbero avere effetti significativi sulla competenza maturativa[16]. Questa considerazione, valida in linea di principio, non trova riscontro concreto: ovociti vitrificati previa decumulazione esibiscono anomalie della piastra metafasica nel 65% dei casi e dimostrano una capacità di sviluppo post ICSI limitata rispetto a COCs sottoposti al medesimo trattamento crioconservativo dai quali è stato possibile ottenere embrioni vitali[7].

La percentuale di COCs maturi post-scongelamento ottenuta da noi è comparabile con i dati riportati in letteratura, che indicano percentuali di IVM post-vitrificazione comprese tra l'8,2 ed il 30%[5,15]. Anche la percentuale di maturazione nel gruppo di controllo (57,63%) concorda con i dati bibliografici (55,6-80%)[15].

Non è stato possibile utilizzare anche come controllo esclusivamente COCs compatti, dal momento che, soprattutto col progredire della stagione riproduttiva equina, diventa sempre più difficile reperire COCs appartenenti a questa categoria. Non sono presenti in bibliografia dati relativi all'attivazione *in vitro* di ovociti equini, tuttavia anche questa prova ha dimostrato la perdita di competenza maturativa dei gameti dopo vitrificazione.

La manualità di vitrificazione presenta difficoltà oggettive a causa della tossicità dei crioprotettori. La manipolazione dei COCs durante i vari passaggi è problematica per l'osmolarità e la viscosità elevate dei terreni: le cellule si disidratano rapidamente e si spostano dal punto di fuoco del microscopio. Il contatto con i crioprotettori può determinare modificazioni ultrastrutturali a carico dei mitocondri e delle giunzioni intercellulari a livello del cumulo che non sono evidenti nell'immediato, ma compromettono la vitalità e la competenza meiotica post-scongelamento[5]. Poiché l'abbassamento della temperatura danneggia il citoscheletro, la rapidità dei passaggi di vitrificazione e scongelamento resta imperativa.

La percentuale di cellule vitali indicata dalla prova del Trypan Bleu è stata decisamente maggiore di quella individuata con l'IVM; questa divergenza ci ha suggerito che la capacità di sopravvivenza degli ovociti del campione in seguito alla vitrificazione sia buona, mentre l'attitudine maturativa appare compromessa. Questo dato conferma la supposizione secondo la quale la competenza meiotica dipende da una serie di fattori che non riguardano solo la vitalità delle cellule e l'integrità delle membrane. Il TB provoca la degenerazione cellulare entro pochi minuti dall'esposizione, di conseguenza non è possibile eseguire un controllo crociato incubando lo stesso campione in terreno di maturazione.
Ai fini sperimentali, l'attivazione partenogenetica *in vitro* rappresenta una soluzione pratica ed economica per la verifica della vitalità e della competenza meiotica post vitrificazione, ma preclude qualsiasi altro impiego del materiale processato, in conseguenza all'attivazione aberrante della segmentazione da cui derivano elementi aploidi disfunzionali. L'alternativa ideale consisterebbe nel coniugare la tecnica di fecondazione *in vitro* (FIV) con l'IVM post-scongelamento dei COCs. Attualmente, per ottenere percentuali soddisfacenti di fertilizzazione, è indispensabile ricorrere alla microiniezione, dato il basso potere fecondante *in vitro* del materiale seminale equino[13]. In quest'ottica le ultime acquisizioni in materia riguardano il miglioramento dei protocolli di attivazione e capacitazione *in vitro* del seme[1,8], volti alla semplificazione dei protocolli di FIV.
La possibilità di produrre ovociti vitrificati su scala commerciale rappresenterebbe un'innovazione rilevante per le tecniche di fecondazione assistita nella specie equina, permettendo l'organizzazione di una vera e propria banca di germoplasma di fattrici di pregio ed, al tempo stesso, intervenendo su alcuni dei problemi che riducono la fertilità. Sebbene la sperimentazione di diverse tecniche di vitrificazione dell'ovocita equino impegni attualmente vari gruppi di ricerca nel mondo, allo stato dell'arte non esistono i presupposti per un'applicazione commerciale di questa tecnologia. Questa limitazione è inevitabile, visti i deludenti risultati relativi alla competenza maturativa post-scongelamento, aspetto che è emerso dalla nostra sperimentazione e del resto trova pieno riscontro in bibliografia.
Per il futuro si renderà necessario approfondire la conoscenza della biologia cellulare e perfezionare alcuni aspetti della metodica, al fine di minimizzare i danni da congelamento a carico delle strutture citoplasmatiche e di membrana; in particolare sarebbe opportuno riconsiderare la composizione delle soluzioni di vitrificazione privilegiando l'impiego di crioprotettori meno aggressivi o variandone la diluizione in modo da attenuarne la tossicità.
Avendo ottenuto buoni risultati di IVM a fresco, il nostro prossimo passo consisterà nella vitrificazione di gameti maturi, ipotizzando che mantengano una competenza per lo sviluppo embrionale superiore anche dopo scongelamento.

Parole chiave
Fattrice, ovocita, vitrificazione, maturazione in vitro.

Equine oocyte vitrification before *in vitro* maturation

Summary
Oocyte cryopreservation is the option of choice for genetic preservation of female mammals. In particular, the equine oocyte is very susceptible to classic freezing technique, so different vitrification protocols have to be developed. The purpose of this study is to vitrify immature oocytes, from slaughtered mares ovaries, then to allow them to mature and to activate *in vitro*. In this way the meiotic competence will be tested. 111 cumulus-oocyte complexes (COCs) were vitrified in Open Pulled Straw (OPS), then the 97 COCs considered suitable after thawing were subjected to *In Vitro* Maturation (IVM), as previously described by the Authors[9,10]. In total, the 30.93% of cases were considered mature. 118 fresh COCs were the control samples and they have provided the 57.63% of maturity. The mature oocytes of both groups were subjected to parthenogenetic activation using ionomycin and 6-dimethylaminopurine. They were cultivated in Synthetic Oviductal Fluid (SOF) for a few days at 38.5°C, 5% O_2 and 5% CO_2. 72h after activation, the 24.14% of the oocytes were vitrified and 80.00% of the control samples showed signs of segmentation. The Fisher Exact Test was applied to both groups of *in vitro* maturated and activated samples and they showed a highly significant degree of association ($p < 0.0001$). Our results about IVM do not differ from those described by bibliography[5,15]. The activation also showed further loss of meiotic competence of vitrified COCs. Having achieved good results in fresh IVM, our next step will be the vitrification of mature gametes, assuming that they maintain higher meiotic competence after thawing.

Key words
Mare, oocyte, vitrification, in vitro maturation.

BIBLIOGRAFIA

1. Alm H, Torner H, Blottner S, Nurnberg G, Kanitz W (2001). Effects of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophor or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. Theriogenology. 56, 817-829.
2. Ambrosi V, Morini G, Parmigiani E, Bigliardi E (2002). Il congelamento lento di embrioni bovini micromanipolati: recenti progressi nella composizione dei media. Ann. Fac. Med. Vet. Parma. Vol. XXII, 333-340.
3. Bautista JA, Kanagawa H (1998). Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: EG as the emerging cryoprotecting of choice. Jpn. J. Vet. Res. 45, 183-191.
4. Hinrichs K (2010). In vitro production of equine embryos: state of the art. Reprod. Domest. Anim. 45, Suppl 2, 3-8.
5. Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N (1996). In vitro maturation and transmission electron microscope observation of equine oocytes after vitrification. Cryobiology. 33, 300-310.
6. Hurtt AE, Landim-Alvarenga F, Siedel GE Jr, Squires EL (2000). Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylen glycole, ficoll and sucrose solution using open pulled straws. Theriogenology. 54, 119-128.
7. Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Scoggins CF, Bruemmer JE, Squires EL (2002). Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. Theriogenology. 58, 911-919.
8. McPartlin LA, Visconti PE, Bedford-Guaus SJ (2011). Guanine-nucleotide exchange factors (RAPFGEF3/RAPFGEF4) induce sperm membrane depolarization and acrosomal exocytosis in capacitated stallion sperm. Biol. Reprod. 85, 179-188.
9. Nervo T, Vincenti L (2004). Trials on equine oocytes in vitro maturation. 20ème Colloque scientifique AETE. 166.
10. Nervo T, Semita C, Brachet Cota R, Loconte D (2007). Vitrificazione dell'ovocita equino: esperienze preliminari. Ippologia. Anno 18, 2, 27-30.
11. Otoi T, Yamamoto K, Suzuki T (1995). In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved whit ethylene glycol and sucrose. Cryobiology. 32, 455-460.
12. Shellander K, Peli J, Shmoll F, Brem G (1994). Effects of cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and un matured bovine oocytes. Theriogenology. 24, 909-915.
13. Squires EL, Wilson JM, Kato H, Blaszczyk A (1996). A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. Theriogenology. 45, 306.
14. Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TA (2006). Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. Molecular reproduction and development. 61, 627-637.
15. Tharasanit T, Colleoni S, Lazzari G, Colenbrander B, Galli C, Stout TA (2006). Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. Reproduction. 132, 759-769.
16. Tharasanit T, Colleoni S, Galli C, Colenbrander B, Stout TA (2009). Protective effects of the cumulus-corona radiata complex during vitrification of horse oocytes. Reproduction research. 137, 391-401.
17. Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T (1997). Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo-letters. 18, 191-195.
18. Vajta G (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim Reprod Science. 60-61, 357-364.

CORSI A.N.M.V.I. SALUTE E SICUREZZA SUL LAVORO

Da inviare in busta chiusa ad ANMVI - Via Trecchi, 20 - 26100 Cremona oppure al fax 0372-457091 **entro il 12 Ottobre 2012**, allegando l'attestazione di versamento

IL SOTTOSCRITTO

COGNOME ..... NOME .....

VIA .....

CAP, CITTÀ E PROVINCIA .....

TELEFONO ..... CELL. .....

EMAIL ..... CODICE FISCALE .....

ORDINE DEI VETERINARI DI ..... TESSERA N. .....

CHIEDE DI ISCRIVERSI AL

(spuntare il corso o i corsi prescelti)

❑ **Corso per datore di lavoro in struttura veterinaria**

18-19 Ottobre 2012

VERSANDO LA QUOTA DI € 185,00 (IVA inclusa)

❑ **Corso per Addetti all'antincendio, attività a rischio basso**

20 Ottobre 2012

VERSANDO LA QUOTA DI € 110,00 (IVA inclusa)

❑ **Corso per addetti al primo soccorso**

20-21 Ottobre 2012

VERSANDO LA QUOTA DI € 160,00 (IVA inclusa)

VERSANDO MEDIANTE
(è possibile effettuare un unico versamento per più corsi)

❑ **vaglia postale intestato a EV Soc. Cons. a r.l. - Via Trecchi, 20 - 26100 Cremona**
(si prega di indicare la causale del versamento. Allegare fotocopia del versamento)

❑ **tramite carta di credito** (non si accettano carte elettroniche)

❍ **Carta Sì** ❍ **Mastercard** ❍ **Visa**

Intestata a .....

Numero della carta ____ ____ ____ ____

(3 numeri sul retro) ____ Scadenza (mese e anno) ____ ____

FATTURAZIONE

La fattura dovrà essere intestata a: .....

Domicilio fiscale .....

PARTITA IVA ____

CODICE FISCALE ____
(solo se non in possesso di Partita IVA)

DATA ..... FIRMA .....

AVVERTENZE

Agli iscritti verrà inviata una comunicazione **solo in caso di mancata accettazione**.
Le richieste di rinuncia verranno totalmente rimborsate solo se pervenute entro 10 gg dalla data di inizio del corso.

Ai sensi del decreto legislativo 30 giugno 2003, n. 196 (G.U. 29 luglio 2003, Serie generale n. 174, Supplemento ordinario n. 123/L), il sottoscritto acconsente al trattamento dei dati sopra indicati, consapevole che l'esecuzione dei servizi richiesti non può avere luogo senza le comunicazioni dei dati personali all'ANMVI e/o ai soggetti a cui la stessa deve rivolgersi.

FIRMA .....