

CARATTERIZZAZIONE DELL'OVOCITA EQUINO OSSERVATO IN MICROSCOPIA OTTICA A LUCE POLARIZZATA

T. Nervo, DMV, PhD¹, A. Bertero, DMV¹, F. Ritrovato, MS², F. Evangelista, MS³,
V. Stabile, MS³, L. Bergamini, DMV⁴, L. Vincenti, DMV, PhD¹

¹ *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO), Italia*

² *Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino,
Torino, Italia*

³ *Presidio Ostetrico Ginecologico S. Anna, Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università degli Studi di Torino, Torino, Italia*

⁴ *Ippos, Vigone (TO), Italia*

Tipologia: **Ricerca Originale**
Area di interesse: **Riproduzione**

Scopo del lavoro. La microscopia ottica a luce polarizzata (PLM) desta grande interesse in riproduzione assistita umana poiché permette, senza danneggiare i gameti, di identificare caratteristiche morfologiche di zona pellucida (ZP) e fuso meiotico correlabili alla qualità ovocitaria e alla possibilità di dare origine a embrioni vitali^{1,4,9}. Il fuso meiotico è indispensabile per l'allineamento corretto dei cromosomi durante la meiosi: la sua morfologia fornisce un importante strumento diagnostico per definire il successo della maturazione in vitro (IVM) e prognostico per le fasi successive di fecondazione in vitro^{3,8}. Spessore e birifrangenza della ZP sono indicatori prognostici di successo di impianto embrionale⁷. Alcuni Autori hanno osservato che il PLM è un sistema efficiente per l'individuazione delle stesse strutture anche in ovocellule bovine maturate in vitro e/o vitrificate² e che tale procedura non esercita effetti deprimenti sulla competenza di sviluppo gametico⁵. Scopo del lavoro è stato quello di individuare, attraverso PLM, delle caratteristiche morfologiche di zona pellucida e fuso meiotico di ovociti equini maturati in vitro che possano essere marker di buona qualità gametica, nell'ottica di una successiva fecondazione assistita.

Materiali e metodi. 45 ovociti, raccolti da ovaie di cavalle macellate con anamnesi ignota, sono stati maturati in vitro per 36 ore e decumulati, come descritto dagli Autori in precedenti lavori⁶, poi osservati in PLM. Le osservazioni sono state effettuate con un microscopio a contrasto di fase (Eclipse TE 2000-S) collegato ad un controller LC PolScope (CRI, USA) e ad una camera CCD (Colour-Coded Doppler). Le immagini sono state acquisite ad un ingrandimento 40x e le misurazioni effettuate mediante il software Oosight™. Gli ovociti sono stati posti in capsule Petri di vetro (GWst-3522, 50x7 mm, WillCo-Wells, Olanda) in gocce da 8 µl di terreno tamponato (Gamete Medium, Cook, Irlanda), precedentemente equilibrato a 38,5°C e 5% di CO₂, coperte da 3 ml di olio di paraffina liquida anch'esso equilibrato (Oil Medium, Cook Irlanda) e posizionati al microscopio su una piastra riscaldata. Per la visualizzazione ottimale delle strutture, gli ovociti sono stati rotati utilizzando una micropipetta holding (Holding Pipette, Cook, Irlanda) in modo da avere globulo polare (GP), fuso meiotico e ZP sullo stesso asse. Le immagini raccolte sono state archiviate e le misurazioni eseguite successivamente. Sono stati misurati: area, spessore e birifrangenza (ritardanza) dello strato interno della ZP e spessore della ZP in toto. Per i dati numerici ottenuti è stata calcolata la media ± DS (deviazione standard). Vista l'esiguità numerica del campione, non è stata effettuata un'analisi statistica.

Risultati. L'osservazione è stata effettuata su 45 ovociti (20 con cumulo ooforo compatto, 18 espansi e 7 con la sola corona radiata) che dopo IVM risultavano: 27 maturi con estrusione del GP (A),

6 con segni di sola maturazione citoplasmatica (B), 12 non maturi (C). L'area dello strato interno della ZP era $2285,46 \pm 394,74 \mu\text{m}^2$ per il gruppo A, $2261,88 \pm 414,54 \mu\text{m}^2$ per i B e $2531,01 \pm 790,32 \mu\text{m}^2$ per i C. Lo spessore della ZP era $17,36 \pm 2,58 \mu\text{m}$ per gli A, $15,22 \pm 1,90 \mu\text{m}$ per i B e $19,33 \pm 3,70 \mu\text{m}$ per i C. Lo spessore dello strato interno della ZP era $3,89 \pm 1,08 \mu\text{m}$ per gli A, $4,18 \pm 0,90 \mu\text{m}$ per i B e $4,38 \pm 1,46 \mu\text{m}$ per i C. La ritardanza era $1,81 \pm 0,32 \text{nm}$ per il gruppo A, $1,99 \pm 0,22 \text{nm}$ per i B e $2,53 \pm 1,36 \text{nm}$ per i C. Non è stato possibile analizzare le 4 caratteristiche per tutti gli ovociti a causa di alterazioni morfologiche a carico degli stessi o per imprecisioni nel rilevamento dei parametri da parte del software.

Conclusioni. La PLM potrebbe essere un utile strumento per valutare la qualità dell'ovocita equino, a fresco o crioconservato, senza danneggiarlo e potendo quindi sottoporlo ad ulteriori manipolazioni. Analogamente al bovino⁵ e all'uomo¹, stadi maturativi più avanzati sembrano corrispondere ad una bassa birifrangenza della ZP anche nell'equino. Purtroppo non è sempre stato possibile osservare il fuso meiotico, a causa dell'elevata presenza di granuli citoplasmatici caratteristici dell'ovocellula equina matura². Nell'ovocita umano, lo spessore aumentato dello strato interno della ZP sembra predittivo di corretto sviluppo embrionale⁷, mentre nel bovino appare il contrario⁵, così come appare da questi primi dati. Ovociti equini, prelevati in vivo o post mortem, potrebbero essere utilizzati per l'applicazione di altre tecnologie riproduttive come l'Oocyte Transfer o l'Intracytoplasmic Sperm Injection. La possibilità di valutarne contestualmente la qualità con la PLM permetterebbe di limitare i tentativi (ed i costi) esclusivamente ai gameti ottimali con un innalzamento considerevole della percentuale di successo ed un'applicazione vantaggiosa per la pratica clinica. Ad oggi non sono presenti in bibliografia lavori organici sull'argomento e questa indagine preliminare ha permesso di creare la base di dati a cui riferire il prosieguo delle indagini.

Bibliografia

1. Borges (2009), *Reprod Biomed* 18(5):681-86.
2. Caamaño et al. (2013), *Reprod Domest Anim* 48(3):470-6.
3. Ebner et al. (2000), *Hum Reprod* 15:427-30.
4. Keefe et al. (1997), *Hum Reprod* 12:1250-2.
5. Koester et al. (2011), *Reproduction* 141:779-87
6. Nervo et al. (2012), *Ippologia* 23(2):17-22.
7. Rama Raju et al. (2007), *Reprod Biomed* 14(2):166-74.
8. Rienzi et al. (2003), *Hum Reprod* 18(6):1289-93.
9. Wang e Keefe (2002), *Cloning Stem Cells* 4:269-76.

Indirizzo per corrispondenza

Dott.ssa Tiziana Nervo - Dipartimento di Scienze Veterinarie
Via Leonardo Da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco (TO), Italia
Tel. 011/6709047 - E-mail: tiziana.nervo@unito.it