



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

---

*SCUOLA DI DOTTORATO in*

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA DEGLI  
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore Prof. Giovanni Garippa

**INDIRIZZO IN: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXII CICLO)**

(coordinatore: prof. Sergio Ledda)

**Utilizzo dell'ultrasonografia nei piccoli ruminanti  
per la caratterizzazione della dinamica follicolare  
al fine di identificare fattori ovarici in grado di  
influenzare la qualità dell'oocita**

**Docente Guida**

**Dott.ssa Fiammetta Berlinguer**

**Direttore**

**Prof. Giovanni Garippa**

**Tesi di dottorato del**

**Dott. Antonio Spezzigu**

**ANNO ACCADEMICO 2009 - 2010**

# Indice generale

|  |     |
|--|-----|
| Summary .....  | 4   |
| Scopo della tesi .....   | 5   |
| Revisione bibliografica .....  | 8   |
| Follicologenesi e oogenesi .....   | 8   |
| Competenza di sviluppo dell’oocita .....   | 23  |
| Aspetti endocrinologici della follicologenesi.....   | 32  |
| Storia dell'ecografia.....   | 39  |
| Bibliografia .....   | 73  |
| Caratterizzazione della dinamica follicolare e di accrescimento del corpo luteo durante il ciclo<br>estrale nella pecora Sarda ..... | 77  |
| Evoluzione della ricerca sulle ovaie.....  | 77  |
| Scopo del lavoro.....  | 82  |
| Materiali e Metodi .....   | 85  |
| Risultati.....   | 87  |
| Discussione.....   | 92  |
| Bibliografia .....   | 95  |
| Esperimento 1: Lo stato fisiologico e la funzionalità follicolare: effetti dell’invecchiamento<br>riproduttivo .....                 | 100 |
| Le basi fisiologiche dell’invecchiamento riproduttivo .....  | 100 |
| Scopo del lavoro.....  | 103 |
| 1. Caratterizzazione della dinamica follicolare durante il ciclo estrale in pecore giovani e vecchie<br>.....                        | 106 |
| Materiali e Metodi .....   | 106 |
| Risultati.....   | 109 |
| 2. Risposta alla somministrazione di FSH e qualità dell’oocita in pecore giovani e vecchie.....                                      | 115 |
| Materiali e Metodi .....   | 115 |

|  |     |
|--|-----|
| Risultati.....   | 120 |
| Discussione.....   | 124 |
| Bibliografia .....   | 134 |
| Esperimento 2. Effetto della supplementazione ormonale sulla funzionalità follicolare e sulla competenza allo sviluppo dell’ocita..... | 142 |
| Funzione della melatonina e suo ruolo biologico .....  | 142 |
| Scopo del lavoro.....  | 155 |
| Materiali e Metodi .....   | 157 |
| Risultati.....   | 164 |
| Discussione.....   | 169 |
| Bibliografia .....   | 175 |
| Allegato .....   | 182 |
| Esperimento 3. Effetto della supplementazione glucogenica sulla funzionalità follicolare.....  | 193 |
| Relazione tra nutrizione e riproduzione.....   | 193 |
| Scopo del lavoro.....  | 200 |
| Materiali e Metodi .....   | 202 |
| Risultati.....   | 205 |
| Discussione.....   | 210 |
| Allegato. Metabolismo del glicole monopropilenico e del glicerolo nei ruminanti.....   | 216 |
| Bibliografia .....   | 225 |
| Conclusioni generali .....   | 231 |
| Bibliografia .....   | 237 |
| Pubblicazioni .....  | 241 |
| Immagini ecografiche.....  | 262 |

## Summary

The current Doctoral Thesis studied the effect of the ovarian status, as evaluated by ultrasonography, on oocyte developmental competence in small ruminants. The first experiment assessed differences in oestrus cycle characteristics, follicle growth in response to exogenous FSH administration, hormonal milieu and oocyte quality in aged and adult sheep. Results obtained evidenced that aging in the sheep is accompanied by alterations in follicle functions, but fertility seems to be maintained, as evaluated by oocyte in vitro developmental competence after FSH stimulation. The second experiment examined the effects of melatonin on ovarian follicular growth patterns and on in vitro oocyte developmental competence in anestrous goats. Melatonin treatment prior to oocyte collection hastened dominant follicle growth phase, thus increasing ovarian follicle turnover, and improved oocyte quality. The third experiment determined influence of the glucogenic supply on follicular growth patterns and oocyte developmental competence in Sarda sheep. Short-term energy inputs modified the growth dynamics of ovarian follicles by increasing both their recruitment and development to larger categories, and improved oocyte developmental competence. In conclusion, this study evidenced the strong link existing between follicle function and oocyte developmental competence and set the basis for the development of new protocols aimed at improving oocyte quality in small ruminants.



## Scopo della tesi

La presente tesi di dottorato è stata portata avanti con lo scopo di studiare la relazione esistente tra il quadro ovarico, valutato attraverso ultrasonografica, e la competenza allo sviluppo dell'ocita nei piccoli ruminanti. In un esperimento preliminare, è stato innanzitutto caratterizzato in termini di dinamica follicolare e di accrescimento del corpo luteo, il ciclo estrale nella pecora Sarda. In questa specie, infatti, non esistono riferimenti in bibliografia circa le modificazioni ovariche durante il ciclo estrale e queste informazioni sono di importanza fondamentale nel valutare poi gli effetti di diversi protocolli sperimentali sul quadro ovarico. Successivamente, sono stati designati tre esperimenti aventi lo scopo di valutare gli effetti dello stato fisiologico, della supplementazione ormonale ed energetica sulla funzionalità follicolare, e quindi sulla competenza dell'ocita.

In particolare, il primo esperimento aveva lo scopo di caratterizzare la dinamica follicolare durante il ciclo estrale in pecore giovani e vecchie allo scopo di identificare la comparsa di eventuali modificazioni rilevabili mediante markers ecografici. In secondo luogo, si sono volute determinare eventuali differenze nella crescita follicolare in risposta all'FSH, nell'ambiente ovarico e nella qualità dell'ocita in pecore adulte e vecchie. I risultati ottenuti hanno dimostrato che in assenza di alcuna alterazione nelle principali caratteristiche del ciclo estrale, l'invecchiamento ovarico si manifesta fisiologicamente nella specie ovina con una alterazione della funzionalità follicolare, evidenziata da un mancato effetto di dominanza sui follicoli di piccole dimensioni e da una diminuita produzione di estradiolo ed inibina A. D'altra parte, la fertilità sembra essere mantenuta considerando che non è stato riscontrato alcun effetto dell'età sulla risposta al

trattamento di stimolazione ovarica, sulla competenza allo sviluppo degli oociti ottenuti e sulla qualità embrionale.

Il secondo esperimento è stato portato avanti con lo scopo di esaminare gli effetti della melatonina sulla crescita dei follicoli ovarici e sulla competenza allo sviluppo degli oociti. Come modello sperimentale sono state utilizzate capre in anastro stagionale al fine di minimizzare le variazioni nei livelli degli ormoni steroidei e delle gonadotropine che caratterizzano il ciclo estrale. Inoltre, la caratterizzazione della dinamica follicolare e la produzione embrionale in vitro in questa specie sono ormai consolidate. Inoltre, sono stati valutati gli effetti della melatonina sulla qualità degli embrioni prodotti, valutata come resistenza alla vitrificazione ed espressione di un panel di geni relazionati alla competenza allo sviluppo degli embrioni pre-impianto. Da questo studio sono state tratte tre principali conclusioni. In primo luogo, è stato evidenziato per la prima volta che il trattamento con melatonina porta a delle modificazioni nelle caratteristiche di sviluppo dei follicoli; in particolare, modifica il pattern di sviluppo dell'ondata follicolare aumentando il turnover del follicolo dominante. In secondo luogo, gli oociti contenuti all'interno di questi follicoli hanno mostrato una maggiore qualità quando paragonati a quelli ottenuti da animali controllo, garantendo, infine, una maggiore competenza allo sviluppo fino allo stadio di blastocisti.

Il terzo esperimento aveva l'obiettivo di determinare l'influenza della supplementazione glucogenica sulla competenza allo sviluppo dell'oocita. A questo scopo sono stati utilizzati due gruppi di pecore Sarde adulte a cui veniva somministrato o meno un substrato altamente energetico per 5 giorni durante il trattamento a base di FSH esogeno. L'effetto nutrizionale immediato è stato valutato studiando il pattern di sviluppo follicolare, in modo da poterlo correlare successivamente con la funzionalità degli oociti, e la competenza allo sviluppo in vitro

degli oociti prelevati alla fine del trattamento. I risultati ottenuti hanno confermato che la supplementazione energetica acuta modifica le dinamiche di accrescimento follicolare, aumentando la quota di reclutamento dei follicoli di piccole dimensioni e stimolandone uno sviluppo fino a dimensioni maggiori. La somministrazione di dosi superovulatorie di FSH ha poi annullato le differenze nella dinamica follicolare tra pecore trattate e controllo; d'altra parte gli oociti ottenuti da pecore trattate con la miscela glucogenica hanno mostrato una maggiore competenza allo sviluppo rispetto al gruppo controllo, come testimoniato dal più alto numero di blastocisti ottenute in seguito a maturazione, fertilizzazione e coltura in vitro.

In conclusione, la presente tesi di Dottorato ha evidenziato il forte legame esistente tra funzionalità follicolare e competenza allo sviluppo dell'oocita ed ha posto le basi per lo sviluppo di nuovi protocolli aventi lo scopo di migliorare la competenza allo sviluppo dell'oocita, e quindi la fertilità, nei piccoli ruminanti.

# Revisione bibliografica

## *Follicologenesi e oogenesi*

Con il termine riproduzione si intende l'insieme di meccanismi mediante i quali gli esseri viventi provvedono alla conservazione della propria specie. Negli animali si sono evolute svariate modalità di riproduzione, che possono rientrare globalmente in due tipi fondamentali: asessuata e sessuata.

La riproduzione sessuata si basa, invece, sull'unione di due gameti, oociti e spermatozoi. Questi vengono prodotti per meiosi e sono aploidi, cioè con corredo cromosomico pari alla metà di quello dell'individuo generante. La principale caratteristica della riproduzione sessuata consiste nel rimescolamento del materiale ereditario dando luogo, in seguito alla fusione del gamete femminile con quello maschile, ad individui geneticamente diversi fra loro e dai genitori. Lo sviluppo dei gameti avviene attraverso il processo biologico della gametogenesi e si svolge all'interno di ghiandole specializzate che sono: l'ovaio nella femmina e il testicolo nel maschio. La gametogenesi segue tre fasi successive:

1. la fase mitotica, caratterizzata dall'intensa proliferazione delle cellule germinali immature, che porta ad un loro rilevante incremento;
2. la meiosi, nel corso della quale il numero di cromosomi presenti nelle cellule germinali si riduce della metà e le cellule da diploidi divengono aploidi. In questo contesto avviene lo scambio di materiale genetico tra cromosomi omologhi (crossing-over) con riassortimento dei caratteri ereditari;
3. la maturazione post meiotica (propria della cellula germinale maschile) durante la quale le cellule germinali acquisiscono, senza dividersi ulteriormente, caratteristiche morfologiche

e funzionali specifiche che le rendono adatte al processo della fecondazione (Monesi, 1992)

La meiosi consiste in due divisioni cellulari. La prima, definita *divisione riduzionale*, è preceduta dalla replicazione del DNA e si conclude con il dimezzamento del corredo cromosomico (Monesi, 1992). Le coppie di cromosomi omologhi si scambiano materiale genetico attraverso il crossing-over e si segregano in ciascuna delle cellule figlie (Yen e coll., 2000). L'assortimento degli omologhi materni e paterni e il crossing over aumentano la variabilità genetica.

La seconda divisione meiotica, detta *equazionale*, non è preceduta dalla replicazione del DNA ed è caratterizzata dalla separazione dei cromatidi fratelli.

Il processo di formazione dei gameti femminili si definisce *oogenesi*, quello relativo alla formazione di gameti maschili *spermatogenesi*.

Il processo di oogenesi inizia quando le cellule germinali primordiali migrano nella gonade embrionale e diventano oogoni. Questi ultimi proliferano tramite la divisione mitotica, vengono rivestiti da uno strato di cellule della granulosa e si differenziano in oociti primari che sintetizzano un rivestimento glicoproteico, la zona pellucida. A questo punto entrano nel processo meiotico, duplicano il proprio patrimonio di DNA, raggiungono la profase I della meiosi e resta in questo stato fino al momento dell'ovulazione (stadio di diplotene della prima divisione meiotica o stadio di riposo). Dopo l'ovulazione l'oocita completa la meiosi, espelle il primo globulo polare e diviene un oocita secondario. L'oocita secondario rimane bloccato alla metafase II della meiosi fino all'eventuale fecondazione. (Yen e coll., 2000).

Al momento della nascita, l'ovaio contiene un numero notevolmente elevato di follicoli primordiali, molto piccoli con un diametro di circa 0.03 mm, che risultano funzionalmente quiescenti e che contengono un piccolo oocita privo di zona pellucida e rivestito da un unico

strato di cellule appiattite che poggiano su una membrana basale. Nei mammiferi l'oogenesi e la follicologenesi iniziano nelle prime fasi della vita fetale.

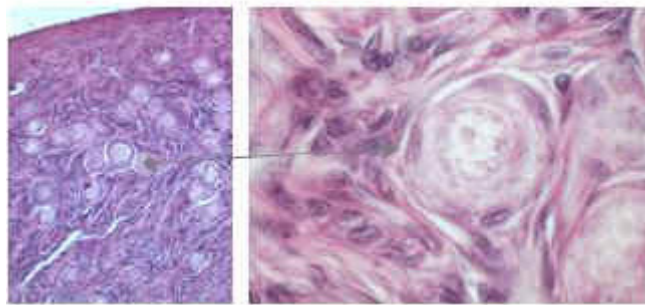


Figura 1. Follicoli primordiali all'interno della corticale ovarica

Negli organismi in cui esiste una linea germinale distinta che si separa dalle cellule somatiche nel corso dello sviluppo, le cellule germinali non si originano nelle gonadi. I loro precursori, le cellule germinali primordiali (*PGC, primordial germ cells*) hanno invece origine altrove e migrano nelle gonadi quando queste si sviluppano. Il primo passo della gametogenesi, allora comporta la formazione delle PGC e il loro ingresso nella cresta genitale allorché si forma la gonade. Nei mammiferi non esiste un plasma germinale evidente e le cellule germinali non sono morfologicamente distinte durante le fasi iniziali dello sviluppo. Piuttosto, le cellule germinali sono indotte nell'embrione. Nei topi, le cellule germinali si formano a livello della regione posteriore dell'epiblasto, nella zona di giunzione dell'ectoderma extraembrionale, dell'epiblasto, della linea primitiva e dell'allantoide (Molyneaux e Wylie, 2004). A 6,5 giorni di sviluppo embrionale, la BMP4 e la BMP8b derivate dall'ectoderma extraembrionale conferiscono a certe cellule di questa regione la capacità di produrre cellule germinali. Il gruppo di cellule capaci di generare PGC esprime *fragilis*, un gene che codifica una particolare proteina transmembrana. Tuttavia, le cellule che esprimono *fragilis* possono formare sia PGC sia alcune cellule somatiche. Al centro di questo gruppo di cellule si trova un piccolo gruppo che esprime anche *stella*. Queste cellule sono ristrette al destino di cellule germinali (Molyneaux e Wylie, 2004).

Le PGC dei mammiferi migrano direttamente nell'endoderma dalla regione posteriore della linea primitiva. Queste cellule che esprimono stella si trovano esse stesse nell'intestino. Successivamente le PGC escono dall'intestino e migrano nelle creste genitali. A 11,5 giorni di sviluppo le PGC entrano nelle gonadi che si stanno formando. Nel corso di questa migrazione sono proliferate da una popolazione iniziale di 10-100 cellule alle 2500-5000 PGC presenti nelle gonadi a 12 giorni (Molyneaux e Wylie, 2004).

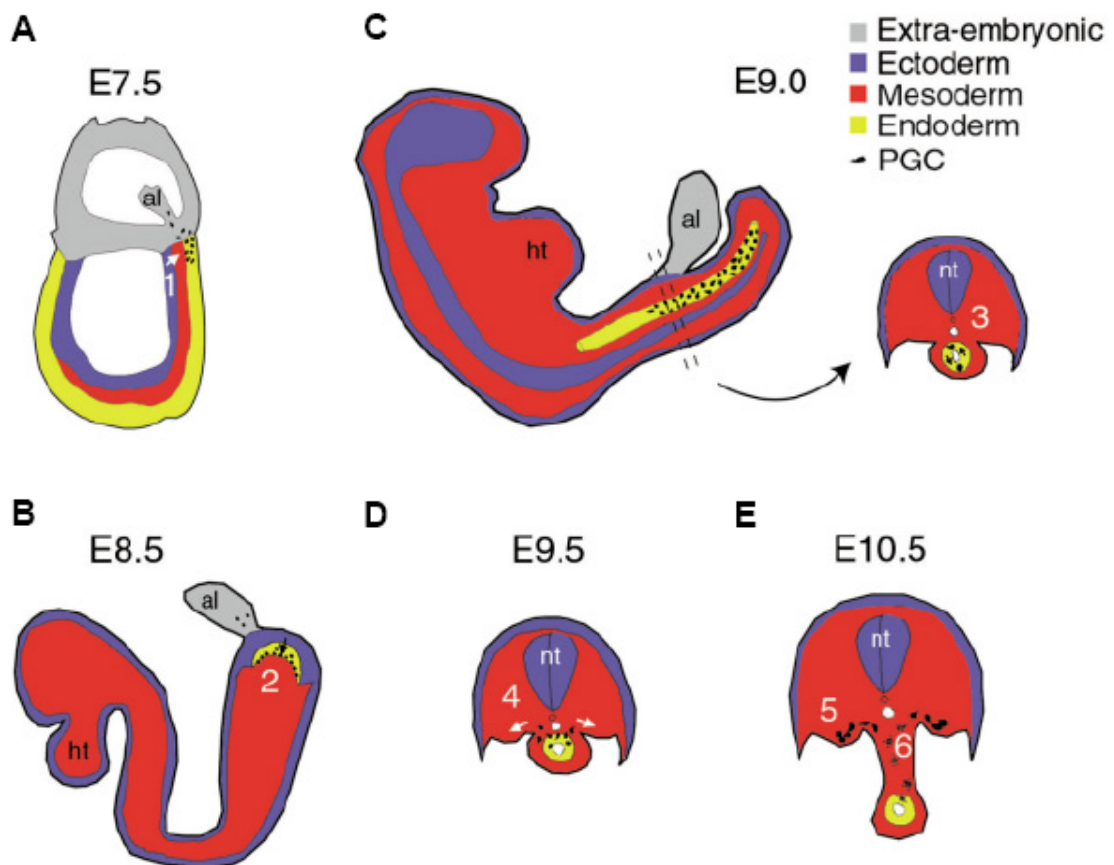


Figura 2. Migrazione delle cellule germinali nel topo. Il comportamento delle PGCs può essere suddiviso in 6 stadi temporali. A) le PGCs si differenziano nell'epiblasto prossimale; B) le PGCs dall'endoderma vengono incorporate nell'intestino in via di formazione; questo processo può essere passivo o attivo; C) le PGCs sono confinate nell'intestino, ma si muovono liberamente tra le cellule dell'epitelio intestinale; D) le PGCs migrano verso le creste genitali in formazione; E) le PGCs iniziano a raggrupparsi, formando una rete di cellule in migrazione. Abbreviazioni: al, allantoide; ht, cuore, nt, tubo neurale. Da Molyneaux e Wylie, *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 537-544.

Le PGC dei mammiferi sono strettamente associate alle cellule sulle quali migrano, e si spostano emettendo filopodi sopra la superficie delle cellule sottostanti. È probabile che la fibronectina sia un substrato importante per la migrazione delle PGC e le cellule germinali prive delle integrine che agiscono da recettori per queste proteine della matrice extracellulare non possono migrare nelle gonadi. Sebbene non si sia trovato plasma germinale nei mammiferi, il mantenimento della totipotenza è stato messo in relazione con l'espressione di un fattore di trascrizione nucleare Oct4. All'inizio della segmentazione, questo fattore è espresso nei nuclei di tutti i blastomeri, ma durante la gastrulazione, è espresso soltanto in quelle cellule dell'epiblasto posteriore che si ritiene diano origini alle cellule germinali primordiali.

Le cellule germinali primordiali (PGC) dopo la propria migrazione, per attività ameboide, lungo il mesentero dorsale si localizzano nelle *creste genitali* che si formano nell'epitelio celomatico (mesoderma) e che danno origine allo stroma delle gonadi, alle cellule interstiziali ed alle cellule di sostegno. Le creste genitali sono due ispessimenti longitudinali della somatopleura, localizzate tra il mesentero dorsale ed il mesonefro; consistono in una proliferazione dell'epitelio celomatico ed un addensamento dell'epitelio sottostante (Fig. 3). Giunti a livello del mesenchima delle creste genitali, i gonociti si dividono ripetutamente e si associano a cellule mesodermali formando strutture cordoniformi, *i cordoni sessuali primitivi*, immersi nel tessuto mesenchimale della gonade in via di sviluppo (Monesi, 1992).



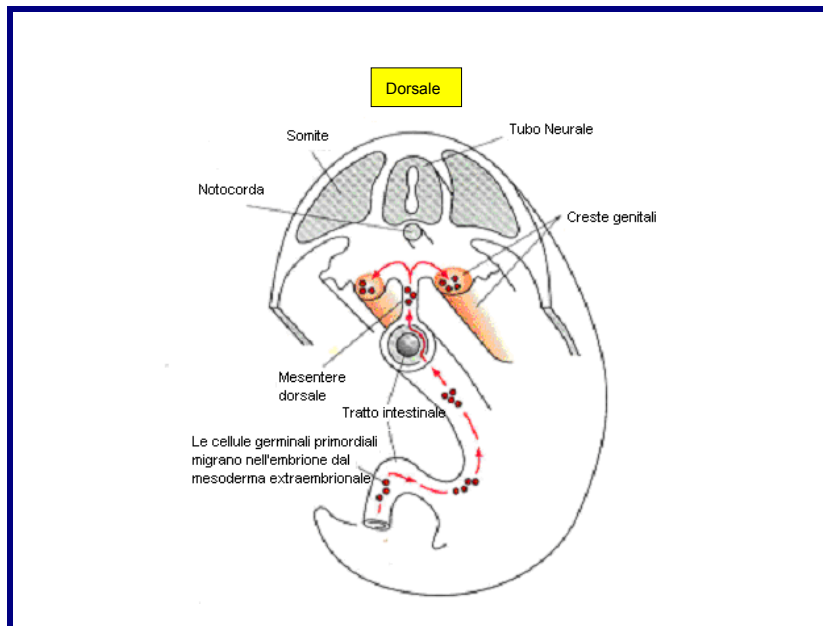


Figura 3. Schema rappresentante la migrazione delle cellule germinali primordiali verso le creste genitali. Da Monesi, Istologia 1992.

Fino a questo momento non è possibile distinguere le gonadi maschili da quelle femminili, per questo si parla di *gonadi indifferenziate*. La posizione midollare o corticale che i cordoni sessuali assumono a carico delle creste genitali, rappresenta la prima manifestazione della differenziazione sessuale. Nell'embrione maschile i cordoni sessuali si localizzano in posizione midollare, nella femmina, invece occupano la corteccia della gonade in sviluppo.

Le fasi iniziali di sviluppo delle gonadi hanno andamento temporale diverso nel maschio e nella femmina. Il differenziamento della gonade femminile è molto più lento rispetto a quello maschile. Il tessuto genitale femminile, infatti, rimane indifferenziato per lungo tempo prima di dare origine alle cellule follicolari.

Le cellule germinali primordiali femminili si differenziano in principio in ovogoni. Gli ovogoni sono circondati da cellule follicolari e sono connessi a queste cellule tramite ponti intercellulari, e sono caratterizzati da un'alta frequenza di divisioni mitotiche. Durante l'interfase che segue l'ultima divisione mitotica, gli ovogoni realizzano l'ultima replicazione del loro DNA. Giunti al termine della

loro proliferazione mitotica, gli ovogoni si avviano a sostenere i primi stadi della profase della prima divisione meiotica. Una volta iniziato il processo meiotico gli ovogoni vengono definiti **oociti primari** (Smits e coll., 2002). Quando gli oociti si arrestano in meiosi allo stadio di diplotene della profase I, i precursori delle cellule follicolari si differenziano andando a formare la parete del follicolo ovarico primordiale. Nel **follicolo primordiale** l'oocita primario, del diametro di circa 20 µm, è circondato da un monostrato di cellule follicolari appiattite che poggiano su una sottile lamina basale. Alla nascita l'ovaio è popolato da un pool di follicoli primordiali, diverso a seconda della specie. L'ovaio contiene 20000, 160000, 1000000 follicoli rispettivamente nei ratti, nelle pecore e nell'uomo. E' stato visto che ci sono enormi differenze individuali anche all'interno della stessa specie. Per esempio, ovaie di pecora Ile-de-France di due anni di età possono contenere da 20000 a 86000 follicoli. Ovaie di donna di 45 anni di età possono contenere da 1500 a 24000 follicoli. I follicoli primordiali sono localizzati a livello della cortex ovarica e costituiscono il maggior numero di follicoli contenuti nell'ovaio (>95%).

Dopo la nascita, in seguito a segnali che originano a livello ovarico, una parte dei follicoli primordiali viene indotta ad accrescersi e gli oociti insieme alle cellule follicolari di supporto si sviluppano in maniera coordinata. L'attività mitotica dell'oocita rimane bloccata per tutto il periodo allo stadio di vescicola germinale.

Il totale dei follicoli primordiali rappresenta, insomma, una sorta di serbatoio del gamete femminile che per l'intervento di non ben definiti fattori intraovarici vengono continuamente dimessi dal pool di riserva ed avviati allo sviluppo. Pertanto in qualsiasi momento noi possiamo riscontrare sulla superficie dell'ovaio, sia in stagione riproduttiva che anaestrale, un certo numero di follicoli a diverso stadio di sviluppo.

A partire dallo stadio di follicolo primordiale, l'ovocita richiede settimane o mesi per completare la sua fase di crescita incrementando il suo volume di circa 100 volte. L'ovocita è essenziale per la

formazione del follicolo e senza la sua presenza, il follicolo non è assolutamente in grado di costituirsi e svilupparsi. Questo è in contrasto con quanto si verifica invece nel maschio dove il tubulo seminifero è in grado di organizzarsi in assenza degli spermatozoi.

Nel momento in cui le cellule follicolari che circondano l'ovocita si trasformano in cellule cuboidali, il follicolo da primordiale si converte in **follicolo primario**. Anatomicamente i follicoli primari si localizzano a livello di cortex ovarica ed assumono disposizioni variabili a seconda della specie: nei ruminanti e nella scrofa sono isolati o sparsi; sono invece raggruppati in ammassi nei carnivori e talvolta nella cavalla (Barone, 1994). Nel follicolo primario lo strato di cellule della granulosa, è circondato da una membrana basale. L'ovocita presenta un sottile involucro rifrangente, la *zona pellucida* (*membrana vitellina* negli invertebrati), che aumenterà di volume negli stadi successivi. Essa è un prodotto di secrezione sia dell'ovocita che delle cellule follicolari ed è costituita da glicoproteine, tra le quali ZP1, ZP2 e ZP3. Quest'ultima è responsabile della specie-specificità funzionando da recettore per gli spermatozoi e da induttore della reazione acrosomiale. Le cellule della granulosa mantengono tuttavia, anche dopo l'interposizione della zona pellucida, il contatto con l'ovocita attraverso giunzioni di tipo "gap" con l'ooplasma. Giunzioni dello stesso tipo collegano anche le cellule follicolari tra di loro e sono importanti per la comunicazione e il trasferimento in queste cellule di segnali e metaboliti, vista la mancanza di un diretto supporto ematico.

Le gap junction sono canali acquosi di natura proteica, che consentono il passaggio di molecole idrosolubili con peso molecolare inferiore ai 1000 Dalton (Buccione e coll., 1990). Le proteine che costituiscono questi canali sono la Connexina 37 (Cx37), presente nelle giunzioni tra oocita e cellule del cumulo (Simon e coll., 1997) e la Connexina 43 (Cx43) tipica delle giunzioni tra le cellule del cumulo (Vozzi e coll., 2001). La quantità e le dimensioni dei canali tra le cellule non sono costanti; variano in risposta a fattori ambientali intra ed extracellulari, quali la disponibilità di

AMPC (Adenosina Monofosfato ciclica), e l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio (Mattioli e coll., 1998).

Le connessioni che si stabiliscono tra oocita e cellule somatiche sono indispensabili dunque alla crescita dell'oocita stesso in quanto garantiscono l'assorbimento di sostanze nutritive che altrimenti non potrebbero essere assunte a causa delle notevoli dimensioni dell'oocita, della sua impossibilità a muoversi e della scarsa permeabilità della sua membrana. Le cellule della granulosa trasferiscono facilmente sostanze a basso peso molecolare, come amminoacidi, zuccheri e ribonucleosidi (Senbon e coll., 2003) e hanno inoltre l'importante compito di metabolizzare alcune molecole prima di trasferirle all'oocita. Il glucosio, per esempio, non viene utilizzato tal quale dalla cellula uovo, ma previa riduzione in piruvato da parte delle cellule follicolari (Tanghe e coll., 2002). Un'altra importante funzione della comunicazione tra cellule del cumulo e oocita è quello della regolazione sulla ripresa meiotica della cellula uovo.

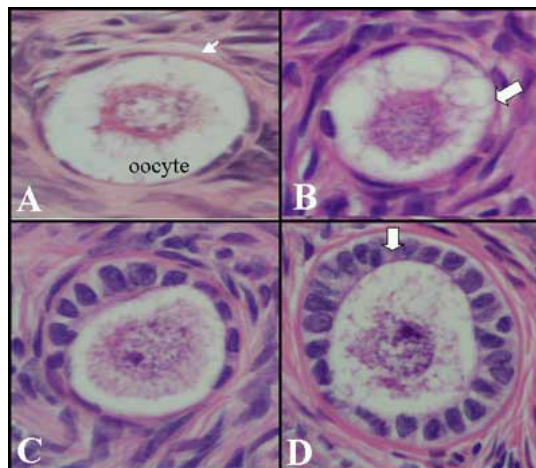


Figura 4. Stadi iniziali della follicologenesi. A) Follicolo primordiale; la freccia indica le cellule della granulose appiattite; B) transizione tra follicolo primordiale e primario; la freccia indica le cellule della granulose cuboidali; C) Follicolo primario con cellule della granulosa cubiche; D) transizione tra follicolo primario e secondario.

E' evidente che ovocita e cellule della granulosa manifestano un sistema metabolico intimamente legato. Le stesse cellule della granulosa sono in stretto contatto fra loro per una attività metabolica di tipo sincrono. Le cellule della granulosa, inoltre, producono una varietà di **fattori di crescita** e di citochine che hanno un ruolo decisivo sul futuro sviluppo dell'ovocita. Uno di questi è rappresentato dal kit-legante (KL) che si lega ad una tirosina chinasi presente sulla superficie dell'ovocita. La mancanza di questo fattore determina il blocco dello sviluppo dell'ovocita.

In un recente passato si riteneva che l'ovocita fosse una cellula sottoposta alla totale influenza delle cellule della granulosa. Esperienze condotte utilizzando tecniche dell'ovocitotomia (asportazione dell'ovocita dal follicolo) hanno evidenziato, invece, che il gamete influenza attivamente lo sviluppo del follicolo. Gli studi hanno potuto accertare che anche l'ovocita sintetizza dei fattori di crescita indispensabili per l'attività delle cellule della granulosa.

Fra questi fattori uno è rappresentato dal GDF-9 (Growth Differentiation Factor) ed un altro dal BMP 15 (Bone Morphometric Protein), entrambe le molecole appartengono all'enorme famiglia del TGF-beta. Gli appartenenti alla super-famiglia del TGF-beta svolgono un'ampia gamma di attività nell'interazione fra il tessuto epiteliale e quello mesenchimale, come ad esempio crescita cellulare, produzione di matrice extracellulare rimodellamento dei tessuti. La delezione o la mutazione del gene che controlla il BMP 15 e GDF 9 determina una mancata proliferazione delle cellule della granulosa ed un arresto della crescita dell'ovocita.

Studi in vitro condotti utilizzando il GDF-9 ed il BMP-15 ricombinante hanno permesso di stabilire che entrambi i fattori sono in grado di stimolare la proliferazione delle cellule della granulosa, in modo particolare su follicoli ad uno stadio iniziale della formazione dell'antro. Da questo momento in poi si arresta il processo proliferativo ed inizia quello differenziativo con la formazione dei due tipi di cellule della granulosa.

Le cellule della granulosa sono inoltre in grado di sintetizzare un ormone ad attività locale chiamato l'Anti-Muller Hormon (AMH). L'ormone è stato evidenziato per la prima volta nel testicolo del feto. L'azione di questo ormone nel maschio è improntata alla regressione dei dotti del Muller dai quali si evolverà il tratto genitale femminile. Negli individui di sesso femminile l'AMH avrebbe invece il compito di inibire il processo di attivazione del follicolo e di limitare l'azione di reclutamento dei follicoli dal pool di riserva. Studi in vitro hanno mostrato che la presenza in coltura dell'AMH determina una riduzione del 40% della crescita follicolare. L'AMH è capace di limitare l'avvio allo sviluppo dei follicoli primordiali e perciò funziona come una sorta di inibitore dell'attività di crescita follicolare nell'ovaio durante le prime fasi del processo di follicologenesi.

Questa azione inibitoria è verosimilmente il risultato di un azione di tipo paracrino delle cellule della pre-granulosa sui follicoli primordiali. L'azione dell'AMH può di conseguenza influenzare l'attività dell'FSH nel reclutamento dei follicoli durante il ciclo sessuale. Infatti recenti studi evidenziano che in assenza di AMH la risposta follicolare alla gonadotropina ipofisaria si è mostrata più evidente. Si è pertanto ipotizzato che l'AMH esercita nell'ovaio una duplice azione: di inibire lo sviluppo dei follicoli primordiali e di limitare l'effetto di stimolo dell'FSH sulla crescita dei follicoli pre-antrali e dei piccoli follicoli antrali durante il ciclo sessuale.

I primi segnali che si intravedono durante questa continua attività di dismissione dei follicoli primordiali dal pool di riserva sono rappresentati dall'avvio dell'attività di sintesi di RNA dell'oocita (alcuni di questi RNA vengono espressi da geni che controllano la sintesi proteica nella zona pellucida). Questo genere di attività determina l'aumento delle dimensioni dell'oocita, l'attività di mitosi nelle cellule piatte che avvolgono l'oocita nonché la loro successiva differenziazione in cellule cuboidali, molto simili alle cellule della granulosa, e la completa formazione della zona pellucida.

L'attività continua incessantemente dando vita ai 2-3 strati di cellule della granulosa che avvolgono l'ocita. La comparsa di un secondo strato di cellule della granulosa caratterizza il **follicolo secondario** (o **follicolo preantrale**).

Dalla membrana basale sulla quale poggiano le cellule piatte si iniziano a differenziare le cellule della teca che avvolgono interamente il follicolo.

Il follicolo dimesso dal pool a questo punto presenta un diametro di circa 0.1 mm con un quantitativo di cellule della granulosa pari a 100.000. Queste strutture sono fortemente presenti in tutto l'ovaio, raggiungono un quantitativo enorme ma limitato e rappresentano la quota di follicoli pre-antrali che proseguiranno nel loro sviluppo caricandosi di recettori per le gonadotropine ipofisarie. Naturalmente altri eventi strutturali caratterizzano lo sviluppo del follicolo. Tra questi la costituzione della teca, che si dividerà funzionalmente in *teca esterna* formata da tessuto connettivo e da cellule muscolari lisce scarsamente vascolarizzata (Tajima e coll., 2007) che delimita morfologicamente il follicolo, attorno alla quale si sviluppa tutta la rete mirabile ematica e *teca interna* che si caratterizzerà per l'attività endocrina. La comparsa dello strato tecale del follicolo è dunque associato alla comparsa della vascolarizzazione. Infatti simultaneamente allo sviluppo della teca, il follicolo acquisisce le arteriole che terminano in una rete di capillari, adiacenti alla membrana basale. Con la formazione dei capillari, le cellule interstiziali della teca intraprendono una nuova via di differenziazione con l'acquisizione dei recettori per l'LH (Ormone Luteinizzante) e la capacità della steroidogenesi. (Yen e coll., 2000).

L'acquisizione dei recettori per l'FSH e per l'LH rappresenta il presupposto affinché il follicolo possa entrare, dopo una prima fase di sviluppo gonadotropo-indipendente regolata da fattori intraovarici, nello stadio gonadotropino-dipendente.

Il follicolo continua la sua crescita fino ad arrivare all'incirca a 2 mm di diametro, stadio per il quale si ritiene che il follicolo abbia acquisito la completa capacità di sintesi steroidogenetica e

risulta totalmente dipendente dalle gonadotropine ipofisarie. In questa fase si osserva che i follicoli appaiono strettamente dipendenti dall'attività dell'FSH e ciò li rende particolarmente sensibili ai fenomeni di atresia. Da questo momento il controllo dello sviluppo e crescita follicolare passa sotto la guida dell'FSH ed LH.

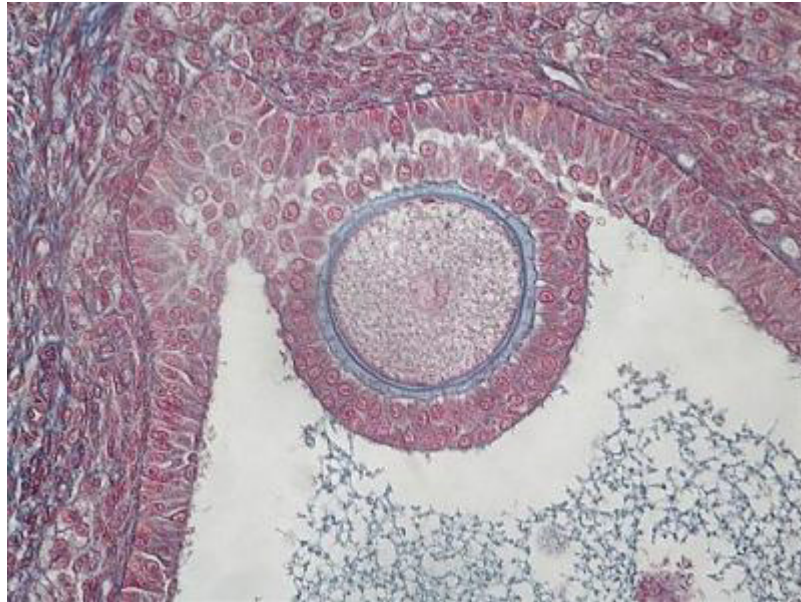


Figura 5. Particolare di un follicolo terziario che evidenzia il cumulo ooforo.

Sotto lo stimolo dell'LH, le cellule della teca iniziano a produrre androgeni che per diffusione, raggiungono le cellule della granulosa che li convertono in estrogeni ( $E_2$ ). Gli  $E_2$  in concomitanza all'azione dell'FSH, determinano l'aumento del numero delle cellule della granulosa fino a formare 10-12 strati attorno all'ocita. In questa fase vengono a costituirsi delle lacune tra le cellule contenenti liquido follicolare; si passa così allo stadio di **follicolo early-antral**.

Il liquido follicolare è ricco di glicosaminoglicani solforati e deriva dalla teca interna per trasudazione di plasma, con l'apporto di fattori di crescita ed ormoni steroidei secreti dalle cellule follicolari (Prevost e coll., 1989). La quantità di liquido follicolare aumenta, portando così alla formazione di numerose piccole cavità che confluiscono formando l'*antro*. Il follicolo a questo



punto è detto **“antrale”** o **“terziario”** o **“di Graaf”**. Le cellule follicolari che circondano l’oocita costituiscono il *cumulo ooforo* (Bortolami e coll., 2000); le cellule del cumulo che sono a diretto contatto con la zona pellucida, hanno forma cilindrica o colonnare e costituiscono la cosiddetta *corona radiata* (Monesi, 1992). Le connessioni garantite dalle gap-junctions tra le cellule follicolari e la corona radiata da una parte, e la corona radiata e l’oocita dall’altra, garantiscono lo sviluppo coordinato del follicolo e della cellula uovo (Eppig, 2001). Le cellule follicolari che formano la parete pluristratificata del follicolo, e sono avvolte dalle teche, costituiscono lo strato della granulosa. Tra la granulosa e la teca interna è interposta la membrana basale (Monesi, 1992).

L’oocita, presente nel follicolo antrale, raggiunge le sue dimensioni definitive e, a causa della presenza dell’antro, perde la posizione centrale all’interno del follicolo e va ad assumere una posizione periferica, collocandosi a ridosso della parete. L’oocita raggiunge anche la completa competenza meiotica, riprendendo la meiosi. Ciò è possibile poiché durante le diverse fasi dell’accrescimento, l’oocita accumula numerosi fattori coinvolti nel ciclo cellulare quali l’MPF (Meiosis Promoting Factor) e le cicline, proteine regolatrici del ciclo, necessarie per la ripresa della progressione meiotica (Fulka e coll., 1998).

Nelle fasi finali della follicologenesi si verificano importanti cambiamenti nel follicolo e nell’oocita:

- la quantità di liquido follicolare nell’antro aumenta bruscamente in risposta all’azione dell’LH;
- le cellule del cumulo ooforo subiscono alterazioni citoscheletriche e si trasformano in una massa meno compatta e mucillaginosa. La zona di attacco del cumulo alla granulosa, pertanto, si riduce notevolmente e l’oocita, con il suo rivestimento di cellule, rimane sospeso nell’antro;

- il brusco aumento preovulatorio delle gonadotropine circolanti, oltre ad indurre la ripresa della maturazione meiotica dell'ovocita, stimola anche le cellule del cumulo a produrre notevole quantità di acido ialuronico, che si accumula tra le cellule stesse e le dissocia (*espansione del cumulo ooforo*). Il cumulo pertanto aumenta notevolmente di dimensioni;
- l'ovocita, che per tutto il periodo di accrescimento del follicolo era aumentato di dimensioni senza rilevanti modificazioni nucleari, completa la prima divisione meiotica poche ore prima dell'ovulazione. I cambiamenti preovulatori dell'ovocita prendono il nome di *maturazione dell'ovocita*. Il nucleo dell'ovocita, denominato *vescicola germinale*, si sposta alla periferia della cellula, subito al di sotto della membrana plasmatica. I cromosomi si accorciano e si ispessiscono. L'involucro nucleare scompare e si forma il fuso meiotico. I cromosomi omologhi si separano ai due poli e tra questi si forma un piccolo solco di segmentazione eccentrico che fa sì che l'ovocita primario si divida nell'ovocita secondario, contenente quasi tutto il citoplasma della cellula madre, e nel primo globulo polare, che viene a trovarsi nello spazio perivitellino, tra l'oolemma e la zona pellucida. Immediatamente si forma il fuso meiotico della seconda divisione ed i cromosomi dell'ovocita si dispongono sulla piastra metafisica (metafase II). L'ovulazione avviene in questo stadio. Il completamento della seconda divisione meiotica, con formazione del secondo globulo polare, è determinato dalla penetrazione dello spermatozoo al momento della fecondazione;
- poco prima della rottura del follicolo, il tratto di parete del follicolo (granulosa e teche) rivolto verso la superficie dell'ovaio e la parete di questo organo, si assottigliano formando una zona translucida denominata *stigma* o *macula pellucida*, che sporge a forma di vescichetta sulla superficie dell'ovaio. La parete del follicolo e quella dell'ovaio, in corrispondenza dello stigma, si rompono (rottura o deiscenza del follicolo) e l'ovocita,

rivestito dal cumulo ooforo è espulso dall'ovaio (*ovulazione*) e penetra nella tuba uterina.

(Monesi, 1992).

In corrispondenza del follicolo ovulato si formerà il **corpo luteo**, una sorta di formazione cicatriziale costituita da cellule follicolari differenziate che si raggruppano in tre classi: le cellule endoteliali, i macroluteociti, derivanti dalla granulosa, e i microluteociti, derivanti dalla teca interna.

E' a carico della membrana dei microluteociti che si trovano i recettori per l'LH; i macroluteociti sono invece deputati alla sintesi di steroidi. L'interazione fra questi due tipi cellulari porta alla secrezione di progesterone ( $P_4$ ) sotto la stimolazione dell'LH.

Nel caso in cui si instauri una gravidanza si parla di *corpo luteo gravidico* che persiste per tutto l'arco della gestazione con la funzione di produrre  $P_4$ . Questo ormone svolge un ruolo fondamentale nella preparazione dell'apparato genitale per accogliere un'eventuale gravidanza e agisce inoltre come immunosoppressore per impedire il rigetto del conceptus.

Se l'oocita non è fecondato, il corpo luteo prende il nome di *corpo luteo spurio*, cessa la produzione di ormoni e le cellule luteiniche degenerano. Si accumula, al suo interno, materiale intercellulare ialino che trasforma il corpo luteo in una cicatrice bianca denominata *corpo albicans*; a ciò consegue un incremento nella sintesi di FSH che porta ad una nuova crescita follicolare ed all'inizio di un nuovo ciclo estrale (Gore-Langton e coll., 1994).

### ***Competenza di sviluppo dell'oocita***

L'oocita viene definito competente quando, in seguito all'accrescimento raggiunge la maturazione citoplasmatica, epigenetica e nucleare che gli consente di riprendere spontaneamente o sotto appropriata stimolazione ormonale il proprio ciclo cellulare. La fase di massimo accrescimento

dell'oozita, si verifica in momenti diversi in base alla specie: nel topo è stato osservato al momento della differenziazione dell'antro, nei mammiferi domestici, invece l'accrescimento dell'oozita è completo solo successivamente alla formazione dell'antro.

Durante l'accrescimento, nel citosol dell'oozita si accumulano sostanze di riserva e fattori di controllo del ciclo cellulare come le cicline e l'MPF (Fulka e coll., 1998). L'oozita acquisisce una serie di complessi macchinari che gli consentono la riattivazione meiotica e, dopo un'eventuale fecondazione, la capacità di sostenere un corretto programma di sviluppo embrionale in grado di condizionare il mantenimento della gravidanza, coordinare l'organizzazione fetale ed evitare l'insorgenza di forme patologiche nell'individuo dopo la nascita (Eppig e coll., 1996).

La maturazione epigenetica consiste nel raggiungimento del corretto assetto epigenetico della cromatina materna, che richiede interventi strutturali di condensazione della cromatina stessa, biochimici, come processi di metilazione e acetilazione che coordinano la trascrizione globale della cellula definendone il potenziale di sviluppo (De La Fuente e coll., 2004). In effetti, la cromatina, nella vescicola germinale, cambia da una configurazione diffusa o decondensata, definita NSN (non surrounded nucleolus), ad una configurazione condensata intorno al nucleolo, definita SN (surrounded nucleolus) (Zuccotti e coll., 1995). Solo gli oociti completamente accresciuti presentano configurazione di tipo SN, mentre gli oociti in crescita presentano più frequentemente la configurazione NSN (Debey e coll., 1993). Il passaggio da una configurazione all'altra è temporalmente coordinata mediante la repressione globale della trascrizione (De La Fuente e coll., 2001). Da un punto di vista funzionale questa differenza morfologica si riflette sulla capacità o incapacità della cellula uovo di progredire nello sviluppo embrionale: infatti solo l'oozita con configurazione nucleare SN si è dimostrato capace di completare la progressione meiotica ed arrivare allo sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti, mentre quello NSN si

blocca allo stadio di due cellule. A livello molecolare, la causa dei differenti assetti cromatinici, è stata individuata nella diversa disposizione dei centromeri che negli oociti NSN sono localizzati alla periferia del nucleolo, negli oociti SN, invece, si localizzano sulla superficie del nucleolo andando a costituire il caratteristico anello di cromatina (Longo e coll., 2003).

Dopo il picco dell'LH si osserva la ripresa della divisione meiotica e il raggiungimento della maturazione nucleare. Questo processo si realizza con la rottura della vescicola germinale (GVBD: *Germinal Vesicle Break Down*), la progressione allo stadio di metafase I (MI), l'espulsione del primo globulo polare (contenente la metà dei cromosomi della cellula) e il raggiungimento dello stadio di metafase II (MII). Dopo l'ovulazione e durante il trasporto lungo la tuba uterina, l'oocita è bloccato in metafase II fino al momento della fecondazione. Un presupposto fondamentale per la ripresa meiotica dell'oocita, è la continua interazione di quest'ultimo con le cellule del cumulo. Queste cellule rispondono al segnale dell'LH inducendo l'allontanamento di molecole inibitorie, come ad esempio l'AMPC nel topo, e l'attivazione di segnali stimolatori, come ad esempio un aumento intracellulare di  $Ca^{2+}$  che diffonde, attraverso le gap junction, all'interno dell'oocita (Mattioli e coll., 1998). La capacità della cellula uovo di riprendere la meiosi è conseguenza anche dell'attivazione di importanti molecole, come ad esempio le MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Ohashi e coll., 2003). In particolare Fan e coll. hanno ipotizzato la presenza di un fattore solubile, secreto dalle cellule del cumulo, che porta alla fosforilazione e all'attivazione delle MAPK dell'oocita, contribuendo alla ripresa meiotica dello stesso (Fan e coll., 2004) (Fig. 6). Nei mammiferi, l'attivazione delle MAPK è necessaria per la ripresa della progressione meiotica dell'oocita indotta dalle gonadotropine, mentre non è indispensabile per la ripresa spontanea (Fan e Sun, 2004). Dopo la fase GVBD, le MAPK hanno anche il compito di regolare l'assemblaggio del fuso mitotico e, infine, durante l'estrusione del globulo polare sono associate all'anello di citocinesi (Lee e coll., 2000).

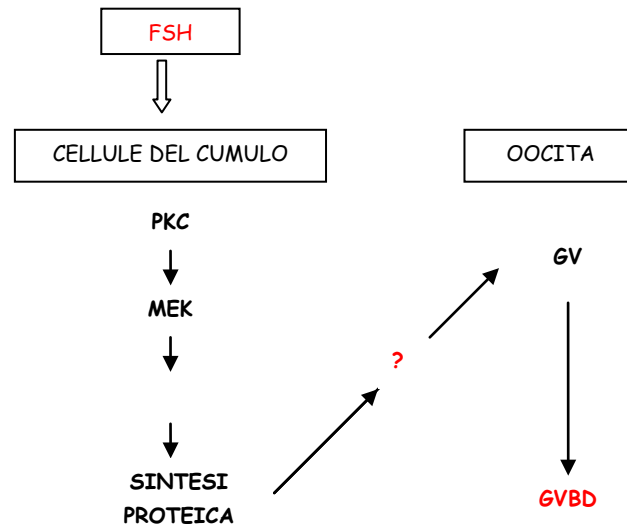


Figura 6: Schema del meccanismo d'azione delle MAPK.

Insieme alla maturazione nucleare, dopo il picco dell'LH, anche il citoplasma subisce numerose variazioni relative a una ridistribuzione degli organelli citoplasmatici:

1. aumenta il numero, la morfologia e la distribuzione dei mitocondri che assumono posizione corticale;
2. l'apparato del Golgi subisce cambiamenti strutturali;
3. aumenta il numero di ribosomi;
4. i granuli corticali migrano verso la periferia dell'ooplasma (requisito essenziale per ottenere il blocco della polispermia) (Galeati e coll., 1991).

Si verifica inoltre una riorganizzazione e un utilizzo dei prodotti accumulati durante l'accrescimento, ed una riprogrammazione della sintesi proteica che coinvolge la sintesi e l'accumulo di fattori coinvolti nel ciclo cellulare, come ad esempio l'MPF (Fulka e coll., 1998).

Infine l'oocita acquisisce la capacità di decondensare un eventuale spermatozoo penetrato attraverso l'accumulo di elevati livelli di GSH (glutazione) e la sintesi di istoni necessari per il

rimodellamento della struttura cromatinica spermatica e per rendere quindi possibile la formazione di due pronuclei e la loro fusione (Spinaci e coll., 2004).

Se sono portati a termine positivamente tutti e tre gli eventi maturativi (maturazione del nucleo e del citoplasma e maturazione epigenetica), la cellula uovo riesce a dirigere la transizione da oocita ad embrione utilizzando i trascritti accumulati durante oogenesi, accrescimento e maturazione. Inoltre l'oocita è in grado di riorganizzare le cromatine parentali e contemporaneamente attivare, durante i primi cicli cellulari, il macchinario necessario a promuovere l'attivazione del genoma embrionale. L'oocita, infatti, mette in atto un rimodellamento nucleare preliminare alla costituzione del nuovo genoma embrionale. Il compito più complesso che l'oocita deve svolgere è proprio quello di accogliere il DNA dello spermatozoo, convertirlo in DNA somatico, e riprogrammarlo in modo coordinato con il DNA materno. La conversione del DNA spermatico in DNA somatico avviene solo dopo la rottura, operata da GSH, dei ponti disolfuro presenti fra le molecole di protamina associate al DNA dello spermatozoo. In seguito a questi eventi le protamine vengono sostituite dagli istoni e la cromatina paterna assume un'architettura somatica. Studi recenti hanno evidenziato, oltre a modificazioni di carattere strutturale, anche modificazioni che riguardano l'assetto epigenetico. Prima della singamia, infatti, i processi di metilazione/demetilazione del DNA e acetilazione/deacetilazione degli istoni vengono condotti dall'ooplasma in modo differenziato sulla cromatina paterna e materna (Oswald e coll., 2000). Tali eventi sono fondamentali per trasformare una cellula altamente differenziata, come l'oocita, in un complesso multicellulare totipotente quale è l'embrione nelle prime fasi di sviluppo.

L'attivazione del genoma embrionale richiede, quindi, sia una complessa serie di processi preliminari coordinati dall'ooplasma, che interessano il nucleo attraverso la riorganizzazione della cromatina (Ng and Bird, 1999), sia eventi citoplasmatici volti a garantire la presenza di fattori di trascrizione necessari per attivare e modulare la nuova trascrizione genica.

Dal controllo di questi processi, che si realizzano fino allo stadio di 2 cellule nel topo, di 4 cellule nell'uomo, nel ratto e nel maiale, e 8-16 cellule nella pecora e nel bovino, dipenderà il successo della trascrizione del genoma embrionale e quello dell'embriogenesi (Ng and Bird, 1999). L'eredità materna pertanto, condiziona in maniera preponderante la fase di trascrizione e pone le basi molecolari per dirigere in maniera corretta la fase di attivazione del genoma embrionale, da cui dipenderà l'efficienza con cui si realizzano i meccanismi preposti allo sviluppo del nuovo individuo.

Nell'ocita maturato in vitro, il grado di competenza raggiunto può essere valutato mediante due tecniche: la fecondazione e l'attivazione partenogenetica in vitro. Nel primo caso l'attivazione dell'ocita è dovuta alla fusione con lo spermatozoo; nel secondo, invece, avviene, in seguito a stimolazione con diversi agenti di natura fisica o chimica, in assenza del gamete maschile.

Le prime ricerche riguardanti la fecondazione in vitro degli oociti di mammifero furono condotte nel 1981 da Cuthbertson e coll. su oociti di topo e di criceto. Il primo evento segnalato durante l'attivazione dell'ocita è il rilascio di  $Ca^{2+}$  dalle riserve intracellulari del reticolo endoplasmatico in seguito ad una serie di periodiche iperpolarizzazioni a carico della membrana plasmatica dell'ocita (Fig. 7). Il meccanismo di rilascio del calcio all'interno dell'ocita subisce una notevole riorganizzazione durante la sua maturazione. Uno dei cambiamenti che si verificano è l'esposizione dei recettori per l'Inositolo trifosfato (IP3) nel reticolo endoplasmatico (Fitzharris e coll. 2003). L'aumento di calcio comporta l'idrolisi di un fosfolipide di membrana, il fosfatidilinositolo 4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) operata dalla fosfolipasi C (Parrington e coll. 2000). Dall'idrolisi del PIP<sub>2</sub> derivano due prodotti: l'IP3, idrosolubile, e l'1,2-diacilglicerolo (1,2-DAG) che resta localizzato a livello della membrana cellulare. L'IP3 diffonde nel citosol, si lega ai suoi recettori e promuove il rilascio del calcio (Miyazaki e coll., 1993). Il 1,2-DAG rimane nella



membrana e attiva la protein chinasi C (PKC) responsabile anch'essa delle oscillazioni di calcio all'interno dell'ocita.

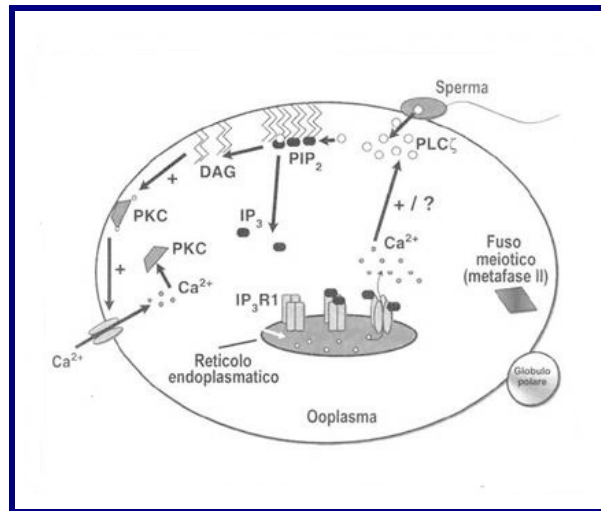


Figura 7: Meccanismi proposti per l'aumento del calcio intracellulare dopo la fusione della membrana dello spermatozoo e dell'ocita durante la fecondazione.

Negli oociti fecondati, il rilascio di Ca $^{2+}$  si verifica poco dopo la fusione delle membrane dei gameti e si manifesta in una serie di oscillazioni a bassa frequenza (intervalli: 6-31 minuti nel topo; 8-25 minuti nella bovina), che continuano per diverse ore. I livelli di calcio aumentano da un livello basale di 0,1 $\mu$ M (negli oociti in MII) fino a circa 1  $\mu$ M. Nel topo la risposta del [Ca $^{2+}$ ], avviata dallo spermatozoo cessa in coincidenza con la formazione dei pronuclei, mentre in mammiferi di altre specie le oscillazioni persistono per tutto il primo ciclo cellulare (Nakada e coll. 1995).

L'incremento della concentrazione di calcio all'interno dell'ocita è la causa principale della cosiddetta *reazione corticale* che consiste in una massiccia esocitosi di granuli corticali contenenti enzimi, tra cui diverse proteasi che diffondono nella zona pellucida inducendo la *reazione zonale*. Le proteasi determinano infatti un'alterazione strutturale della zona pellucida che diviene pertanto impermeabile ad altri spermatozoi.

L'attività meiotica degli oociti dei mammiferi domestici è spontaneamente arrestata allo stadio di MII; il successivo sviluppo nucleare dipende pertanto dall'attivazione sperma-indotta. Una volta penetrato nel citoplasma della cellula uovo, il nucleo dello spermatozoo perde la sua membrana, la cromatina diviene meno compatta ed assume aspetto filamentoso. Successivamente le vescicole del reticolo endoplasmatico dell'oocita si dispongono attorno alla cromatina del gamete maschile per ricostituire l'involucro nucleare. Si forma così il *pronucleo maschile* che contiene un corredo apolide di cromosomi. L'oocita, attivato dalla penetrazione dello spermatozoo, completa la seconda divisione meiotica ed emette il secondo globulo polare. A questo punto anche i cromosomi dell'oocita si decondensano e vengono avvolti da un nuovo involucro membranoso: si forma così il *pronucleo femminile* anch'esso aploide. L'ultima fase dell'attivazione oocitaria, che è anche il primo evento dello sviluppo embrionale, è rappresentato dall'unione dei due corredi cromosomici aploidi per formare lo *zigote* diploide. Comincia, a questo punto, la prima divisione mitotica dello zigote che determina la separazione dell'oocita nei primi due blastomeri. Alla prima divisione ne seguono altre che suddividono l'uovo in un numero crescente di blastomeri. Tale processo prende il nome di *segmentazione* il cui prodotto finale è una massa solida di cellule denominata *morula*. Mentre si segmenta la morula procede verso l'utero e giunta a questo livello si trasforma rapidamente in *blastocisti*; questa è composta da una cavità centrale ripiena di liquido, detta *blastocela*, da uno strato di cellule piatte periferiche che costituiscono il *trofoblasto* e da un ammasso di cellule detto *embrioblasto* attaccato ad un polo della superficie interna del trofoblasto e da cui si svilupperanno l'embrione, l'amnios, il sacco vitellino, l'allantoide ed il mesoderma del corion (Monesi, 1992).

La ripresa meiotica in assenza della penetrazione dello spermatozoo all'interno dell'ooplasma, viene definita attivazione partenogenetica o partenogenesi (Lee e coll., 2006). Il meccanismo dell'attivazione partenogenetica negli oociti ha lo scopo di mimare la cascata di eventi che si

manifestano nell'ooocita al momento della fecondazione. L'applicazione di stimoli di diversa natura inducono un aumento delle concentrazioni di calcio intracitoplasmatiche. Tale evento induce la ripresa meiotica dell'ooocita con la conseguente estrusione del secondo globulo polare. Subito dopo la stimolazione quest'ultimo viene inglobato nell'ooocita, proprio come lo spermatozoo, e avviene così la ricombinazione genetica e la formazione di un corredo cromosomico diploide.

In letteratura vengono riportati numerosi protocolli che si basano sostanzialmente sull'uso di agenti di natura chimica o fisica. Stimoli di natura chimica efficacemente utilizzati sono rappresentati da concentrazioni variabili di ionomicina ed etanolo (Loi e coll., 1998) usati singolarmente. Anche l'inattivazione dell'MPF o i trattamenti con inibitori della sintesi proteica, come la cicloexamide e la puromicina, che sono stati utilizzati per indurre la partenogenesi in oociti di suino (Machaty e coll., 1999) possono rappresentare tecniche efficaci.

Gli eventi innescati dall'attivazione partenogenetica sono in grado di indurre lo sviluppo embrionale di un oocita meioticamente competente (Loi e coll., 1998). Negli embrioni partenogenetici lo sviluppo si arresta dopo le prime divisioni cellulare e, nei rari casi in cui lo sviluppo prosegue, si osservano malformazioni a livello della placenta. Tale evento è da imputarsi all'esistenza dell'*imprinting genomico*, una forma di controllo dell'attivazione del genoma diretta da particolari geni che si ereditano in parte dalla madre e in parte dal padre. Alcune porzioni di genoma ereditate dalla linea materna e paterna vengono attivate nell'embrione, mentre altre restano inattive. Una delle funzioni dell'*imprinting* genomico sembra essere correlato ad uno sviluppo armonico dei tessuti embrionali ed extraembrionali (placenta). Venendo pertanto a mancare questo controllo, risulta impossibile lo sviluppo completo di embrioni partenogenetici.

Per quanto esposto precedentemente, nell'andare a valutare la capacità di sviluppo dell'ooocita, la partenogenesi supera i limiti oggettivi della fertilizzazione relativi soprattutto alle caratteristiche del materiale seminale. In effetti, pur disponendo di un oocita competente, un'alterazione

morfologica o funzionale degli spermatozoi potrebbe non indurne l'attivazione. Pertanto la partenogenesi in vitro risulta essere un indice di qualità della cellula uovo maturata in vitro.

### ***Aspetti endocrinologici della follicologenesi.***

Lo sviluppo follicolare si svolge inizialmente indipendentemente dalla stimolazione gonadotropa, sotto il controllo di fattori intraovarici,. Appena formato il follicolo secondario (preantrale), le cellule della granulosa esprimono recettori per FSH, estrogeni ed androgeni. La formazione dello strato tecale con specifici recettori per l'LH e la capacità steroido-sintetica dello stesso, avviene sempre nello stadio preantrale, in seguito all'acquisizione della vascolarizzazione follicolare. E' a questo punto che inizia la fase gonadotropo-dipendente. L' ipotalamo e le sue connessioni neuroendocrine che controllano la secrezione ormonale ipofisaria, formano la base della neuroendocrinologia della riproduzione (Fig. 8).

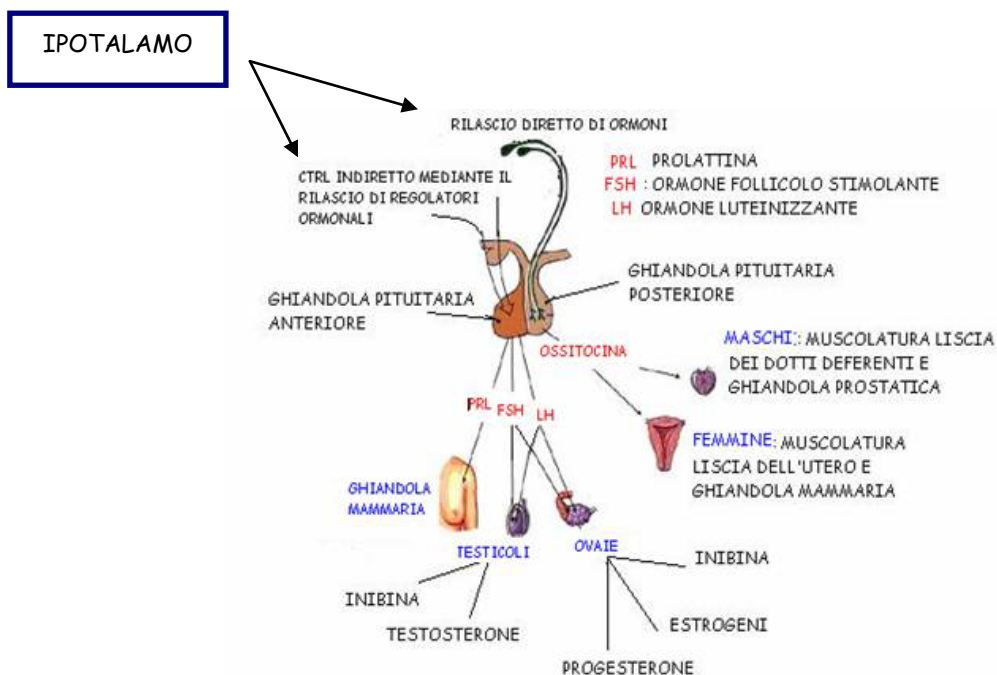


Figura 8: Schema del controllo endocrino degli ormoni sessuali.

L'ipotalamo esplica il suo controllo sull'ipofisi anteriore, attraverso un piccolo ormone peptidico, il GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormon*). Si tratta di un decapeptide prodotto nel nucleo preottico mediale dell'ipotalamo; il suo precursore è costituito da 56 amminoacidi ed è chiamato GAP (GnRH-peptide associato). Il GnRH viene rilasciato nell'eminenza mediana, raggiunge l'ipofisi anteriore attraverso il sistema portale ipofisario, e qui si lega a specifici recettori stimolando la sintesi ed il rilascio di gonadotropine e aumentando la sensibilità delle cellule gonadotrope al GnRH stesso.

E' necessario, inoltre, per la sintesi e secrezione di LH, ma solo parzialmente per la secrezione dell'FSH. Quest'ultimo risulta essere sotto il controllo di diversi fattori di origine ovarica come: l'inibina e l'estradiolo  che hanno un effetto a feed-back negativo sull'FSH, inducendo, con la loro secrezione, una progressiva diminuzione della concentrazione di questo ormone. Il GnRH inoltre ha un'emivita molto breve, ed è in grado di incrementare la secrezione di FSH ed LH solo per poche ore (2-4 ore). La secrezione basale o tonica di GnRH è di tipo pulsatile, specialmente per quanto riguarda l'LH, con emissioni intermittenti ad intervalli variabili a seconda dell'età, dello stadio del ciclo e dei fattori ambientali (alimentazione, stagione, fotoperiodo, temperatura, tipo di allevamento, ecc.). Tale secrezione basale di LH è importante per la crescita follicolare.

La pulsatilità del GnRH è fondamentale: l'esposizione ad alti livelli di GnRH causa una diminuzione della capacità di risposta dell'ipofisi (down-regulation dei recettori); al contrario, l'esposizione a basse quantità dell'ormone comporta un aumento del numero dei recettori (up-regulation).

Durante la fase estrale si verifica una caratteristica scarica di gonadotropine (prevalentemente di LH), detta secrezione fasica o "picco preovulatorio dell'LH", che è responsabile dell'ovulazione. Tale aumento preovulatorio è indotto dalle elevate concentrazioni di estrogeni provenienti dal follicolo maturo, che agiscono con un feed-back di tipo positivo sull'asse ipotalamo-ipofisi. La

frequenza dei picchi di LH, invece, diminuisce nella fase luteinica quando la secrezione della gonadotropina torna ad essere nuovamente di tipo tonico.

Le due gonadotropine FSH ed LH sono glicoproteine prodotte dalle cellule basofile adenoipofisarie o cellule gonadotrope, che le accumulano sotto forma di granuli secretori all'interno del loro citoplasma. L'FSH è l'ormone che dà inizio all'attività ovarica, in quanto promuove il reclutamento dei follicoli e stimola il loro accrescimento; stimola inoltre la sintesi e la produzione di estrogeni nelle cellule della granulosa.

L'LH, invece, oltre a contribuire alla sintesi degli ormoni steroidei, è responsabile della ripresa della divisione meiotica della cellula uovo, dell'ovulazione e sostiene la funzione del corpo luteo.

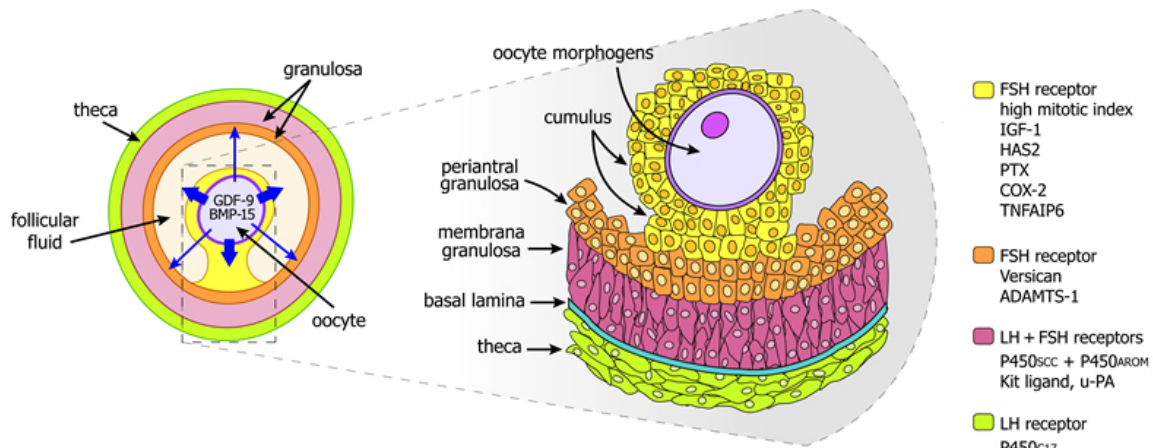


Figura 9. Schema rappresentante i diversi tipi di recettori per le gonadotropine presenti a livello del follicolo.

Entrambe le gonadotropine sono costituite da due catene polipeptidiche chiamate  $\alpha$  e  $\beta$ . All'interno di una stessa specie, la subunità  $\alpha$  di LH e FSH, possiede un identico scheletro polipeptidico. Al contrario, la subunità  $\beta$  nei due ormoni è differente, poiché ha una sequenza

proteica caratteristica che conferisce all'ormone la specificità biologica, essendo responsabile del legame al recettore sulla membrana della cellula bersaglio.

L'FSH e l'LH, essendo di natura proteica, sono idrosolubili e non riescono ad attraversare la membrana cellulare, ma interagiscono con degli specifici recettori su essa esposti, producendo l'attivazione di un sottogruppo di proteine regolatrici (proteine G). L'ulteriore legame di queste ultime con il guanosintrifosfato (GTP), produce la formazione di secondi messaggeri, quali AMPc e diacilglicerolo (DAG), che attivano rispettivamente protein chinasi A (PKA) e protein chinasi C (PKC). Queste ultime, infine, fosforilano proteine intracellulari specifiche. (Yen e coll., 2000).

L'azione delle gonadotropine può essere limitata o potenziata da fattori quali:  $Ca^{++}$ , calmodulina, metilxantine, glicocorticoidi, mentre la traduzione del segnale può essere bloccata attraverso l'inattivazione della proteina G, ad opera, per esempio, degli oppioidi endogeni, presenti in circolo in ogni situazione di stress.

Le gonadotropine regolano la funzione delle ovaie agendo su due strutture bersaglio, il follicolo ovarico ed il corpo luteo. Con la pubertà aumenta la sintesi di gonadotropine, che stimolano le cellule follicolari a proliferare, comportando un progressivo accrescimento dei follicoli antrali presenti nell'ovaio. Esse guidano anche le funzioni endocrine di queste strutture ovariche, comportando un progressivo aumento della concentrazione di estrogeni in circolo. A livello follicolare, l'LH stimola le cellule della teca a produrre steroidi androgeni, quali androstenedione e testosterone, a partire da pregnenolone sintetizzato dal colesterolo. Essi diffondono, attraverso la membrana basale, all'interno del follicolo, dove le cellule della granulosa li convertono in  $E_2$  sotto l'influenza dell'FSH grazie all'enzima aromatasi. Questo meccanismo è alla base della teoria "2 cellule-2 gonadotropine" per il controllo della steroidogenesi a livello follicolare (Fig. 10).

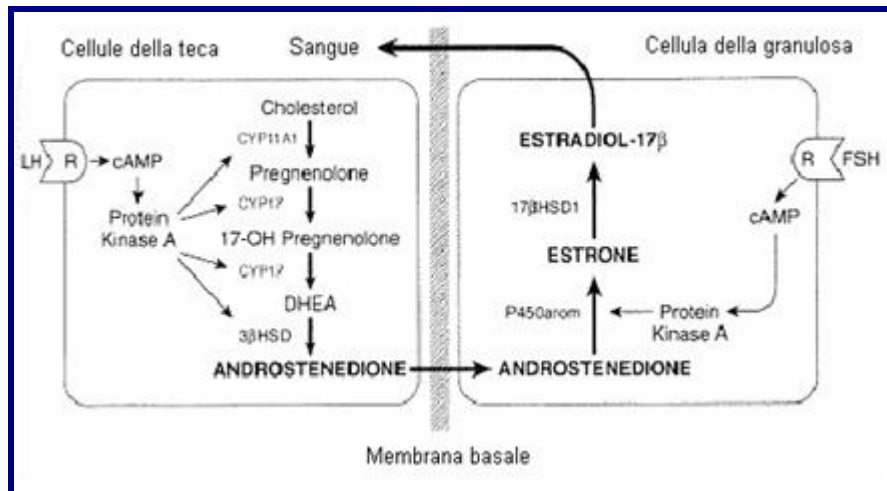


Figura 10: Teoria "2 cellule-2 gonadotropine", alla base della sintesi degli estrogeni.

Sull'asse ipotalamo-ipofisi, gli E2 hanno un'azione a feedback positivo sulla liberazione delle gonadotropine (Gore-Langton, 1994).

Gli E2, in sinergia con l'FSH, inducono la proliferazione e la maturazione delle cellule della granulosa e la formazione su di esse dei recettori per l'LH, preparandole per la luteinizzazione e determinando le condizioni locali più adatte all'accrescimento e alla maturazione della cellula uovo. A livello ipotalamico, gli estrogeni guidano il comportamento della recettività sessuale; nell'apparato genitale femminile creano le condizioni migliori per la sopravvivenza e il trasporto degli spermatozoi e preparano l'utero ad accogliere il prodotto del concepimento.

Il meccanismo di feedback positivo esercitato dagli E2 sull'ipotalamo innesca il picco gonadotropo. Grazie al picco dell'LH, si determinano profonde modificazioni morfologiche a carico del follicolo, come il passaggio dalla produzione di E2 a quella di progesterone, la lisi della parete follicolare da parte di enzimi proteolitici per l'ovulazione, e la ripresa della progressione meiotica da parte dell'oocita.

L'ovulazione porta alla liberazione di un oocita in metafase II nel tratto genitale femminile. Sulle vestigia del follicolo ovulato, per differenziazione delle cellule follicolari, si forma il corpo luteo



che, sotto lo stimolo dell'LH, produce P4, uno steroide a 21 atomi di carbonio derivante dall'ossidazione del pregnenolone. Per espletare appieno le sue funzioni, il P4, necessita che i tessuti abbiano precedentemente subito l'azione degli estrogeni e prepara l'apparato genitale ad accogliere e mantenere un'eventuale gravidanza. Sembra, inoltre, avere un ruolo nell'ovulazione, modificando la distensibilità delle pareti del follicolo e nel suo accrescimento, accelerandone lo sviluppo. Sull'utero ha un effetto di immunodepressione, evitando il rigetto del conceptus. Esercita un feedback negativo sulla produzione ipotalamica di GnRH, impedendo, così, ad alte concentrazioni, la liberazione fasica delle gonadotropine. In caso di concepimento il corpo luteo è detto gravidico e la produzione di P4 ha il compito di supportare la gravidanza, e la sua durata è pari al periodo di gestazione. In caso di mancato concepimento, e perciò in assenza del conceptus, il corpo luteo è detto spurio o ciclico, ed ha una durata limitata.

In caso di formazione di un corpo luteo gravidico intervengono fattori quali le prostaglandine E2 (PGE2) e la relaxina. Le PGE2 sono prodotte dalle cellule stromali dell'utero ed il loro rilascio è stimolato dal fattore di necrosi tumorale. Esse sono importanti per il mantenimento del corpo luteo, avendo un'azione luteotrfica ed antiluteolitica (Milvae e coll., 1996) e bloccano la luteolisi indotta dalle prostaglandine F2 $\alpha$  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), quando rilasciate simultaneamente nell'arteria ovarica. La produzione basale di PGE2 è significativamente più elevata nella fase luteinica che nella fase follicolare.

La relaxina, invece, è un ormone proteico costituito da due catene unite da due ponti disolfuro; è prodotta principalmente dal corpo luteo gravidico, ma può avere anche un'origine uterina e placentare. La sua funzione necessita di una precedente sensibilizzazione dei tessuti bersaglio da parte degli estrogeni. L'effetto più importante della relaxina è al momento del parto, poichè dilata il canale del parto, rendendo più morbide e cedevoli sia la cervice che i legamenti sacro-ischiatici e

la sinfisi pubica. Inoltre regola le contrazioni dell'utero, aumentando la loro coordinazione durante il parto.

In caso di formazione di un corpo luteo spurio intervengono le  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Esse sono fattori luteolitici prodotti nell'utero sotto lo stimolo degli estrogeni. Inducono una rapida riduzione del flusso sanguigno che irrorava il corpo luteo, provocando ischemia che porta a morte le cellule luteali con conseguente caduta della produzione di  $\text{P}_4$ . Inoltre, durante la luteolisi  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dipendente, si generano nel corpo luteo radicali idrossilici che causano danni irreversibili al DNA cellulare. Con la lisi del corpo luteo cessa la produzione di progesterone e termina il feedback negativo esercitato dall'ormone sull'asse ipotalamo-ipofisi. Segue, così, un incremento della produzione di FSH, che induce una nuova crescita follicolare e l'inizio di un nuovo ciclo estrale (Gore-Langton e coll., 1994).

## Storia dell'ecografia



Il termine SONAR significa “Sound Navigation and Ranging”.

La sua storia inizia nel 1822 quando **Daniel Colladen**, un fisico svizzero, fece uso di una campana subacquea per cercare di calcolare la velocità del suono nelle acque del lago di Ginevra. I primi tentativi di ottenere delle mappe dei fondali oceanici tramite mezzi ecosonori non ottennero

alcun risultato. Nel 1877 **Lord Rayleigh** in Inghilterra pubblicò il suo famoso trattato “La teoria del suono” in cui venivano chiaramente esposti i principi fisici fondamentali delle vibrazioni sonore (le onde), della trasmissione e della rifrazione. Il balzo in avanti nelle tecniche eco-sonore venne compiuto nel 1880 in Francia da **Pierre Curie** e da suo fratello Jaques con la scoperta dell'*effetto*



Pierre Curie  
1859 - 1906

*piezoelettrico* di alcuni cristalli. Essi osservarono che quando veniva esercitata una pressione meccanica su un cristallo di quarzo quale il sale di Rochelle (sodio potassio tartrato tetraidrato) si produceva un potenziale elettrico e che, al contrario, l'applicazione di una carica elettrica produceva una deformazione del cristallo facendolo vibrare. Tale effetto venne poi utilizzato per la generazione e la riproduzione di ultrasuoni (della frequenza

di alcuni milioni di cicli al secondo, i megahertz) negli apparecchi sonografici.

I sistemi di rilevazione subacquea vennero sviluppati dopo l'affondamento del Titanic nel 1912 e nella navigazione sottomarina durante la I Guerra mondiale. Tra il 1914 ed il 1918 venne ampiamente utilizzato il SONAR nell'individuazione dei sottomarini germanici. **Constantin**



Paul Langevin  
1872 - 1946

**Chilowsky**, un russo emigrato in Svizzera, e **Paul Langévin**, eminente fisico francese di Parigi, progettaron e costruirono un efficiente apparecchio eco-sonoro, che chiamarono **idrofono**, un antesignano degli apparecchi medici a tipo SONAR ad emissione eco-pulsati che sarebbero stati sviluppati in seguito. Nei primi anni '30, in seguito alle scoperte di Langevin, molti transatlantici francesi vennero dotati di sistemi di esplorazione eco-sonora subacquea. La seconda Guerra Mondiale vide ulteriori sviluppi negli equipaggiamenti radar navali e militari (con l'impiego di onde elettromagnetiche, non ultrasonore) che contribuirono enormemente alla progettazione di SONAR e di apparecchi di esplorazione ultra-sonora.

Un altro filone nel campo degli ultrasuoni che si sviluppò parallelamente negli anni '30 fu la costruzione di **analizzatori di difetti dei metalli ad ultrasuoni pulsati**, utilizzati soprattutto nel valutare gli scafi di grandi navi e le corazze dei carri armati. Il concetto alla base di tali apparecchiature era stato elaborato dallo scienziato sovietico **Sergei Y. Sokolov** nel 1928 all'Istituto Elettrotecnico di Leningrado. Pionieri di tali apparecchi furono **Floyd A. Firestone** dell'Università del Michigan e **Donald Sproul** in Inghilterra.



The ultrasonic Reflectoscope in use\*\*  
( Courtesy of KretzTechnik, Austria )

Firestone, nel 1941 brevettò il suo "**reflettoscopio supersonico**". **Kelvin e Hughes** in Inghilterra, dove lavorava Sproule, produssero anche uno dei primi analizzatori di metalli ad emissione eco pulsata, l'**M1**. La versione tedesca fu prodotta da Josef e da Herbert Krautkrämer a Colonia nel 1949. Tali versioni vennero ben presto migliorate in Germania dalla **Siemens** ed in Austria dalla **KretzTechnik**. Successive modifiche permisero l'impiego di frequenze più elevate e di

pulsazioni di durata minore, permettendo quindi una migliore risoluzione. La disponibilità poi di amplificatori ad altissime impedenze d'ingresso costruiti con tubi elettrometrici di qualità superiore, nei primi anni '50, permise agli ingegneri di amplificare i loro segnali con conseguente maggiore sensibilità e stabilità delle apparecchiature commerciali. Tali elettroscopi furono i precursori dei successivi apparecchi medici ultrasonici funzionanti in A-mode (unidirezionali) e che vennero usati all'inizio degli anni '50 da **Lars Leksell** in Svezia e **JC Turner** a Londra per lo studio di lesioni cerebrali, e da **Inge Edler** e **Carl Hellmuth Hertz** nel 1953 nel primo tracciato cardiaco in M-Mode. Anche i Giapponesi furono attivi nello studio e nella produzione di apparecchiature ultrasoniche, ma i loro studi comparvero solo saltuariamente nella letteratura inglese.



An A-mode scanner in the early 1950s ^^

Oltre al suo impiego nella navigazione subacquea e nell'analisi delle imperfezioni dei metalli, l'uso iniziale degli Ultrasuoni in medicina rimase confinato alla **terapia** piuttosto che alla diagnosi, utilizzando la sua azione distruttiva sui tessuti animali. Fu solo nei primi anni '40 che vennero fatti i primi tentativi per il loro impiego in campo diagnostico.

**Karl Theodore Dussik**, un neurologo-psichiatra dell'Università di **Vienna**, è considerato il primo



Karl Theodore Dussik

medico ad avere utilizzato gli ultrasuoni in diagnostica medica. Con suo fratello Friederich, un fisico, riuscì ad individuare tumori e ventricoli cerebrali misurando la trasmissione del fascio di ultrasuoni attraverso la testa, utilizzando un trasduttore su ogni lato. Il suo metodo venne pubblicato nel 1942 in un articolo dal titolo "**Iperfonografia del cervello**". In quel tempo egli non ebbe

grande successo sia perchè la maggior parte dell'energia degli ultrasuoni veniva assorbita dal cranio sia per l'inadeguatezza degli strumenti di misurazione. Il suo lavoro ispirò comunque quello di altri scienziati oltre oceano, in particolare al **Massachusetts Institute of Technology**.

Alla fine degli anni '40 **George Ludwig**, un medico dell'Università della Pennsylvania fu uno dei pionieri nell'impiego degli ultrasuoni ad emissione pulsata sui tessuti animali. Con F. Struthers, Ludwig studiò la rilevazione di calcoli tramite gli ultrasuoni, nascondendo tali calcoli nei muscoli degli animali. Il suo lavoro presso il Laboratorio di Bioacustica del **Massachusetts Institute of Technology**, in collaborazione col fisico **RH Bolt**, ed i medici **HT Ballantine** ed il tedesco **Theodor Heuter**, permise la misurazione della trasmissione del suono nei tessuti molli degli animali, che risultò essere di 1500-1600 metri al secondo. Egli dimostrò anche che era possibile ottenere senza troppa distorsione immagini **bi-dimensionali**. L'attività del MIT proseguì negli anni '60 influenzando profondamente i successivi sviluppi nella strumentazione e nelle metodiche ad ultrasuoni.

**John Julian Wild**, laureatosi in medicina all'Università di Cambridge, in Inghilterra,



John Julian Wild

successivamente emigrato negli Stati Uniti alla fine della la Guerra Mondiale dopo il 1945, viene considerato il vero fondatore della diagnostica tissutale ad ultrasuoni. Wild, lavorando alla **Medico Technological Research Institute** di **Minneapolis**, in Minnesota, insieme a **Donald Neal**, un ingegnere, pubblicò per primo nel 1949 un lavoro sugli studi ultrasonori unidirezionali (A-mode) di materiali

chirurgici intestinali e più tardi di tumori intestinali e della mammella, concludendo che gli aspetti A-mode potevano cambiare. La concezione originale di Wild a proposito dell'impiego della diagnostica ultrasonora in medicina, consisteva più in una metodologia di diagnosi tissutale a

seconda delle caratteristiche degli echi di ritorno, piuttosto che in una tecnica d'immagine capace poi di evolvere in metodi capaci di distinguere tra tumori con caratteristiche di benignità o di malignità. La strumentazione che essi utilizzarono era quella in dotazione alla marina USA per l'addestramento dei piloti all'uso del radar, con la quale era possibile "volare" sopra un contenitore d'acqua che copriva una piantina in scala ridotta del territorio nemico. Donald Neal venne rapidamente impiegato in servizio attivo in una base navale, dopo la guerra di Corea. John Reid, un ingegnere elettronico neolaureato, fu assunto con una borsa di studio del National Cancer Institute come l'unico ingegnere designato a costruire e a lavorare con l'apparato ultrasonico di Wild. Wild e Reid costruirono rapidamente uno strumento manuale B-Mode lineare: si trattava di un'apparecchiatura eccezionale per quei tempi. Essi furono in grado di scoprire tumori mammari. Nel Maggio del 1953 ottennero immagini in real-time a 15 megahertz di un tumore maligno della mammella, di 7 mm di diametro. Chiamarono la loro tecnica **Ecografia o Ecometria** sottolineando l'aspetto quantitativo dell'indagine. Ecco uno stralcio di quanto Reid scrisse a proposito del suo apparecchio negli Archives of the American Institute of Ultrasound in Medicine.

*"Il primo apparecchio a scansione fu costruito prevalentemente da John con pezzi ottenuti con l'aiuto di diversi suoi amici di Minneapolis. Io riuscii a modificare il circuito di un oscilloscopio. Riuscimmo così a far funzionare la nostra macchina, ad effettuare le prime registrazioni cliniche, ed ad inviare una pubblicazione allo Science Magazine, il tutto in 10 giorni. L'articolo venne accettato nei primi mesi del 1952 e divenne la prima pubblicazione, a mia conoscenza, riguardante le immagini ultrasonografiche. Venne pubblicata ancora prima di quella di **Douglass Howry**, il quale utilizzò una macchina molto più complessa verso la fine di quell'anno."*

Wild e Reid (1952) avevano anche studiato l'impiego di trasduttori endoluminali e di apparecchi in tempo reale: essi descrissero l'impiego **di trasduttori per scansioni** in A-mode **vaginali e transrettali**.

A Denver, all'Università del Colorado, **Douglass Howry** aveva iniziato alcuni studi ultrasonici pionieristici, già dal 1948. Howry, un radiologo impiegato al **Veteran's Administration Hospital**, aveva concentrato la sua attività nella tecnologia B-mode. Aiutato dal suo amico e collega nefrologo **Joseph Homles**, che divenne in seguito il direttore del Laboratorio di Ricerche Mediche dell'Ospedale, Howry costruì nel 1951 con gli ingegneri **William Roderic Bliss** e **Gerald J. Posakony**, dapprima il **Sistema ultrasonoro ad immersione**, cioè la prima sonda lineare da contatto **bidimensione B-mode** (o **PPI, plan position indication mode**, a schema di indicazione di posizione), quindi nel 1954, il "somoscopio" dotato di motore, una sonda a movimento composito circolare. Il trasduttore del somatoscopio era montato sul bordo di una grossa vasca riempita d'acqua. L'apparecchio riusciva ad eseguire delle scansioni composite, cioè da differenti angolature, di un organo addominale, ottenendo così delle immagini di qualità superiore. Tali immagini sonografiche vennero chiamate "**sonogrammi**".



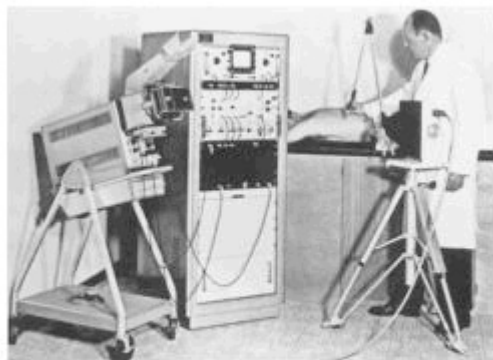
The pan-scanner in 1957

Nel 1957 venne invece ideato il "**pan-scanner**", dove il trasduttore ruotava intorno al paziente secondo un arco semicircolare. Tutti questi apparecchi, anche se in grado di ottenere immagini bidimensionali e sufficientemente fedeli, degli organi corporei, avevano però bisogno che il soggetto fosse in parte o completamente immerso in acqua, e che inoltre vi rimanesse,

senza muoversi, per un certo periodo di tempo. Alla fine del 1955 cominciarono ad essere costruiti con le **piezoceramiche** (di bario e di zirconato titanato) dei trasduttori più piccoli e più



efficienti che avrebbero contribuito ad una maggiore sensibilità delle apparecchiature successive. Ben presto si imposero delle varianti più leggere di queste macchine, dotate di sacchetti d'acqua e di trasduttori a contatto e mobili sulla superficie corporea del paziente.



The articulated-arm scanner designed by Wright and Meyers in 1962

**Howry e Homles**, con gli ingegneri **William Wright** e **Edward Meyers**, alla fine inventarono uno **scanner composito a contatto**, dove il trasduttore poteva essere posizionato dall'operatore (ciò dopo l'incontro con Ian Donald, vedi dopo). Nel **1962** Wright e Meyers abbandonarono l'Università per formare la **Physionics Engineering® Inc**: così negli Stati Uniti venne prodotto e commercializzato il primo scanner composito con

braccio orientabile manualmente (dotato di meccanismi di posizione variabili ad ogni giunzione). La Physionics venne in seguito acquistata dalla **Picker® Corporation**. La maggior parte del lavoro successivo sugli ultrasuoni venne sviluppato a Denver da Homles e dai suoi Colleghi, cioè da **Stewart Taylor**, **Horace Thompson** e da **Kenneth Gottesfeld**. Questo gruppo pubblicò i primi articoli statunitensi sugli ultrasuoni in Ostetricia e Ginecologia. Douglass Howry si trasferì a Boston nel 1962 dove lavorò presso il Massachusetts General Hospital. Morì nel 1969.

Nello stesso tempo in Giappone, **Kenji Tanaka** e **Toshio Wagai**, chirurghi alla **Università di Juntendo** a **Tokio**, con il fisico **Rokuro Uchida**, stavano effettuando ricerche sugli ultrasuoni nella diagnosi di tumori mammari presso il Laboratorio Nihon Musen Radiation and Medical Electronics, noti in seguito nel 1950 col nome di Aloka®. Uchida costruì il primo scanner giapponese ultrasonico in A-Mode nel **1949**. Tanaka e Wagai con le strumentazioni del fisico **Yoshimitsu Kikuchi** di Sendai, iniziarono una ricerca sistematica sugli ultrasuoni nel **1952**. Nel **1956**, il **MIT**

organizzò ed ospitò un Congresso sulla Bioacustica, con la partecipazione di **Wagai, Uchida, Dussik, Bolt, Ballantine, Heuter, Wild, Fry e Howry**. Molti di loro si incontravano per la prima volta, e si ebbe così un fruttuoso scambio di opinioni. **William Fry** organizzò un altro congresso sugli ultrasuoni nel 1962 presso l'Università dell'Illinois che risultò un utile punto d'incontro per gli scienziati americani, europei e giapponesi.

Il contributo probabilmente più importante allo sviluppo degli ultrasuoni, in particolare in Ostetricia e Ginecologia, venne da Glasgow, in Scozia, dove **Ian Donald** era Professore



Professor Ian Donald  
1910 - 1987

all'Università Dipartimentale di Midwifery. Riportiamo qui, per le sue caratteristiche di originalità, un estratto di un articolo della rivista dell'Università di Glasgow **Avenue** (n° 19 del Gennaio 1996) dal titolo: **Ultrasuoni in Medicina – una scoperta di Glasgow che percorse il mondo** – del Dr. James Willocks, che descrisse bene quegli eventi: *“Esame ad ultrasuoni è un termine familiare. Ogni madre lo conosce e molte ne hanno anche le fotografie. E' un esame*

*indolore, sicuro ed attendibile. Il suo successo dall'inizio del suo impiego 40 anni fa, è stupefacente. Iniziò a Glasgow all'Università Dipartimentale di Midwifery col Professore Ian Donald, ed allora pareva un esperimento abbastanza pazzoide. Ma Ian Donald era un personaggio geniale ed originalissimo. Nacque a Cornwall nel Dicembre 1910, figlio e nipote di medici Scozzesi. La sua educazione scolastica iniziò in Scozia e terminò in Sudafrica. Tornò in Inghilterra nel 1931 e si laureò in Medicina alla Scuola di Medicina dell'Ospedale di San Thomas nel 1937. Nel 1939 si arruolò nella RAF dove si distinse particolarmente. Fu decorato al valore per essere entrato in un bombardiere in fiamme con a bordo ancora delle bombe, allo scopo di salvare alcuni aviatori feriti bloccati al suo interno. Il servizio nella RAF stimolò il suo interesse nei congegni di ogni tipo*

familiarizzando con radar e sonar, basati su tecniche sviluppate da alcuni fisici francesi quali Langevin nel corso della Prima Guerra mondiale allo scopo di identificare i sottomarini. Tornato a Londra, alla fine della guerra scelse Ostetricia e Ginecologia, e lavorò in diversi ospedali londinesi. La sua prima ricerca riguardò i problemi respiratori nel neonato ed egli ideò un congegno per aiutare i bambini a respirare. Per la sua passione sulle apparecchiature alcuni suoi colleghi londinesi chiamavano Ian "Donald il Pazzo" ma il suo talento venne scoperto da Sir Hector Hetherington, maggiorente dell'Università ed egli fu segnalato al Regius Chair di Midwifery dell'University of Glasgow. A quel tempo Ian stava lavorando al suo libro "Problemi nella pratica Ostetrica", che gli avrebbe procurato grande fama. Il suo motto era "l'arte dell'insegnamento è l'arte di condividere gli entusiasmi". Giovane entusiasta, dinamico, instancabile ed irriverente, non perdeva occasione per sfidare ogni pratica considerata già acquisita; le sue lezioni erano una sorta di festa in cui si alternavano silenzi e scoppi di ilarità. Erano infarcite di riferimenti alla Bibbia ed a Shakespeare, a lui molto familiari, citati con una vivacità istrionica. Ben presto il suo interesse si concentrò sul Sonar, con l'idea che questo potesse essere impiegato nella diagnosi medica. L'idea venne trasposta in pratica il **21 luglio 1955**, quando visitò, su invito di uno dei direttori marito di una sua paziente, il Dipartimento della Ricerca dei costruttori di caldaie Babcock e Wilcox a Renfrew. Vi portò due auto, riempiendone i bagagliai di fibromi e di cisti ovariche recentemente asportate. Su questo materiale e su una grossa bistecca fornita dalla Compagnia ed utilizzata come controllo, eseguì alcuni esperimenti utilizzando un analizzatore industriale di difetti di metalli ad ultrasuoni (in seguito tutti persero l'appetito per le bistecche!). In seguito collaborò con la **Kelvin e Hughes Scientific Instrument Company**, in particolare con un giovane tecnico di nome **Tom Brown**. Quasi per caso Tom Brown era venuto a sapere di questo strano professore che stava tentando di usare un analizzatore di difetti di metalli ad ultrasuoni per diagnosticare patologie femminili. Telefonò al Professor Donald. Tutto ciò accadde non molto prima che Tom Brown, Ian

Donald e il Dr. **John Mc Vicar** –futuro professore di Ostetricia e Ginecologia all'Università di Leicester – si immergessero in uno studio intensivo sull'impiego degli Ultrasuoni nella diagnosi differenziale tra cisti, fibromi e masse addominali di altra natura.

I primi risultati furono deludenti e l'iniziativa fu considerata con un misto di scetticismo e di ilarità. Quando però ci fu un caso drammatico in cui gli ultrasuoni permisero di salvare la vita di una paziente riuscendo a diagnosticare una grossa cisti ovarica facilmente asportabile, che era stata confusa con un tumore inoperabile dello stomaco, lo studio cominciò ad essere preso sul serio. "Quello– disse McDonald – fu un punto di non ritorno". I risultati alla fine vennero pubblicati su **The Lancet** il **7 giugno 1958** con il titolo un po' arido di "**Studi sulle masse addominali con ultrasuoni ad emissione pulsata**". Fu probabilmente l'articolo più importante mai pubblicato sugli ultrasuoni in medicina. 10 anni dopo Ian descrisse così quel periodo: "Appena riuscimmo a scrollarci di dosso il passato ed ad utilizzare la macchina al Dipartimento su una quantità incredibile di pazienti con le più svariate patologie, i progressi furono rapidissimi. Ogni nuova tecnica diventa ancora più affascinante se la sua utilità è accompagnata dall'assenza di dolore o fastidio per il paziente...Chiunque sia assolutamente soddisfatto della propria capacità di diagnosi o di trattamento chirurgico non darà mai alcun contributo allo sviluppo di nuove tecniche. Bisogna prima essere rosi dall'insoddisfazione. Ovviamente bisogna avere l'idea giusta al momento giusto, e le idee buone possono giungere alla maniera di Archimede, in bagno."

Nel **1959** Ian Donald notò che si potevano ottenere echi dalla testa fetale, e cercò di sfruttare questo dato. "La cosa ben presto mi appassionò. Al Royal Maternity Hospital di Rottenrow, non c'era nemmeno una stanza dove visitare le pazienti, tanto meno un armadio in cui tenere l'apparecchio, cosicché io ed il mio collega, il fisico **Tom Duggan** spingevamo l'apparecchio su un carrellino sino ai letti dei pazienti in pronto soccorso chiedendo loro il permesso di visitarli. Le

*donne di Glasgow sono meravigliose ed accettavano senza esitazione. Applicammo il metodo delle misurazioni della testa fetale per stabilire la grandezza e la crescita del feto. Quando nel 1964 aprì il Queen Mother's Hospital si riuscì a migliorare di molto i risultati. Col mio Collega il **Prof. Stuart Campbell** (futuro Professor al King's College Hospital di Londra) la **Cefalometria** per parecchi anni divenne il metodo standard di studio della crescita fetale. In pochi anni divenne possibile studiare la gravidanza dall'inizio alla fine e diagnosticare complicanze quali le gravidanze multiple, le anomalie fetali e la placenta previa (causa di emorragie anche mortali)."*

Il Professor Donald aveva raccolto intorno a sé un gruppo di giovani medici e di tecnici di talento, tra i quali spiccavano ingegneri di ricerca come **John Fleming e Angus Hall**, assunti dall'Università quando la Kelvin Hughes Company venne chiusa nel 1966. John Fleming rimase al Queen Mother's Hospital e fu sempre il tecnico geniale dei successivi progressi ecasonori. Oggi tutte le apparecchiature sono considerate di ideazione giapponese, ma il contributo dell'ingegneria scozzese allo sviluppo delle tecnologie ecasonore in medicina non dovrebbe essere dimenticato.

**John Wild** tornò in Inghilterra per presentare ad un Congresso nel **1954** la sua nuova scoperta. A



The prototype compound contact scanner  
Donald and Brown built in 1957

tale riunione partecipò Ian Donald che fu lieto a capire quanto gli ultrasuoni avrebbero potuto fare. Pur entrando in questo campo più tardi di Wild, la maggior parte dei lavori pionieristici in particolare nel campo dell'Ostetricia e della Ginecologia erano iniziati in Scozia. Wild aveva focalizzato i suoi studi sulla diagnosi dei tumori della mammella e del

colon. Nel **1956** Wild pubblicò un articolo fondamentale su 117 noduli mammari, riportando una accuratezza di diagnosi superiore al 90%. Nonostante questi dati, il metodo ultrasonico di

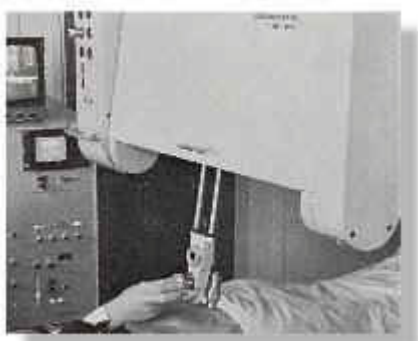
diagnosi tissutale da lui propagandato non raggiunse ampi consensi. Ian Donald, che parlava di tali apparecchi ultrasonici come di Sonar ultrasonici, ripeteva spesso che molti dei suoi progressi nel campo degli ultrasuoni erano avvenuti in un misto di coincidenze, casualità e fortuna. La “vescica piena”, che egli scoprì nel 1963, ne fu un esempio. Che la testa fetale essendo un osso cranico simmetrico fosse poi facilmente evidenziabile da un fascio di ultrasuoni in A-mode ne fu un altro, così come lo fu l’opportunità di incontrare numerosi importanti amministratori interessati e di lavorare con un brillante ingegnere come **Tom Brown**.



Tom Brown  
c. 1956

Brown all’età di 24 anni nel 1954, ideò e costruì con Ian Donald il prototipo **della prima sonda B-Mode da contatto di tipo composito**. In seguito il prototipo venne perfezionato diventando nel 1961 il **Diasonografo®**, prodotto su scala commerciale dalla **Smith Industrials of England** che aveva acquistato la **Kevin and Hughes Scientific Instrument Company**. I disegni del quadro di comando erano di **Dugald Cameron**, allora studente

di disegno industriale alla Scuola d’Arte di Glasgow. Brown concepì anche e brevettò nel **1958** una sofisticata e costosa **sonda B-mode automatica a sacchetto d’acqua** e fu proprio durante la presentazione di tale apparecchiatura nel 1960 a Londra che Ian Donald incontrò per la prima



The Diasonograph scanning gantry  
( Picture of a later model )

volta lo statunitense Douglass Howry, colui che aveva utilizzato per diversi anni lo il più grande scanner circolare a serbatoio d’acqua (vedi sopra).La riunione influenzò il gruppo di Howry che costruì un apparecchio simile a quello di Donald, ma che si trasformò presto in una versione a braccio orientabile a giunzioni

multiple. L’apparecchio automatizzato che Brown progettò originariamente per superare gli

effetti delle variabili del movimento non andò bene, mentre il **Diasonografo**<sup>®</sup> fu venduto in Gran Bretagna ed in Europa, in particolare in Svezia, a Londra ed a Bristol: proprio qui un altro pioniere degli Ultrasuoni, **Peter NT Wells**, un fisico medico, stava elaborando un'altra versione della sonda a braccio articolato a giunzioni multiple (cosiddetto a proboscide d'elefante) indipendentemente dalla controparte statunitense, giungendo a porre le fondamenta della **Diasonograph electronics**. Una breve descrizione del funzionamento del prototipo **Diasonografo**<sup>®</sup>, la sonda composta a contatto, venne fatta da Donald e da Brown nel 1958: *“Una sonda contenente entrambi i trasduttori di trasmissione e di ricezione è montata su un supporto graduato, che a sua volta è posto sopra il letto del paziente. La sonda può muoversi in senso verticale ed orizzontale e, quando lo fa, stimola due potenziometri lineari che forniscono dei valori di voltaggio proporzionali all'entità della deviazione rispetto ad un determinato punto di riferimento. La sonda può anche ruotare ed anche tale movimento viene interpretato da un potenziometro seno-coseno. I voltaggi ottenuti da questo sistema di potenziometri controlla un tubo a raggi catodici elettrostatico, cosicché la direzione della curva del tracciato corrisponde all'inclinazione della sonda, ed il punto di partenza della curva alla posizione istantanea della sonda. La strumentazione è tarata in modo tale che lo stesso punto di riflessione venga riprodotto esattamente nello stesso punto sullo schermo del tubo a raggi catodici da qualsiasi punto venga fatta la scansione, ed una superficie piana viene riprodotta come una linea. Gli echi ricevuti dalla sonda vengono proiettati su tre schermi oscilloscopici: uno schermo a scopia A, un altro combinato B-PPI proiettabili su un monitor a lunga persistenza utile per lo studio; ed uno schermo con un monitor a breve persistenza con una telecamera montata davanti ad esso. La sonda viene spostata lentamente da un fianco all'altro sull'addome, facendola oscillare avanti ed indietro sul suo albero, per studiare da diverse angolazioni i tessuti profondi”*.



Ian Donald speaking at one of his lectures

**Joseph Holmes** e **Ian Donald** divennero poi grandi amici, e Ian Donald insieme a John Flemming furono invitati a parlare delle loro ricerche al Congresso Internazionale di Pittsburgh organizzato nel **1963** da Holmes e da altri. Dal 1961 Ian viaggiò molto negli Stati Uniti. Durante un discorso al **World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology (WFUMB)**, nel

1967, disse di Holmes: *“Penso che Joe Holmes si sia adoperato più di qualsiasi altro per far convergere tutti i nostri differenti percorsi”*. Holmes nel **1973** divenne il fondatore del **Journal of Clinical Ultrasound**.

In Europa, **Bertil Sunden** a Lund, in Svezia, aveva iniziato nel **1958** alcuni studi sui parti prematuri col suo Professore di Ostetricia e Ginecologia Alf Sjovall, utilizzando un ecoscopio in A-Mode (un Krautkramer® reflectoscope USIP 9 ). Egli venne a trovare Ian Donald per 3 settimane nel 1960, desiderando studiare le scansioni in B-Mode. Il suo lavoro al Dipartimento di Donald portò all'invio del **Disonografo**® di seconda generazione a Lund, col quale Sunden discusse la sua tesi di dottorato sull'uso degli Ultrasuoni in Ostetricia e Ginecologia, riportando la sua esperienza su 400

casi di patologia pelvica. Egli studiò anche i possibili effetti dannosi degli ultrasuoni su ratte gravide, senza trovarne alcuno. In realtà a Lund gli studi sugli Ultrasuoni erano iniziati già dal 1953 in cardiologia ed in neurochirurgia, facendo uso dei riflettoscopi.



An early articulated-arm compound static scanner from KretzTechnik, Austria™  
A vaginal scanning device is seen on the left

**ID Selezneva**, discepolo del famoso



scienziato sovietico **SY Solokov**, nel **1962**, pubblicò un lavoro sulla ecografia in **Unione Sovietica**.

**RA Khentov** la seguì con numerose pubblicazioni di argomento ostetrico e ginecologico.

Importanti contributi giunsero dopo il 1965 da Hans Henrik Holm, Jorgen Kristensen e Jens Bang a Copenaghen, Danimarca, da D. Hofmann, Hans Holländer e P. Weiser dell'Università di Wilhelm a Münster, Germania, ed anche da Alfred Kratochwil della seconda università Frauenklinik, Vienna, Austria.

Questi avevano usato il Vidoson®, della Siemens Medical Systems®, uno scanner composito a contatto, lo scanner vaginale della KretzTechnik®. Alfred Kratochwil era probabilmente il più creativo di tutti i ricercatori in Europa. **Hans Henrik Holm** creò un laboratorio di ultrasuoni all'ospedale di Gentofte a Copenaghen in **1964**, con un agguerrito gruppo di ricerca. Lo stesso Holm progettò la loro versione d'uno scanner a braccio orientabile che successivamente venne adottato per la produzione commerciale dalla **Smith Kline and French** negli Stati Uniti.

Nel 1966, la fabbrica degli Smiths in Scozia non rendeva. Allo stesso tempo la Corte suprema degli Stati Uniti decretò a sfavore degli Smiths ed a favore delle **Automation Industries** di Denver, a proposito dei cosiddetti "brevetti Firestone" sulle prove ultrasoniche. Come parte dell'accordo, gli Smiths decisero di ritirarsi sia dalle applicazioni industriali che da quelle mediche sugli ultrasuoni, e Automation Industries acquisì i diritti sui brevetti Smith. I brevetti Brown sullo scanner bidimensionale da contatto facevano parte di questo "pacchetto". Gli Smiths vendettero la parte commerciale medica alle **Nuclear Enterprises (G.B.) Ltd** di Edinburgo, che rilevò la produzione del Disonograph®. Ian Donald fu costretto a installare il suo reparto di tecnologia ultrasonica al Queen Mother's Hospital. John Flemming ed Angus Hall lo aiutarono. Lavorarono come ingegneri su tutti i progetti sugli ultrasuoni e Flemming lavorò fino al suo pensionamento nel 1997.

Attualmente è coordinatore della collezione storica del BMUS ed è responsabile delle apparecchiature ultrasoniche al museo di Hunterian, all' università di Glasgow. La stessa era vide una proliferazione di nuove apparecchiature negli Stati Uniti, in Europa ed in Giappone. **Physionics**® produsse la sua seconda versione dello “scanner composito a contatto con porta-braccio” nel 1964, che venne ampiamente impiegato negli Stati Uniti.

**KretzTechnik** continuò nel 1967 con la sua prima versione di scanner a contatto con braccio articolato, mentre i giapponesi stavano usando un modello prodotto dalla Compagnia **Aloka**®.

“**Il primo congresso mondiale sugli ultrasuoni in diagnostica medica**” si tenne a Vienna nel 1969 ed il secondo a Rotterdam nel 1972 dove vennero presentati moltissimi articoli su questo argomento. Queste riunioni identificarono e riunirono un gruppo internazionale di clinici e di scienziati che dovevano interessarsi allo sviluppo ed alla strumentazione e della metodologia degli ultrasuoni. In Europa, G. Boog, F. Weill, A. Kuhn, E De Mot (Francia), Jerzy Groniowski, I. Roszkowski (Polonia), Manfred Hansmann, B-Joachim Hackelöer, H. Schillinger (Germania), Malte Hinselmann (Svizzera), Salvator Levi (Bruxelles), Asim Kurjak (Iugoslavia, ora Croazia), Juriy Wladimiroff (Rotterdam), Paavo Pystynen, Pekka Ylöstalo, Pentti Jouppila (Finlandia), Alberto Zacutti, C. Brugnoli, Achille Ianniruberto (Italia), insieme a molti altri, svilupparono presto una enorme mole di lavoro in ostetricia e ginecologia. I delegati di 13 società europee di ultrasuoni si incontrarono a Basilea, in Svizzera nel 1972 per **formare la federazione europea delle società per gli ultrasuoni in medicina e in biologia (EFSUMB)**.

Presto sempre nuove macchine quali la Laminograph® 102 ed il Portascan® 661-BU della **Picker**, l' Echoline®-20 della **SKI**, l'Ultrasongraph® 4100 della **KretzTechnik**, il Disonograph® 4102 della **Nuclear Enterprise** e gli scanner compositi a contatto SSD-20® della **Aloka** divennero disponibili,

mentre Jan C. Somers e Nicolaas Bom nei Paesi Bassi introdussero rispettivamente in **1968 ed in 1971 i trasduttori di fase e quelli lineari**. Nel frattempo in Gran Bretagna, El Kohorn e Stuart



J S Lehman  
working with his scanner

Campbell a Londra, Patricia Morley e Ellis Barnett a Glasgow, Peter Wellsa a Bristol, Hyton Meire e Pat Farrant nel Middlesex, Christopher Hill al Royal Marsden estendevano gli studi sugli ultrasuoni in vari campi. Hugh Robinson emigrato in Australia si interessò dell'applicazione degli ultrasuoni nella valutazione della sterilità al Royal Women's Hospital di Melbourne. Nel 1969 venne fondato il Gruppo Medico Britannico sugli Ultrasuoni. Il gruppo in seguito cambiò

nome nel 1977 e divenne ufficialmente la Società Medica Britannica degli Ultrasuoni (BMUS). Negli Stati Uniti, all' inizio degli anni 60, J Stauffer **Lehman**, a Hahnemann, presso Filadelfia, si occupava dello sviluppo delle tecnologia degli ultrasuoni negli Stati Uniti. Con la Smith Kline Instruments® aveva partecipato alla produzione, da parte dell'azienda, degli scanner a contatto in B-mode, apparecchi di punta nella loro lista di strumenti per ecocardiografia in A- e M-Mode. La sua squadra successivamente assunse George Evans e Marvin Ziskin. Le immagini ad ultrasuoni dal laboratorio di Hahnemann vennero pubblicate nella rivista LIFE® nel settembre del 1965. Barry Golberg successivamente nel 1968 affiancò Lehman ed allargò la ricerca. Pubblicò moltissimi articoli su diversi argomenti anche di ecocardiografia e di ultrasonografia interventistica e nel 1965 fu fra i primi a diffondere la cefalometria fetale al di fuori della Gran-Bretagna.

Lajos von Micsky, che lavorava al St. Luke's Medical Center di New York, fu uno dei pionieri delle apparecchiature ultrasonografiche endoscopiche. Egli nel 1963 creò un laboratorio di bioacustica ed elaborò diversi scanner transvescicali, rettali e trans-vaginali. M. Kobayashi, Arthur Fleischer, W Frederick Sample, George Leopold, Roy Filly, Roger Sanders e Fred Winsberg dopo gli anni 60

svolsero una enorme quantità di lavoro sull' applicazione degli ultrasuoni in Ostetricia e Ginecologia. Nel 1965, Winsberg fu il primo per usare lo scanner in tempo reale della tedesca **Vidoson®** negli Stati Uniti

L' Istituto americano degli ultrasuoni in medicina (AIUM) che fu fondato nel 1952 da un gruppo di



B-mode scanner produced at Wuhan, China in the early 1960s

medici che si occupavano soprattutto dell'impiego degli ultrasuoni in medicina cominciò ad accettare membri solo dal **1964**. Da allora gli ultrasuoni diagnostici rappresentarono l'applicazione principale dell'organizzazione. Il **Primo congresso sulla diagnosi con ultrasuoni** si tenne a Pittsburgh, in Pennsylvania, nel

1965 e ed ottenne la partecipazione di tutti i pionieri degli ultrasuoni. Il **Journal of Ultrasound in Medicine**, la Rivista ufficiale dell'AIUM, venne inaugurato nel 1982 sostituendo il Journal of Clinical Ultrasound come principale veicolo di comunicazione tra i membri dell'associazione.



Hisaya Takeuchi

Nel frattempo, la **H. Takeuchi**, il S. Mizuno, K. Nakano e M. Arima continuavano il lavoro di Ishihara e di Murooka all' università di Juntendo a Tokyo, in **Giappone** e sperimentavano nuove versioni dello scanner transvaginale in A-Mode. La prima esplorazione ad ultrasuoni d'un sacco gestazionale di sei settimane venne segnalata in lingua giapponese nel 1963. Il gruppo fu molto

attivo in molti campi di ricerca e produsse un numero enorme di pubblicazioni, **dalla diagnosi precoce di gravidanza alla cefalometria alla placentografia**. Nel 1965 riportarono un'ampia casistica di tumori pelvici utilizzando sia sonde lineari da contatto a sacchetto d'acqua sia sonde articolate da contatto a braccio articolato. Un altro gruppo composto da T. Tanaka, della I. Suda e

della S. Miyahara iniziò delle ricerche sulle differenti fasi della gravidanza nel 1964. La Società Giapponese degli Ultrasuoni in Medicina fu fondata ufficialmente nel 1962.

Nella Repubblica di Cina, An Shih fondò nel 1958 il Gruppo di ricerca medico sugli Ultrasuoni di Shanghai al Sixth People's Hospital di Shanghai; la sua squadra comprendeva Tao-Hsin Wang e Shih-Yuan. Nello stesso anno essi iniziarono delle indagini ultrasoniche usando un rilevatore modificato dei difetti del metallo (il tipo Chiang Nan I) prodotto alla Chiang Nan Ship Building Plant. Il gruppo pubblicò nel 1960 un rapporto preliminare sull'applicazione degli ultrasuoni diagnostici in varie situazioni cliniche. Questo articolo pubblicato in cinese nel "**Chinese Medical Journal**" non fu noto in occidente se non 2 anni dopo, quando apparve un loro successivo articolo dal titolo "L'impiego degli ultrasuoni pulsati nella diagnostica clinica" pubblicato nell'edizione in lingua straniera dello stesso giornale. In questi articoli venne descritta la diagnosi ultrasonica in A-Mode della **Mola Idatidea**, con la dimostrazione tra le pareti prossimale e distale dell'utero di un aumento significativo del numero di piccoli spot ecogeni. Altri lavori in ostetricia e ginecologia vennero eseguiti da **Xin-Fang Wang e da Ji-Peng Xiao** all'Università medicina di Wuhan (ora Università di Medicina di Tongji) nello **Wuhan, in Cina. Nel 1963**, il gruppo riportò una casistica di risultati sonografici in 261 gravidanze anormali, e nel 1964 descrisse l'ecocardiografia fetale in M-



The UI Octoson

mode - probabilmente il più precoce di tali rapporti nella letteratura medica -. La Cina a quel tempo era chiusa al mondo esterno e le apparecchiature venivano prodotte solo localmente. Oltre alle sonde in A-Mode, le apparecchiature in B-Mode venivano costruite

da una fabbrica di radar nello Wuhan. Purtroppo tali ricerche avanzate vennero bloccate con la

rivoluzione culturale nel 1966 e non ripresero che alla fine degli anni 70. **Chow Wing** di Hong Kong, aveva studiato con Ian Donald a Glasgow per 6 mesi sabbatici nel 1968 ma una vera attività nel suo paese d'origine non iniziò che nel 1975 a causa dei vincoli finanziari ed amministrativi.

In Australia, la Sezione di Ricerca sugli Ultrasuoni presso il Laboratorio Acustico Nazionale (precedentemente del Commonwealth - CAL) di Sydney venne varata nel 1959, con l'obiettivo di creare un centro tecnico specializzato nel campo degli ultrasuoni in medicina. Direttore della Sezione era il fisico George Kossoff. Il CAL era stato fondato nel 1948 dal governo australiano per stimolare la ricerca nel campo dei deficit uditivi. Un "comitato per gli ultrasuoni" era stato creato nel 1955 sotto la presidenza di Norman Murray. Nel 1958 Murray visitò il laboratorio di Joseph Holmes e rimase colpito dall'utilità degli ultrasuoni come strumento diagnostico. Presto, l'anno successivo, venne quindi istituita la Sezione Ricerca sugli Ultrasuoni. Lavorando insieme a William Garrett, un ginecologo del Royal Hospital for Women di Sydney desideroso di avere un nuovo metodo diagnostico per la localizzazione placentare, Kossoff nel 1959 iniziò ad usare l'**ecoscopio CAL** ad acqua, perfezionandolo poi nel 1962. La sua squadra comprendeva, dal 1961, David Robinson, un altro brillante ingegnere. Essi riferirono dei loro risultati in ostetricia al Simposio **Ultrasonics** che si tenne nell'Illinois l'anno seguente. L'"ecoscopio" originario venne poi sostituito nel 1969 con una versione Mark II, che già comprendeva una scala dei grigi per le immagini, ancora prima dell'invenzione del "convertitore di immagini". Il gruppo pubblicò nel 1971 immagini ostetriche ottenute con la scala dei grigi al Meeting Internazionale di Ingegneria Biologica a Melbourne e poi nel 1973 al Congresso mondiale di Diagnosi ultrasonica in Medicina a Rotterdam. Nel 1975, essi costruirono l'UI **Octoson**<sup>®</sup>, una sonda multi-trasduttore veloce a bagno d'acqua, che incorporava il neo-nato convertitore di immagini.

Il problema della **sicurezza degli ultrasuoni ad uso diagnostico** non sfuggì agli studi sin dal principio, soprattutto quando negli anni '40 ultrasuoni di potenza elevata venivano impiegati per scopi distruttivi e terapeutici. In seguito a un certo numero di rapporti iniziali che non avevano dimostrato alcun effetto nocivo dell'esposizione agli ultrasuoni delle cellule umane, **Ian Donald**, nel 1961, in collaborazione con Malcolm Ferguson-Smith, direttore del laboratorio di citogenetica del Queen Mother's Hospital, eseguì approfonditi esperimenti per delineare gli effetti nocivi possibili degli ultrasuoni ad alta intensità sui cromosomi in interfase e mitotici, e non ne trovò. Altri studi nel 1963 al Centro di Ricerca sugli Ultrasuoni Juntendo in Giappone egualmente non rivelarono alcun effetto nocivo su ratti femmina incinte esposte alla potenza massima delle apparecchiature diagnostiche per 3 giorni dopo fertilizzazione. Nel 1964 **Bertil Sunden** a Lund, in Svezia, nella sua tesi di ricerca non trovò alcun effetto teratogeno. Nel 1967 anche altri studi intrapresi in Inghilterra da **El Kohorn** e negli Stati Uniti da **John C. Hobbins** non mostrarono alcun effetto citologico apprezzabile. Gli studiosi ricercarono in particolare un aumento di scambi fra cromatidi gemelli da esposizione ad ultrasuoni. Nel 1970 uno studio di **LM Hellman** su 400 neonati sottoposti ad ultrasuoni prima della nascita non rivelò un'aumentata incidenza di anomalie infantili. Seguirono molti altri studi. Un **Comitato di Bioeffetti** venne organizzato nell'AIUM, col compito di revisionare e controllare periodicamente la letteratura mondiale sugli effetti biologici degli ultrasuoni.

Anche in ambito veterinario ed in particolare nella specie ovina, oggetto di studio della presente tesi di dottorato, sono state effettuate delle prove per valutare se l'utilizzo dell'ultrasonografia transrettale come metodo di diagnosi di gravidanza poteva provocare delle perdite embrionali o fetali o comunque una diminuzione del tasso di gravidanza. Wurst e coll. (2007) infatti dimostrarono che le pecore a cui viene effettuata la diagnosi di gravidanza per via transrettale hanno pregnancy rate, lambing rate e prolificità del tutto simili ai gruppi controllo. Quindi non si

ha né un danneggiamento di tipo meccanico causato dall'introduzione della sonda né problemi dovuti agli ultrasuoni emanati dal trasduttore.

La **visualizzazione in A-mode** venne impiegata per la localizzazione della placenta in Europa ed in Gran Bretagna alla fine degli anni '50 - inizio '60.



An A-mode scanner in the early 1960's

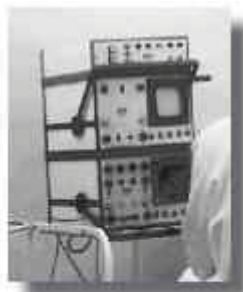
La **visualizzazione M.-mode** (tempo-movimento) venne descritta per la prima volta da **Inge Edler** e da **Hellmuth Hertz** a Lund, in Svezia nel 1954, usando un rilevatore di difetti dei metalli modificato della tedesca Siemens® . Essi dimostrarono la possibilità di registrare i movimento valvolari cardiaci con gli ultrasuoni. **Sven Effert** in Germania, che aveva collaborato con Hertz in alcuni dei suoi lavori, dimostrò chiaramente l'utilità

dell'ecocardiografia in M.-mode, futuro pilastro della diagnostica cardiologia.

Le tecniche ultrasoniche color doppler per lo studio sui movimento valvolari cardiaci vennero sviluppate per primi da **Shiego Satomura** e da **Yasuhara Nimura** all' Istituto di ricerca scientifica ed industriale **di Osaka**, in Giappone nel 1955. Il principio di Doppler in realtà era stato esposto per la prima volta 100 anni prima da **Christian Andreas Doppler** in Austria nel 1842. Successivamente il lavoro di "sfondamento" fu compiuto dal gruppo dell' università di Washington a Seattle dal 1964 in poi, e venne condotto da **Robert Rushme**, **Dean Franklin** e **Donald Baker**, tre bioingegneri che si occuparono dell'impiego degli ultrasuoni in medicina; più tardi da **John Reid** e da **George Tome**. Nel 1964 **D. Eugene Strandness** descrisse e pubblicò i primi segnali flussimetrici. Così nel 1974 si giunse alla produzione di strumenti doppler pulsati (Barber e coll., 1974). Verso la fine degli anni 60 il gruppo di **Takeuchi** in Giappone, di **Peronneau** a Parigi e quello di **Wells** a Bristol, in Inghilterra, erano molto attivi nello sviluppo dei dispositivi doppler pulsati. I dispositivi



d'esplorazione **B-mode** all'inizio usavano un tipo di rilevazione "a soglia" che registrava gli echi come dei puntini di luce su uno schermo rivestito di fosforo di un oscilloscopio. Veniva utilizzato un tubo a raggio catodico "a memoria" o "bi stabile". Gli echi sopra una certa ampiezza venivano



The early B-scan with the bistable oscilloscope \*\*

visualizzati come puntini di intensità costante e gli echi di minore ampiezza sotto la soglia non venivano registrati. Il sonogramma finale veniva riprodotto in una fotografia in bianco e nero della **polaroid®** (disponibile dal 1959 sia in Inghilterra che negli Stati Uniti) senza informazioni sull'ampiezza degli echi. C'era buona rappresentazione delle dimensioni, della figura e della posizione ma senza una descrizione degli

echi interni. Divenne presto chiaro che era necessario una specie di "**scala dei grigi**" se si volevano aumentare le possibilità diagnostiche e l'accuratezza dell'esame B-mode. L'innovazione più grande in ecografia successiva all'invenzione del dispositivo d'esplorazione a contatto a braccio snodabile fu il **convertitore di immagini**. Il tubo a raggi catodici aveva un "range" dinamico basso, di circa 16 decibel. I tentativi iniziali di creare una **scala dei grigi** vennero fatti con l'uso d'un oscilloscopio a persistenza breve, e cambiando i tempi di esposizione dell'otturatore nella fotografia. Ciò dava luogo approssimativamente a sole 4 tonalità di grigio nell'immagine finale ma il processo era difficile da gestire e risultava imprevedibile. In seguito, prima della comparsa del convertitore di immagini, gli echi venivano compressi per mezzo di sofisticati **amplificatori a compressione logaritmica** per ridurre la massima quantità di informazioni possibile nel "range", ottenendo così un certo grado di scala di grigi. Le macchine costruite a Glasgow verso la metà degli anni '50 erano dotate di scale di grigi. La funzione dell'elaboratore dei segnali era di ottenere una immagine in base agli impulsi nel tempo, nel tentativo di separare gli eco in arrivo in spazi di tempo brevi, e permettendo una visualizzazione in modo di registrare l'ampia gamma dinamica di segnali che venivano ricevuti, senza andare fuori range da un lato, o

senza eliminare gli echi “piccoli” dall’altro. Il fuoco a quel tempo era piuttosto una "riduzione del rumore di fondo" tramite una integrazione di segnali, poichè si basava su un “aggiustamento” della vasta gamma dei segnali ricevuti. Il convertitore analogico di immagini usava un obiettivo al silicene che fungeva da tabella di capacità e che veniva esplorato da un fascio di elettroni che lo leggeva e che visualizzava le informazioni su un' unità video. Facendo così, la tecnologia basata sui processori di calcolo, che nasceva proprio in quel periodo, venne applicata all’elaborazione dei segnali. Le immagini poterono dunque venire regolate, riprodotte, calibrate su schermo, ed elaborate in una scala di grigi. L' applicazione di un vero gradiente di grigi si sviluppò in seguito al lavoro del gruppo di **Kossoff** all' **Istituto Ultrasonico di Sydney** (precedentemente chiamati Laboratori Nazionali di Acustica), in **Australia**. **George Kossoff**, fisico e direttore della Sezione di Ricerca sugli Ultrasuoni, aveva inventato ed affinato un'apparecchiatura ad ultrasuoni per diversi scopi incluse le applicazioni oftalmiche sin dal 1959. Insieme a **William Garrett**, un ginecologo, ed a due brillanti ingegneri, George Radovanovitch e David Carpenter, pubblicarono nel 1970 il loro nuovo convertitore di immagini con scala di grigi, basato sul lavoro che già avevano iniziato sin dal 1969. Intorno al ' 73 - '74 anche altri centri in Gran-Bretagna ed in Europa pubblicarono apparecchi simili. Nel 1974 il gruppo di **Kossoff** costruì e presentò l’**Octoson®**, un dispositivo d'esplorazione veloce a bagno d'acqua ad 8-trasduttori che realizzava le sue immagini tramite una combinazione delle vibrazioni dei vari trasduttori ed il loro funzionamento sequenziale in eco pulsato. La macchina produceva immagini stupefacenti. Le apparecchiature a scala di grigi entrarono rapidamente in commercio sin dal 1975. L’ecografia a scala di grigi, da quando Kossoff la presentò, “ebbe una brevissima fase di transizione fra invenzione e diffusione”: ciò perché i miglioramenti nella qualità e nella interpretazione delle immagini furono veramente incredibili. Un apparecchio simile venne elaborato al **Royal Marsden Hospital** in Inghilterra allo stesso tempo da **Kenneth Taylor** e da **David Carpenter**, l’ingegnere dal gruppo di Kossoff. Insieme a **CR Hill** ed a

**VR McCready** il gruppo nel 1973 presentò la sua esperienza con immagini in scala di grigi e diede una dimostrazione della loro versione di sonda da contatto in scala di grigi. Kenneth Taylor divenne poi Professore di Radiologia all'Università di Yale. Con il miglioramento della tecnologia informatica, all'inizio degli anni '80 il convertitore analogico delle sonde venne sostituito da convertitori digitali (DSC). **David Robinson** e **George Kossoff** descrissero uno dei primi DSC nel 1979, impiegando una memoria digitale di 512x512 pixel. Le immagini erano più stabili e c'era la possibilità di leggere e di scrivere in contemporanea, il che rendeva l'apparecchio più versatile. Divennero così disponibili macchine a 4 (16 tonalità di grigio) ed a 5 bit (32 tonalità). Gli sviluppi



successivi nella formazione e nella conversione di immagini eco-pulsate si basarono sulla comprensione che gli echi ultrasonori avevano origine non solo dalle grandi superfici, ma anche dalle più piccole strutture meccaniche del corpo umano. I miglioramenti si orientarono dunque nella rilevazione di piccoli echi in presenza di disturbi e nel visualizzare le informazioni

successive nella gamma dinamica più completa dei **dettagli spaziali**, ottenendo **maggiore risoluzione** con **maggiori livelli di luminosità** delle immagini. L'innovazione che **cambiò**



**radicalmente la pratica dell'esame ad ultrasuoni** fu l'avvento di **apparecchi real-time**. Il primo dispositivo d'esplorazione in tempo reale, noto allora come B-scanner veloce, venne ideato da **W. Krause** e da **R. Soldner**, e costruito nel 1965 col nome di **Vidoson®**

dalla **Siemens Medical Systems** in Germania. Il Vidoson era dotato di 3 trasduttori ruotanti alloggiati davanti uno specchio parabolico in un sistema ad acqua e produceva 15 immagini al

secondo. L'immagine era composta di 120 righe. L' uso di trasduttori ad ampia superficie con fuoco fisso produsse buone risoluzioni ed immagini. Da allora, altri sistemi meccanici vennero studiati e divennero presto disponibili quale il sistema di rotazione circolare della austriaca **Kretztechnik®**. **James Griffith** e **Walter Henry** produssero nel 1973 dei trasduttori meccanici oscillanti in tempo reale molto migliori e capaci di produrre nitide immagini settoriali di 30 gradi in tempo reale. Questi vennero successivamente estesamente impiegati nei dispositivi d'esplorazione cardiaci.

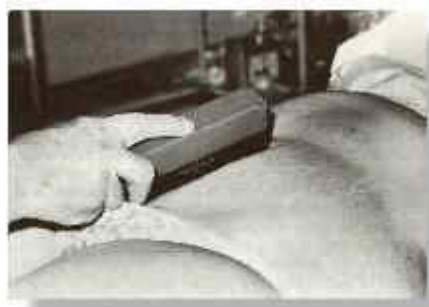
I dispositivi d'esplorazione **elettronici** entrarono in commercio nella seconda metà degli **anni 70**. I primi **trasduttori lineari ad allineamento**, disponibili sul mercato dal **1973**, erano formati da 64



An early real-time scanner from Diagnostic Sonar \*\*\*

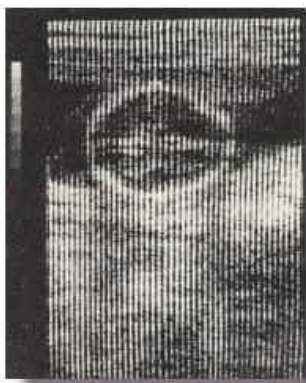
cristalli disposti in fila. Esiste una commutazione elettronica nel passaggio dai singoli piccoli elementi o gruppi di elementi di cristallo in un modello capace di produrre il cosiddetto fuoco dinamico. Il trasduttore è opportunamente collegato alla sezione comandi principale da un cavo flessibile. I **dispositivi**

**d'esplorazione statici compositi** continuarono la loro tradizione di macchine voluminose e ingombranti (probabilmente influenzate dal disegno delle altre macchine capaci di produrre immagini, quali quelle delle tomografie a raggi X).



I nuovi dispositivi d'esplorazione statici, capaci d'immagini eccellenti, all' inizio degli anni 80 erano ancora in fase di programmazione. Si pensava che le macchine real-time potessero svolgere un ruolo complementare a quelle statiche nella valutazione delle

strutture in movimento. Le macchine statiche invece vennero sostituite o eliminate con una velocità maggiore del previsto. Non c'era apparentemente nessun vantaggio pratico, economico o clinico nell'uso di queste macchine costose rispetto a quelle in real-time più mobili e flessibili. Il passaggio all'uso di queste ultime ebbe seri risvolti finanziari per alcune aziende che avevano ancora in magazzino grandi quantità di dispositivi d'esplorazione statici. Il concetto degli **allineamenti elettronici** a più elementi venne descritto per primo da **Werner Buschmann** in un' applicazione oftalmologica nel **1964** a **Berlino Est**; venne migliorata da **Nicolaas Bom** a Rotterdam nel 1971. Il primo trasduttore lineare di allineamento di Bom era formato da 20 cristalli ed produceva immagini in movimento a 17 fotogrammi al secondo. In collaborazione con l'industria olandese **Organon Teknika**, essi produssero e misero in commercio probabilmente il primo dispositivo elettronico d'esplorazione in tempo reale nel mondo. Un altro dei primi trasduttori ad allineamento lineare venne costruito al **Stanford Research Institute** in California e venne descritto da Zatz e da Marich nel **1975**. Tali macchine sequenziali a più elementi vennero descritte al Secondo Congresso Europeo sugli Ultrasuoni in Medicina da **altri gruppi in Europa** durante lo stesso anno. **Martin Wilcox**, fondatore ed ingegnere dell'Acoustic Diagnostic Research Corporation (ADR, un' azienda statunitense fondata nel 1972) progettò e produsse uno dei primi modelli



disponibili in commercio di dispositivi lineari d'esplorazione in real-time fissando le linee-guida per i successivi sviluppi. Il loro secondo modello il **2130**, messo in commercio nel 1975 ebbe grande successo negli Stati Uniti e venne venduto in oltre 5000 unità. Le tecnologie ad allineamento lineare e anulare vennero studiate attentamente, all' inizio degli anni 70, anche dai **giapponesi** (Aloka, Toshiba), che stavano avanzando con molto successo in ingegneria

elettronica in molti settori. Le immagini dei primi modelli non erano tuttavia eccezionali in gran

parte a causa della piccolezza dei cristalli e delle gravi distorsioni di immagine dell'elaborazione elettronica. I più piccoli **trasduttori ad allineamento di fase** ed **ad allineamento anulare** con circuiti elettronici più complicati divennero di moda e divennero i più impiegati per gli esami ecocardiografici. Questi meccanismi d'esame vennero descritti da **Jan C. Somers** all'Università di Limberg nei Paesi Bassi e vennero impiegati a partire dal **1968**, parecchi anni prima degli apparecchi a sistema lineare. Attività pionieristiche in progetti di allineamento ed in tecniche di **focalizzazione elettronica** vennero condotte anche da **Frederick Thurstone** negli Stati Uniti.



L'ingegneria legata alle sonde ecografiche passò presto nelle mani delle aziende commerciali piuttosto che dei clinici. Le compagnie che si evidenziarono con la produzione di apparecchi in real-time furono **Aloka®**, **Toshiba®** e **Shimadzu®** in Giappone; **EMI®**, **Diagnostic Sonar®**, **Siemens®**, **KretzTechnik®**, **Bruel e Kjaer®**, **GEC®**, **Philips®** e **Roche-Kontron®** in Europa; **ADR®**, **SKI®**, **Phosonic Searle®**, **Technicare®** e **Diasonics®** negli Stati Uniti. I lavori di **Kasai**, **K Namekawa** e **A.Koyano** in Giappone, pubblicati in

lingua inglese nel **1985**, condussero rapidamente al concetto che fosse possibile ottenere **immagini di flusso a colori in real-time**. Essi fecero uso di un rilevatore di fase basato su una **tecnica di autocorrelazione** in cui il cambio di fase di un segnale forniva informazioni su un cambio di velocità lungo il fascio ultrasonico. Questo metodo basato su tracciati a colori dei flussi è in uso ancora oggi. La **qualità delle immagini** dei dispositivi ecografici in tempo reale produsse, con il perfezionarsi dei microprocessori, ulteriori miglioramenti durante la metà degli anni 80 ed all'inizio degli anni 90. Tuttavia fu alla metà degli anni 90 che si ebbero i maggiori progressi nella

qualità delle immagini. La diffusione delle nuove tecnologie e la loro applicazione alle apparecchiature ecografiche aveva già permesso grandi progressi in altri campi scientifici quali la **navigazione con radar, le telecomunicazioni e l'elettronica di consumo**. Contemporaneamente si ebbero rapidi progressi nei **telefoni cellulari, nei microcomputer, nei lettori di CD e nelle televisioni ad alta definizione**. Strumentazioni elettroniche ad alta velocità necessarie per l'ultrasonografia divennero disponibili a prezzi ragionevoli. Il solo mercato ultrasonografico non sarebbe stato in grado di affrontare simili spese per tali tecnologie. I miglioramenti furono i seguenti:

- 1) **L'intera catena di elaborazione del segnale diventò digitale**. Tale modifica digitale si basò sulla disponibilità di piattaforme informatiche più efficienti, che vennero sviluppate alla fine degli anni '80. I processori delle macchine di ultima generazione hanno la potenza di circa **40 processori Pentium** e sono in grado di eseguire da **20 a 30 miliardi di operazioni al secondo**.
- 2) **L'ampio impiego di trasduttori ad ampia banda**, capaci di migliorare sia la definizione della trama tissutale, sia il "range" dinamico.
- 3) Vengono sottoposti ad elaborazione sia i **dati di fase di ritorno degli eco** ultrasonici, sia i dati di ampiezza, ottenendo una immagine di elaborazione coerente. Tale tecnica produce una quantità doppia di dati, dai quali è possibile ottenere immagini ad alta risoluzione. Anche la velocità delle immagini risulta aumentata. Gli ultimi anni '90 videro anche lo sviluppo di **trasduttori capaci di elaborare i dati in 2 dimensioni**, costituiti sulla loro superficie da un gran numero di elementi disposti in righe e colonne. La messa a fuoco avviene in 2 direzioni il che produce una definizione migliore in tutt'e due i piani, eliminando così gli artefatti dei piani tissutali adiacenti.

- 4) **La scoperta delle immagini armoniche** dei tessuti. Tale tecnologia, sviluppatasi negli ultimi 20 degli anni '90, si basa sull'impiego di frequenze armoniche durante la propagazione degli echi attraverso i tessuti, riducendo in questo modo vari **artefatti**. Tali immagini armoniche sono particolarmente utili nei **pazienti obesi**.

#### **L'avvento dell'ecografia in 3 dimensioni.**

Con il miglioramento della tecnologia degli ultrasuoni, la **visualizzazione tridimensionale** cominciò ad essere la prassi nei primi anni '80, ma confinata alla cardiologia, nel tentativo di valutare i volumi delle camere cardiache. Venivano impiegate sonde attive in tempo reale e montate su bracci snodabili dove la posizione della sonda veniva stabilita con precisione. Il principio era di fissare in successione immagini in sezioni parallele, unitamente ai dati relativi alla loro sequenza.



Nel 1989, **Kazunore Baba** e **Kazuo Satoh**, insieme a **Shoichi Sakamoto** presso il **Saitama Medical Center in Giappone** descrissero la visualizzazione tridimensionale utilizzando una sonda tradizionale in real-time "convex" (Aloka SD280®) montata su un braccio snodabile di una macchina statica-composita (Aloka

M8U-10C®). Nella seconda metà degli anni '90 almeno un'altra dozzina di altri Centri eseguirono ricerche cliniche sull'ecografia tridimensionale.

In conclusione l'evoluzione dell'ecografia diagnostica è il risultato di sforzi combinati di clinici, ricercatori, fisici, ecografisti, di ingegneri meccanici, elettronici e bio-medici, di tecnici informatici, di amministratori di università e di governo, ed anche di imprenditori avventurosi. Gli ecografi in



**A-mode** che rappresentarono l'evoluzione dei primi rivelatori dei difetti dei metalli non avrebbero avuto un impatto tanto duraturo in medicina senza la successiva evoluzione verso le macchine in **B-mode**, le quali originarono dai radar militari. Gli apparecchi A-mode non erano in grado di fornire informazioni tanto accurate da essere interpretabili e da permettere una diagnosi attendibile. Così gli apparecchi B-mode non sarebbero diventati i mezzi affidabili che essi rappresentano oggi, senza la loro evoluzione in **convertitori di immagini** e con la scoperta della **gradazione dei grigi**. Gli apparecchi statici-compositi a scala dei grigi, forniti delle tecnologie informatiche sviluppatesi negli anni '70, si imposero come veri baluardi clinico-diagnostici fornendo informazioni cliniche sino a quei tempi impensabili per numerose patologie. Il concetto originario di **Howry** di ottenere immagini anatomiche chiare registrando selettivamente gli echi più grossolani provenienti dalle superfici più ampie, eliminando gli echi più piccoli, venne in seguito completamente sovvertito, quando si tentò di raccogliere gli echi più piccoli in presenza di disturbi, cercando di ottenere fini definizioni spaziali. L'arrivo poi degli **scanner in real-time** aggiunse ulteriore forza alle tecniche ecografiche. Un'ulteriore spinta tecnologica determinò, durante gli anni '90, altri miglioramenti nelle capacità diagnostiche degli ecografi, grazie ai progressi esplosivi delle tecnologie elettroniche con i microprocessori. Si giunge ai giorni nostri, al tempo dell'ecografia tridimensionale statica (3D) e dinamica (4D).

Il lavoro dei primi pionieri italiani inizia alla fine degli anni '60 ed all'inizio del decennio successivo. In principio l'interesse per la diagnostica ecografica si diffonde soprattutto tra specialisti in cardiologia, oculistica, ostetricia e neurologia, i settori in cui sembrano più promettenti le prospettive di questa nuova tecnica. Sono relativamente pochi i radiologi, internisti, o chirurghi che si affacciano precocemente alla diagnostica ecografica, verosimilmente in relazione alla complessità delle apparecchiature ed alla difficile interpretazione dei primi risultati. Questa matrice multidisciplinare della diagnostica ecografica fa sì che nasca tra gli "ecografisti" la

necessità di confrontare le esperienze e di coordinare la crescita e la diffusione della nuova metodica. A tal fine, a Ferrara, nel 1975, si tiene il primo convegno della **SISUM, la Società Italiana per lo Studio degli Ultrasuoni in Medicina**, una Società Scientifica di tipo federativo, nella quale convergono tutti gli interessati alla diagnostica con ultrasuoni organizzati in Sezioni o Società Scientifiche autonome. Radiologi, gastroenterologi e chirurghi confluiscono in una Sezione della Società, raccogliendo un'unica vasta area scientifica e professionale denominata "Ecografia Internistica".

Grande è stato l'impulso culturale, scientifico, professionale, che la SISUM ha dato allo sviluppo dell'ecografia italiana nei suoi primi anni di vita e fondamentale è stato il suo ruolo nel presentare le esperienze italiane nel contesto internazionale. Nel 1978, a Bologna, la SISUM ospitò il Congresso della Federazione Europea delle Società per lo Studio degli Ultrasuoni in Medicina e Biologia (EFSUMB), la prima importante "vetrina" dell'ecografia italiana nel mondo. Peraltro, con il maturare della tecnologia, il diffondersi della tecnica e il suo entrare sempre più capillarmente nella diagnostica di tutti gli organi ed apparati, la spinta verso interessi scientifico-professionali specifici divenne preponderante nell'ambito delle sue diverse componenti. Nel 1982 la Sezione Internistica si strutturò come Società autonoma: la **SIUI (Società Italiana di Ultrasonografia Internistica)**. Il Convegno Nazionale, che la Società da allora organizza annualmente, è punto di riferimento per la presentazione del lavoro scientifico svolto dai ricercatori italiani, strumento didattico che fa fronte alla sempre crescente domanda di aggiornamento in ecografia internistica da parte dei medici italiani, punto di incontro e dibattito tra gli ecografisti che provengono da discipline cliniche differenti. Nel 1983 la SISUM, esaurito il suo ruolo propulsore nei confronti dell'ultrasonografia italiana, si sciolse. Le tematiche di ricerca ed i rapporti scientifici e culturali dibattuti fino ad allora tra ecografisti di estrazione diversa vennero principalmente rivolti verso le rispettive specialità cliniche di appartenenza. Nel 1987 la SIUI, che continua a raccogliere

l'apporto multidisciplinare di radiologi e di specialisti internisti e chirurghi, cambia il proprio nome in SIUMB (Società Italiana Ultrasonologia in Medicina e Biologia), denominazione che dura a tutt'oggi. Nello stesso anno, vede accolta la propria domanda di affiliazione alla Federazione Europea delle Società per lo Studio degli Ultrasuoni in Medicina e Biologia. La SIUMB ha quindi, a livello internazionale, l'onore e l'onere di rappresentare, con l'attività dei propri soci, l'ecografia italiana nella sua interezza.

In definitiva ai nostri giorni l'ecografia è una metodica di "imaging" a basso costo, facilmente eseguibile e ripetibile, senza rischi per il paziente e per l'operatore, che richiede un breve tempo d'esecuzione ed una preparazione e un discomfort minimi per il paziente. I suoi limiti principali possono essere di natura tecnica, dipendenti dalla strumentazione tecnologica, dal soma del paziente o dall'abilità e esperienza dell'operatore.

I limiti di natura tecnica riguardano la qualità dell'immagine e la possibilità di estrapolarne tutte le informazioni disponibili con la maggior accuratezza possibile. Tali limiti possono essere dipendenti, come detto sopra, dalla strumentazione disponibile che può avvalersi o meno dei dispositivi hardware e software di nuova generazione derivati dalla sinergia tra ricerca tecnologica e scientifica. Tali nuove soluzioni tecnologiche sono utili per ridurre gli artefatti, per migliorare la risoluzione spaziale di ciò che si valuta, e anche per superare i limiti tecnici correlati alla posizione delle varie strutture anatomiche da esaminare e i rapporti reciproci con le strutture ad esse adiacenti. Nonostante le innovazioni tecnologiche contribuiscano a migliorare la qualità dell'immagine, le caratteristiche somatiche, la collaborazione e la preparazione del paziente influiscono ancora oggi in maniera rilevante sulla visualizzazione delle strutture anatomiche interne.

L'ecografia, infine, è una metodica operatore-dipendente, e numerosi studi hanno dimostrato come ci sia una variabilità nell'esecuzione e nell'interpretazione dell'esame sia tra operatori diversi, sia nello stesso operatore in tempi diversi. È stato anche dimostrato come questa variabilità, anche se non eliminabile del tutto, possa essere ridotta da un adeguato addestramento e dall'accordo sulle tecniche di esecuzione e sui criteri di valutazione. La disponibilità delle tecniche di imaging ha apportato un grosso contributo allo studio delle strutture e degli organi splancnici, sia in ambito fisiologico che patologico.

## ***Bibliografia***

1. Barber FE, Baker DW, Strandness DE Jr, e coll. Duplex Scanner II: for simultaneous imaging of artery tissues and flow. Ultrasonics Symposium Proceedings, IEEE Press, 1974; 744-748.
2. Barone R. Utero. In "Anatomia comparata dei mammiferi domestici" . Edagricole, Bologna 1994;Vol. 4, pag. 267
3. Bortolami e coll., Anatomia e Fisiologia degli Animali Domestici, 2° Calderini Edagricole, Bologna Edizione 2000.
4. Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells thought mammalian oogenesis. Biology of Reproduction 1990; 43: 543–547
5. De La Fuente R, Eppig JJ. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. Dev Biol 2001;229:224-236.
6. De La Fuente R, Viveiros MM, Wigglesworth K, Eppig JJ. ATRX, a member of the SNF2 family of helicase/ATPases, is required for chromosome alignment and meiotic spindle organization in metaphase II stage mouse oocytes. Dev Biol. 2004; 1;272(1):1-14.
7. De Rensis, F., Allegri, M., Seidel, G.E. Jr. Estrus synchronization and fertility in post-partum dairy cattle after administration of human chorionic gonadotropin (hCG) and prostaglandin PGF2alfa analog. Theriogenology 1999; 52:259-269
8. Debey P, Szollosi MS, Szollosi D, Vautier D, Girusse A, Besombes D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. Mol Reprod Dev 1993;36:59-74.
9. Donald I., Brown TG. Demonstration of tissue interfaces within the body by ultrasonic echo sounding. Br. J. Radiol. 1961; 34: 539-546.
10. Donald I, MacVicar J, Brown TG. Investigation of abdominal masses by pulsed ultrasound. Lancet 1958; 1:1188-1195.
11. Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. Reprod Fertil Dev. 1996;8(4):485-9.
12. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction. 2001 Dec;122(6):829-38.

13. Fan HY, Huo LJ, Chen DY, Schatten H, Sun QY. Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase cascade in mouse cumulus cells: cross talk and effect on meiotic resumption of oocyte. *Biol Reprod.* 2004 Apr;70(4):1178-87.
14. Fan HY, Sun QY. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod.* 2004 Mar;70(3):535-47.
15. Fulka J Jr, First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod.* 1998 Jan;4(1):41-9.
16. Galeati G, Modina S, Lauria A. Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. *Molecular Reproduction and Development* 1991; 29:40-46.
17. Garrett WJ, Grunwald G, Robinson DE. Prenatal diagnosis of fetal polycystic kidney by ultrasound. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol* 1970; 10: 7-9.
18. Gore-Langton RE, Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. In: Knobil, E., Neill, J.D. *The physiology of reproduction.* 2. ed. New York: Raven Press 1994; vol. 1, pp. 571-627,.
19. Hewitt DA and England GCW The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation in vitro. *Theriogenology* 1998;49 957–966
20. Lee B, Vermassen E, Yoon SY, Vanderheyden V, Ito J, Alfandari D, De Smedt H, Parys JB, Fissore RA. Phosphorylation of IP3R1 and the regulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses at fertilization: a role for the MAP kinase pathway. *Development.* 2006;133:4355-65.
21. Lee J, Miyano T, Moor RM. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote.* 2000; 8:119-25.
22. Loi P, Ledda S, Fulka J Jr, Cappai P, Moor RM. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biol Reprod* 1998; 58: 1177-1187.
23. Longo F, Garagna S, Merico V, Orlandini G, Gatti R, Scandroglio R, Redi CA, Zuccotti M. Nuclear localization of NORs and centromeres in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mol Reprod Dev.* 2003;66:279-90.
24. Macháty Z, Rickords LF, Prather RS. Parthenogenetic activation of porcine oocytes after nuclear transfer *Cloning.* 1999;1:101-109.
25. Mattioli M, Barboni B. Induction of oocyte maturation. In: LAURIA, A., GANDOLFI, F., ENNE, G., e coll. (eds.). *Gametes: development and function.* Roma : Serono Symposia, 1998;p.141-153.

26. Milvae RA, Hinckley ST, Carlson JC. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*. 1996 ;1;45:1327-49
27. Miyazaki S. IP3 receptor-mediated spatial and temporal Ca<sup>2+</sup> signaling of the cell. *Jpn J Physiol*. 1993;43(4):409-3
28. Molyneaux K and Wylie C. Primordial germ cell migration *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 537-544.
29. Monesi V.: Epiteli ghiandolari. Ghiandole. In "Istologia". 4thed.,. Piccin editor 1992; pag. 460.
30. Nakada, K., Mizuno, J., Shiraishi, K., Endo, K. and Miyazaki, S. Initiation, persistence, and cessation of the series of intracellular Ca<sup>2+</sup> responses during fertilization of bovine eggs. *J. Reprod. Dev* 1995.;41, 77–84
31. Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev* 1999; 9:158-163
32. Ohashi S, Naito K, Sugiura K, Iwamori N, Goto S, Naruoka H, Tojo H. Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod*. 2003;68(2):604-9
33. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*. 2000;10(8):475-8.
34. Parrington J, Lai FA, Swann K. The soluble mammalian sperm factor protein that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs: evidence for expression of mRNA(s) coding for sperm factor protein(s) in spermatogenic cells. *Biol Cell*. 2000 Jul;92(3-4):267-75
35. Prévost J, Bélanger A, Bernard C, Lambert RD. Androgen metabolites in bovine follicular fluid. *Theriogenology*. 1989;31:675-81
36. Senbon S. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development. *Reprod* 2003;49: 259.
37. Smitz JE, Cortvrint RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*. 2002;123:185-202
38. Spinaci, M., Seren, E. e Mattioli, M.. Maternal chromatin remodeling during maturation and after fertilization in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev*2004; 69, 215–21.
39. Tajima K, Orisaka M, Mori T, Kotsuji F. Ovarian theca cells in follicular function. *Reprod Biomed Online*. 2007;15(5):591-609.

40. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev.* 2002;61:414-24
41. Taylor KJ, Burns PN, Woodcock JP, Wells PN. Blood flow in deep abdominal and pelvic vessels: ultrasonic pulsed-Doppler analysis. *Radiology* 1985; 154:2 487.
42. Vozzi C, Formenton A, Chanson A, Senn A, Sahli R, Shaw P, Nicod P, Germond M, Haefliger JA. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. *Reproduction* 2001;122:619-628.
43. Wild, J.J. and Reid, J.M. Application of echo-ranging techniques to the determination of structure of biological tissues. *Science* 1952; 115:226-230.
44. Wild, J.J. and Reid, J.M. Current developments in ultrasonic equipments of medical diagnosis. *IRE Trans. Ultrason. Engng.* 1957; 5:44-56.
45. Wurst AK, Dixon AB, Inskeep EK. Lack of effect of transrectal ultrasonography with restraint on lambing rate and prolificacy in ewes. *Theriogenology.* 2007; 68:1012-6.
46. Yen S.S.C., Jaffe R.B., Barbieri R.L., *Endocrinologia della riproduzione. Fisiologia, fisiopatologia e aspetti clinici*, Roma ( 2000) Verduci, , p.725
47. Zuccotti M, Piccinelli A, Giorgi Rossi P, Garagna S, Redi CA.. Chromatin organization during mouse oocyte growth *Mol Reprod Dev.* 1995;41:479-85.



# **Caratterizzazione della dinamica follicolare e di accrescimento del corpo luteo durante il ciclo estrale nella pecora Sarda**

## ***Evoluzione della ricerca sulle ovaie***

L'anatomia e la funzione ovarica sono state oggetto di studio fin dai primi inizi della storia della scienza medica. Nel V° secolo a.C., Ippocrate non attribuì alcun ruolo generativo all'ovaio, ma piuttosto suggerì che la generazione di una nuova vita sarebbe il risultato dell'azione di due tipi di seme, uno di origine maschile (eiaculazione) ed uno di pertinenza della femmina (sangue mestruale). Un secolo più tardi, Aristotele caratterizzò l'ovaio come un vestigio imperfetto del testicolo maschile senza alcuna funzione apparente. Fino alla metà del 1600 l'ovaio non era stato ancora riconosciuto per quello che era realmente, un produttore di cellule germinali. Il medico olandese, Regnier de Graaf, è spesso citato come il primo a riconoscere il legittimo ruolo delle ovaie nel suo "*Nuovo trattato relativo agli organi genitali delle donne*" pubblicato nel 1672. Il giovane de Graaf, a soli 31 anni, è stato coinvolto in una spiacevole discussione con il suo professore di anatomia, Johannes van Horne, e il suo compagno di classe, Jan Swammerdam, che sostenevano di aver già rivelato la forma (e per estensione, la funzione) dell'ovaio in una breve comunicazione nel 1668. Il loro primo "abstract" scientifico fu tuttavia preceduto da uno di de Graaf poche settimane prima, nel Marzo del 1668. Ironicamente, la conclusione di un comitato incaricato di risolvere la controversia fu che né de Graaf, né Van Horne furono i primi ad aver visto le uova in organismi vivipari, ma piuttosto un altro compagno di classe, Niels Steno, che ha riportato nel suo trattato del 1667 che "i testicoli delle donne sono analoghi alle ovaie". Tutti questi primi scienziati moderni avevano la convinzione errata che il follicolo corrispondeva alla

cellula uovo - come un uovo senza guscio di un piccolo uccello. Questo era il pensiero comune sino al 1827 quando un medico estone, Karl Ernst von Baer, fece la prima descrizione di un uovo di mammifero tramite lo studio microscopico delle vescicole ovariche (follicoli) dell'ovaio di un cane.

Solo nel 1914 Marshall e Runciman effettuando l'ovariectomia riuscirono a capire che l'ovaio svolgeva un ruolo centrale nell'ambito delle manifestazioni del ciclo estrale. Purtroppo i due ricercatori non arrivarono a comprendere quale struttura dell'ovaio stesso fosse la responsabile della ricorrenza degli estri. Successivamente Frank nel 1922 affermò che il susseguirsi dei cicli estrali era dovuto dall'azione delle ovaie sull'utero e che lo sviluppo, la crescita e l'evoluzione dei follicoli rappresentavano l'evento centrale. In definitiva, a partire dagli studi di De Graaf della metà del 1600 che già aveva dimostrato che i follicoli erano presenti sulle ovaie nelle diverse fasi del ciclo estrale poco è cambiato per circa 3 secoli. Infatti i primi studi sulla dinamica di sviluppo del follicolo sono stati effettuati solo alla fine degli anni '20. E' risultato decisamente doveroso, anche se un po' scontato, da parte degli scienziati del 1900 dedicargli almeno il nome di un follicolo. Infatti il follicolo preovulatorio, quello più importante, viene ormai universalmente riconosciuto come **follicolo di Graaf**.

Solo nel 1927 John A. Hammond con il testo *The Physiology of Reproduction in the Cow* riprese a parlare di studio della dinamica follicolare. Un anno dopo Mc Nutt affermò che i grandi follicoli nelle bovine non gravide subivano dei cambiamenti ciclici e che di solito raggiungevano il loro maggior diametro nella seconda metà del ciclo estrale di 21 giorni. Nel 1931 Quinlan e Marè con il report che trattava dei cambiamenti fisiologici nelle ovaie, produssero il primo lavoro che trattava specificatamente la specie ovina. Sebbene furono poche le pubblicazioni apparse subito dopo, il trattato di Roux (1936) dal titolo *Sex physiology of sheep* è senza dubbio la più completa

di tutti ed è ancora riconosciuto da molti come uno dei classici documenti sul tema. Ad ogni modo, sebbene a partire dagli anni '30 e sino ai primi anni '60 si descrissero gli importanti cambiamenti morfologici delle ovaie durante le varie fasi del ciclo estrale, i ricercatori continuavano ad affermare che i follicoli preovulatori sviluppano rapidamente nei primissimi giorni del ciclo per poi crescere molto lentamente in tutto il diestro, mentre la maggiore crescita in volume si osservava alla fine del ciclo (Quinlan e Marè, 1931). Finora gli studi sulla crescita e l'atresia dei follicoli ovarici si sono tradizionalmente basati sulla misurazione e il conteggio dei follicoli tramite **valutazione istologica** di ovaie da animali macellati in diversi momenti durante il ciclo estrale. Le ovaie venivano prelevate dalle carcasse subito dopo la macellazione, venivano pesate, esaminate macroscopicamente e quindi fissate e preparate per l'istologia. Esse venivano sezionate in fette da 10  $\mu\text{m}$  e colorate principalmente con ematossilina-eosina. Il diametro dei follicoli terziari osservati veniva calcolato sulla conta del numero di sezioni in cui era possibile apprezzarlo. Il lato positivo di questa metodica di studio della dinamica follicolare è che permise di evidenziare i cambiamenti morfologici microscopici di un follicolo destinato all'atresia (diminuzione dello spessore della lamina basale della granulosa, assenza di attività mitotica e nuclei irregolari nelle cellule della granulosa; Brand e de Jong, 1973). Tuttavia per ciò che concerne la dinamica di crescita follicolare solo nel 1971 grazie a Smeaton e Robertson che seguirono *in vivo* la crescita e l'atresia dei follicoli di Graaf si suppose che durante il ciclo estrale erano presenti almeno 3 fasi di crescita ed altrettante di atresia follicolare. I due studiosi ebbero un altro approccio per seguire i follicoli durante il ciclo. Essi tramite laparotomia in anestesia generale marcavano i follicoli più grandi (4-5 mm) con 2  $\mu\text{l}$  di inchiostro di china utilizzando un ago da 27 Gauge e penetrando nel follicolo solo dopo aver attraversato parte dello stroma ovarico in modo tale che il tragitto dell'ago fosse chiuso immediatamente dai tessuti circostanti evitando alcuna perdita di liquido follicolare. Una volta terminata la marcatura dei follicoli venivano

effettuate diverse laparotomie e nell'ambito di queste se erano presenti altri grandi follicoli venivano marcati di nuovo. L'ultima laparotomia avveniva dopo 8-10 ore dalla detezione del calore e serviva per marcare i follicoli preovulatori. Dopo 11 giorni si faceva l'ovariectomia e l'ovaio contenente i follicoli marcati veniva fissato e preparato per la valutazione istologica (Smeaton e Robertson, 1971).

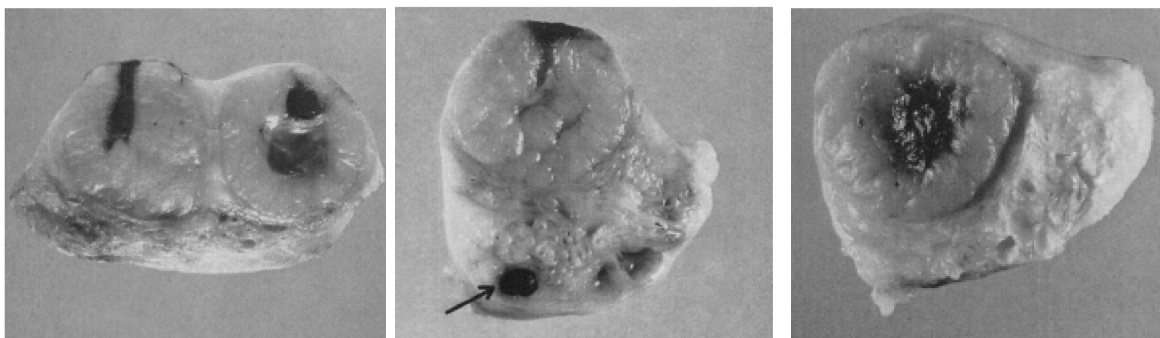


Figura 1. Corpi lutei e follicoli atresici marcati con l'inchiostro di china (Smeaton e Robertson, 1971).

Successivamente, l'avvento dell'endoscopia ridusse l'invasività di questo tipo di studi e si rivelò una metodica altrettanto affidabile della laparotomia nella conta e misurazione dei follicoli ovarici (Noël e coll., 1993). Inoltre, Noel (1993) fu il primo a confermare la teoria delle ondate di crescita follicolare anche nella pecora. Egli infatti descrisse 3 ondate di crescita follicolare nella pecora Suffolk in tre periodi diversi dell'anno descrivendo il numero dei piccoli (2-3.5 mm), medi (4-5.5 mm) e grandi follicoli ( $\geq 6$  mm) e il tasso di ovulazione. Nella bovina il "wave pattern" era già stato dimostrato negli anni '80 grazie ai primi studi con l'ultrasonografia transrettale di Pierson e Ginther (1984) che confermarono quanto proposto da Rajakosky nel 1960. Infatti quest'ultimo, già dal 1960 con gli esperimenti effettuati su ovaie fresche di bovine macellate, come descritto precedentemente, conìò il termine di **ondata follicolare**. Egli capì che i follicoli con diametro  $>$  di 5 mm non erano uniformemente distribuiti durante l'intero ciclo estrale bensì sembrava fossero

organizzati in 2 periodi di crescita. Le ondate di crescita follicolare del Rajakosky furono per decenni argomento di studio per vari ricercatori che si occupavano sia di bovini che di piccoli ruminanti che ne cercavano una reale dimostrazione. Sempre nella bovina si evidenziarono 2 ondate di crescita follicolare (Knopf e coll., 1989) oppure 3 ondate di crescita (Savio e coll., 1991; Sirois e Fortune, 1988).

Nonostante tutto, la laparoscopia ed ancor di più la laparotomia rappresentano procedure chirurgiche invasive che necessitano anestesia generale o sedazione profonda e comunque delle manipolazioni che creano un certo discomfort per gli animali. È evidente che ci sono implicazioni riguardo al benessere animale ed inoltre l'aspetto normale delle ovaie può essere influenzato da questo stress particolarmente in studi a lungo termine (Dickie e coll, 1999).

L'ecografia transrettale fornisce un mezzo indispensabile per effettuare esami ripetuti, per il monitoraggio diretto non-invasivo delle strutture ovariche e per determinare il numero e le dimensioni dei follicoli, indipendentemente dalla loro profondità all'interno dell'ovaio (Ginther e coll., 1989). Si tratta di un potente strumento per studiare la fisiologia ovarica, come la relazione tra follicoli dominanti e follicoli subordinati e corpo luteo (CL). Tuttavia, un aspetto limitante per gli studi di dinamica follicolare nelle pecore è la dimensione delle ovaie e delle loro strutture. Questo problema è stato ormai superato grazie alle ultime tecnologie messe a disposizione delle case costruttrici di ecografi che hanno prodotto sonde lineari endocavitarie ad alta frequenza che permettono di evidenziare follicoli delle dimensioni di 1 mm. Alcuni studi hanno testato l'accuratezza dell' ecografia transrettale (US) paragonandolo all'esame di ovaie fresche di pecore (Evans e coll, 2000), ma non c'è una dettagliata informazione relativa al valore predittivo e alla sensibilità degli US per misurare i diametri dei follicoli. Gli ultrasuoni ad alta frequenza (almeno 7,5 MHz) emanati da una sonda lineare consentono un'ottima precisione nella misurazione dei

follicoli al decimo di millimetro, probabilmente ancor più precisa della misurazione effettuata su ovaie fresche. L'ultrasonografia transrettale con sonde lineari adattate o di tipo prostatico di derivazione dall'andrologia umana è divenuta ormai il gold standard per lo studio della dinamica follicolare nei piccoli ruminanti.

### ***Scopo del lavoro***

Negli ultimi anni in Sardegna l'allevamento ovi-caprino ha subito un'importante evoluzione dal punto di vista strutturale (ricoveri adeguati e sala di mungitura) e manageriale (gestione sanitaria e alimentare più precisa) riuscendo a raggiungere una migliore efficienza produttiva tanto da determinare una riduzione del periodo anaestrale ad un periodo piuttosto limitato compreso tra i mesi di fine inverno ed inizio primavera. Tale effetto ha determinato una minore sensibilità verso il fotoperiodo ed una più facile stimolazione dell'attività riproduttiva. Si è ottenuto che la maggior parte delle pecore pluripare partorisce in autunno, consentendo un maggior sfruttamento della lattazione. Ovviamente alcuni errori di tipo gestionale effettuati dall'allevatore od altri imprevisti di natura sanitaria possono ripercuotersi su questo fragile meccanismo che ha permesso di ingannare il fotoperiodo, causando enormi perdite economiche per l'azienda. Infatti le pecore riprenderanno a seguire il solo stimolo luminoso come marcatempo della propria riproduzione cosicché si accoppieranno dopo il mese di settembre e partoriranno, secondo natura, nella primavera seguente. Oltre al fotoperiodo, la stagionalità può essere influenzata da altri fattori come la genetica (molte razze sono molto più sensibili alle variazioni delle ore di luce giornaliere), management riproduttivo (per es. effetto maschio) e le interazioni sociali (Henderson e Robinson, 1984). Secondo Goodman (1999) le razze ovine ad elevata prolificità hanno una stagione riproduttiva più lunga delle razze meno prolifiche nell'ambito delle stesse condizioni climatiche.

Per esempio la pecora Finish Landrace è una razza molto prolifica (ovulation rate medio:  $2.7 \pm 0,2$ ) presenta una stagione riproduttiva decisamente più lunga della Western White Face (ovulation rate medio:  $1,8 \pm 0,3$ ) (Bartlewsky e coll., 1999).

Nell'ovino, il ciclo estrale ha una durata di 16-17 giorni con un range di 14-19 giorni. Tuttavia, nel periodo di transizione tra anaestro e stagione riproduttiva è frequente osservare cicli brevi sotto i 12 giorni. Inoltre è da sottolineare come il primo calore della stagione non è accompagnato dalle tipiche manifestazioni del calore. L'estro ha una durata che varia con l'età, la razza e la stagione, e va dalle 18 alle 72 ore con una media di 36 ore. Esso rappresenta il giorno 0 del ciclo ed è caratterizzato dalle manifestazioni comportamentali determinate dall'incremento degli estrogeni. La deiezione del follicolo si manifesta dalle 20 alle 40 ore dopo l'inizio delle manifestazioni estrali (Henderson e Robinson 1984), segue la formazione del corpo luteo che al 14-16° giorno del ciclo subirà la regressione. Appare pertanto evidente che gran parte del ciclo sessuale è caratterizzato da una fase progestinica, molto lunga rispetto a quella estrogenica, nel corso della quale si osservano fluttuazioni del livello dell'ormone FSH.

Nella pecora, nonostante sia possibile tramite i sempre più moderni ecografi ad alta definizione che il mercato odierno offre, poter misurare follicoli a partire da 1 mm di diametro si preferisce utilizzare il follicolo di 3 mm di diametro come punto di cut-off. Questo accade perché la popolazione dei follicoli di 1 e 2 mm è talmente numerosa che risulta estremamente difficile poter seguire la crescita e la regressione di ciascuno di essi. Solo Duggavathi e coll (2003) hanno voluto prendere in considerazione la popolazione follicolare a partire da 1 mm e l'unico risultato diverso che sono riusciti ad ottenere rispetto ad uno studio che parte dai 3 mm è che si è accorciata la finestra di emergenza dell'onda da 48h a 24h. Quindi quest'ultimo studio conferma, ancor più di prima, che non è necessario valutare i follicoli sotto i 3 mm.

Ad ogni modo, grazie alla diffusione mondiale della ultrasonografia transrettale per lo scanning ovarico, in questi ultimi anni ci troviamo di fronte ad una sempre più completa mappatura della dinamica follicolare non solo nella pecora in generale ma nelle diverse razze, a seconda della prolificità, della fase della stagione riproduttiva, in anastro stagionale e nelle rispettive fasi di transizione (da stagione ancestrale ad estrale e viceversa). Gruppi di studio di tutto il mondo producono di continuo sempre più lavori in merito (tabella 1).

| Ewe breed  | Pattern of follicle development<br>(method; number of ewes or cycles) | References                                     |
|--|---|--|
| Welsh mountain   | Unclear (slaughter study; $n = 45$ )                                  | <a href="#">Hutchinson and Robertson, 1966</a> |
| Suffolk  | Three phases of growth (India ink study; $n = 14$ )                   | <a href="#">Smeaton and Robertson, 1971</a>    |
| Texel  | Two growth waves (slaughter study; $n = 39$ )                         | <a href="#">Brand and de Jong, 1973</a>        |
| Merino   | No organised pattern (slaughter study; $n = 21$ )                     | <a href="#">Turnbull et al., 1977</a>          |
| D'Mann and Timahdite   | No organised pattern (slaughter study; $n = 48$ )                     | <a href="#">Lahlou-Kassi and Mariana, 1984</a> |
| Suffolk cross  | No organised pattern (ultrasonography; $n = 36$ )                     | <a href="#">Schrick et al., 1993</a>           |
| Suffolk  | Three waves (laparoscopy; $n = 5$ )                                   | <a href="#">Noel et al., 1993</a>              |
| Suffolk  | Three waves (laparoscopy; $n = 16$ )                                  | <a href="#">Noel et al., 1994</a>              |
| Western White Face<br>(Rambouillet $\times$ Columbia)          | Two waves (ultrasonography; $n = 8$ )                                 | <a href="#">Ravindra et al., 1994</a>          |
| Polypay  | Three to six waves (ultrasonography; $n = 16$ )                       | <a href="#">Ginther et al., 1995</a>           |
| Merino del Pais  | No organised pattern (ultrasonography; $n = 9$ )                      | <a href="#">Lopez-Sebastian et al., 1997</a>   |
| Scottish Blackface $\times$ Merino<br>(ovarian autotransplant) | Wave 1 described (ultrasonography; $n = 13$ )                         | <a href="#">Souza et al., 1997</a>             |
| Scottish Blackface $\times$ Merino<br>(ovarian autotransplant) | Three waves (ultrasonography; $n = 6$ )                               | <a href="#">Souza et al., 1998</a>             |
| Suffolk  | Two or three waves (ultrasonography; $n = 13$ )                       | <a href="#">Leyva et al., 1998b</a>            |
| 3/4 Rambouillet $\times$ 1/4<br>Booroola Merino                | Two to four waves (ultrasonography; $n = 21$ )                        | <a href="#">Gibbons et al., 1999</a>           |
| Western White Face   | Three ( $n = 2$ ) or four ( $n = 8$ ) waves<br>(ultrasonography)      | <a href="#">Bartlewski et al., 1999</a>        |
| Finn   | Three ( $n = 2$ ) or four ( $n = 5$ ) waves<br>(ultrasonography)      | <a href="#">Bartlewski et al., 1999</a>        |
| Corriedale   | Two waves (ultrasonography; $n = 8$ )                                 | <a href="#">Vinoles et al., 1999</a>           |
| Suffolk cross or Texel   | Two ( $n = 9$ ) or three ( $n = 17$ ) waves<br>(ultrasonography)      | <a href="#">Evans et al., 2000</a>             |
| Suffolk cross  | Waves with FSH (ultrasonography; $n = 18$ )                           | <a href="#">Evans et al., 2002</a>             |

Tabella 1. Studi effettuati sulla dinamica di sviluppo follicolare nella pecora (da Evans, 2003).



Ad oggi, tuttavia, non esistono riferimenti in bibliografia circa le modificazioni ovariche durante il ciclo estrale nella pecora Sarda, sebbene queste informazioni siano di importanza fondamentale nel valutare poi gli effetti di diversi protocolli sperimentali sul quadro ovarico. Lo scopo del presente esperimento preliminare, è stato quindi quello di caratterizzare in termini di dinamica follicolare e di accrescimento del corpo luteo, il ciclo estrale nella pecora Sarda.

## ***Materiali e Metodi***

Per questo studio sono state utilizzate un totale di 10 pecore di razza Sarda, adulte e pluripare, monitorate nel corso della stagione riproduttiva. Nel gruppo di animali non erano presenti arieti da almeno 4 mesi. Gli animali avevano la possibilità di pascolare durante tutta la giornata in un prato pascolo di graminacee spontanee di circa 4 Ha e ricevevano una piccola integrazione di circa 200 gr./capo di un mangime da mantenimento in pellets al 14% di proteina grezza una volta al dì in concomitanza col ricovero serale in stalla in cui trascorrevano la notte. Le ecografie venivano effettuate proprio nel momento del ricovero degli animali, giornalmente alle ore 20:00.

Lo scanning ultrasonografico è stato eseguito giornalmente dal giorno del calore fino al calore successivo e venivano effettuate con le pecore poste in decubito dorsale. Durante ogni seduta, veniva registrato il numero, il diametro e la posizione dei follicoli di diametro  $\geq 2$  mm e le dimensioni e la posizione dei corpi lutei. Una ondata follicolare consisteva di un follicolo o un gruppo di follicoli che, in seguito all'emergenza, si sono accresciuti fino a raggiungere un diametro  $\geq 5$  mm (fase di crescita), fino a regredire ad un diametro  $\leq 3$  mm (fase di regressione) o all'ovulazione. Per il follicolo di maggiori dimensioni di ogni ondata veniva registrata la lunghezza della fase di crescita, e di regressione. Se più di un follicolo raggiungeva lo stesso diametro

massimo, quello che lo raggiungeva prima o lo manteneva per un periodo di tempo più lungo veniva classificato come follicolo dominante. Durante ogni osservazione ecografica, veniva anche registrato il numero totale di follicoli presenti sulla superficie ovarica.

## **Analisi statistica**

I dati ultrasonografici sono stati riassunti al fine di caratterizzare il pattern di sviluppo follicolare durante il periodo di studio. In primo luogo, i follicoli presenti sulla superficie ovarica sono stati classificati a seconda del loro diametro maggiore in quattro categorie: follicoli totali (mm), piccoli (3-3.4 mm), medi (3.5-4.4 mm) e grandi ( $\geq$  4.5 mm). In seguito, i dati sullo sviluppo di ogni singolo follicolo sono stati utilizzati per caratterizzare le ondate follicolari in base al (a) giorno di insorgenza dell'onda, considerato come primo giorno nel quale i follicoli venivano visualizzati a 3 mm di diametro; (b) fase di crescita (durata), definita come il tempo necessario al follicolo per raggiungere il suo massimo diametro; (c) fase di regressione (durata), definita come il tempo necessario al follicolo per passare dal diametro massimo a quello minimo; (d) fine dell'onda, cioè il giorno nel quale in follicolo dominante terminava la fase di regressione; (e) durata dell'onda, cioè il tempo necessario al follicolo dominante per crescere da 3 mm al suo massimo diametro e poi regredire.

Gli effetti del giorno e dell'onda di accrescimento follicolare sulle caratteristiche individuali del follicolo dominante e sul numero e le dimensioni del restante pool follicolare sono state studiate tramite ANOVA, così come le modificazioni nell'area del corpo luteo. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il programma Statgraphic Centurion XV (versione 15.2.06 per Windows; StatPoint Inc., Herndon, VA, USA) e una probabilità 0.05 è stata considerata come livello minimo di significatività. Tutti i risultati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M.

## Risultati

In seguito all'analisi delle ondate di accrescimento follicolare, è stato possibile riconoscere due gruppi di pecore, caratterizzate dalla presenza di 4 (n=8) e 5 (n=2) ondate di accrescimento follicolare all'interno di un ciclo estrale. Di conseguenza, i dati relativi alla dinamica follicolare e di accrescimento del corpo luteo, sono stati analizzati separatamente nei due gruppi di animali. La durata media del ciclo estrale era pari a  $17 \pm 3.2$  e  $16.3 \pm 1.4$  giorni nelle pecore con 4 e 5 ondate, rispettivamente. Il giorno di emergenza delle singole ondate e le loro caratteristiche sono riassunte nella figura 2.

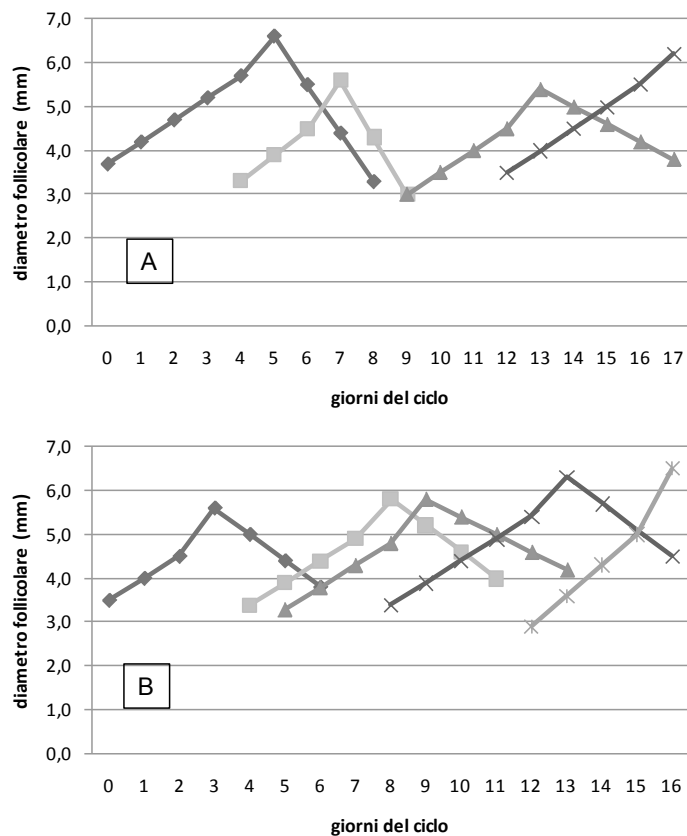


Figura 2. Dinamica di sviluppo follicolare in pecore sarde con 4 (grafico A) e 5 (grafico B) ondate di crescita follicolare

Sono state inoltre riscontrate delle differenze significative tra le caratteristiche delle ondate follicolare in pecore con 4 e 5 ondate (tabelle 2 e 3). In particolare, la 3° ondata differisce significativamente per il giorno di insorgenza, il massimo diametro ed il giorno in cui esso viene raggiunto dal follicolo dominante ( $p < 0.05$ ). Inoltre, è stata riscontrata una differenza significativa tra la durata della fase di crescita e la durata totale della 1° e 2° ondate tra pecora con 4 e 5 ondate di accrescimento. Anche il massimo diametro raggiunto dal follicolo dominante è significativamente maggiore nelle pecore con 4 ondate rispetto a quello con 5 ( $p \leq 0.001$ ).

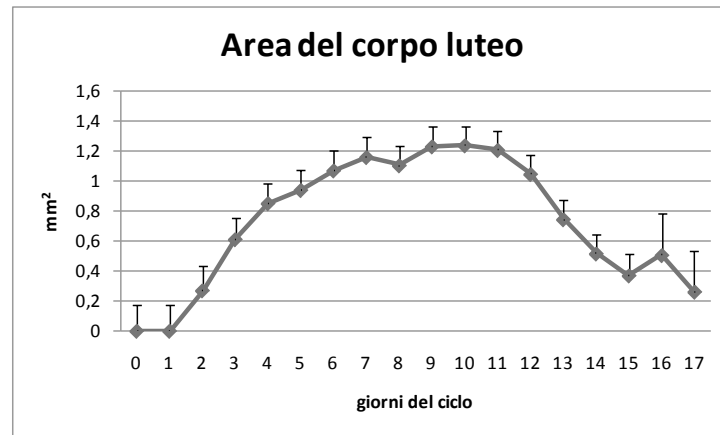


Figura 3. Curva della superficie media del Corpo Luteo in 10 pecore Sarde durante l'intero ciclo estrale.

È stato possibile valutare ecograficamente il CL già dal 2° giorno in 4 pecore e dal 3° giorno nelle restanti 6 pecore. Ovviamente i primi giorni il tessuto luteinico presentava dei margini meno netti ma comunque misurabili. Dal grafico sottostante si nota come dal secondo giorno del ciclo l'area media dei CL aumenta abbastanza velocemente sino al 7° giorno per subire una leggera diminuzione il giorno successivo, questa caratteristica sembra essere sempre presente, per poi aumentare in maniera più graduale sino a raggiungere i valori massimi nei giorni 9-10-11 dopo i quali inizia la regressione a picco sino al giorno prima dell'ovulazione in cui appare un'ulteriore lieve aumento poco prima di divenire un corpo albicante non più distinguibile ecograficamente.

Tabella 2. Differenza nelle caratteristiche principali tra le ondate di accrescimento di pecore di razza Sarda (n=8) con 4 ondate di accrescimento follicolare all'interno di un ciclo estrale monitorato nel corso della stagione riproduttiva.

| onda    | Insorgenza              |           | Durata                   |                          |                        | Massimo diametro       |                         | Tasso         |                        |
|---------|-------------------------|-----------|--------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|---------------|------------------------|
|         | giorno                  | diámetro  | crescita                 | regressione              | totale                 | mm                     | giorno                  | accrescimento | regressione            |
| 1       | 0 ± 0.9 <sup>a</sup>    | 3.7 ± 0.2 | 6.1 ± 0.4 <sup>a</sup>   | 2.6 ± 0.3 <sup>a</sup>   | 8.7 ± 0.4 <sup>a</sup> | 6.6 ± 0.2 <sup>a</sup> | 5.1 ± 0.9 <sup>a</sup>  | 0.5 ± 0.04    | 1.1 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| 2       | 4.7 ± 0.9 <sup>b</sup>  | 3.3 ± 0.2 | 3.7 ± 0.4 <sup>b</sup>   | 1.6 ± 0.3 <sup>b</sup>   | 5.3 ± 0.4 <sup>b</sup> | 5.6 ± 0.2 <sup>b</sup> | 6.7 ± 0.9 <sup>a</sup>  | 0.6 ± 0.04    | 1.3 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| 3       | 8.7 ± 0.9 <sup>c</sup>  | 3.0 ± 0.2 | 5 ± 0.4 <sup>c</sup>     | 1.9 ± 0.3 <sup>a,b</sup> | 6.9 ± 0.4 <sup>c</sup> | 5.4 ± 0.2 <sup>b</sup> | 12.7 ± 0.9 <sup>b</sup> | 0.5 ± 0.04    | 0.4 ± 0.1 <sup>b</sup> |
| 4       | 12.4 ± 0.9 <sup>d</sup> | 3.5 ± 0.2 | 5.6 ± 0.4 <sup>a,c</sup> | 0 ± 0.3 <sup>c</sup>     | 5.6 ± 0.4 <sup>b</sup> | 6.2 ± 0.2 <sup>c</sup> | 17 ± 0.9 <sup>c</sup>   | 0.5 ± 0.04    | 0 ± 0.1 <sup>c</sup>   |
| p value | 0.0000                  |           | 0.001                    | 0.0001                   | 0.0000                 | 0.0001                 | 0.0000                  |               | 0.0008                 |

Tabella 3. Differenza nelle caratteristiche principali tra le ondate di accrescimento di pecore di razza Sarda (n=2) con 5 ondate di accrescimento follicolare all'interno di un ciclo estrale monitorato nel corso della stagione riproduttiva.

| onda    | Insorgenza              |           | Durata    |             |                        | Massimo diametro |                        | Tasso         |             |
|---------|-------------------------|-----------|-----------|-------------|------------------------|------------------|------------------------|---------------|-------------|
|         | giorno                  | diametro  | crescita  | regressione | totale                 | mm               | giorno                 | accrescimento | regressione |
| 1       | 0 ± 0.7 <sup>a</sup>    | 3.5 ± 0.2 | 4.3 ± 0.6 | 2.7 ± 0.6   | 7 ± 0.5 <sup>a</sup>   | 5.6 ± 0.3        | 3 ± 0.9 <sup>a</sup>   | 0.5 ± 0.1     | 0.6 ± 0.2   |
| 2       | 4 ± 0.7 <sup>b</sup>    | 3.4 ± 0.2 | 5.3 ± 0.6 | 2.3 ± 0.6   | 7.7 ± 0.5 <sup>a</sup> | 5.8 ± 0.3        | 8.3 ± 0.9 <sup>b</sup> | 0.5 ± 0.1     | 0.6 ± 0.2   |
| 3       | 5 ± 0.7 <sup>b</sup>    | 3.4 ± 0.2 | 5.3 ± 0.6 | 2.3 ± 0.6   | 7.7 ± 0.5 <sup>a</sup> | 5.8 ± 0.3        | 9.3 ± 0.9 <sup>b</sup> | 0.5 ± 0.1     | 0.4 ± 0.2   |
| 4       | 8.3 ± 0.7 <sup>c</sup>  | 3.4 ± 0.2 | 5.7 ± 0.6 | 1.7 ± 0.6   | 7.3 ± 0.5 <sup>a</sup> | 6.3 ± 0.3        | 13 ± 0.9 <sup>c</sup>  | 0.5 ± 0.1     | 0.6 ± 0.2   |
| 5       | 11.8 ± 0.7 <sup>d</sup> | 2.9 ± 0.2 | 5.3 ± 0.6 | 0 ± 0.6     | 5.3 ± 0.5 <sup>b</sup> | 6.5 ± 0.3        | 16 ± 0.9 <sup>d</sup>  | 0.7 ± 0.1     | 0 ± 0.2     |
| p value | 0.0000                  |           |           |             | 0.0098                 | 0.0001           | 0.009                  |               |             |

Nelle pecore aventi 4 ondate di accrescimento follicolare, il numero dei follicoli di 2-3 mm di diametro varia significativamente a seconda del giorno del ciclo ( $p < 0.05$ ), tendendo ad aumentare a partire dal 10° giorno del ciclo, all'avvicinarsi della fase follicolare. Non sono state riscontrate differenze significative, invece, nel numero di follicoli  $\geq 4$  mm e totali durante il ciclo estrale (figura 4). Nelle pecore con 5 ondate follicolari, invece, non sono state riscontrate variazioni significative nel numero di follicoli di 2-3 mm,  $\geq 4$  mm e totali durante il ciclo estrale (figura 4).

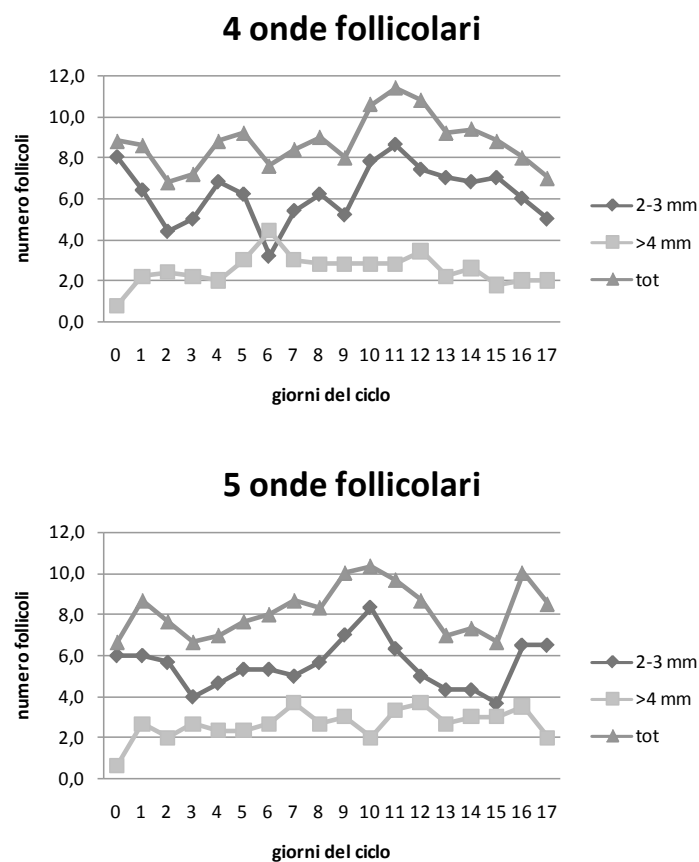


Figura 4. Popolazione dei follicoli appartenenti alle 2 classi e totale nelle pecore con 4 ondate di crescita ed in quelle con 5.

## ***Discussione***

Nella specie ovina, i follicoli antrali emergono e crescono a partire da un pool di piccoli follicoli di 2-3 mm di diametro, raggiungendo il diametro di 5 mm prima della regressione od un'eventuale ovulazione (Ghinter e coll., 1995; Souza e coll., 1998). Normalmente ci sono tre o quattro onde follicolari per ciclo estrale, ed ogni onda è preceduta da un picco nella concentrazione serica dell'ormone follicolo-stimolante (Ghinter e coll., 1995; Souza e coll., 1997). Tuttavia, i meccanismi che regolano il numero delle onde follicolari per ciascun ciclo nella pecora rimangono ancora poco chiari.

Nel presente studio è stato evidenziato che nella razza Sarda la maggioranza delle pecore presenta 4 ondate di accrescimento follicolare per ciclo estrale, mentre solo una minoranza presenta 5 ondate follicolari. La durata del ciclo estrale, non presentava differenze significative tra i due gruppi di animali. Diversi studi in letteratura hanno evidenziato che nel bovino i cicli estrali, con due onde sono più brevi ( $20.4 \pm 0.3$  giorni) rispetto a quelli delle bovine che presentano tre onde per ciclo ( $22.8 \pm 0.6$  giorni) (Ginther e coll., 1989). Il follicolo dominante dell'ultima onda, ossia quella ovulatoria, differiva significativamente tra soggetti con due o tre onde per ciclo, non solo nel giorno dell'emergenza ( $9.6 \pm 0,2$  e  $16.0 \pm 1.1$  giorni, rispettivamente), ma anche nella ampiezza dell'intervallo tra la comparsa del follicolo preovulatorio e l'ovulazione stessa ( $10.9 \pm 0.4$  e  $6.8 \pm 0.6$ , rispettivamente) e il diametro massimo raggiunto il giorno prima dell'ovulazione ( $16.5 \pm 0,4$  e  $13.9 \pm 0.4$  mm, rispettivamente). In un altro studio più recente sempre nella specie bovina (Jaiswal e coll., 2009), è stato confermato che cicli con 2 onde fossero più brevi rispetto ai cicli con tre onde ( $19.8 \pm 0.2$  vs  $22.5 \pm 0.3$  giorni, rispettivamente). Sulla base di tale studio, gli autori hanno concluso che la durata del follicolo dominante della prima onda regola il numero totale



delle onde durante tutto il ciclo estrale (Jaiswal e coll., 2009). Nella specie ovina, un recente studio non ha riscontrato differenze nella durata del ciclo estrale di soggetti con 3 e 4 ondate (Seekallu e coll., 2010), mentre in studi precedenti, cicli di lunghezza prolungata (da 22 a 24 giorni) erano associati a 5-6 ondate di accrescimento follicolare (Ginther e coll., 1995).

Nel presente studio, inoltre, sono state riscontrate differenze significative nelle caratteristiche delle ondate follicolari tra cicli con 4 e 5 onde. Nelle pecore con 5 ondate, non è stato possibile riconoscere differenze significative nel pattern di accrescimento follicolare durante il ciclo estrale. Al contrario, nelle pecore con 4 onde la durata della fase di crescita e la durata totale dell'onda tendevano a decrescere progressivamente dalla 1° alla 4° ondata di accrescimento. Questi dati sono in accordo con quanto precedentemente descritto nella specie ovina (Seekallu e coll., 2010). Inoltre, studi effettuati nella pecora (Bartlewski e coll., 1999) e nella bovina (Ginther e coll., 1989), avevano riscontrato che il follicolo dominante della prima ondata mostrava una fase di crescita più lunga rispetto ai follicoli delle ondate successive. Questo differente pattern di accrescimento potrebbe essere dovuto alla diminuzione del picco di FSH sotto la dominanza del progesterone durante la metà della fase luteinica (Bartlewski e coll., 1999; Seekallu e coll., 2010). Nella pecora, durante la prima ondata di crescita follicolare, le variazioni in diametro dei vari follicoli sono accompagnate dall'aumento delle concentrazioni sieriche degli ormoni steroidei di derivazione ovarica e di inibina A (Souza e coll., 1998). Invece risulta interessante come nelle successive ondate di crescita tali variazioni di concentrazioni sieriche non si riscontrano affatto nonostante l'accrescimento in diametro dei follicoli sia del tutto assimilabile a quello della prima ondata. Si suppone quindi che le variazioni della secrezione sia di inibina A che di estradiolo controllano il picco di FSH precedente alla prima ondata di crescita follicolare (Souza e coll., 1998). Ad ogni modo, la causa delle variazioni di FSH nelle onde 2 e 3 del ciclo estrale rimane ancora da chiarire (Seekallu e coll., 2010).

Con questo studio si è capito che mentre nelle pecore con 5 ondate il massimo diametro raggiunto dal follicolo dominante non mostrava differenze significative nel corso del ciclo, questo tendeva ad essere maggiore nella prima e nell'ultima ondata rispetto alle altre nelle pecore con 4 ondate follicolari. Questo trend di variazione del massimo diametro raggiunto dal follicolo dominante durante il ciclo estrale è simile a quanto descritto nella specie ovina (Seekallu e coll., 2010), in quella caprina (Ginther e coll., 1994) e bovina (Ginther e coll., 1989). È stato suggerito che questo potrebbe essere dovuto al fatto che il primo e l'ultimo follicolo dominante del ciclo si accrescono all'inizio ed alla fine della fase luteinica e quindi in presenza di concentrazioni inferiori di progesterone (Leyva e coll., 1998). Quindi questi follicoli sarebbero stati esposti ad una maggiore frequenza di rilascio di LH, rispetto ai follicoli che si accrescono nella 2° e 3° ondata (Henderson e Robinson 1984; Currie e coll., 1993).

Il pattern di accrescimento del corpo luteo riscontrato nel presente studio è del tutto sovrapponibile a quanto descritto in studi precedenti nella specie ovina (Seekallu e coll., 2010; Bartlewski e coll., 1999).

In conclusione, il presente studio ha evidenziato che nella pecora Sarda il ciclo estrale è caratterizzato nella maggioranza degli animali dall'emergenza di 4 ondate di accrescimento follicolare, anche se è possibile riscontrare cicli con 5 ondate di accrescimento. Il pattern di sviluppo del follicolo dominante nelle 4 ondate è sovrapponibile a quanto precedentemente descritto nella specie ovina, testimoniando l'influenza che le modificazioni nella concentrazione di progesterone hanno sullo sviluppo follicolare. Le informazioni ottenute da questo studio offriranno una utile base di partenza per la caratterizzazione delle modificazioni del quadro ovarico in relazione allo stato fisiologico, energetico ed ormonale oggetto della presente tesi di dottorato.

## ***Bibliografia***

48. Baird DT. Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol Reprod* 1978;18:359–64.
49. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables through out the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J Reprod Fertil* 1999;115:111–24.
50. Brand A and de Jong WHR. Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrous cycle in sheep *Journal of Reproduction and Fertility* 1973; 33:431-439
51. Currie WD, Medhamurthy RJ, Cook SJ, Rawlings NC. Seasonal fluctuation in diurnal rhythms of luteinizing hormone secretion in ewes during the mid-luteal phase of the oestrous cycle. *J Reprod Fertil.* 1993 Jan;97(1):71-4.
52. Dickie AM, Paterson C, Anderson JLM, Boyd JS. Determination of corpora lutea numbers in booroola — texel ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology* 1999; 51: 1209-1224.
53. Duggavathi R, Bartlewski PM, Barrett DM, Rawlings NC. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. *Theriogenology* 2003;60:495–510
54. Evans AC, Duffy P, Hynes N, Boland MP. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 2000;53:699-715.
55. Evans AC. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci.* 2003;78:289-306
56. Evans ACO, Flynn JD, Duffy P, Knight PG, Boland MP. Effects of ovarian follicle ablation on FSH, oestradiol and inhibin A concentrations and growth of other follicles in sheep. *Reproduction* 2002; 123:59–66.
57. Gibbons JR, Kot K, Thomas DL, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogenology* 1999; 52:1005–1020.
58. Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 1989; 87:223–230.
59. Ginther OJ, Kot K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology* 1994; 42:987–1001.

60. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology* 1995; 43:689–703.
61. Goldman BD. The circadian timing system and reproduction in mammals, *Steroids* 1999; 64:679-685.
62. Henderson DC and Robinson JJ. The reproductive cycle and its manipulation. In Martin WB, *Disease of Sheep* 3rd ed. Blackwell scientific, 1984.
63. Hutchinson JS, Robertson HA. The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. *Res. Vet. Sci.* 1966 ; 7:17–24.
64. Jaiswal RS, Singh J, Marshall L, Adams GP. Repeatability of 2- wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 2009;72:81–90.
65. Knopf L, Kastelic JP, Schallenberger E, Ginther OJ. Ovarian follicular dynamics in heifers: Test of two wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest Anim Endocrinol* 1989;6: 111-119.
66. Lahlou-Kassi A, Mariana JC. Ovarian follicular growth during the oestrous cycle in two breeds of ewes of different ovulation rate, the D'Man and the Timahdite. *J. Reprod. Fertil.* 1984; 72: 301–310.
67. Leyva V, Buckrell BC, Walton JS. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology* 1998;50:395–416.
68. Lopez-Sebastian A, Gonzalez de Bulnes A, Santiago Moreno J, Gomez-Brunet A, Townsend EC, Inskip EK. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Paris ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 1997; 48:279–291.
69. Martin GB. Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1984;59:1–87.
70. Noel B, Bister JL and Paquay R. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 99: 695-700
71. Noel B, Bister JL, Paquay R. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99: 695–700.
72. Noel B, Bister JL, Pierquin B, Paquay R. Effects of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology* 1994; 41: 719–727.

73. Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogenology* 1984; 22: 225-233.
74. Pierson RA and Ginther OJ. Follicular populations during the oestrous cycle in heifers III. Time of selection of the ovulatory follicle *Animal Reproduction Science* 1988; 16: 81-95.
75. Quinlan J, Mare GS. The physiological changes in the ovary of the Merino sheep in South Africa, and their practical application in breeding. *17/A. Ann. Rep. Dir. Vet. Educ. e Res.* 1931; *S. Afr. p.* 663.
76. Rajakoski E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical, and left—right variations. *Ada endocr., Copenh. Suppl.* 1960; 52: 1.
77. Ravindra JP, Rawlings NC, Evans ACO, Adams GP. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 101: 501–509.
78. Rawlings NC, Cook SJ. LH secretion around the time of the preovulatory gonadotrophin surge in the ewe. *Anim Reprod Sci* 1993;30:289–99.
79. Roux LL. Sex physiology of sheep. *Onderstepoort J. vet. Sci.* 1936; 6: 465.
80. Savio JD, Bongers H, Drost M, Lucy MC, Thatcher WW. Follicular dynamics and superovulatory response in Holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states. *Theriogenology* 1991; 35: 915-929.
81. Schrick FN, Surface RA, Pritchard JY, Dailey RA, Townsend EC, Inskoop EK. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* 1993; 49: 1133–1140.
82. Seekallu SV, Toosi BM, Duggavathi R, Barrett DM, Davies KL, Waldner C, Rawlings NC. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: comparison among estrous cycles with three or four follicular waves. *Theriogenology.* 2010; 73:670-80
83. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacological Reviews* 2003; 55: 325-395
84. Sirois J, Fortune JE. Monitoring ovarian follicular development in cattle by ultrasound imaging: A 1990 update. *Embryo Transfer News Letter* 1990; 8: 9-16.
85. Smeaton TC, Robertson HA. Studies on the growth and atresia of graafian follicles in the ovary of the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 1971; 25: 243–252.
86. Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J Reprod Fertil* 1996;108:101–6.

87. Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 1997; 56:483–488.
88. Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *J Endocrinol* 1998;156:563–72.
89. Thiéry JC, Chemineau P, Hernandez X, Migaud M, Malpaux B. Neuroendocrine interactions and seasonality, *Dom. Anim. Endocrinol* 2002; 23:87-100.
90. Turnbull KE, Braden AWH, Mattner PE. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci.* 1977; 30:229–241
91. Vinales C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology* 1999; 51:1351–1361.
92. Wheaton JE, Mullett MA, Cornelius SG. Plasma follicle stimulating hormone and luteinizing hormone patterns during the estrous cycle of ewes. *Theriogenology* 1984;21:989–99.

# Esperimento 1

*Lo stato fisiologico e la funzionalità follicolare: effetti dell'invecchiamento riproduttivo*

# **Esperimento 1: Lo stato fisiologico e la funzionalità follicolare: effetti dell'invecchiamento riproduttivo**

## ***Le basi fisiologiche dell'invecchiamento riproduttivo***

Secondo la teoria basata sul ruolo centrale dell'ovaio nel processo dell'invecchiamento riproduttivo, il declino della fertilità dipendente dall'età è fondamentalmente legato alla progressiva diminuzione sia nella qualità che nella quantità dei follicoli ovarici (Te Velde and Pearson, 2002). Durante la vita fetale nelle ovaie si differenzia l'intero stock di follicoli primordiali che garantiranno dell'individuo la fertilità per l'intera durata della vita riproduttiva. Da dopo la nascita in poi, il numero dei follicoli è destinato a declinare in maniera esponenziale, sia a causa dell'atresia che del continuo reclutamento alla crescita. Nel momento in cui la deplezione dei follicoli raggiunge un valore soglia specie-specifico, i cicli diventano prima irregolari e poi si interrompono (Finch e Holmes, 2010). Nella donna, è stato descritto che quando il numero di follicoli ovarici scende al di sotto di alcune migliaia, solitamente intorno ai 45-46 anni, i cicli mestruali diventano irregolari, e quando inizia la menopausa (età media 51 anni) la riserva ovarica è ridotta a poche centinaia di follicoli, un numero insufficiente per sostenere i processi ormonali ciclici necessari per i cicli riproduttivi (Faddy e coll., 1992).

Quindi, la base di questa teoria prevede che dopo un periodo di massima fertilità, nella donna compresa tra i 18 e i 30 anni circa, la qualità dell'oocita declina in parallelo con il progressivo impoverimento della riserva ovarica. Sebbene questa teoria sia abbastanza accreditata nel mondo scientifico, manca in realtà di prove certe e si basa soprattutto su esperimenti portati avanti nella specie murina e che hanno dimostrato che la riduzione del 50% del tessuto ovarico portava ad un



anticipo nel declino della fertilità, nell'irregolarità dei cicli e nei difetti cromosomici degli embrioni (Eichenlaub-Ritter e coll., 1988). Alterazioni simili sono state rilevate in pecore in cui il pool dei follicoli era stato drasticamente ridotto dopo autotrapianto di tessuto ovarico sottoposto a congelamento (Baird e coll., 1999; Campbell e coll., 2000). Sebbene le conseguenze di una ovariectomia unilaterale non siano state studiate sufficientemente nella specie umana, i risultati appaiono generalmente simili a quanto descritto nel topo: porterebbe, infatti, ad un anticipo nell'instaurarsi della menopausa (Hardy e Kuh, 1999), ad un aumento nei livelli di FSH (Khalifa e coll., 1992) e ad un aumento dell'incidenza della trisomia 21 (Freeman e coll., 2000).

Secondo la teoria neuro-endocrina, invece, l'invecchiamento riproduttivo sarebbe causato da una alterazione nei meccanismi di regolazione della secrezione di GnRH ipotalamico dovuto alla progressiva mancanza del controllo neuro-chimico da parte di altri centri encefalici, e portando in ultima analisi a modificazioni nel normale pattern di rilascio del GnRH (Wise e coll., 1996). Il primo segnale di questa transizione sarebbe dovuto all'aumento dei livelli circolanti di FSH, che a loro volta accelererebbero la deplezione della riserva follicolare ovarica. In effetti, il ruolo dell'ipotalamo non può comunque essere completamente escluso dal processo di invecchiamento ovarico. La sola teoria basata sul ruolo centrale dell'ovaio, non spiega altri sintomi descritti nella specie umana con l'approssimarsi della menopausa ed evidenti in presenza di cicli regolari e livelli ormonali non alterati, quali le vampate di calore (de Velde, 2000). È stato dimostrato che questi sintomi sono associati ad un aumento della pulsatilità dell'LH, indice di un aumento nel rilascio di GnRH (Casper e coll., 1979). Dato che il centro tonico ipotalamico per il rilascio del GnRH ed il centro della termoregolazione sono connessi sia funzionalmente che fisicamente, uno stimolo comune relazionato al processo di invecchiamento riproduttivo dell'ipotalamo o dei centri encefalici superiori potrebbe essere responsabile della loro aumentata attività. La dimostrazione che modificazioni nella pulsatilità dell'LH inizia a verificarsi in donne con cicli regolari dall'età di 39

anni in poi, supporterebbe il ruolo dell'ipotalamo nel processo dell'invecchiamento riproduttivo (Matt e coll., 1998). D'altra parte, molti dei segni attribuiti all'ipotalamo avvengono molto dopo l'inizio del declino della fertilità e per questo motivo si ritiene che l'ovaio debba comunque giocare un ruolo centrale in questo processo.

Studi effettuati nella specie umana hanno più volte messo in evidenza come il primo segno dell'invecchiamento riproduttivo sia testimoniato da un aumento nei livelli circolanti di FSH (de Koning e coll., 2008). Un aumento nei livelli circolanti di FSH è stato rilevato anche in bovine di 13-14 anni (Malhi e coll., 2005), in cavalle di 15-19 anni (Carnevale) ed in pecore di 10-12 anni (Gonzalez-Bulnes e coll., 2004). Si ritiene che l'aumento nei livelli di FSH sia causato dal feedback delle proteine modulanti la secrezione di FSH di origine ovarica, che includono l'inibina A, l'inibina B, l'activina e la follistatina. I piccoli follicoli antrali secernono in maniera predominante l'inibina B all'inizio della fase follicolare, mentre l'inibina A è prodotta dal follicolo dominante e dal corpo luteo (Groome e coll., 1996; Illingworth e coll., 1996). È stato dimostrato che una minore secrezione di inibina B è associata ad un aumento dell'FSH nella fase follicolare. Di conseguenza, molti studi hanno concluso che una diminuzione dei livelli di inibina B possa riflettere una compromessa funzionalità follicolare (Reame e coll., 1998; Welt e coll., 1999; Scheffer 2000). Anche i livelli di LH aumentano con l'età, ma in un secondo momento rispetto all'aumento dei livelli di FSH (Ahmed Ebbiary e coll., 1994). I dati disponibili sui livelli di estradiolo e progesterone non mostrano modificazioni apprezzabili con l'avanzare dell'età, almeno fino a quando i cicli riproduttivi mantengono una certa regolarità (Klein e coll., 1996b). La diminuzione nei livelli circolanti di dell'ormone della crescita e dell'IGF-1 sembrano invece relazionati al processo di invecchiamento dell'intero organismo, più che a quello dell'apparato riproduttore (Weltman e coll., 1994). I livelli ormonali, d'altra parte, non sono ritenuti un marker attendibile del processo di invecchiamento ovarico a causa dell'alta variabilità individuale nei valori basali, che rende difficile

trovare un valore cut-off che segnali l'inizio del processo di declino della fertilità. Un marker decisamente più affidabile sarebbe rappresentato, invece, dalla conta dei follicoli antrali presenti sulla superficie ovarica, che insieme all'età, avrebbe una correlazione altamente positiva (coefficiente di correlazione = 0.7) con la fertilità (Scheffer e coll., 1999).

In generale, è comunque importante considerare che sia le alterazioni ormonali che quelle ultrasonografiche debbono essere considerate come indici di funzionalità delle cellule della granulosa costituenti il follicolo, mentre la qualità dell'ocita al suo interno determina in un'ultima analisi la fertilità dell'individuo. Considerato che il declino della funzionalità delle cellule germinali si manifesta molto prima di quelle somatiche, le modificazioni nella qualità dell'ocita e delle cellule della granulosa sembrerebbero essere causate da meccanismi differenti. D'altra parte, le complesse interazioni esistenti tra oocita e cellule della granulosa non permettono di considerare i due processi come completamente separati. L'aumento nella probabilità di non-disgiunzione meiotica dei cromosomi potrebbe essere dovuto a un declino nella funzionalità delle cellule della granulosa (te Velde e Pearson, 2002).

### ***Scopo del lavoro***

Durante la vita fetale, i follicoli ovarici vanno incontro ad una intensa attività mitotica prima di arrestarsi allo stadio di follicoli primordiali per un periodo di tempo variabile da follicolo a follicolo. In seguito alla nascita, il numero di follicoli diminuirà in maniera esponenziale, sia a causa del processo di apoptosi che interesserà il pool di follicoli primordiali, che a causa del loro continuo reclutamento alla crescita. Si ritiene quindi che gli individui di sesso femminile nascano con un numero finito, non rinnovabile di follicoli primordiali, che rappresenta la riserva ovarica. La senescenza riproduttiva sarebbe quindi legata al graduale decremento nella riserva ovarica, che

rappresenta sia la quantità che la qualità degli oociti presenti all'interno dei follicoli nella corticale ovarica (te Velde e coll., 2002).

Il primo segno dell'invecchiamento riproduttivo è dato dalle modificazioni nei livelli circolanti di ormoni ipofisari ed ovarici e dal declino nella qualità dell'oocita, che è stato individuato come il fattore principale in grado di influenzare negativamente le performance riproduttive nella donna (Borini e coll., 1995), nel topo (Perez e Tilly, 1997) e nella cavalla (Carnevale e coll., 1995).

Nella donna, le modificazioni endocrine iniziali legate all'invecchiamento riproduttivo consistono in un incremento selettivo nelle concentrazioni sieriche di FSH, non accompagnato da modificazioni concomitanti nei livelli di LH (Freeman e coll., 2005). Queste modificazioni ormonali sono del tutto paragonabili a quelle descritte nelle pecore (de Souza e coll., 1998), nelle cavalle (Carnevale e coll., 2008) e nelle bovine (Malhi e coll., 2008), e sembrano dovute ad una simile eziologia. Rifletterebbero, infatti, una alterata secrezione degli ormoni ovarici preposti alla modulazione della secrezione di FSH, come l'estradiolo, l'inibina, l'activina e la follistatina (Klein e coll., 2000). L'incremento selettivo nelle concentrazioni di FSH può stimolare una maggiore proporzione di follicoli primordiali ad iniziare la fase di crescita e causare di conseguenza un'accelerata deplezione del pool di riserva dei follicoli primordiali (Alvigi e coll., 2009).

Nelle pecore vecchie elevati livelli di FSH sono associati ad una riduzione nella secrezione di inibina A, ma non a modificazioni nei livelli di estradiolo e nel tasso ovulatorio (de Souza e coll., 1998). È stata quindi suggerita l'esistenza di una relazione tra la secrezione di inibina A e la popolazione totale di follicoli ovarici, la cui riduzione potrebbe risultare in un aumento nelle concentrazioni di FSH in maniera paragonabile a quanto osservato nella donna in pre-menopausa (de Souza e coll., 1998). Per questo motivo, la pecora è considerata come un utile modello animale nello studio

delle modificazioni ovariche ed ormonali associate all'invecchiamento riproduttivo ed alla menopausa nella donna (de Souza e coll., 1998).

Il presente studio ha quindi lo scopo di caratterizzare inizialmente la dinamica follicolare durante il ciclo estrale in pecore giovani e vecchie allo scopo di identificare la comparsa di eventuali modificazioni rilevabili mediante markers ecografici. In secondo luogo, si sono volute determinare eventuali differenze nella crescita follicolare in risposta all'FSH, nell'ambiente ovarico e nella qualità dell'oocita in pecore adulte e vecchie. La dinamica follicolare durante e dopo la somministrazione di FSH è stata monitorata mediante scanning ultrasonografico delle ovaie, mentre la qualità dell'oocita è stata determinata mediante valutazione della competenza allo sviluppo in vitro. Inoltre, i possibili effetti dell'invecchiamento sulla qualità degli embrioni prodotti in vitro sono stati studiati mediante la valutazione della criotolleranza.

# ***1. Caratterizzazione della dinamica follicolare durante il ciclo estrale in pecore giovani e vecchie***

## ***Materiali e Metodi***

### **Animali e disegno sperimentale**

Per questo studio sono state utilizzate 14 pecore di razza Sarda distribuite in due gruppi sperimentali a seconda dell'età: 6 pecore avevano 4-5 anni d'età (gruppo ADULT) e 9 pecore avevano 12-14 anni d'età (gruppo AGED). L'età delle pecore è stata individuata secondo quanto riportato in studi precedenti sulla senescenza riproduttiva in questa specie, secondo quanto di seguito riportato:

| Autore                        | specie                 | Età invecchiamento | Markers   |
|-------------------------------|------------------------|--------------------|---|
| Mysterud e coll., 2002        | <i>Ovis aries</i>      | 5-6 anni           | Numero di nati e peso alla nascita                        |
| Berubé e coll., 1999          | <i>Ovis canadensis</i> | 11 anni            | Numero di nati  |
| Forcada e coll., 2007         | <i>Ovis aries</i>      | 10 anni            | Risposta ipofisaria al GnRH basata sulla secrezione di LH |
| Gonzalez-Bulnes e coll., 2004 | <i>Ovis aries</i>      | 8-14 anni          | Concentrazioni ematiche di FSH                            |

Il periodo di osservazione, condotto durante la stagione riproduttiva (settembre) decritta per questa razza a questa latitudine, comprendeva la fase follicolare e la fase luteinica di un ciclo estrale. Il ciclo riproduttivo e l'ovulazione sono stati sincronizzati in tutti gli animali mediante la somministrazione a 10 giorni di distanza di due dosi di 125 µg di un analogo delle prostaglandine (cloprostenol, Estrumate<sup>TM</sup>, Essex Animal Health, Friesoythe, Germany).

Lo sviluppo dei follicoli ovarici e la loro funzionalità sono stati monitorati ogni giorno per i 3 giorni successivi alla seconda somministrazione di cloprostenolo rispettivamente mediante esame ultrasonografico transrettale e misurazione dei livelli serici di estradiolo ed inibina A. Al giorno

della detezione dell'estro attraverso l'utilizzo di arieti vasectomizzati, è stata determinata la pulsatilità dell'LH mediante prelievi ripetuti ad intervalli di 15' durante un periodo di 4 ore. In seguito, il tasso di accrescimento dei corpi lutei (CL) e la loro funzionalità sono stati determinati a giorni alterni durante le due settimane successive, rispettivamente mediante ultrasonografia e determinazione dei livelli serici di progesterone. Nello stesso intervallo temporale sono stati determinati i livelli serici di LH, FSH ed inibina A.

### **Valutazione morfometrica dei follicoli e dinamica di accrescimento dei corpi lutei**

La presenza e la misurazione del numero e delle dimensioni dei corpi lutei e del numero e del diametro dei follicoli maggiori di 2 mm venivano determinati in ogni soggetto attraverso ecografia transrettale. Le ecografie avvenivano attraverso l'utilizzo di una sonda lineare elettronica da 7,5 MHz per uso transrettale (UST-5820-5, Aloka) collegata ad un ecografo Aloka SSD-500. In breve, le osservazioni ecografiche venivano condotte con gli animali posizionati in decubito dorsale su un tavolo operatorio basculante. Allo scopo di eliminare eventuali bolle d'aria o zone di non aderenza che causerebbero dannose distorsioni dell'immagine ultrasonica e limiterebbero la trasparenza acustica della sonda, veniva introdotto direttamente nel retto del gel idrosolubile per incrementare la trasmissione di ultrasuoni. La sonda veniva, quindi, posizionata nel retto con il trasduttore orientato perpendicolarmente alla parete addominale. Una volta sorpassata la vescica e localizzate le corna uterine, la sonda veniva ruotata lateralmente di 90° in senso orario e di 180° in senso antiorario in modo da poter localizzare entrambe le ovaie e le loro strutture.

## **Determinazione della secrezione ormonale follicolare, luteinica e ipofisaria**

La funzionalità follicolare, luteinica ed ipofisaria è stata valutata attraverso la determinazione delle concentrazioni plasmatiche di estradiolo, inibina A, di progesterone, LH ed FSH. I campioni di sangue venivano prelevati in concomitanza dell'esame ecografico attraverso provette vacutainer eparinizzate (Vacutainer® Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, France). Subito dopo il prelievo, i campioni ematici venivano centrifugati a 1500 g per 10 minuti, il plasma veniva rimosso e stoccato a -20°C fino al momento delle analisi.

L'estradiolo è stato determinato utilizzando un kit per radio-immuno-analisi (RIA; Serono Diagnostics Ltd, Woking, Surrey, UK), validato per l'utilizzo nel plasma ovino (Beard e coll., 1994) e modificato per potenziarne la sensibilità (Mann e coll. 1995). La sensibilità dell'analisi era di 0.5 pg/ml, mentre i coefficienti di variazione intra- ed interanalisi erano rispettivamente 8.3 e 9.8%. Le concentrazioni plasmatiche di progesterone, FSH e LH sono state determinate in duplicato utilizzando la radio-immuno-analisi con doppio anticorpo (McNeilly and Fraser, 1987, Campbell e coll., 1990). La sensibilità dell'analisi era di 0.2 ng/ml per l'LH, 0.3 ng/ml per l'FSH e di 380 pmol/L per il progesterone, mentre i coefficienti di variazione intra- ed interanalisi erano inferiori al 14% in tutti i casi. L'inibina A è stata determinata immuno-analisi enzimatica (Knight e coll. 1998); la sensibilità dell'analisi era di 15 pg/ml, mentre i coefficienti di variazione intra- ed interanalisi erano rispettivamente 7.6 e 11.9%.

### **Analisi statistiche**

I dati sono stati normalizzati rispetto a due momenti di rilievo fisiologico. Il primo corrispondeva alla seconda somministrazione di prostaglandine, ed il secondo al giorno dell'ovulazione (considerato come giorno 1 del protocollo sperimentale). In un primo luogo, i dati ecografici della



fase follicolare sono stati sommati per caratterizzare i patterns di sviluppo dei follicoli ovarici. Tutti i follicoli presenti sulla superficie ovarica sono stati classificati in base al loro diametro maggiore e classificati come grandi ( $\geq 5.5$  mm), medi (3.5–5.4 mm), piccoli (2–3.4 mm) e totali ( $\geq 2$  mm). In secondo luogo, i dati ecografici della fase luteinica sono stati sommati per caratterizzare il pattern di accrescimento del corpo luteo. Infine, le caratteristiche del pattern di secrezione dell’LH durante i prelievi seriali sono state determinate tramite una formulazione bio-matematica della secrezione basale e pulsatile di LH attraverso equazione stocastica non-lineare differenziale (SDE). I livelli basali di LH sono stati considerati come la media di tutti i valori, ad eccezione di quelli corrispondenti ad ogni pulse. I pulse di LH sono stati definiti come l’intervallo tra il primo valore maggiore del 10% rispetto a quello precedente e l’ultimo maggiore del 10% rispetto al successivo.

L’effetto dell’età sul numero e la dimensione dei follicoli, la dimensione del corpo luteo e la concentrazione ormonale è stato analizzato attraverso spil-plot ANOVA, seguita dal Kruskal–Wallis test, quando il Levene’s test evidenziava variabili non omogenee. Il Duncan multiple range tests è stato utilizzato per testare l’interazione tra i fattori. Il test di Pearson è stato applicato per studiare la relazione tra il numero di follicoli di varie categorie, l’area del CL, i valori ormonali ed i giorni del ciclo. L’effetto dell’età sulla secrezione pulsatile di LH è stato valutato attraverso ANOVA unidirezionale. Tutti i risultati sono espressi come  $media \pm SEM$  e  $p < 0.05$  è stato considerato come il livello minimo di significatività.

## ***Risultati***

L’esame ultrasonografico effettuato durante la fase follicolare indotta ha rilevato che, in seguito alla somministrazione della seconda dose di  $PGF_{2\alpha}$ , le pecore ADULT ed AGED hanno presentato il



| Tabella 2. Popolazione follicolare durante la fase follicolare in pecore Sarde giovani e vecchie |                      |         |
|--|----------------------|---------|
|  | giovani              | vecchie |
| Follicoli 2-3 mm al giorno:  |                      |         |
| trattamento  | 7.0±0.6 <sup>a</sup> | 6.8±0.7 |
| giorno -1  | 5.4±0.9              | 6.6±0.7 |
| giorno 0 (calore)  | 5.3±0.6 <sup>b</sup> | 5.3±0.9 |
| Follicoli 4-5 mm al giorno:  |                      |         |
| trattamento  | 2.6±0.2              | 2.1±0.4 |
| giorno -1  | 2.2±0.5              | 1.9±0.4 |
| giorno 0 (calore)  | 2.2±1.0              | 2.3±0.6 |
| Follicoli >6 mm al giorno:   |                      |         |
| trattamento  | 1.5±0.5              | 1.4±0.2 |
| giorno -1  | 1.6±0.4              | 1.7±0.3 |
| giorno 0 (calore)  | 2.0±0.3              | 1.3±0.2 |
| Follicoli totali al giorno:  |                      |         |
| trattamento  | 9.7±1.0              | 9.8±0.6 |
| giorno -1  | 9.2±0.7              | 9.6±0.7 |
| giorno 0 (calore)  | 9.2±1.0              | 8.2±1.0 |

a≠b: p<0.05

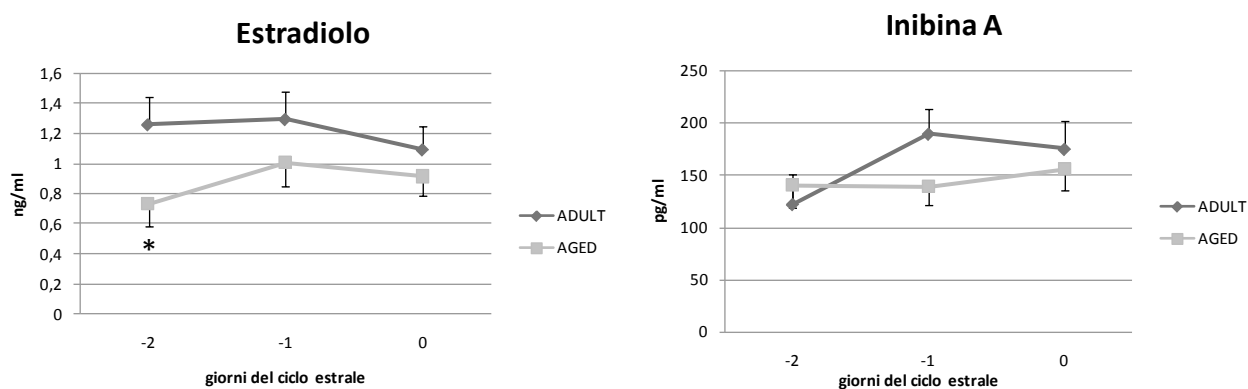


Figura 1. Concentrazioni plasmatiche di estradiolo ed inibina A in pecore Sarde giovani e vecchie durante i tre giorni successivi alla seconda somministrazione di PGF2 $\alpha$  (giorno 0 = calore).

\* Indica una differenza significativa tra i due gruppi sperimentali: p<0.05 (ANOVA unidirezionale).

D'altra parte, non sono state riscontrate differenze tra pecore giovani e vecchie nella pulsatilità dell'LH determinata il giorno del calore (fig. 2).

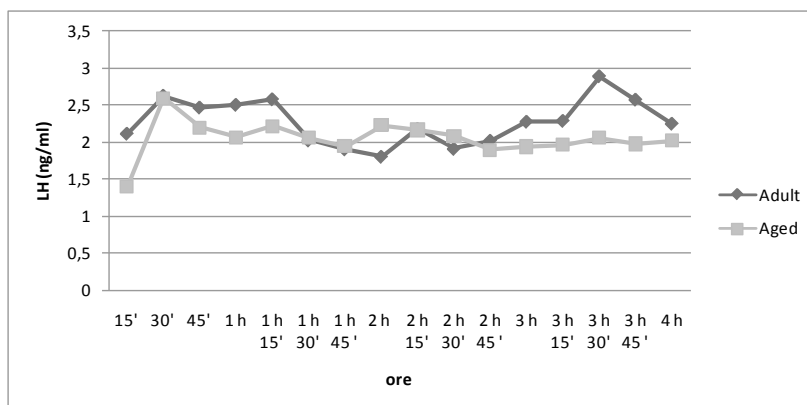


Figura 2. Pulsatilità dell'LH determinata nel corso 4 ore il giorno del calore in pecore Sarde giovani (ADULT) e vecchie (AGED).

I dati relative alle caratteristiche della fase luteinica in pecore Sarde giovani e vecchie sono illustrati nella tabella 3. Nelle pecore AGED in numero di follicoli di 2-3 mm di diametro subisce delle variazioni significative a seconda del giorno del ciclo, raggiungendo il valore massimo al giorno 13 ( $6.9 \pm 0.9$ ), in cui risulta significativamente maggiore rispetto al numero di follicoli della stessa classe nelle pecore ADULT ( $4.5 \pm 0.9$ ;  $p < 0.05$ ). In generale, si può affermare che nelle pecore AGED non si evince alcun effetto di dominanza da parte dei follicoli in accrescimento, dato che il numero dei follicoli di 2-3 mm di diametro aumenta significativamente all'avvicinarsi della successiva fase follicolare, e raggiunge il numero massimo il giorno 15 del ciclo, in cui si registra anche il più alto numero di follicoli  $\geq 6$  mm di diametro. Nelle pecore ADULT, invece, il numero di follicoli di 2-3 mm di diametro si mantiene costante durante tutta la fase luteinica. Inoltre, con l'avanzare dell'età il diametro massimo raggiunto dai follicoli durante la fase luteinica tenderebbe a diminuire, come testimoniato dal minor numero di follicoli  $\geq 6$  mm di diametro nei giorni 7 e 13 del ciclo, che nella pecora Sarda corrispondono alla fine della fase di crescita del follicolo

dominante secondo quanto illustrato nel primo capitolo di questa tesi. Il numero di follicoli di 4-5 mm di diametro ed il numero di follicoli totali non differiscono significativamente tra i due gruppi sperimentali. In entrambi i casi, in particolare, il numero di follicoli totali tende ad aumentare man mano che ci si avvicina alla successiva fase follicolare e la concentrazioni plasmatiche di progesterone diminuiscono.

Tabella 3. Popolazione follicolare durante la fase luteinica in pecore Sarde giovani e vecchie

| Giorno | 2-3 mm                 |                      | 4-5 mm  |         | ≥ 6 mm               |                      | Follicoli totali       |                        |
|--------|------------------------|----------------------|---------|---------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
|        | Aged                   | Adult                | Aged    | Adult   | Aged                 | Adult                | Aged                   | Adult                  |
| 5      | 3.7±0.9 <sup>a</sup>   | 4.7±0.9              | 1.3±0.5 | 1.5±0.6 | 0.6±0.2              | 0.5±0.3              | 5.6±1 <sup>a</sup>     | 6.7±1 <sup>a</sup>     |
| 7      | 4.0±0.9 <sup>a</sup>   | 5.2±0.9              | 2.2±0.5 | 1.8±0.6 | 0.1±0.2 <sup>A</sup> | 1.0±0.3 <sup>B</sup> | 6.3±1 <sup>a,b</sup>   | 8.0±1 <sup>a,b</sup>   |
| 9      | 5.0±0.9 <sup>a,b</sup> | 5.7±0.9              | 1.8±0.5 | 2.3±0.6 | 0.7±0.2              | 0.5±0.3              | 7.4±1 <sup>a,b,c</sup> | 8.5±1 <sup>a,b,c</sup> |
| 11     | 4.8±0.9 <sup>a,b</sup> | 4.5±0.9              | 2.3±0.5 | 2.0±0.6 | 0.3±0.2              | 0.5±0.3              | 7.4±1 <sup>a,b,c</sup> | 7.0±1 <sup>a,b</sup>   |
| 13     | 6.9±0.9 <sup>A,b</sup> | 4.5±0.9 <sup>B</sup> | 1.8±0.5 | 2.0±0.6 | 0.4±0.2 <sup>A</sup> | 1.5±0.3 <sup>B</sup> | 9.1±1 <sup>b,c</sup>   | 8.0±1 <sup>a,b</sup>   |
| 15     | 7.1±0.9 <sup>b</sup>   | 5.8±0.9              | 2.4±0.5 | 2.8±0.6 | 0.8±0.2              | 0.8±0.3              | 10.3±1 <sup>c</sup>    | 9.5±1 <sup>b,c</sup>   |

I dati sono espressi come media±SE.

<sup>a,b,c</sup> All'interno delle stessa colonna indicano una differenza significativa: p<0.05 (ANOVA)

<sup>A,B</sup> All'interno delle stessa riga indicano una differenza significativa: p<0.05 (ANOVA)

Tra i due gruppi sperimentali non è stata riscontrata alcuna differenza tra il tasso di accrescimento e regressione del CL e nessuna interazione tra i giorni del ciclo estrale ed il gruppo sperimentale (tabella 4). All'interno dello stesso gruppo, l'area del CL varia nel corso del ciclo estrale, raggiungendo i valori massimi il giorno 11 nelle pecore giovani e il giorno 9 in quelle vecchie.

Tabella 4. Caratteristiche della fase luteinica in pecore Sarde giovani e vecchie.

|   | giovani                   | vecchie                   |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Durata del ciclo (giorni)                               | 17±0.3                    | 17.1±0.3                  |
| Tassa di accrescimento del CL (mm <sup>2</sup> /giorno) | 20.4±3.2                  | 16±2.3                    |
| Area del CL (mm <sup>2</sup> )                          |                           |                           |
| giorno 5  | 54.8±9.5 <sup>a</sup>     | 48.5±7.7 <sup>a</sup>     |
| giorno 7  | 96.5±14.2 <sup>a,b</sup>  | 88.8±11.6 <sup>a,b</sup>  |
| giorno 9  | 134.7±15 <sup>a,b</sup>   | 121.7±12.3 <sup>b,c</sup> |
| giorno 11   | 156.7±16.4 <sup>b,c</sup> | 120±13.4 <sup>b,c</sup>   |
| giorno 13   | 124.5±17.6 <sup>b,c</sup> | 98.7±14.3 <sup>c</sup>    |
| giorno 15   | 95.4±15.2 <sup>c</sup>    | 61.4±11.4 <sup>c</sup>    |

I dati sono espressi come media±SD.

\* Indica una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi sperimentali:  $p=0.0000$  (ANOVA unidirezionale).

<sup>a,b,c</sup> Indica una differenza statisticamente significativa all'interno dello stesso gruppo tra i diversi giorni del ciclo: giovani  $p<0.05$ ; vecchie:  $p<0.0001$  (ANOVA unidirezionale).

La funzionalità ipofisaria durante la fase luteinica presenta differenze significative tra i due gruppi (fig. 3). Mentre nelle pecore giovani i livelli di LH e di FSH si mantengono relativamente costanti tra il giorno 5 e 15 del ciclo, nelle pecore vecchie i livelli di FSH variano in relazione al giorno del ciclo, tendendo a diminuire all'avvicinarsi dell'ovulazione successiva. Inoltre, all'inizio della fase luteinica (giorno 5 del ciclo) i livelli circolanti di FSH sono significativamente maggiori nelle pecore vecchie rispetto a quelle giovani ( $p<0.05$ ). La funzionalità follicolare, valutata attraverso i livelli plasmatici di inibina A, non presenta differenze tra i due gruppi sperimentali. Allo stesso modo la funzionalità luteinica non varia tra i due gruppi sperimentali, ma solo in relazione al giorno del ciclo ( $p<0.05$ ), presentando in entrambi i casi il plateau al giorno 11 del ciclo.

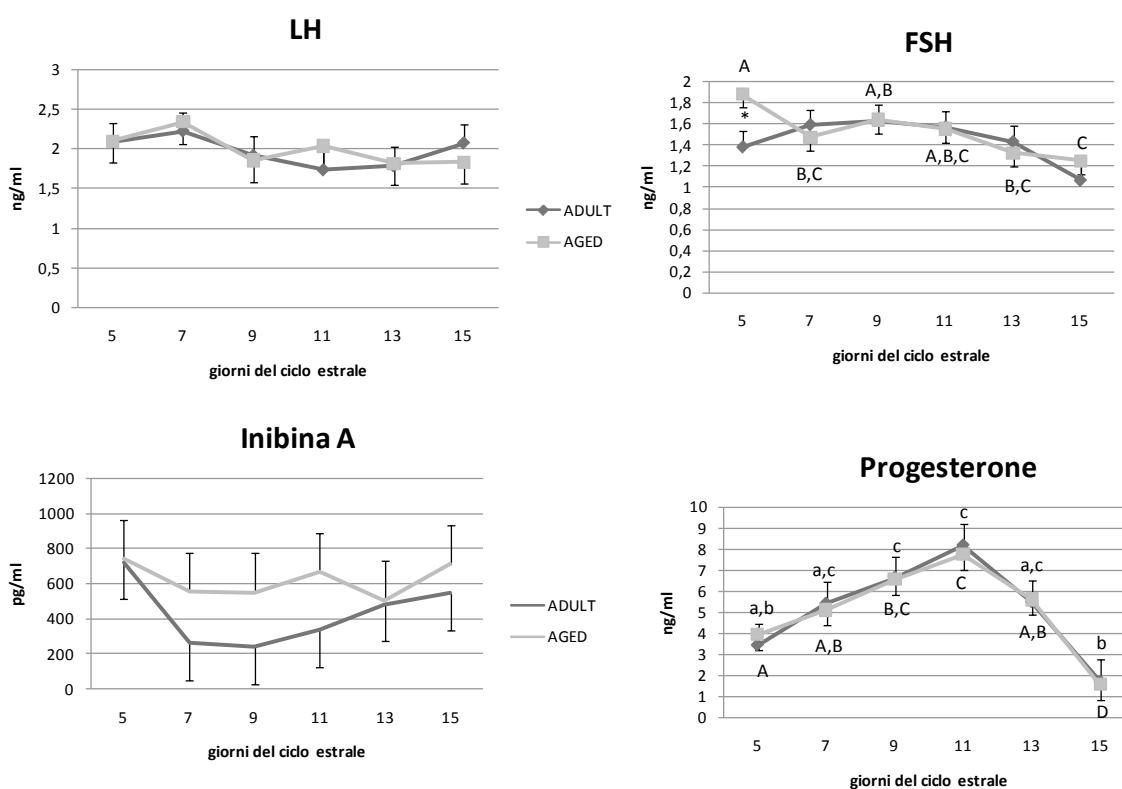


Figura 3. Livelli plasmatici di LH, FSH, inibina A e progesterone durante la fase luteinica del ciclo estrale in pecore Sarde giovani (ADULT) e vecchie (AGED).

\* Indica una differenza significativa tra i due gruppi sperimentali:  $p < 0.05$  (ANOVA unidirezionale).  
Le lettere indicano una differenza significativa all'interno dello stesso gruppo (minuscole: ADULT; maiuscole: AGED):  $p < 0.05$  (ANOVA unidirezionale).

## ***2. Risposta alla somministrazione di FSH e qualità dell'ocita in pecore giovani e vecchie***

### ***Materiali e Metodi***

Per questo studio sono state utilizzate 22 pecore di razza Sarda distribuite in due gruppi sperimentali a seconda dell'età: 12 pecore avevano 4-5 anni d'età (gruppo ADULT) e 10 pecore avevano 12-14 anni d'età (gruppo AGED). Il periodo di osservazione è stato condotto tra marzo e maggio, corrispondente all'anaestro stagionale (gennaio - luglio) descritto per questa razza a questa latitudine.

Il ciclo estrale è stato indotto, in tutti gli animali, attraverso l'inserimento di una spugna intravaginale contenente 45 mg di fluorgestone acetato (Chronogest<sup>®</sup>, Intervet International, Boxmeer, The Netherlands) lasciata in situ per 12 giorni. Al momento della rimozione della spugna (giorno 0 del periodo sperimentale), l'ovulazione è stata indotta con la somministrazione di 300 UI di eCG (Folligon<sup>®</sup>, Intervet International, Boxmeer, The Netherlands).

Al giorno 3, è stato eseguito l'esame ultrasonografico delle ovaie, al fine di accertare lo sviluppo di un corpo luteo e allo stesso tempo sono stati prelevati i campioni ematici per la determinazione dei livelli plasmatici di LH, estradiolo ed inibina A. Dal giorno 6 al giorno 8, è stato stimolato lo sviluppo follicolare attraverso la somministrazione di 175 UI di FSH (Folltropin<sup>™</sup>, Bioniche Animal Health, Bio 98, Milano, Italy) suddivise in 6 dosi costanti ogni 12 ore. Dal giorno 6 al giorno 9, è stato valutato l'accrescimento follicolare in risposta all'FSH mediante esame ultrasonografico delle ovaie e sono stati prelevati campioni ematici per la determinazione del profilo ormonale. Il giorno 9, 12 ore dopo l'ultima somministrazione di FSH, sono state recuperate le ovaie mediante

ovariectomia e processate per il recupero degli oociti e la produzione embrionale in vitro. In seguito, la competenza allo sviluppo degli oociti così ottenuti è stata valutata in termini di produzione embrionale totale e di criotolleranza delle blastocisti dopo vitrificazione e ripristino della temperatura.

### **Valutazione morfometrica dei follicoli**

Come precedentemente descritto

### **Determinazione della secrezione ormonale follicolare e ipofisaria**

Come precedentemente descritto

### **Produzione embrionale in vitro**

Le condizioni colturali per la maturazione in vitro degli oociti erano quelle impiegate nella gran parte dei laboratori che si occupano di biotecnologie riproduttive in vitro. Il medium di coltura era costituito dal TCM 199 contenente il 10% di SPE, antibiotici, gonadotropine ipofisarie alla dose di 0.1 UI/ml (LH ed FSH) (Pergonal, Serono), cisteamina 100 $\mu$ M ed estradiolo. Il sistema di maturazione era costituito da 0,5 ml di medium in una piastra four wells Nunc per colture cellulari ricoperto da paraffina liquida in cui erano coltivati per 24 ore i complessi cumulo-oocita a 39 °C in ambiente di massima umidità, con il 5% di CO<sub>2</sub> in aria atmosferica.

La fertilizzazione avveniva mediante l'utilizzo di seme crioconservato di ariete. Le paillettes in azoto liquido venivano scongelate mediante immersione in bagno d'acqua a 39°C per 10" e il loro contenuto versato in una provetta (Falcon) contenente 10 ml di Sintethic Oviductal Fluid (SOF) supplementato con il 2% di siero di pecora in estro. Questo medium è stato preparato nel nostro laboratorio, utilizzando acqua deionizzata prodotta da un sistema MillyQ (Millipore) portando la soluzione finale ad una osmolarità di 285 mOsm/Kg e ad un pH di 7,3. La provetta contenente gli



spermatozoi veniva sottoposta a centrifugazione (800 g per 1'). Il pellet veniva quindi risospeso nello stesso medium ad una concentrazione di  $10^6$  spermatozoi/ml.

Per la fertilizzazione, 400  $\mu$ l di medium contenente gli spermatozoi venivano posti in un pozzetto di una piastra Nunc e il sistema veniva ricoperto con olio minerale per evitare l'evaporazione e di conseguenza la variazione dell'osmolarità. Gli oociti maturati da sottoporre ai procedimenti di fertilizzazione, venivano denudati meccanicamente facendoli passare in una pipetta di vetro con calibro leggermente superiore al diametro dell'oocita in modo da lasciare intatto lo strato di cellule della corona radiata. Questo procedimento simula la perdita delle cellule della granulosa che avviene fisiologicamente durante il passaggio dell'oocita nell'ovidotto, facilitando così la penetrazione da parte degli spermatozoi. Gli oociti denudati venivano lavati in medium di fertilizzazione per 3 volte e coincubati con gli spermatozoi per 24 ore a 39°C in condizioni di massima umidità e in atmosfera di azoto contenente il 5% di O<sub>2</sub> e il 5% di CO<sub>2</sub>. Al termine della coltura i presunti zigoti sono stati ripuliti dallo strato di cellule della corona radiata e dagli spermatozoi adesi alla zona pellucida e trasferiti in un nuovo sistema colturale per lo sviluppo embrionale. Il sistema di coltura in vitro prevedeva l'utilizzo di un medium colturale composto da SOF addizionato con 4 mg/ml di BSA e aminoacidi essenziali e non essenziali (AA), alla stessa concentrazione del liquido oviduttale. La coltura veniva effettuata a 39°C, in condizioni controllate al 5% di O<sub>2</sub>, 5% di CO<sub>2</sub> e 90% di N<sub>2</sub>. La coltura veniva protratta nelle stesse condizioni per 8 giorni.

### **Vitrificazione degli embrioni**

Nelle procedure di crioconservazione è stata utilizzata una soluzione salina di base rappresentata dal PBS (Sigma) contenente siero ematico in ragione del 20% (Naitana e coll., 1997). Gli embrioni stazionavano per un periodo di 10-15 minuti nella soluzione di PBS e siero a temperatura

ambiente, prima di venire trasferiti in 200 µl della soluzione di condizionamento, costituita dal medium di base contenente glicerolo (1.4 M). In questa soluzione gli embrioni stazionavano 5 minuti, venivano quindi trasferiti e mantenuti per lo stesso periodo di tempo in 200 µl di una seconda soluzione di condizionamento, costituita dalla soluzione di base con glicerolo 1.4 M di e 3.6 M di glicole etilenico. Le blastocisti venivano quindi caricate in 25 µl del medium di vitrificazione costituito dalla soluzione di base con l'aggiunta di 3.4M di glicerolo e 4.6 M di glicole etilenico.

Le procedure di caricamento delle paillettes da 0.25 ml (IMV, Aigle) venivano effettuate con l'ausilio di una pipetta di vetro ed avvenivano con le seguenti modalità: 60µl di una soluzione di saccarosio 0.5 M seguiti da due bolle d'aria, 20µl della soluzione di vitrificazione contenente gli embrioni seguiti da altre due bolle d'aria e 60 µl della soluzione di saccarosio 0.5 M. La paillet veniva prontamente chiusa con del polivinilpirrolidone ed immersa rapidamente in azoto liquido a -196° C per circa metà, mentre la successiva parte veniva immersa più lentamente al fine di prevenire fenomeni di frattura. Tutta l'operazione di caricamento degli embrioni nella paillet e la successiva immersione in azoto liquido era contenuta in un tempo di circa 25-35 secondi.

Il ripristino della temperatura ambiente avveniva immergendo la paillet in un bagno d'acqua a + 20°C per circa 10 secondi, fintanto che non si osservava il completo passaggio dallo stato solido a quello liquido delle soluzioni. L'intero contenuto della paillet veniva versato in una capsula Petri nella quale le soluzioni di saccarosio e di vitrificazione venivano miscelate e mantenute per 3 minuti. Le blastocisti venivano quindi trasferite e mantenute per 3 minuti in una soluzione di saccarosio 0.25 M con lo scopo di rimuovere i crioprotettori presenti all'interno delle cellule embrionali.

Dopo questo trattamento, gli embrioni stazionavano nella soluzione salina di base ed osservati al microscopio per verificare eventuali danneggiamenti macroscopici come ad esempio rottura della zona pellucida o lisi dei blastomeri. Ultimate queste procedure, gli embrioni venivano lavati per almeno 6 volte nella soluzione salina di base rappresentata dal PBS con l'alcool polivinilico e trasferiti in una capsula Petri e mantenuti nella stessa soluzione per 5 minuti al fine di garantire una completa reidratazione.

Le blastocisti venivano poi trasferite in medium 199 addizionato del 10% di siero fetale bovino ed incubate in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub> in aria a 39°C. Al fine di evidenziare differenze nella qualità embrionale tra i due gruppi sperimentali, veniva valutata la ri-espansione della cavità blastocelica entro 8 e 16 ore di coltura in vitro, dato che questo parametro rappresenta un affidabile indicatore della qualità degli embrioni prodotti in vitro (Leoni e coll., 2008). Gli embrioni che mostravano la ri-espansione della cavità blastocelica venivano considerati vitali (Leoni e coll., 2006).

### **Analisi statistiche**

Tutti i follicoli presenti sulla superficie ovarica sono stati classificati in base al loro diametro maggiore e classificati come grandi ( $\geq 5.5$  mm), medi (3.5–5.4 mm), piccoli (2–3.4 mm) e totali ( $\geq 2$  mm). L'effetto dell'età sul numero e la dimensione dei follicoli, e la concentrazione ormonale è stato analizzato attraverso spil-plot ANOVA, seguita dal Kruskal–Wallis test, quando il Levene's test evidenziava variabili non omogenee. Il Duncan multiple range tests è stato utilizzato per testare l'interazione tra i fattori. Il test di Pearson è stato applicato per studiare la relazione tra il numero di follicoli di varie categorie, i valori ormonali ed i giorni del trattamento. L'effetto dell'età sulla produzione embrionale in vitro e sulla ri-espansione della cavità blastocelica dopo

vitrificazione è stato analizzato mediante  $\chi^2$  test. Tutti i risultati sono espressi come  $\text{media} \pm \text{SEM}$  e  $p < 0.05$  è stato considerato come il livello minimo di significatività.

## ***Risultati***

L'analisi ultrasonografica della popolazione follicolare non ha evidenziato differenze tra le pecore giovani e vecchie nel numero e nelle dimensioni dei follicoli, né durante il periodo di somministrazione dell'FSH, né al giorno di recupero degli oociti. La stimolazione con l'FSH ha portato ad un aumento nel numero di follicoli in entrambi i gruppi sperimentali ( $p < 0.001$ ; fig. 1). In particolare, abbiamo evidenziato che in entrambi i gruppi i follicoli che hanno raggiunto un diametro maggiore di 4 mm al giorno del recupero degli oociti hanno iniziato la fase di crescita il giorno  $7.1 \pm 0.1$  (24 ore dopo la somministrazione della prima dose di FSH). Inoltre, il tasso di accrescimento di questi follicoli non differiva tra pecore giovani e vecchie ( $1.7 \pm 0.2$  vs  $1.8 \pm 0.1$  mm/giorno, rispettivamente).

Le concentrazioni circolanti di LH, estradiolo ed inibina A non differivano tra i due gruppi durante il periodo di osservazione (fig. 2). In entrambi i gruppi, i livelli plasmatici di LH aumentarono dopo la prima somministrazione di FSH (giorno 6;  $2.7 \pm 0.2$  e  $2.8 \pm 0.3$  ng/ml in pecore giovani e vecchie, rispettivamente), raggiungendo il picco il giorno 8 ( $3.8 \pm 0.2$  and  $3.4 \pm 0.3$  ng/ml in pecore giovani e vecchie, rispettivamente), prima di diminuire nuovamente (giorno 9;  $2.7 \pm 0.2$  ng/ml nelle pecore giovani,  $p < 0.001$ ;  $2.5 \pm 0.3$  ng/ml nelle pecore vecchie,  $p < 0.05$ ). I livelli plasmatici di estradiolo aumentarono significativamente durante i giorni del trattamento, raggiungendo un picco il giorno del recupero degli oociti ( $0.9 \pm 0.4$  il giorno 6 vs  $3.5 \pm 0.4$  pg/ml il giorno 9 nelle pecore giovani,  $p < 0.0001$ ;  $1 \pm 0.5$  il giorno 6 vs  $3.4 \pm 0.5$  pg/ml il giorno 9 nelle pecore vecchie,  $p < 0.01$ ). I livelli plasmatici di inibina A hanno mostrato lo stesso pattern, aumentando significativamente dal

giorno 6 al giorno 9 ( $267.2 \pm 152.2$  vs  $1155.2 \pm 152.2$  pg/ml nelle pecore giovani,  $p < 0.0001$ ;  $108.8 \pm 114.9$  vs  $963.5 \pm 109$  pg/ml nelle pecore vecchie,  $p < 0.0001$ ).

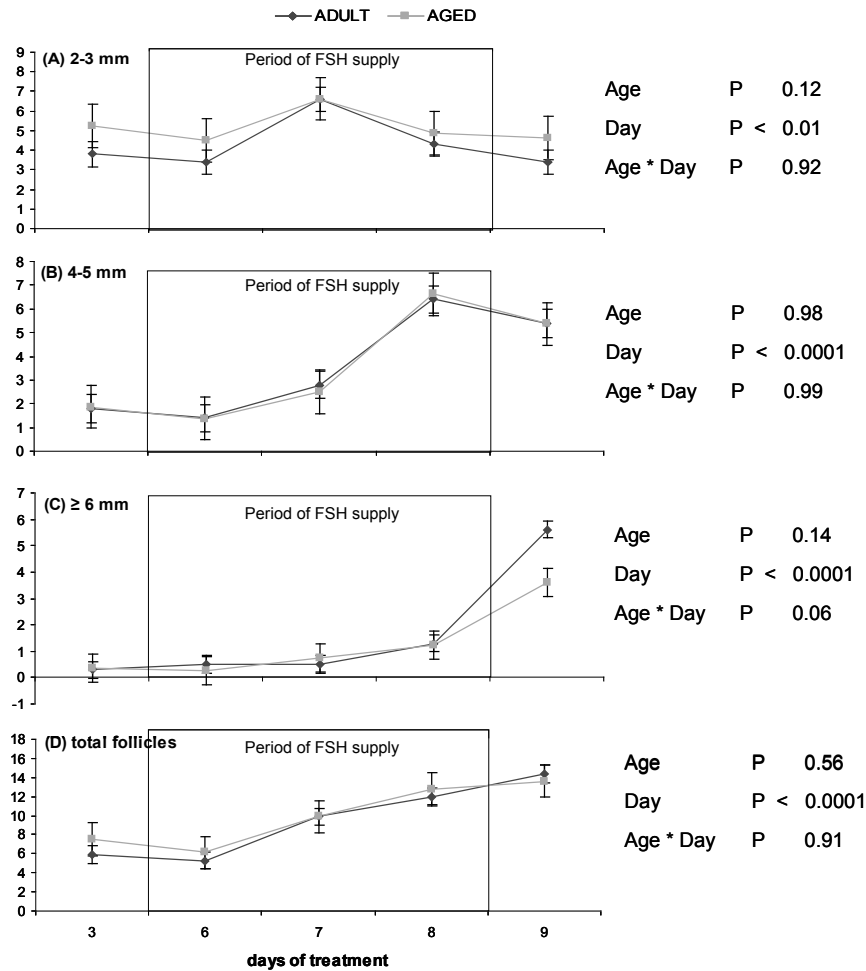


Figura 1. Numero (media $\pm$ SE) dei follicoli di 2-3 mm (A), 4-5 mm (B),  $\geq$  6 mm (C) e totali (D) in pecore Sarde giovani (ADULT; n=12) e vecchie (AGED; n= 10) prima (giorno 3; il giorno 0 del periodo sperimentale corrisponde alla rimozione delle spugne impregnate di fluorgestone acetato), durante la somministrazione di FSH (giorni 6-8) e il giorno del recupero degli oociti (giorno 9).

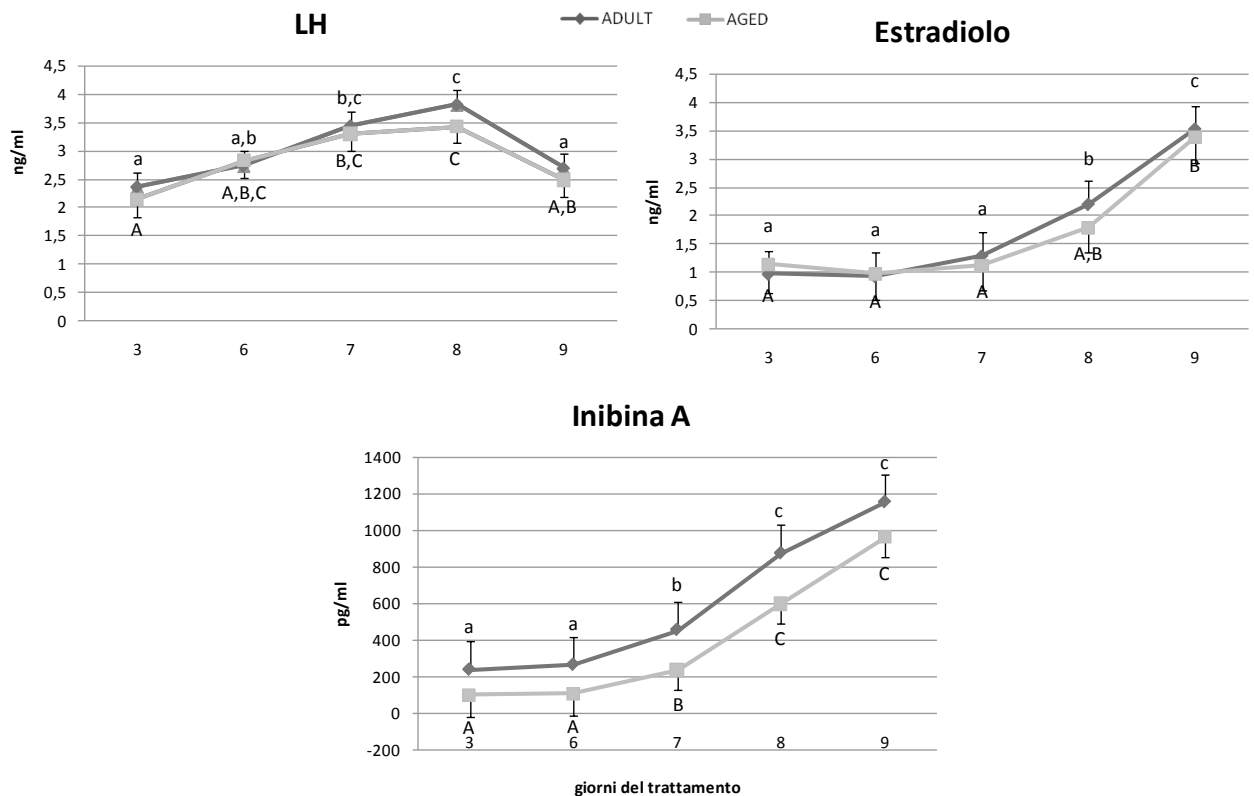


Figura 2. Livelli plasmatici di LH, estradiolo ed inibina A in pecore Sarde giovani (ADULT) e vecchie (AGED) durante un trattamento di stimolazione con FSH eseguito durante l'anaestro stagionale. Giorno 0 = rimozione delle spugne impregnate di fluorgestone acetato; giorni 6-9 = somministrazione di FSH; giorno 9 = recupero degli oociti. Le lettere indicano una differenza significativa all'interno dello stesso gruppo (minuscole: ADULT; maiuscole: AGED):  $p < 0.05$  (ANOVA unidirezionale).

Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nel numero di oociti recuperati dalle pecore giovani ( $n=201$ ;  $16.7 \pm 5$ ) e vecchie ( $n=160$ ;  $16 \pm 7.6$ ; Tabella 1). D'altra parte, il numero di oociti selezionati per la maturazione in vitro era significativamente inferiore nelle pecore vecchie rispetto a quelle giovani (85 vs 92.5%, rispettivamente;  $p < 0.05$ ). Di seguito, non è stata riscontrata alcuna differenza nelle percentuali di fecondazione, cleavage e produzione embrionale.

Tabella 1. Competenza allo sviluppo in vitro di oociti recuperati da pecore Sarde giovani (4-5 anni) e vecchie (10-12 anni) in seguito ad un trattamento di stimolazione con FSH durante l'anaestro stagionale.

|       |      | Oociti                   |                            |                          | Embrioni (%)* |                     |                     |                     |               |
|-------|------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------|
|       |      | Recuperati<br>(media±SD) | IVM<br>(%)                 | Fertilizzati<br>(%)      | Cleavage      | Blastocisti         |                     |                     |               |
|       |      |                          |                            |                          |               | 6° dpf <sup>+</sup> | 7° dpf <sup>+</sup> | 8° dpf <sup>+</sup> | TOT           |
| ADULT | # 1  | 4                        | 4                          | 4                        | 4             | 0                   | 2                   | 0                   | 2             |
|       | # 2  | 16                       | 12                         | 11                       | 11            | 0                   | 2                   | 4                   | 6             |
|       | # 3  | 16                       | 14                         | 12                       | 12            | 0                   | 9                   | 1                   | 10            |
|       | # 4  | 16                       | 18                         | 13                       | 12            | 3                   | 1                   | 4                   | 8             |
|       | # 5  | 24                       | 22                         | 20                       | 19            | 9                   | 6                   | 1                   | 16            |
|       | # 6  | 17                       | 16                         | 15                       | 15            | 0                   | 9                   | 3                   | 12            |
|       | # 7  | 17                       | 15                         | 15                       | 15            | 13                  | 2                   | 0                   | 15            |
|       | # 8  | 15                       | 13                         | 12                       | 11            | 5                   | 3                   | 0                   | 8             |
|       | # 9  | 14                       | 14                         | 10                       | 10            | 0                   | 7                   | 0                   | 7             |
|       | # 10 | 22                       | 22                         | 20                       | 20            | 13                  | 3                   | 0                   | 16            |
|       | # 11 | 21                       | 18                         | 8                        | 7             | 0                   | 3                   | 2                   | 5             |
|       | # 12 | 19                       | 18                         | 15                       | 13            | 0                   | 7                   | 1                   | 8             |
|       | TOT  | 201<br>(16.7±5)          | 186 <sup>a</sup><br>(92.5) | 155                      | 149<br>(96.1) | 43<br>(27.7)        | 54<br>(34.8)        | 16<br>(10.3)        | 113<br>(72.9) |
| AGED  | # 1  | 14                       | 12                         | 11                       | 9             | 3                   | 1                   | 0                   | 4             |
|       | # 2  | 10                       | 8                          | 4                        | 3             | 0                   | 1                   | 0                   | 1             |
|       | # 3  | 13                       | 9                          | 7                        | 7             | 0                   | 1                   | 2                   | 3             |
|       | # 4  | 29                       | 26                         | 23                       | 23            | 13                  | 3                   | 1                   | 17            |
|       | # 5  | 14                       | 13                         | 12                       | 11            | 2                   | 7                   | 0                   | 9             |
|       | # 6  | 5                        | 5                          | 2                        | 2             | 1                   | 1                   | 0                   | 2             |
|       | # 7  | 26                       | 17                         | 11                       | 11            | 0                   | 4                   | 2                   | 6             |
|       | # 8  | 10                       | 9                          | 7                        | 6             | 5                   | 1                   | 0                   | 6             |
|       | # 9  | 23                       | 22                         | 18                       | 18            | 12                  | 4                   | 0                   | 16            |
|       | # 10 | 16                       | 15                         | 10                       | 10            | 4                   | 3                   | 0                   | 7             |
|       |      | TOT                      | 160<br>(16±7.6)            | 136 <sup>b</sup><br>(85) | 105           | 100<br>(95.2)       | 40<br>(38.1)        | 26<br>(24.8)        | 5<br>(4.8)    |

\*hpf: ore di coltura post-fertilizzazione; dpf: giorni di coltura post-fertilizzazione. \*Le percentuali sono calcolate sul numero degli oociti fertilizzati.

All'interno della stessa colonna, lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa: a≠b p<0.05 (Chi-square test).

Le blastocisti ottenute dai due gruppi sperimentali non differivano in termini di criotolleranza in seguito a vitrificazione e ripristino della temperatura. Nel gruppo di embrioni ottenuti dalle pecore giovani, su 71 blastocisti sottoposte a vitrificazione e ripristino della temperatura, 30 (42.2%) hanno mostrato una completa ri-espansione della cavità blastocelica entro 8 ore di

coltura in vitro e 13 nelle successive 8 ore (18.3%). D'altra parte, nel gruppo di embrioni ottenuti dalle pecore vecchie, su 64 blastocisti sottoposte a vitrificazione e ripristino della temperatura, 28 (43.7%) hanno mostrato una completa ri-espansione della cavità blastocelica entro 8 ore di coltura in vitro e 15 nelle successive 8 ore (23.4%).

## ***Discussione***

Il graduale declino nella potenzialità riproduttiva che si verifica con l'avanzare dell'età è una caratteristica comune nei vertebrati, essendo stato descritto nella maggior parte delle specie studiate (Ottinger, 2010). D'altra parte, le modalità di insorgenza dell'invecchiamento riproduttivo sono molto varie (Congdon e coll., 2001; Ricklefs e coll., 2003; Brunet-Rossinni e Austad, 2006; Ricklefs, 2008; deBruin e coll., 2004), andando dal repentino e drammatico declino della fertilità descritto nelle specie selmipare, come il salmone ed alcuni marsupiali, all'estremamente lento e quasi non manifesto declino del successo riproduttivo documentato in alcuni uccelli marini, rettili e pesci. I markers legati al processo della senescenza, inclusa quella delle gonadi, sono stati documentati in popolazioni naturali di numerose specie di uccelli e mammiferi, e sono state riportate evidenze demografiche che proverebbero un declino della fertilità con l'avanzare dell'età in un ampio numero di taxa, comprendenti anche numerose specie di pesci. D'altra parte alcuni mammiferi sociali e con una lunga vita media, come le balene e alcune specie di ratti, hanno mostrato di non subire alcun apprezzabile declino della fertilità con l'avanzare dell'età, anche esaminando dati provenienti da centinaia di animali (Austad e coll., 1997; Haenel, 1986; Olesiuk e coll., 1990). Inoltre, le modificazioni ovariche e neuroendocrine che si manifestano durante l'invecchiamento riproduttivo sono state descritte, oltre che nella specie umana,



unicamente in un numero ristretto di specie animali, comprendenti ceppi di laboratorio di topi e ratti e alcune specie di primati (Packer e coll., 1998).

Per queste ragioni, si ritiene che ci sia bisogno di ulteriori studi su specie diverse al fine di dimostrare se il declino nella fertilità descritto in numerosi gruppi di mammiferi possa essere attribuito a patterns comuni, guidati da spinte evoluzionistiche di ugual natura, anche fine di identificare modelli animali per lo studio dell'invecchiamento riproduttivo nella specie umana (reviewed by: Finch and Holmes, 2010).

A questo riguardo, la specie ovina è stata proposta come modello animale per lo studio delle variazioni nella popolazione follicolare e nella secrezione ormonale tipica della senescenza al fine di ottenere degli indicatori dell'inizio della menopausa e delle sue espressioni patologiche, come la premature ovarian failure (de Souza e coll., 1998). Studi precedenti (de Souza e coll., 1998; Gonzalez-Bulnes et al., 2004) hanno infatti riscontrato in pecore vecchie variazioni nelle caratteristiche ormonali e di accrescimento dei follicoli paragonabili a quelle descritte nella specie umana. In particolare, pecore in età avanzata hanno mostrato un aumento nella concentrazioni di FSH, una diminuzione nei livelli di inibina A durante la fase luteinica e nessuna modificazione nella secrezione steroidea (de Souza e coll., 1998). Queste variazioni ormonali sono simili a quelle descritte in donne nel periodo che precede la menopausa (Alvigi e coll., 2009), e dipingono uno scenario in cui il graduale esaurimento della riserva ovarica porta ad una diminuzione nella secrezione di inibina, con conseguente aumento nella concentrazione di FSH. Questi dati sono confermati da uno studio successivo (Gonzalez-Bulnes e coll., 2004), che inoltre riporta un minor diametro dei follicoli ovulatori ed un ritardo nel picco di LH in seguito alla somministrazione di PGF2 $\alpha$  in pecore vecchie rispetto a quelle adulte. Questi dati rifletterebbero ancora una volta la

riduzione del pool di follicoli tipica dell'età avanzata, che ridurrebbe le possibilità di disponibilità di un follicolo di dimensioni ovulatorie al momento della luteolisi.

Entrambi questi studi, d'altra parte, sono stati effettuati in pecore sottoposte ad emiovariectomia e autotrapianto dell'ovaio in prossimità della carotide sinistra. Modificazioni ormonali simili sono state rilevate in pecore di età inferiore in cui il pool dei follicoli era stato drasticamente ridotto dopo autotrapianto di tessuto ovarico sottoposto a congelamento (Baird e coll., 1999; Campbell e coll., 2000). È noto che il pool iniziale di follicoli è un fattore determinante dell'instaurarsi del declino della funzionalità ovarica, come dimostrato da Nelson e Felicio in un elegante esperimento che prevedeva la rimozione parziale del tessuto ovarico nel topo (Nelson e Felicio, 1986.). Il momento in cui si manifesta la fine dei cicli sessuali dovuta all'esaurimento della riserva ovarica è direttamente relazionato alla quantità di tessuto rimosso: quando l'impovertimento dei follicoli raggiunge un valore soglia specie-specifico i cicli riproduttivi cessano (Finch and Holmes, 2010). Inoltre, il verificarsi dell'aneuploidia fetale, un altro marker di senescenza ovarica che precede l'arresto dei cicli, è accelerato dall'emiovariectomia nei roditori (Brook e coll., 1984).

Di conseguenza, negli studi sopracitati le modificazioni ormonali e del pattern di accrescimento dei follicoli rilevate potrebbe essere state accelerate dalla rimozione di tessuto ovarico necessaria per l'autotrapianto. Inoltre, nella specie ovina non è noto se alle sopracitate modificazioni ormonali e nella crescita follicolare legate all'invecchiamento ovarico corrisponda anche un declino della fertilità.

Il presente studio, eseguito su pecore in una situazione fisiologica di invecchiamento, dimostra che le principali caratteristiche del ciclo estrale non subiscono alterazioni legate all'età. Non si riscontrano, infatti, differenze nella durata del ciclo estrale, nella risposta al trattamento di

sincronizzazione, nelle caratteristiche dell'ondata ovulatoria, nel pattern di accrescimento del corpo luteo e nella sua funzionalità, valutata attraverso la produzione di progesterone.

Il primo segnale di inizio della fase pre-menopausa nella donna è data da una diminuzione nella lunghezza dei cicli estrali [Johannes e coll., 1999], determinata da una più breve fase follicolare ma con una simile fase luteinica e senza alterazioni nelle concentrazioni di progesterone (Soules e coll., 2000). Allo stesso modo, in cavalle di 15-19 anni è stata riscontrata una riduzione del 15% nella lunghezza della fase follicolare, rispetto a cavalle di 5-7 anni (Carnevale e coll., 1993). Sia nella cavalla che nella donna queste modificazioni sono accompagnate da un aumento nei livelli di FSH (Richardson e coll., 1987). D'altra parte, nella bovina non è stata riscontrata una riduzione nella lunghezza del ciclo estrale in relazione all'età (Malhi e coll., 2005; Bryner e coll., 1990).

Inoltre, nel presente studio non sono state riscontrate differenze nella conta totale dei follicoli antrali effettuata sia nel corso della fase follicolare che di quella luteinica. Si ritiene che il declino nel numero dei follicoli ovarici rappresenti il principale fattore coinvolto nell'invecchiamento ovarico (Faddy e coll., 1992). Il processo di invecchiamento riproduttivo sembra essere dettato da una graduale diminuzione sia nella quantità che nella qualità degli oociti presenti all'interno dei follicoli della corteccia ovarica (te Velde and Pearson, 2002). Diversi anni prima la cessazione dei cicli estrali, la crescita follicolare inizia ad aumentare, velocizzando il processo di deplezione dello stock follicolare (Gougeon e coll., 1994); man mano che diminuisce il numero dei follicoli, anche la qualità dell'oocita diminuisce, e questo fenomeno è manifesto nella donna già a 35 anni d'età con una maggiore incidenza di aborti precoci (Navot e coll., 1991; te Velde e coll., 1998). La conta dei follicoli antrali rappresenta, quindi, un marker più attendibile sia dell'età cronologica che dei livelli di FSH nel determinare lo stato di invecchiamento ovarico (Klinkert e coll., 2005). Inoltre, il numero dei follicoli antrali sarebbe direttamente relazionato al numero dei follicoli primordiali presenti nella riserva ovarica (Broekmans e coll., 2009).

Nella cavalla il numero dei follicoli antrali tende a diminuire con l'avanzare dell'età (Carnevale 2008). Nella bovina, non sono state riscontrate differenze nel numero di follicoli di 2-3 mm per ondata tra animale di 13-14 anni e giovani, mentre diminuiva il numero di follicoli > 4 mm (Malhi 2005).

Secondo quanto da noi riscontrato nella specie ovina, non si assiste ad un significativo declino nel numero dei follicoli antrali con l'avanzare dell'età, e l'AFC non rappresenterebbe quindi un marker affidabile di invecchiamento ovarico in questa specie.

Nel corso del nostro studio, sebbene non siano state evidenziate modificazioni nelle principali caratteristiche del ciclo estrale in relazione all'età, sono emerse alterazioni significative nella funzionalità follicolare. Sia durante la fase follicolare che luteinica, infatti, nelle pecore vecchie non si riscontra alcun effetto di dominanza dei follicoli di maggior diametro sui follicoli di 2-3 mm, al contrario di quanto osservato nelle pecore adulte. L'alterata funzionalità follicolare viene poi confermata dalla determinazione dei livelli serici di estradiolo ed inibina A. Nelle pecore adulte, le concentrazioni medie dei due ormoni nella fase follicolare successiva alla somministrazione della seconda dose di PGF2 $\alpha$ , sono significativamente maggiori rispetto a quelle vecchie. Studi precedenti non avevano riscontrato modificazioni nella concentrazione dell'estradiolo e dell'inibina A durante questa fase del ciclo (de Souza e coll., 1998; Gonzalez-Bulnes e coll., 2004). I dati finora disponibili nella specie umana evidenziano che i livelli di estradiolo ed inibina A tendono a decrescere relativamente tardi nel processo di invecchiamento ovarico, essendo preceduti dalla diminuzione nella secrezione di inibina B (Broekmans e coll., 2009).

Nella pecora si ritiene che l'inibina A regoli la concentrazione basale di FSH, mentre l'estradiolo sia responsabile delle sue fluttuazioni durante il ciclo (Baird e coll., 1991). Non è precisamente noto, invece, il pattern di secrezione dell'inibina B. Ad ogni modo, la diminuzione nei livelli medi di questi due ormoni follicolari durante la fase follicolare sarebbe consistente con il transitorio

aumento dell'FSH riscontrato nel presente studio all'inizio della fase luteinica. Nella specie umana la secrezione ipofisaria di FSH viene regolata in primo luogo dalla secrezione di inibina B e di AMH da parte dei follicoli ovarici immaturi (Gregory e Kaiser, 2004; Durlinger e coll., 2002). Con la progressiva diminuzione nella riserva ovarica all'aumentare dell'età, il feed-back negativo esercitato da queste molecole sulla secrezione di FSH diminuisce e i livelli basali della gonadotropina aumentano. Gli elevati livelli di FSH promuovono una maturazione inappropriata delle cellule della granulosa dei rimanenti follicoli pre-antrali contenenti oociti che non hanno completato la fase di maturazione gonadotropino-indipendente. Questo processo viene poi amplificato dal progressivo aumentare dei livelli di FSH, fino a che anche i livelli di inibina A e di estradiolo decrescono, ed i cicli si interrompono (Beemsterboer e coll., 2006). Nel nostro studio, la diminuzione nei livelli medi di estradiolo ed inibina A durante la fase follicolare è evidenziabile prima che si manifesti alcuna alterazione nelle caratteristiche principali del ciclo estrale.

Studi effettuati nella specie umana hanno più volte messo in evidenza come il primo segno dell'invecchiamento riproduttivo sia testimoniato da un aumento nei livelli circolanti di FSH (de Koning e coll., 2008). Un aumento nei livelli circolanti di FSH è stato rilevato anche in bovine di 13-14 anni (Malhi e coll., 2005), in cavalle di 15-19 anni (Carnevale) ed in pecore di 10-12 anni (Gonzalez-Bulnes e coll., 2004). Elevate concentrazioni di FSH sono associate a deplezione della riserva ovarica, diminuita risposta alla stimolazione con gonadotropine esogene, minore competenza dell'oocita e diminuita fertilità durante l'invecchiamento nella donna (Beckers e coll., 2002; Kupesic e coll., 2003; Scheffer e coll., 2003) e nella bovina (Singh e coll., 2004; Wolfenson e coll., 2004; Malhi e coll., 2005).

Nel corso del presente studio la funzionalità ipofisarie è stata valutata anche attraverso la determinazione della pulsatilità dell'LH il giorno del calore e dei livelli medi circolanti della gonadotropina durante la fase luteinica, non evidenziando alcune alterazioni in relazione all'età.

Studi effettuati nella specie umana hanno evidenziato che le concentrazioni sieriche di LH tendono ad aumentare dopo l'aumento dell'FSH, anche se in alcuni casi non si rileva alcuna modificazione nei livelli dell'LH legata all'età (Freeman e coll., 2005; Hall Moran e coll., 2001; Piltonen e coll., 2003). D'altra parte, il relativo ruolo dell'asse neuroendocrino sul processo di invecchiamento ovarico è ancora oggetto di studio e sembra mostrare importanti differenze specie-specifiche (Yin and Gore, 2006).

In conclusione, l'esperimento 1 mostra come in assenza di alcuna alterazione nelle principali caratteristiche del ciclo estrale, l'invecchiamento ovarico si manifesti fisiologicamente nella specie ovina con una alterazione della funzionalità follicolare, evidenziata da un mancato effetto di dominanza sui follicoli di piccole dimensioni e da una diminuita produzione di estradiolo ed inibina A, entrambi markers riconosciuti di qualità follicolare (Campbell e coll., 2001). D'altra parte, queste alterazioni non sono accompagnate da una parallela riduzione nella risposta ovarica alla stimolazione ormonale e nella competenza allo sviluppo in vitro degli oociti, come evidenziato nell'esperimento 2.

Nel presente studio, infatti, l'analisi ultrasonografica della popolazione follicolare non ha evidenziato differenza tra pecore vecchie e pecore giovani nel numero e nelle dimensioni dei follicoli, né durante il periodo di somministrazione dell'FSH, né al giorno di recupero degli oociti. Inoltre, la funzionalità di questi follicoli, valutata attraverso i livelli di estradiolo ed inibina A non differiva tra i due gruppi sperimentali.

Nella specie umana, i dati ricavati dagli interventi di riproduzione assistita hanno evidenziato che le donne che rispondono poco al trattamento di iperstimolazione ovarica con gonadotropine, vanno incontro alla menopausa più precocemente e quindi si trovano in uno stadio più avanzato di invecchiamento ovarico (Crosignani e coll., 2000; De Boer e coll., 2002; Nikolaou e coll., 2002; Lawson e coll., 2003). Si ritiene, infatti, che l'intervallo temporale tra la menopausa e l'inizio dei

segni di sub fertilità sia fisso (van Zonneveld e coll., 2001; te Velde and Pearson, 2002). Una bassa risposta alla stimolazione ovarica corrisponde ad uno stadio intermedio tra il declino della fertilità e l'infertilità, mentre la mancanza totale di risposta corrisponderebbe ad uno stadio ormai conclamato di infertilità. Per queste ragioni, la risposta ai trattamenti di iperstimolazione ovarica e fertilizzazione dell'ocita è stata proposta come un test dinamico dello stato di invecchiamento ovarico (Nikolau e Templeton, 2003; Beckers e coll., 2002).

Nella specie bovina è stato dimostrato che il numero di follicoli reclutati in risposta al trattamento di iperstimolazione ovarica diminuisce significativamente con l'età (Malhi e coll., 2008). D'altra parte, nella specie ovina non è stata riscontrata una diminuzione nella risposta al trattamento di superovulazione, anche ripetuto, con l'avanzare dell'età (Forcada e coll., 2000, 2006).

In seguito al recupero degli oociti, nelle pecore vecchie è stato ottenuto un minor numero di oociti morfologicamente di buona qualità e quindi selezionabili per la produzione embrionale in vitro, rispetto alle pecore adulte. Un precedente studio ha evidenziato che oociti recuperati da follicoli preovulatori di cavalle >19 anni presentavano diverse anomalie morfologiche, se paragonati a quelli recuperati da soggetti di 3-19 anni, quali vescicolazione del citoplasma, forme atipiche, sezioni del citoplasma prive di organelli, e riduzione dei microvilli nell'olemma (Carnevale, 2008). Un aumento significativo nella vacuolizzazione del citoplasma è stato osservato anche in oociti recuperati in seguito a biopsia ovarica da donne di 38-45 anni rispetto a quanto osservato in donne di 25-33 anni (de Bruin e coll., 2004). L'aumento della vacuolizzazione potrebbe essere causato dall'accumulo dei danni a carico dell'ocita con l'avanzare dell'età (de Bruin e coll., 2004). In realtà, le cause delle anomalie morfologiche in oociti prelevati da soggetti di età avanzata non sono note. Mutazioni nel DNA mitocondriale ed aumentata produzione di

radicali liberi potrebbe contribuire al declino della qualità dell'ocita con l'avanzare dell'età (Cummins, 2000; Thouas e coll., 2005).

Nel presente studio, d'altra parte, gli oociti selezionati da pecore vecchie hanno poi mostrato una competenza allo sviluppo in vitro, valutata sia come quantità che come qualità delle blastocisti prodotte, del tutto simile quella ottenuta da oociti recuperati pecore adulte.

Nella specie bovina è stato evidenziato un declino nella qualità dell'ocita in relazione all'età, evidenziato attraverso una minor produzione di embrioni in vivo ed una maggior proporzione di oociti non fertilizzati e di zigoti in bovine vecchie rispetto a quelle adulte, suggerendo così un declino nella fertilizzazione e nel cleavage con l'età (Malhi e coll., 2007). In un altro studio, (Fujino e coll. 1996), oociti maturi recuperati dall'ovidotto di topi vecchi hanno portato a minori percentuali di fertilizzazione in vitro (determinate dalla conta degli zigoti allo stadio di 2 cellule) se paragonati a quelli ottenuti da topi giovani. Nella specie umana sono stati ottenuti risultati contraddittori in seguito ad IVF; alcuni riportano una ridotta fertilizzazione/cleavage in donne >40 anni (Ashkenazi e coll. 1996, Dew e coll. 1998), mentre altri riportano risultati paragonabili a quelli ottenuti in donne più giovani (Hull e coll. 1996, Lim e Tsakok 1997, Klein e Sauer 2001). In uno studio effettuato nella specie equina (Carnevale e Ginther 1995), l'avanzare dell'età era associato ad una diminuzione nel numero di gravidanze in seguito a trasferimento intra-tubarico di oociti prelevati da cavalle vecchie rispetto a quelle giovani. La gravidanza veniva diagnostica per ecografia 12 giorni dopo trasferimento ed inseminazione.

La proporzione di embrioni di buona qualità (valutata morfologicamente), e le percentuali di gravidanza dopo trasferimento, non differiva tra bovine giovani e vecchie (Malhi, 2007). Uno studio precedente aveva già evidenziato che l'età non influenza le percentuali di gravidanza dopo trasferimento nella specie bovina (Lerner e coll. 1986). Al contrario, le percentuali di



impianto/gravidanza dopo embryo transfer diminuiscono con l'aumentare dell'età della donatrice nella specie umana (Hull e coll. 1996, Lim e Tsakok, 1997).

Nel presente studio, non è stato riscontrato alcun effetto dell'età sulla risposta al trattamento di stimolazione ovarica, sulla competenza allo sviluppo degli oociti ottenuti e sulla qualità embrionale. I dati sopra riportati testimoniano come le alterazioni nella funzionalità ovarica riscontrabili con l'età varino sensibilmente anche tra specie vicine, evidenziando la complessità di fattori che può influenzare la durata della vita riproduttiva nei mammiferi.

## ***Bibliografia***

93. Alviggi C, Humaidan P, Howles CM, Tredway D, Hillier SG. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7:101.
94. Ashkenazi J, Orvieto R, Gold-Deutch R, Feldberg D, Dicker D, Ben-Rafael Z. The impact of woman's age and sperm parameters on fertilization rates in IVF cycles. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 1996; 66:155–159.
95. Austad, S.N. Postreproductive survival. In *Between Zeus and the Salmon: The Biodemography of Longevity*. 1997, K.W. Wachter e C.E. Finch, Eds.: 161–174. National Research Council, National Academy Press. Washington, DC.
96. Avdi M., Banos G., Stefos K., Chemineau P., Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams, *Theriogenology* 2004; 62:275-282,.
97. Baird DT, Campbell BK, Mann GE. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil* 1991; 43:125-138.
98. Baird DT, Webb R, Campbell BK, Harkness LM, Gosden RG. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at -196° C. *Endocrinology* 1999; 140:462–471.
99. Barrell G.K., Thrun L.A., Brown M.E., Viguíe C., Karsch F.J., Importance of photoperiodic signal to entrainment of the circannual reproductive rhythm in the ewe, *Biol. Reprod* 2000; 63:769-774,.
100. Beemsterboer SN, Homburg R, Gorter NA, Schats R, Hompes PG, Lambalk CB. The paradox of declining fertility but increasing twinning rates with advancing maternal age. *Hum Reprod* 2006; 21:1531-1532.
101. Berubé CH, Festa-Bianchet M, Jorgenson JT. Individual differences, longevity, and reproductive senescence in bighorn ewes. *Ecology* 1999; 80:2555-2565.
102. Bittman E.L., Dempsey R.J. Karsh F.J., Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe, *Endocrinology* 1983; 11:2276-2283,.
103. Borini A, Bianchi L, Bafaro G, Casadio V, Violini F, Flamigni C. Pregnancies in postmenopausal women over 50 years old in an oocyte donation program. *Fertil Steril* 1995;63:258–61.

104. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. *Endocrine Reviews* 2009; 30:465–493.
105. Brook JD, Gosden RG, Chandley AC. Maternal ageing and aneuploid embryos—evidence from the mouse that biological and not chronological age is the important influence. *Hum. Genet.* 1984; 66: 41–45.
106. Brunet-Rossinni AK, Austad SN.. Senescence in wild populations of mammals and birds. In *Handbook of the Biology of Aging*. 2006. E.J. Masoro e S.N. Austad, Eds.: 243–266. Academic Press. Burlington, MA.
107. Bryner RW, Garcia-Winder M, Lewis PE, Inskeep EK, Butcher RL. Changes in hormonal profiles during the estrous cycle in old lactating beef cows. *Domest Anim Endocrinol* 1990; 7:181–189.
108. Campbell BK, Baird DT. Inhibin a is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. *J Endocrinol* 2001; 169:333–45.
109. Campbell BK, Telfer EE, Webb R, Baird DT. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163:131–139.
110. Carnevale EM, Bergfelt DR, Ginther OJ. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. *Anim Reprod Sci* 1993;31:287–99.
111. Carnevale EM, Ginther OJ. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biology of Reproduction* 1995; 1:209–214.
112. Carnevale EM, Ginther OJ. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol Reprod* 1995; 1:209–14.
113. Carnevale EM. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* 2008; 69:23-30.
114. Congdon, J., R.D. Nagle, O.M. Kinney e R.C. van Loben Sels. Hypotheses of aging in a long-lived vertebrate (Blanding's turtle, *Emydoidea blandingii*). *Exp. Gerontol.* 2001; 36: 813–827.
115. Crosignani, P.G., Ragni, G., Guermandi, E., Baroni, E., Arnoldi, M. and Vegetti, W. Menopause and pregnancy outcome in the follow-up of IVF poor responders: A case-control study. *Fertil. Steril.* 2000; 74:169.
116. Cummins JM. Mitochondrial dysfunction and ovarian aging. In: te Velde ER, Pearson PL, Broekmans FJ, editors. *Female reproductive aging*. New York: The Parthenon Publishing Group; 2000. p. 207–24.

117. De Boer, E.J., Den Tonkelaar, I., Te Velde, E.R., Burger, C.W., Klip, H. and Van Leeuwen, F. A low number of retrieved oocytes at in vitro fertilization treatment is predictive of early menopause. *Fertil. Steril.* 2002; 77: 978-985.
118. de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CWN, e coll. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biol Reprod* 2004; 70:419–24.
119. de Koning CH, McDonnell J, Themmen AP, de Jong FH, Homburg R, Lambalk CB. The endocrine and follicular growth dynamics throughout the menstrual cycle in women with consistently or variably elevated early follicular phase FSH compared with controls. *Hum Reprod* 2008; 23: 1416–1423.
120. de Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. Incipient ovarian failure associated with raised levels of follicle stimulating hormone and reduced levels of inhibin A in older sheep. *Hum Reprod.* 1998; 13:3016-3022.
121. deBruin, JP, Gosden RG, Finch CE, Leaman BM. Ovarian aging in two species of long-lived rockfish, *Sebastes aleutianus* and *S. alutus*. *Biol. Reprod.* 2004; 71: 1036–1042.
122. Dew JE, Don RA, Hughes GJ, Johnson TC, Steigrad SJ. The influence of advanced age on the outcome of assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 1998; 15: 210–214.
123. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 2002; 124:601-609.
124. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ and Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in midlife: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 7:1342–1346.
125. Finch CE, Holmes DJ. Ovarian aging in developmental and evolutionary contexts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010; 1204:82–94.
126. Forcada F, Abecia JA, Casao A, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Palacín I. Effects of ageing and exogenous melatonin on pituitary responsiveness to GnRH in ewes during anestrus and the reproductive season. *Theriogenology* 2007; 67:855-62.
127. Forcada F, Abecia JA, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Valares JA, Palacín I, Casao A. The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes. *Theriogenology* 2006; 65:356-65.

128. Forcada F, Abecia JA, Lozano JM, Zuniga O. Repeated superovulation of high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high-quality embryos. *Livestock Production Science* 2000; 66:263–269
129. Freeman EW, Sammel MD, Gracia CR, Kapoor S, Lin H, Liu L, Nelson DB: Follicular phase hormone levels and menstrual bleeding status in the approach to menopause. *Fertil Steril* 2005, 83:383-392.
130. Fujino Y, Ozaki K, Yamamasu S, Ito F, Matsuoka I, Hayashi E, Nakamura H, Ogita S, Sato E, Inoue M. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Human Reproduction* 1996; 11:1480–1483.
131. Gonzalez-Bulnes A, Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. Effect of ageing on hormone secretion and follicular dynamics in sheep with and without the Booroola gene. *Endocrinology* 2004; 145:2858-2864.
132. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC: Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994, 50:653-663.
133. Gregory SJ, Kaiser UB. Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Semin Reprod Med* 2004; 22:253-267.
134. Haenel N.J. General notes on the behavioral ontogeny of Puget Sound killer whales and the occurrence of allomaternal behavior. In *Behavioral Biology of Killer Whales*. 1986, B.C. Kirkevold e J.S. Lockard, Eds.: 285–300. Alan R. Liss. New York.
135. Hall Moran V, Leathard HL, Coley J. Urinary hormone levels during the natural menstrual cycle: the effect of age. *J Endocrinol* 2001; 170:157-164.
136. Hull MG, Fleming CF, Hughes AO, McDermott A. The age related decline in female fecundity: a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 1996; 65: 783–790.
137. Johannes CB, Crawford SL. Menstrual bleeding, hormones, and the menopausal transition. *Semin Reprod Endocrinol* 1999;17: 299–309.
138. Klein J, Sauer MV. Assessing fertility in women of advanced reproductive age. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2001; 185:758–770.
139. Klein NA, Battaglia DE, Woodruff TK, Padmanabhan V, Giudice LC, Bremner WJ, Soules MR. Ovarian follicular concentrations of activin, follistatin, inhibin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and vascular endothelial growth

- factor in spontaneous menstrual cycles of normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:4520-4525.
140. Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER: The antral follicle count is a better marker than basal folliclestimulating hormone for the selection of older patients with acceptable pregnancy prospects after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005, 83:811-814.
141. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril.* 2003;79:190-197
142. Lawson R, El-Toukhy T, Kassab A, Braude P, Parsons J, Seed P. Poor response to ovarian induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH: a life table analysis. *Hum. Reprod* 2003; 18, 527-533.
143. Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskeep EK, Dailey RA, Lewis PE, Butcher RL. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *Journal of Animal Science* 1986; 63: 176–183.
144. Lim AS, Tsakok MF. Age-related decline in fertility: a link to degenerative oocytes? *Fertility and Sterility* 1997; 68: 265–271.
145. Malhi PS, Adams GP, Mapletoft RJ, Singh J. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Anim Reprod Sci.* 2008; 109:100-109.
146. Malhi PS, Adams GP, Mapletoft RJ, Singh J. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Animal Reproduction Science* 2008; 109:100–109.
147. Malhi PS, Adams GP, Singh J. Bovine Model for the Study of Reproductive Aging in Women: Follicular, Luteal, and Endocrine Characteristics. *Biology of Reproduction* 2005; 73:45–53.
148. Malpoux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms.* 2001 Aug;16(4):336-47.
149. Mysterud A, Steinheim G, Yoccoz NG, Holand Ø Stenseth NC. Early onset of reproductive senescence in domestic sheep, *Ovis aries*. *OIKOS* 2002; 97: 177–183.
150. Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Grunfeld L. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* 1991; 337:1375-1377.

151. Nelson JF, Felicio LS. Radical ovarian resection advances the onset of persistent vaginal cornification but only transiently disrupts hypothalamic-pituitary regulation of cyclicity in C57BL/6J mice. *Biol Reprod* 1986; 35:957–964.
152. Nikolaou D, Templeton A. Early ovarian ageing: a hypothesis. Detection and clinical relevance. *Human Reproduction* 2003; 18: 1137-1139.
153. Nikolaou, D., Lavery, S., Turner, C., Margara, R. and Trew, G. Is there a link between an extremely poor response to ovarian hyperstimulation and early ovarian failure? *Hum. Reprod.* 2002; 17:1106-1111.
154. Olesiuk PF, Bigg MA, Ellis GM. Life history and population dynamics of resident killer whales (*Orcinus orca*) in the coastal waters of British Columbia and Washington State. Report of the International Whaling Commission 1990 (Special Issue 2). International Whaling Commission. Cambridge, UK.
155. Ottinger MA. Mechanism of reproductive aging: conserved mechanisms and environmental factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010; 1204:73-81.
156. Packer C, Tatar M, Collins A. Reproductive cessation in female mammals. *Nature* 1998; 392: 807–811.
157. Perez GI, Tilly JL. Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Human Reproduction* 1997; 12: 2781-2783
158. Piltonen T, Koivunen R, Ruokonen A, Tapanainen JS: Ovarian age-related responsiveness to human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3327-3332.
159. Rawlings NC and Bartlewski PM, Clinical reproductive physiology of ewes, chapter 87 in “Current therapy in large animal theriogenology” Saunders, 2007.
160. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65:1231–7.
161. Ricklefs R. The evolution of senescence from a comparative perspective. *Funct. Ecol.* 2008; 22: 379–392.
162. Ricklefs RE, Scheuerlein A, Cohen A. Age-related patterns of fertility in captive populations of birds and mammals. *Exp. Gerontol.* 2003; 38: 741–745.
163. Rosa H.J.H., Bryant M.J., Seasonality of reproduction in sheep, *Small Rum Res* 2003; 48:155-171.

164. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Looman CW, Blankenstein M, Fauser BC, teJong FH, teVelde ER. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod.* 2003; 18:700-706.
165. Singh J, Domínguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology.* 2004; 62:227-243.
166. Soules Mr, Battaglia DE, Klein NA. The endocrinology of ovarian (reproductive) aging in women. In: te Velde ER, Pearson PL, Broekmans FJ, editors. *Female reproductive aging.* New York: The Parthenon Publishing Group; 2000. p. 79–100.
167. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update.* 2002; 8:141-54.
168. te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BC: Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol* 1998, 145:67-73.
169. Thouas GA, Trounson AO, Jones GM. Effect of female age on mouse oocyte developmental competence following mitochondrial injury. *Biol Reprod* 2005;73:366–73.
170. Van Zonneveld P, Scheffer GJ, Broekmans FJM, te Velde ER. Hormones and reproductive ageing. *Maturitas* 2001; 38:83-94.
171. Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology* 2004; 62:1042-1055.
172. Yin W, Gore AC. Neuroendocrine control of reproductive aging: roles of GnRH neurons. *Reproduction* 2006; 131:403–414.



## Esperimento 2

*Effetto della supplementazione ormonale sulla funzionalità follicolare e sulla competenza allo sviluppo dell'oocita*

## Esperimento 2. Effetto della supplementazione ormonale sulla funzionalità follicolare e sulla competenza allo sviluppo dell'oocita

### *Funzione della melatonina e suo ruolo biologico*

La melatonina è una molecola molto diffusa in natura è sufficiente affermare che è presente nei batteri, organismi unicellulari eucarioti, macroalghe, in molte parti di piante più di 20 mono e dicotiledoni, in molte specie di



Figura 1. Formula della melatonina, 2D e 3D

invertebrati e vertebrati (Hardeland e Poeggeler, 2003). La melatonina trova largo impiego nella medicina cinese con più di 60 citazioni contenute in erbe medicinali indicate per la cura dell'invecchiamento (Chen e coll., 2003). La molecola inoltre è presente in elevate quantità in piante dell'area alpina e mediterranea che sono esposte ad alti livelli di raggi UV. La melatonina svolge diverse azioni fisiologiche segnalando non solo il momento del giorno e dell'anno ma anche svolgendo un'azione citoprotettiva come antiossidante, svolge un'azione antioncotica ed immunomodulatrice, ha azione ipnotica ed antidepressiva, interviene sul metabolismo osseo e delle affezioni cardiovascolari ed infine sulla maturazione sessuale e regolazione dell'attività riproduttiva.

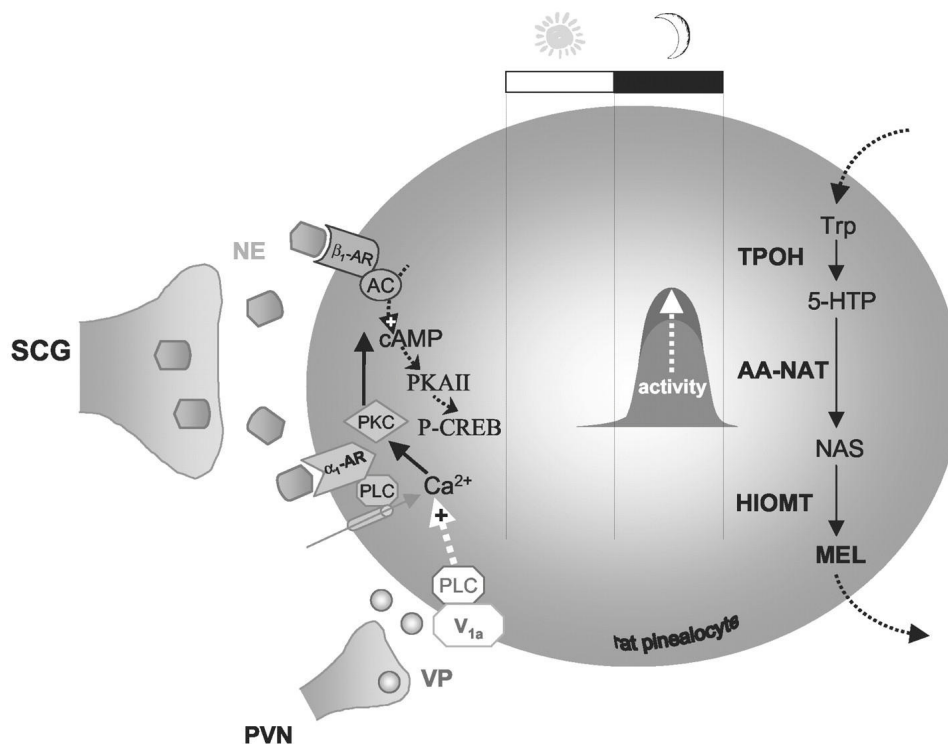
Il precursore della melatonina è costituito dal **triptofano** che viene assunto dal sangue e mediante l'intervento dell'enzima 5-idrossitriptofano viene convertito a serotonina. Questa molecola che ha implicazione sull'attività degli individui e sulla riproduzione viene trasformata in acetil-serotonina che rappresenta la molecola limitante la sintesi della melatonina e infine in seguito all'azione di una idrossiindole metiltransferasi viene convertita a melatonina. La sintesi avviene a livello della

ghiandola pineale mediante un attività ritmica circadiana con un alto livello durante la notte ed un basso livello di giorno (Claustrat e coll., 2005). Tuttavia la capacità di sintesi dell'ormone è presente anche in altri distretti e fra questi il tratto gastro-intestinale ha un ruolo di primo piano mostrando livelli centinaia di volte superiori alla ghiandola pineale.

La regolazione biosintetica della melatonina da parte della pineale viene mediata dal tratto retino-ipotalamico che proietta gli impulsi proveniente dalla retina al nucleo soprachiasmatico. Speciali foto recettori retinici contengono la melapsina sono coinvolti in questa proiezione. Attraverso il nucleo paraventricolare, le fibre passano dal SNC e mediante una serie di tappe intermedie arrivano alle fibre simpatiche pregangliari del ganglio cervicale superiore. Le fibre del ganglio cervicale superiore terminano successivamente sui pinealociti della epifisi e regolano, mediante la liberazione di nor-adrenalina, la liberazione della melatonina. Il rilascio della nor-adrenalina avviene durante la notte, la nor-adrenalina si lega ad un recettore beta adrenergico che attivando l'adenilciclastasi innesca la reazione a cascata nella cellula mediante un sistema delle Gs proteine. Durante il giorno l'attività elettrica del SNC è elevata ed in queste condizioni il rilascio della nor-adrenalina è limitata. La liberazione della melatonina è inoltre influenzata da una serie di neuropeptidi che potenziano l'azione della nor-adrenalina come il VIP e il neuropeptide Y (Carlberg, 2000). La melatonina, in relazione alla sua liposolubilità e quindi in grado di attraversare liberamente le membrane plasmatiche, non viene stoccata nella pineale ma viene immediatamente liberata nel SNC e nel circolo ematico raggiungendo in pochi istanti tutti i tessuti dell'organismo. La concentrazione nel liquido cerebro spinale è circa 20-30 volte superiore al sangue. L'inattivazione della molecola appare molto rapida con due l'emivite, la prima dopo appena 2 minuti e l'altra dopo 20 minuti. La melatonina in circolo viene principalmente viene principalmente metabolizzata a livello epatico dove subisce una prima idrossilazione in posizione C6 dal citocromo P450 monoossigenasi successivamente viene coniugata con solfati per essere

escreta come 6 sulfatossimelatonina; subisce anche la glucuronazione ma in misura molto limitata (Mayo e coll., 2005).

L'azione della melatonina viene mediata da due recettori MT1 e MT2 e sono i principali responsabili dell'effetto cronobiologico dell'ormone; il MT2 agisce principalmente mediante l'induzione della fase di cambiamento, mentre il MT1 su quella d'innescio. Esiste un terzo sito di legame (MT3) che viene principalmente impiegato contro gli stress ossidativi ed è mediato dall'enzima chinone redutasi (QR2); ancora il legame con i recettori per l'acido retinico ROR modula invece alcuni aspetti immunomodulatori. E' probabile che la diretta inibizione del passaggio della melatonina attraverso la membrana mitocondriale lascia intendere che anche su questo organulo citoplasmatico svolga la sua azione direttamente sulla catena respiratoria. I recettori per la Melatonina sono delle proteine G accoppiate e come recettori li possiamo trovare in vari tessuti del corpo, insieme o singolarmente. Nei mammiferi, i recettori della melatonina si trovano nel cervello e alcuni organi periferici. Tuttavia, vi è una notevole variazione nella densità e nella localizzazione dei recettori della melatonina tra le varie specie (Morgan e coll., 1994). Il sottotipo MT1 è presente nel pars tuberalis della ghiandola pituitaria e nel nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo. Il sottotipo MT2 è presente principalmente nella retina. Il sottotipo MT3 è presente pure in molti vertebrati inferiori ed è espresso in varie aree cerebrali.



**Figura 2.** Effetti intracellulari del VIP nella sintesi di MEL nei pinealociti di ratto. Il VIP, proveniente dal PVN (Nucleo ParaVentricolare), si lega al recettore accoppiato PLC-V1a, aumenta il livello intracellulare di  $Ca^{2+}$ , e potenzia l' $\beta_1$ -AR- inducendo un aumento dell'attività AA-NAT e la sintesi e il rilascio di MEL. SCG: Ganglio Cervicale Superiore; PKA: Protein-Kinasi tipo A; TPHO: triptofano-5-idrossilasi AA-NAT: Serotonin-N-Acetil-Transferasi; NAS: N-Acetil-Serotonina; HIOMT: Idrossindole-o-Metil-Transferasi-; (da Al Barassin e coll., 2000).

#### *Ruolo biologico della melatonina come fattore antioncotico*

Sono state riscontrate evidenze sperimentali che l'avvio, la crescita e la progressione di un tumore può essere limitata dal livello ematico di melatonina prodotta durante la notte. In prevalenza l'azione della melatonina, che deve essere somministrata a dosi fisiologiche o farmacologiche, si sviluppa su cellule tumorali estrogeni dipendenti. L'azione positiva della melatonina è stata osservata in particolare su svariati tumori cellulari includendo il carcinoma ovario ed uterino, i melanomi, i tumori della prostata e quelli a carico del tratto intestinale. La somministrazione della melatonina migliora inoltre anche l'attività dei soggetti con tumori non sensibili all'ormone. Il

meccanismo d'azione dell'ormone non è stato completamente spiegato ma si ritiene che l'azione antiossidante e limitante i radicali liberi potrebbe svolgere un ruolo determinate (Vijayalaxmi Thomas e coll., 2002).

*come molecola immunomodulatrice*

Eleganti studi sperimentali condotti sul topo hanno messo in evidenza che il blocco della sintesi di melatonina determina una diminuzione della risposta immunitaria sia umorale che cellulare. Inoltre la somministrazione di melatonina protegge i topi verso malattie virali a carico dell'encefalo. L'azione positiva dell'ormone si esplica anche a livello del midollo rosso delle ossa proteggendolo e preservando le cellule staminali da insulti esterni. L'azione della melatonina sul sistema immunitario provoca un incremento nella produzione di interleukina 2 e 6 in monociti e macrofagi coltivati in vitro. Sono stati messi in evidenza inoltre siti di legame dell'ormone sulle cellule del tessuto linfoideo che implicano in modo chiaro il coinvolgimento diretto dell'indolamina. Da alcuni è stata suggerito inoltre che un ulteriore attività dell'ormone pineale potrebbe essere svolta anche come azione antiapoptotica. E' stato osservato che il livello della melatonina durante la notte è direttamente correlata con la ritmicità dei linfociti T-helper.

*come molecola ipnotica*

Come è noto la melatonina promuove un azione di riposo negli animali ad attività diurna in relazione al fatto che la molecola viene prodotta durante la notte. Tale attività viene mediata dai recettori MT1 che sono prevalentemente presenti nel SNC. L'ingestione di 01-03mg di melatonina durante il giorno incrementa il livello circolatorio dell'ormone ed induce sonnolenza in soggetti normali. Per tale azione l'ormone viene consigliato nelle forme d'insonnia ma anche come coadiuvante nei trattamenti ipnotici con benzodiazepine determinando un incremento del riposo

sia in termini di durata che di sonno ristoratorio. Non tutte le prove sperimentali hanno dato risultati simili, la differenza potrebbe essere data dal fatto che i risultati positivi della somministrazione dell'ormone vengono acquisiti in particolare negli individui che mostrano livelli circolatori dell'ormone molto bassi mentre nessun beneficio nei soggetti con valori dell'indolamina elevati. Sempre nella specie umana sembra tuttavia abbastanza associato che l'impiego dell'ormone nei casi d'insonnia riferibili a persone di una certa età risulti essere consigliabile. La molecola svolge un ruolo importante anche nella sindrome depressoria. La somministrazione di agomelatina, un selettivo antagonista per i recettori MT1 e MT2 è risultato particolarmente attivo in condizioni di profonda depressione di diverse specie animali. Sempre in questa direzione, è stato osservato che la melatonina svolge un'influenza positiva anche sulla condizione mentale (Dollins e coll., 1994).

*come molecola cronobiotica*

Sempre partendo dalla constatazione che la melatonina viene prodotta di notte si è pensato che la sua somministrazione in soggetti con disturbi sul ritmo circadiano potesse determinare effetti positivi. Ebbene prove sperimentali in tal senso hanno confermato positivamente tale ipotesi ed il suo utilizzo in determinate condizioni migliora l'attività umana. In particolare si è osservato l'effetto positivo dell'ormone nei soggetti con turni di lavoro notturni che mostrano alterazioni nella produzione di melatonina, nel ritmo sveglia-sonno e nella risposta alla fatica. In questi soggetti si assiste ad una sorta d'inversione dell'attività dell'individuo e nei ritmi sonno-sveglia. Un ulteriore impiego positivo della melatonina è stato evidenziato nella sindrome del cosiddetto "jet lag" cioè il mancato adattamento ai nuovi ritmi circadiani. È un fenomeno che risulta manifesto in persone che sono costrette a spostarsi con voli aerei da un continente all'altro modificando i propri ritmi biologici. La somministrazione della melatonina in questi soggetti permette di

superare questi inconvenienti e li aiuta a reinserirsi nel nuovo ritmo circadiano. La somministrazione dell'ormone in soggetti con sindrome da jet lag ha evidenziato il pronto ripristino dei soggetti che avevano mostrato sonnolenza diurna e riduzione del livello di concentrazione. L'impiego dell'ormone si è dimostrato più efficace se comparato ad altri due prove come l'esposizione alla luce e l'attività fisica, per diminuire l'effetto del jet lag in atleti in procinto di svolgere gare sportive (Arendt 2005).

#### *come molecola antiulcera*

La melatonina non solo è presente nel tratto intestinale ma è anche secreta dalle cellule enterocromaffini. Il significato della sintesi dell'ormone è stato per diverso tempo un aspetto che ha incuriosito diversi ricercatori. L'ormone viene rilasciato in risposta all'arrivo del cibo dallo stomaco e, mediante il recettore MT<sub>2</sub>, stimola la liberazione del bicarbonato. È stata riscontrata una correlazione negativa fra l'incidenza dell'ulcera e livello della melatonina in suinetti sottoposti a situazione stressanti di allevamento. Nell'uomo si è riscontrato una esacerbazione dell'ulcera in individui con bassi livelli di melatonina. È probabile che effetto positivo di gastro protezione dell'indolamina nel tratto intestinale possa derivare dalla sua azione antiossidativa svolta nei confronti delle cellule. La melatonina esprime anche valori abbastanza alti nella bile e questi valori vengono spiegati come una ulteriore protezione della molecola verso le cellule intestinali nei confronti degli acidi biliari.

#### *come molecola antipressoria*

Evidenze recenti hanno mostrato come la melatonina influenza l'attività cardiaca e la pressione ematica nella specie umana. La somministrazione dell'indolamina incrementa l'attività vagale cardiaca e riduce contemporaneamente il livello circolatorio di nor-adrenalina. L'azione del vago



sul cuore è di frenarne l'attività diminuendo la forza di contrazione, la velocità di trasmissione, il periodo di refrattarietà e la frequenza cardiaca. La somministrazione di 1 mg della molecola a individui ipertesi determina una riduzione della pressione sistolica e diastolica e di conseguenza la pressione media ematica. L'azione ipotensiva dell'ormone potrebbe essere mediate oltreché direttamente sul cuore anche sui vasi ematici attraverso una vasodilatazione. In tal caso l'azione risulterebbe duplice e per questo motivo viene consigliata nella terapia per l'ipertensione essenziale (Scheer, 2005).

#### *come regolatore della massa corporea*

E' riconosciuto alla melatonina un ruolo nella spesa di energia da parte dell'organismo e nella regolazione del peso corporeo. Con l'età, il deposito dei lipidi a livello viscerale aumentano mentre diluisce il livello della melatonina. La somministrazione dell'ormone limita la deposizione dei lipidi nei visceri e riduce il peso corporeo. L'azione dell'ormone è mediata dai recettori MT2 che si trovano nel tessuto adiposo. Tuttavia nella specie umana è possibile osservare che l'obesità non è associata a significative modificazioni del livello circolatorio di melatonina (Prunet-Marcassus e coll., 2003).

#### *come antagonista degli insulti ossidativi*

La scoperta che la melatonina sia in grado di bloccare l'effetto dei radicali liberi ha portato ad una serie di studi per conoscere il meccanismo d'azione. In tutte le cellule e negli spazi extracellulari, la melatonina può essere metabolizzata non per via enzimatica ma ossidata da radicali liberi e da altri ossidanti nelle due sue forme formil 5-metossikinuramina (AFMK) e acetil 5-metossikinuramina (AMK). La via metabolica di passaggio dalla melatonina all'AFMK è in grado di consumare 4 moli di radicali liberi. I primi risultati hanno inoltre mostrato che l'ormone appare

molto più attivo degli altri analoghi naturali. E' stato visto che la melatonina incrementa l'attività respiratoria mitocondriale e la sintesi dell'ATP. L'effetto della melatonina sulla catena respiratoria può costituire una nuova opportunità per la prevenzione della formazione dei radicali e per l'eliminazione dei radicali liberi già formati. Il modello proposto si configura all'interno della catena respiratoria per un ciclo di donazione di elettroni al citocromo C che potrebbe generare un radicale cationico in modo da competere, come un alternativo accettore di elettroni, con la molecola dell'ossigeno per gli elettroni e diminuire la formazione dell'anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Questo composto come è noto è il più pericoloso radicale libero che si forma nelle cellule ed è il responsabile principale degli insulti ossidativi. Il meccanismo di difesa della cellula è di convertire l'anione superossido ad acqua ossigenata tramite l'intervento della superossido dismutasi e successivamente bloccare questo composto tramite il glutathione cellulare. La protezione mitocondriale ad opera del AMK è stata dimostrata sperimentalmente e sviluppa la sua attività sul flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria migliorando la sintesi dell'ATP (Tan e coll., 2003).

#### *come modulatore dell'attività riproduttiva*

Il successo riproduttivo di molte specie animali è garantito dall'andamento sincrono tra attività sessuale e le variazioni climatiche stagionali. Tale andamento dei processi riproduttivi fa sì che il parto e la crescita dei piccoli avvenga in un periodo dell'anno, solitamente in primavera, quando le temperature ambientali e la disponibilità del cibo sono ottimali sia per la vita del neonato che per la produzione latte della madre (Bittman e coll., 1983; Barrel e coll., 2000).

Il fattore ambientale maggiormente coinvolto in questo controllo è il fotoperiodo, in quanto, a latitudini temperate (tra 30° e 60° di latitudine Nord) è il segnale più attendibile delle variazioni stagionali. La Sardegna si trova nella parte bassa della zona temperata boreale ed è compresa tra i

38° 51' 52" e i 41° 15' 42" di latitudine Nord e tra gli 8°8'10" e 9°50'8" di longitudine Est. Nelle differenti specie, il fotoperiodo agisce in modo diverso nel regolare l'attività riproduttiva. Una delle principali caratteristiche della riproduzione ovi-caprina è la stagionalità, infatti la pecora e la capra sono delle specie poliestrionali stagionali che alternano periodi di anaestro a quelli di attività sessuale. Nelle regioni temperate, come già asserito sappiamo che la stagionalità è regolata dal fotoperiodo, ossia dalla durata delle ore di luce nell'ambito della giornata. Riducendo le ore di luce si stimola l'attività sessuale mentre aumentando le ore di luce si induce l'anaestro. I piccoli ruminanti vengono quindi definiti come specie a fotoperiodo decrescente oppure col termine anglosassone di short day breeders. Ovviamente la stagionalità riproduttiva non è prerogativa solo dei piccoli ruminanti ma anche degli equidi e dei roditori, con la differenza che questi ultimi sono dei long day breeders ossia iniziano la loro stagione riproduttiva in concomitanza dell'aumento delle ore di luce giornaliere, hanno cioè un fotoperiodo crescente.

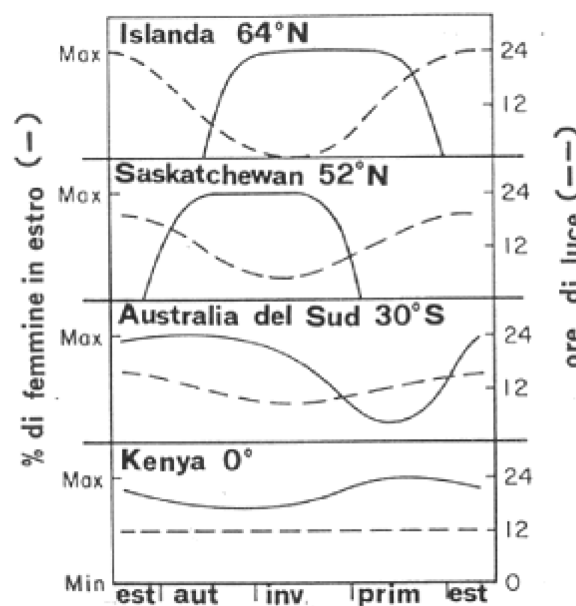


Figura 3. Percentuale di pecore in estro in relazione alle ore di luce a diverse latitudini.

Nelle specie che risentono del fotoperiodo, come gli ovini ed i caprini, anche la latitudine riveste una notevole importanza nel determinare il grado di stagionalità riproduttiva. L'attività riproduttiva alle alte latitudini, dove si hanno ampie variazioni circannuali del rapporto luce/buio è fortemente stagionale. Le femmine presentano un lungo periodo di anaestro (Malpoux, 2002) e i maschi manifestano una scarsa libido e uno scadimento della qualità del seme durante i giorni lunghi (Avdi M, 2004). Infatti, razze presenti nelle latitudini più a nord presentano una stagionalità riproduttiva molto ben definita a partire dal solstizio d'estate (21 giugno) per avere un'attività massima nel periodo autunnale e ed inizio inverno. A latitudini inferiori la stagionalità riproduttiva è meno marcata, evidenziata da una minore durata del periodo anaestrato durante il quale accade che una piccola percentuale di pecore ovula comunque spontaneamente (area mediterranea). Nelle zone sub-tropicali ed equatoriali, dove il fotoperiodo è pressoché costante, si manifesta un'attività riproduttiva continua con parti durante tutto l'anno e anche i maschi non presentano modificazioni circannuali dell'attività sessuale e divengono quindi come una specie poliestrato continua, quale il bovino. Il trasferimento di animali all'emisfero opposto, dove la stagione è sfasata di 6 mesi, induce una re-sincronizzazione dell'attività riproduttiva con l'adattamento di questi al nuovo fotoperiodo (Sweeney, 1997). Durante la stagione non riproduttiva di anaestro normalmente non si osservano calori. Infatti i comportamenti tipici dell'estro sono assenti, ciononostante la dinamica follicolare resta molto attiva pertanto si osservano ugualmente ondate di crescita follicolare seguite da successiva regressione senza ovulazione. L'importanza del fotoperiodo nel determinare la stagionalità riproduttiva è dunque evidente ma risulta più complesso spiegare come questo fattore eserciti la sua azione a livello degli organi che controllano l'attività sessuale. Il segnale luminoso percepito dalla retina viene tradotto in impulso nervoso che viene trasformato in messaggio chimico, la melatonina, dalle cellule della ghiandola pineale, i pinealociti. L'epifisi, pertanto può essere considerata come un trasduttore

neuroendocrino, che producendo la melatonina in maggior quantità durante le ore di buio informa l'organismo della variazione giornaliera e stagionale del fotoperiodo (Goldman, 1999). In letteratura esistono numerose esperienze che testimoniano il ruolo fondamentale che la melatonina svolge nell'attività riproduttiva in particolare nelle specie condizionate dalla stagione. Come è noto un piccolo numero di neuroni presenti a livello ipotalamico è responsabile della produzione di un ormone il GnRH che attraverso il circolo portale ipotalamo-ipofisario regola la liberazione delle gonadotropine ipofisarie LH e FSH che sono gli ormoni responsabili della crescita e dello sviluppo del follicolo. (Tamarkin e coll., 1985). E' stato osservato come la melatonina influenzi pesantemente la secrezione del GnRH mediante i recettori MT1, MT2 e ROR (Malpoux e coll., 2002).

I primi studi avevano individuato nei neuroni dell'area pre-ottica e mediobasale dell'ipotalamo il sito d'intervento dell'azione riproduttiva della melatonina. La ulteriore dimostrazione che i recettori per la melatonina erano presenti negli organi riproduttivi e che recettori per gli ormoni sessuali delle gonadi erano presenti nell'epofisi lasciava chiaramente intendere l'esistenza di una reciproca influenza. E' stato osservato negli individui impuberi appartenenti a specie di laboratorio che la caduta del livello di melatonina nel sangue può costituire un segnale per un aumento della frequenza pulsatile del GnRH e permettere l'avvento della pubertà. Sempre nel topo, specie animale che si riproduce nei giorni lunghi, l'impianto di melatonina in questa area ipotalamica ne bloccava l'attività riproduttiva. La stessa esperienza condotta invece negli ovini determinava invece una ripresa dell'attività riproduttiva (Barrell e coll., 2000).

L'azione dell'ormone quindi appare di stimolo all'attività riproduttiva nelle specie che si riproducono nei giorni corti e di inibizione nelle specie che si riproducono nei giorni lunghi.

Alle latitudini temperate, quali quelle dell'area mediterranea, gli ovi-caprini presentano una attività riproduttiva legata all'andamento del fotoperiodo. Infatti, la diminuzione delle ore di luce determina una ripresa dell'attività ovarica con la conseguente stagione degli accoppiamenti. Tale comportamento è essenziale per la conservazione della specie ma è poco funzionale per gli animali in produzione zootecnica. Infatti, l'addomesticamento in molte specie, per esempio bovini e suini, ha portato alla scomparsa della stagionalità riproduttiva poiché alcune prerogative che la determinavano sono venute a mancare per l'intervento dell'uomo, disponibilità del cibo, ricoveri, ecc. (Rosa, 2003). Negli ovi-caprini, invece, anche per la tipologia di allevamento semibrado, legato quindi alle risorse naturali, ancora è presente in un certo grado. Questo andamento della riproduzione consente uno sfruttamento non ottimale di questi animali e ciò è molto evidente negli ovini da latte come la razza Sarda. Infatti, i parti in primavera consentono pochi mesi di lattazione poiché l'arrivo dell'estate, le alte temperature ambientali ed il graduale depauperamento dei pascoli, determinano un abbassamento della produzione lattea tanto da far sopraggiungere la fase di asciutta.

La stagionalità non influisce solo sugli animali adulti ma condiziona altresì il raggiungimento della pubertà nei giovani. Nonostante la genetica giochi il ruolo predominante nel determinare l'età della pubertà, anche la stagione in cui nascono gli agnelli può portare ad un accorciamento oppure un ulteriore ritardo nel raggiungimento della pubertà anche di diversi mesi (Fig.3).

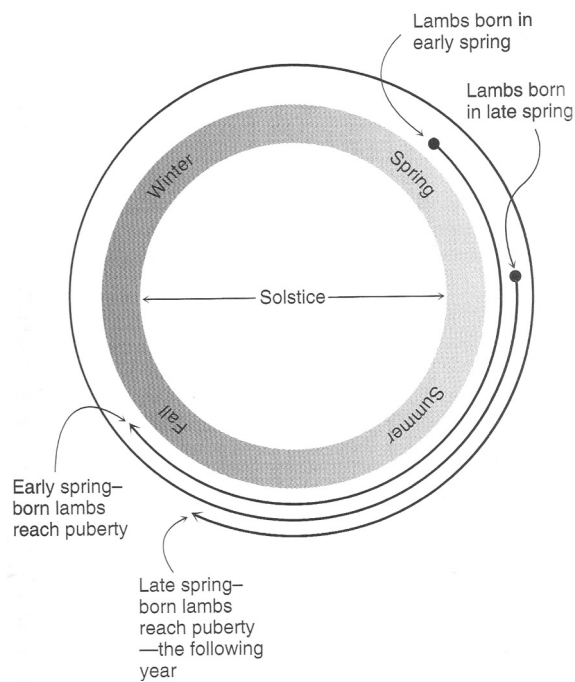


Figura 4. Correlazione tra periodo di nascita degli agnelli, lunghezza ore di luce ed età al raggiungimento della pubertà (RS Youngquist, Current therapy il L.A. animals Theriogenology, 2007).

### **Scopo del lavoro**

Nella maggior parte delle specie animali, ed in qualche misura anche nell'uomo, l'attività riproduttiva è governata da variazioni stagionali nella frequenza del concepimento. Attraverso il ritmo circadiano della melatonina il fotoperiodismo registra le modificazioni nel ciclo annuale della durata delle ore di luce e questo segnale è utilizzato per sincronizzare le fluttuazioni riproduttive stagionali (Weir e coll., 2001). La melatonina agisce anche direttamente sull'ovaio (Nakamura e coll., 2003; Tamura e coll., 1998). I recettori per la melatonina sono stati identificati nelle ovaie di ratti, di topi e di donna (Soares e coll., 2003; Lee e coll., 2001; Niles e coll., 1999). Elevati livelli di melatonina, soggetti a variazioni stagionali (Yie e coll., 1995), sono stati

determinati nel fluido follicolare nella specie umana, in cui raggiungono valori anche 3 volte maggiori di quelli presenti nel circolo ematico (Brzezinski e coll., 1987; Ronnberg e coll., 1990). Sebbene si ritenga che la melatonina presente a livello ovarico derivi da quella ematica, potrebbe anche essere sintetizzata nell'ovaio dato che sono stati ritrovati sia i precursori dell'ormone che gli enzimi responsabili della sua sintesi nelle ovaie di ratto (Itoh e coll., 1997) e di donna (Itoh e coll., 1999). Studi effettuati in vitro hanno dimostrato che la melatonina stimola la secrezione di progesterone da parte delle cellule della granulosa in differenti specie animali e che agisce in sinergia con l'HcG nello stimolare la secrezione di progesterone (Yie e coll., 1995; Brzezinski e coll., 1992). Inoltre, la melatonina è stata utilizzata con successo nel promuovere la produzione embrionale in vitro in numerose specie, quali il topo (Ishizuka e coll., 2000), il bufalo (Manjunatha e coll., 2007), la bovina (Papie e coll., 2007) e il suino (Rodriguez-Osorio e coll., 2007; Kang e coll., 2008). In ragione di questi risultati, la melatonina è stata proposta come trattamento per l'infertilità (Tamura e coll., 2008).

Ad oggi, molti aspetti riguardanti le azioni in vivo dell'indolamina sui follicoli e sugli oociti restano da essere approfonditi. Di conseguenza, questo studio è stato portato avanti con lo scopo di esaminare gli effetti della melatonina sulla crescita dei follicoli ovarici e sulla competenza allo sviluppo degli oociti. Come modello sperimentale sono state utilizzate capre in anastro stagionale al fine di minimizzare le variazioni nei livelli degli ormoni steroidei e delle gonadotropine che caratterizzano il ciclo estrale. Inoltre, la caratterizzazione della dinamica follicolare (Gonzalez-Bulnes e coll., 2006; Menchaca e coll., 2007) e la produzione embrionale in vitro (Jimenez-Macedo e coll., 2006; Katska-Ksiazkiewicz e coll., 2007) in questa specie sono ormai consolidate. Inoltre, sono stati valutati gli effetti della melatonina sulla qualità degli embrioni prodotti, valutata come resistenza alla vitrificazione ed espressione di un panel di geni relazionati alla competenza allo sviluppo degli embrioni pre-impianto.



## ***Materiali e Metodi***

### **Animali e disegno sperimentale**

Tutti gli animali utilizzati erano capre sarda pluripare, di età compresa fra i 4 ed i 6 anni, e mantenute nei recinti della facoltà in assenza di becchi. Gli animali erano esenti da malattie parassitarie ed infettive e mantenevano una buona condizione corporale valutabile intorno ai 3.25 della scala internazionale (BCS). Le condizioni di mantenimento erano costituite da una alimentazione rappresentata da fieno di prato polifita con l'aggiunta di 250 gr. di concentrato al giorno. All'interno dei recinti gli animali potevano spostarsi liberamente per evitare fenomeni stressanti derivanti da scala gerarchica. Il lavoro sperimentale è stato effettuato nel periodo compreso tra marzo e maggio, che coincide con il periodo anaestrato (gennaio – agosto) descritto per questa specie a questa latitudine.

Al fine di investigare gli effetti della melatonina sulla crescita follicolare e sulla competenza allo sviluppo dell'ocita, sono stati portati avanti due esperimenti consecutivi. In entrambi i casi, gli animali venivano suddivisi in due gruppi: uno riceveva un impianto contenente 18 mg di melatonina (Melovine; CEVA VETEM, Milano, Italy) alla base dell'orecchio, mentre l'altro non trattato costituiva il gruppo controllo.

Nel primo esperimento, gli effetti della melatonina sulla dinamica follicolare sono stati valutati in 7 capre trattate ed in 5 capre controllo. La dinamica follicolare veniva valutata quotidianamente mediante ecografia transrettale dal giorno 7 (giorno 0= giorno dell'inserzione dell'impianto di melatonina) al giorno 27 , per un totale di 21 giorni corrispondenti alla durata di un ciclo durante la stagione riproduttiva.

Il secondo esperimento è stato condotto allo scopo di determinare gli eventuali effetti della supplementazione di melatonina sulla qualità dell'ocita, intesa come competenza allo sviluppo in vitro. Lo sviluppo follicolare è stato stimolato in 7 capre trattate ed in 6 capre controllo mediante

la somministrazione di 175 U.I. di FSH (Folltropin, Bioniche Animal Health, Bio 98, Milano, Italy) suddivise in 6 dosi costanti ogni 12 ore, da giorno 28-30 dopo l'inserzione dell'impianto di melatonina. Al giorno 31, 12 ore dopo l'ultima somministrazione di FSH, le ovaie sono state recuperate mediante ovariectomia e processate per il recupero degli oociti e la produzione embrionale in vitro. In seguito, la competenza allo sviluppo è stata valutata in termini di numero totale di blastocisti prodotte e loro criotolleranza. Inoltre, nelle blastocisti così ottenute è stata quantificata mediante Real Time PCR l'espressione di un panel di geni i cui trascritti sono stati correlati con la qualità embrionale (Leoni e coll., 2008).

### **Valutazione morfometrica dei follicoli**

Come precedentemente descritto

### **Maturazione, fertilizzazione e coltura in vitro degli oociti**

Immediatamente dopo il prelievo, le ovaie provenienti dai due gruppi sperimentali venivano poste in una soluzione salina tamponata (PBS, Sigma) addizionata di antibiotici (penicillina e streptomina 5 mg/100 ml) e trasferite in laboratorio. Il recupero degli oociti è avvenuto seguendo una tecnica già da tempo utilizzata nel nostro laboratorio; dopo essere state lavate per due volte in PBS le ovaie venivano dissezionate per l'isolamento dei follicoli. Tutte queste operazioni sono state eseguite a temperatura ambiente sotto una cappa a flusso laminare. Dai follicoli così dissezionati veniva liberato l'oocita mediante rottura della parete follicolare con un ago di 18 gauge in una piastra petri contenente medium di dissezione costituito da TCM 199 contenente HEPES per stabilizzare il pH, antibiotici, e 0.1% di alcool polivinilico come macromolecola inerte. I complessi cumulo-oocita presenti nel medium venivano selezionati in relazione ad alcune caratteristiche morfologiche e strutturali. Sono stati infatti selezionati solo quelli provvisti di almeno 4 strati di cellule della granulosa, con citoplasma uniforme e omogenea

distribuzione dei lipidi. Dopo essere stati lavati in medium di dissezione per 2 volte sono stati sottoposti a maturazione in vitro per il completamento della meiosi.

Il medium di coltura era costituito dal TCM 199 contenente il 10% di siero di capra in estro, antibiotici, FSH e hCG 0.1 UI/ml, cisteamina 100µM e piruvato 8 mg/ml. Il sistema di maturazione era costituito da 0,5 ml di medium in una piastra four wells Nunc per colture cellulari ricoperto da paraffina liquida in cui erano coltivati per 24 ore da 25 a 40 complessi cumulo oocita a 39 °C in ambiente di massima umidità, con il 5% di CO<sub>2</sub> in aria atmosferica.

Dopo maturazione i complessi cumulo-oocita venivano parzialmente denudati dalle cellule della granulosa, e fertilizzati in vitro. Il medium di fertilizzazione era composto da Synthetic Oviductal Fluid (SOF) supplementato con il 2% di siero di capra in estro (v/v), 50 µg/ml di streptomicina e 50 IU/ml di penicillina, eparina 10 mg/ml ed ipotaurina 1 mg/ml. Il seme utilizzato per la fertilizzazione proveniva da un unico becco di provata fertilità ed era stato precedentemente congelato in un extender (Tris 375 mM, acido citrico 124 mM, glucosio 41 mM) supplementato del 20% di tuorlo d'uovo e del 4% di glicerolo. Lo scongelamento veniva effettuato ponendo il pellet in una falcon sterile di vetro in un bagno d'acqua a 39°C per 20 secondi. Dopo scongelamento aliquote di seme venivano trasferite in tubi conici di vetro sterilizzati alla base di una colonna liquida di 1 ml di SOF e incubate per 15 minuti in condizioni standard. Gli spermatozoi mobili ottenuti mediante swim-up venivano diluiti in SOF equilibrato con una concentrazione finale di  $1 \times 10^6$  spermatozoi/ml e co-incubati in pozzetti ricoperti da olio minerale con una media di 30 oociti maturi per pozzetto in condizioni di massima umidità a 39°C, 5% di CO<sub>2</sub>, 5% di O<sub>2</sub>, e 90% di N<sub>2</sub>. Dopo 24 h i presunti zigoti venivano lavati e posti in coltura in four-well Petri contenente SOF + 0,4% di BSA (bovine serum albumin) supplementato con una miscela di aminoacidi essenziali e non essenziali a concentrazione oviduttale, ricoperti con olio minerale in condizioni atmosferiche

di massima umidità con 5% di CO<sub>2</sub>, 5% di O<sub>2</sub>, 90% di N<sub>2</sub> e coltivati per 8 giorni sino al raggiungimento dello stadio di blastocisti.

## **Vitrificazione degli embrioni prodotti**

Come precedentemente descritto.

## **Analisi dell'espressione genica**

I campioni di mRNA sono stati ottenuti da pools di 3 blastocisti ri-espansi in seguito a vitrificazione e ripristino della temperatura. Gli embrioni venivano rimossi dal medium di coltura e posti in 2 mL di acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC); in seguito venivano immersi in azoto liquido e conservati a -80°C fino ad analisi.

Gli RNA messaggeri (mRNA) sono stati isolati con il kit Dynabeads Oligo (dT)25 (DynaL A.S. Oslo, Norway). La purificazione dell'mRNA avviene grazie all'appaiamento tra i nucleotidi del poliA presente all'estremità 3' di ogni mRNA e gli oligo dT legati covalentemente alla superficie delle microsferiche magnetiche Dynabeads. Mentre il DNA e l'RNA di altro genere sono eliminati con il resto del campione durante i lavaggi, gli mRNA legati alle microsferiche magnetiche sono trattiene grazie ad un separatore magnetico (Magnetic Particle Concentrator, Dynal MPC®). Ad ogni provetta contenente il campione da analizzare, precedentemente conservata a -80°C, sono stati aggiunti 50 µl di Lysis buffer. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti, sono stati aggiunti 10 µl di Dynabeads, precedentemente condizionate con lysis/binding buffer. I campioni sono stati incubati a 25°C, in agitazione, per 5 minuti ed in seguito posti nel separatore magnetico per 2 minuti. Il sovrantante è stato rimosso e i poli(A)+RNA sono stati lavati una volta con 60 µl di Washing Buffer A (10 mM Tris HCl pH 7,5; 0,15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0,1% LiDS) e 3 volte con 60 µl di Washing Buffer B (10 mM Tris HCl pH 7,5; 0,15 M LiCl, 1 mM EDTA). I poli(A)+RNA sono stati infine eluiti dalle sfere magnetiche tramite incubazione in 11µl di acqua trattata con DEPC per 2

minuti a 65°C. Le aliquote di mRNA sono state immediatamente utilizzate per la trascrizione inversa.

Il DNA complementare all'mRNA è stato sintetizzato tramite una reazione di trascrizione inversa (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: RT-PCR). La reazione è stata effettuata in un volume finale di 20 µl, contenente TrisHCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 5 mM, dNTPs 1 mM, Random Hexamer Primers (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2,5 µM, 20 U di RNase OUTTM (Invitrogen Carlsbad, CA,) e 100 U di SuperScript™ III RT (Invitrogen, Carlsbad, CA). I campioni sono stati tenuti a 25°C per 10 minuti, poi a 42°C per 1 ora, ed infine a 70°C per 15 minuti per inattivare la reazione. Come controlli negativi sono stati utilizzati un campione costituito dalla miscela di reazione per la sintesi di cDNA e non contenente l'mRNA, ed un campione costituito dalla miscela di reazione, contenente l'mRNA, ma non l'enzima trascrittasi inversa.

#### **Quantificazione relativa dei trascritti tramite Real Time PCR**

La quantificazione degli mRNA di tutti i geni analizzati nelle due classi di embrioni (n=4 trattati con melatonina; n=5 controllo) è stata effettuata tramite Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). La reazione è stata effettuata in uno strumento BioRad iCycler™ (Bio-Rad, USA), in 25 µl di miscela di reazione contenente 12,5 µl 2x Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,025 nM Fluorescein Reference Standard (Molecular Probes – Invitrogen Detection Technologies, Leiden, The Netherlands), 200 nM di ogni primer e una quantità di cDNA equivalente a 0.1 embrione. I primers utilizzati sono rappresentati nella tabella 1. Il protocollo di PCR è costituito da due fasi di incubazione (50°C per 5 minuti and 95°C per 2 minuti) seguiti da 40 cicli di amplificazione (15 secondi a 95°C, 30 secondi alla temperatura di annealing (specifica per ogni gene; vedi tabella 1) e 30 secondi a 72°C), il programma per la curva di dissociazione (melting curve program: 65°C – 95°C, con misurazioni della fluorescenza ogni 10 secondi) ed una fase finale

di raffreddamento a 4°C. Nel corso dei cicli di amplificazione, la fluorescenza è stata misurata durante la fase di estensione a 72°C. La curva di dissociazione è stata generata per verificare la specificità del prodotto di amplificazione. Per ridurre al minimo le variazioni dovute alle procedure sperimentali, l'analisi di tutti i campioni sono state effettuate contemporaneamente ed utilizzando una miscela di reazione comune, contenente tutti i reagenti a parte i campioni di cDNA. Le dimensioni dei frammenti amplificati sono state ulteriormente verificate tramite visualizzazione su gel di agarosio. Una miscela costituita da un'aliquota di 10 µl dell'amplificato e 2,5 µl di loading buffer (0,25% blu di bromofenolo, 0,25% xilene cianolo, 40% (w/v) saccarosio in acqua) è stata caricata in un gel di agarosio al 2% in TBE 0,5 X (Tris base 0,89 M, acido borico 0,89 M, Na<sub>2</sub>EDTA 20 mM) con Etidio Bromuro 0,002 M. Il gel è stato sottoposto a corsa elettroforetica in una camera orizzontale contenente TBE 0,5 X ad una potenza costante di 80 W. Il prodotto di reazione è stato visualizzato esponendo il gel su un transilluminatore a raggi UV. I prodotti della PCR sono stati sequenziali (Applied Biosystem, Model 3130 xl Genetic Analyzer, Foster City, CA, USA) dopo purificazione e le sequenze sono state confermate attraverso il Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Tabella 1. Informazioni sui primers utilizzati per l'amplificazione.

| Gene           | GenBank accession number | Sequence   | Annealing Temperature | Location  | Size (bps) |
|----------------|--------------------------|--|-----------------------|-----------|------------|
| HSP90 $\beta$  | AB072369                 | 5' tggagatcaaccctgacca 3'<br>5' ctctcgcttgaggatccc 3'    | 56°C                  | 1959-2101 | 143        |
| Ccnd1          | L26548                   | 5' cagtgtatgacaggtaatgc 3'<br>5' cgtagtccagcatagtagt 3'  | 56°C                  | 1089-1222 | 134        |
| $\beta$ -actin | NM_001009784             | 5' ttctgggtatggatcctg 3'<br>5' ggtgatctcctctgcatcc 3'    | 60°C                  | 532-678   | 162        |
| Atp1a1         | X02813                   | 5' gctgacttggtcatctgcaa 3'<br>5' cattccagggcagtaggaaa 3' | 58°C                  | 3052-3180 | 129        |
| E-Cad          | NM_001002763             | 5' tgtgactgtgatggatcgt 3'<br>5' accctctcctccgaacaag 3'   | 58°C                  | 2056-2207 | 155        |
| Aqp3           | AF123316                 | 5' ggtgcccattgtctctcc 3'<br>5' acgaggagaatgtgaagttg 3'   | 60°C                  | 500-618   | 119        |

## Analisi statistica

I dati ultrasonografici sono stati riassunti al fine di caratterizzare il pattern di sviluppo follicolare durante il periodo di studio. In primo luogo, i follicoli presenti sulla superficie ovarica sono stati classificati a seconda del loro diametro maggiore in quattro categorie: follicoli totali (mm), piccoli (3-3.4 mm), medi (3.5-4.4 mm) e grandi ( $\geq$  4.5 mm). In seguito, i dati sullo sviluppo di ogni singolo follicolo sono stati utilizzati per caratterizzare le ondate follicolari in base al (a) giorno di insorgenza dell'onda, considerato come primo giorno nel quale i follicoli venivano visualizzati a 3 mm di diametro; (b) fase di crescita (durata), definita come il tempo necessario al follicolo per raggiungere il suo massimo diametro; (c) fase di regressione (durata), definita come il tempo necessario al follicolo per passare dal diametro massimo a quelli minimo; (d) fine dell'onda, cioè il giorno nel quale in follicolo dominante terminava la fase di regressione; (e) durata dell'onda, cioè il tempo necessario al follicolo dominante per crescere da 3 mm al suo massimo diametro e poi regredire. Gli effetti del giorno e dell'onda di accrescimento follicolare sulle caratteristiche

individuali del follicolo dominante e sul numero e le dimensioni del restante pool follicolare sono state studiate tramite ANOVA. Il  $\chi^2$  test, o il Fisher exact test quando appropriato, è stato utilizzato per determinare le differenze nella competenza allo sviluppo e nella ri-espansione e schiusa delle blastocisti dopo le procedure di vitrificazione e ripristino della temperatura. La quantificazione relativa dell'espressione dei geni analizzati è stata effettuata mediante il metodo 2-ddCt (Livak et al., 2001), normalizzando l'espressione dei geni con il livello dei trascritti del gene endogeno della  $\beta$ -actina (Robert e coll., 2002). In breve, per ogni campione, il numero di Ct del gene di controllo ( $\beta$ -actina) è stato sottratto dal numero di Ct del gene in esame (ottenendo un  $\Delta$ Ct). In seguito, al numero medio di Ct di un gruppo è stato attribuito il valore zero e quello del secondo gruppo è stato espresso come la "differenza in Ct" rispetto al primo (ottenendo un  $\Delta\Delta$ Ct). Dopo aver verificato la distribuzione normale dei dati e la varianza usando rispettivamente i tests di Kolmogorov-Smirnov e di Levene, i dati sui trascritti venivano studiati tramite ANOVA. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il programma Statgraphic Centurion XV (versione 15.2.06 per Windows; StatPoint Inc., Herndon, VA, USA) e una probabilità  $\alpha=0.05$  è stata considerata come livello minimo di significatività. Tutti i risultati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M.

## ***Risultati***

Lo studio ecografico ha indicato che sia nelle pecore trattate con melatonina che in quelle controllo lo sviluppo follicolare era caratterizzato da ondate di accrescimento ben definite (figura 1); d'altra parte, sono state individuate differenze significative tra i due gruppi nelle caratteristiche delle ondate follicolari (tabella 2). Il trattamento con melatonina ha determinato lo sviluppo di più ondate durante il periodo di studio ( $5.2 \pm 0.2$  vs  $4 \pm 0.3$ ;  $p < 0.05$ ) dato che le onde duravano in media 2 giorni in meno rispetto al gruppo controllo ( $p < 0.001$ ). queste differenze nella



durata totale delle onde era causate fundamentalmente da una fase di crescita più veloce del follicolo dominante ( $p < 0.05$ ), dato che le differenze nella durata della fase di regressione non erano significative. D'altra parte, non c'era differenza tra i due gruppi sperimentali tra il diametro massimo raggiunto dal follicolo dominante.

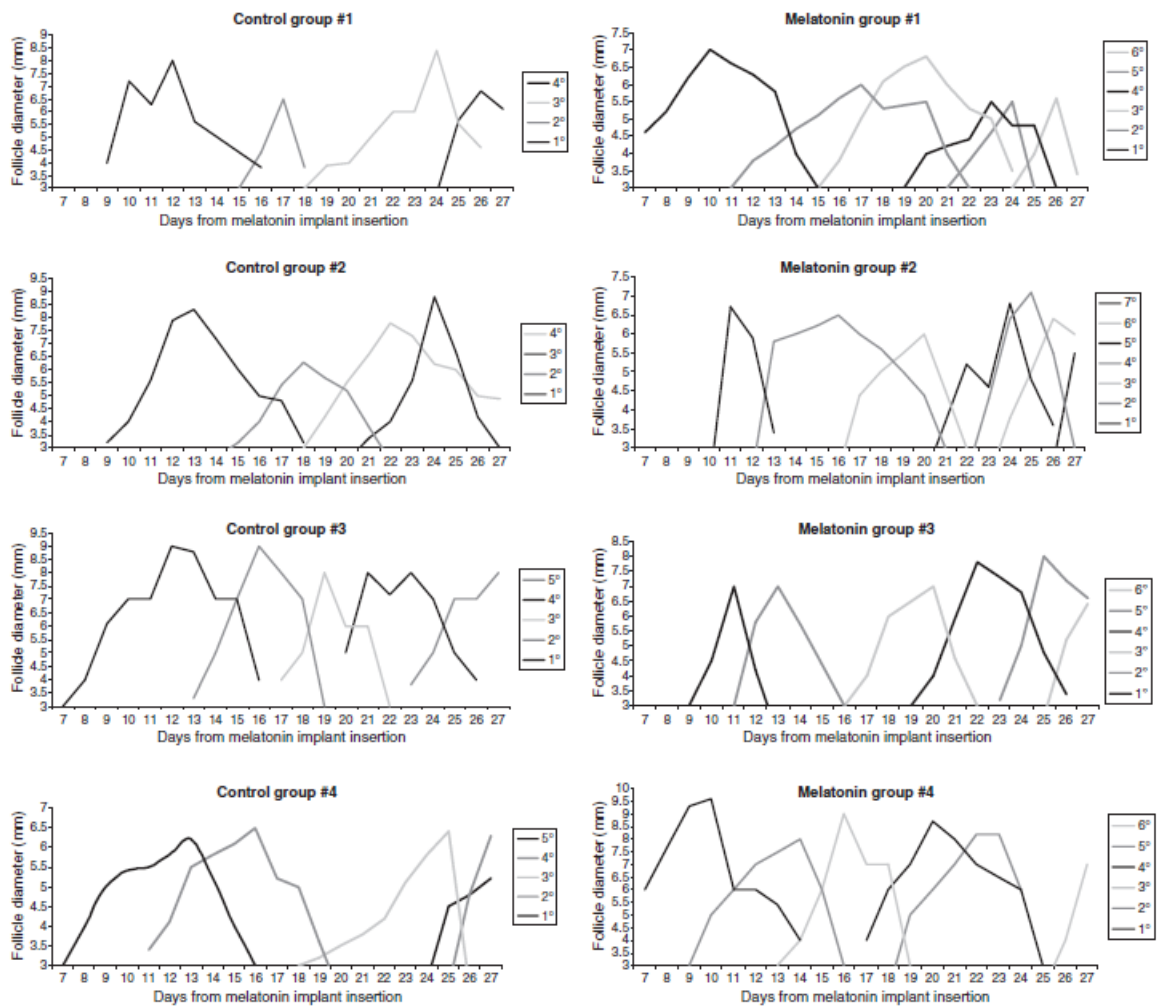


Figura 1. Pattern di accrescimento delle ondate follicolari in pecore Sarde trattate con un impianto sottocutaneo di melatonina (melatonin group) o non trattate (control group) durante l'anaestros stagionale.

Tabella 2. Caratteristiche delle ondate di accrescimento follicolare in capre Sarde Sarde trattate con un impianto sottocutaneo di melatonina (melatonin group) o non trattate (control group) durante l'anaestrosi stagionale.

|   | CTR (media $\pm$ SE)       | MEL (media $\pm$ SE)       |
|---|----------------------------|----------------------------|
| Numero di ondate follicolari                | 4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>   | 5.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> |
| Lunghezza delle ondate follicolari (giorni) | 8.7 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup> | 6.9 $\pm$ 0.3 <sup>d</sup> |
| Diametro massimo del FD (mm)                | 7.4 $\pm$ 0.2              | 7 $\pm$ 0.2                |
| DF tasso di accrescimento (mm/giorno)       | 0.9 $\pm$ 0.1              | 1.1 $\pm$ 0.1              |
| DF tasso di regressione (mm/giorno)         | 1.3 $\pm$ 0.2              | 1.4 $\pm$ 0.1              |
| DF fase di accrescimento (giorni)           | 5.1 $\pm$ 0.3 <sup>e</sup> | 4 $\pm$ 0.2 <sup>f</sup>   |
| DF fase di regressione (giorni)             | 3.6 $\pm$ 0.3              | 2.9 $\pm$ 0.2              |

All'interno della stessa riga, lettere differenti indicano una differenza statisticamente significativa: a $\neq$ b: P<0.05; c $\neq$ d: P = 0.001; e $\neq$ f: P < 0.005 (ANOVA unidirezionale). FD= follicolo dominante.

Non sono state riscontrate differenze significative nel numero totale di oociti ottenuti dal gruppo controllo (n=192) e dai animali trattati con melatonina (n=265; tabella 3). Le differenze nella competenza allo sviluppo degli oociti tra i due gruppi sperimentali sono emerse in seguito a fertilizzazione in vitro e coltura; la melatonina ha determinato un incremento nelle percentuali di cleavage rispetto al gruppo controllo (82.5 vs 63.4% rispettivamente; p<0.001) ed ha determinato un anticipo nella prima divisione embrionale. La percentuale di oociti raccolti dalle capre trattate con melatonina che hanno portato avanti la prima divisione embrionale entro le prime 26 ore di coltura post-fertilizzazione è risultata significativamente maggiore rispetto al gruppo controllo (24.1 vs 11.5, rispettivamente; p<0.05).

Tabella 3. Competenza allo sviluppo in vitro di oociti recuperate da capre Sarde trattate con un impianto sottocutaneo di melatonina (MEL) o non trattate(CTR) durante l'anaestro stagionale.

|     | Follicoli<br>(media ± SE) | Oociti |              | Embrioni (%) <sup>*</sup> |                      |                  |                     |                     |                     |                 |                 |
|-----|---------------------------|--------|--------------|---------------------------|----------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
|     |                           | IVM    | Fertilizzati | Cleavage                  |                      |                  | Blastocisti         |                     |                     |                 |                 |
|     |                           |        |              | 26° hpf <sup>+</sup>      | 42° hpf <sup>+</sup> | TOT              | 6° dpf <sup>+</sup> | 7° dpf <sup>+</sup> | 8° dpf <sup>+</sup> | TOT             |                 |
| CTR | # 1                       | 30     | 17           | 16                        | 1                    | 9                | 10                  | 1                   | 0                   | 0               | 1               |
|     | # 2                       | 25     | 15           | 13                        | 0                    | 2                | 2                   | 0                   | 0                   | 1               | 1               |
|     | # 3                       | 58     | 29           | 25                        | 4                    | 14               | 18                  | 1                   | 4                   | 1               | 6               |
|     | # 4                       | 36     | 27           | 23                        | 4                    | 12               | 16                  | 2                   | 4                   | 2               | 8               |
|     | # 5                       | 23     | 9            | 9                         | 1                    | 5                | 6                   | 0                   | 1                   | 0               | 1               |
|     | # 6                       | 20     | 20           | 18                        | 2                    | 12               | 14                  | 0                   | 0                   | 0               | 0               |
|     | TOT                       | 192    | 117          | 104                       | 12 <sup>a</sup>      | 54               | 66 <sup>c</sup>     | 4                   | 9 <sup>a</sup>      | 4               | 17 <sup>e</sup> |
|     | (32 ± 6.4)                |        |              | (11.5)                    | (51.9)               | (63.4)           | (3.8)               | (8.6)               | (3.8)               | (16.3)          |                 |
| MEL | # 1                       | 38     | 17           | 15                        | 3                    | 10               | 13                  | 1                   | 3                   | 2               | 6               |
|     | # 2                       | 39     | 29           | 19                        | 5                    | 9                | 14                  | 0                   | 3                   | 0               | 3               |
|     | # 3                       | 25     | 17           | 14                        | 5                    | 8                | 13                  | 2                   | 6                   | 1               | 9               |
|     | # 4                       | 73     | 42           | 39                        | 10                   | 20               | 30                  | 1                   | 13                  | 2               | 16              |
|     | # 5                       | 19     | 23           | 18                        | 2                    | 12               | 14                  | 0                   | 1                   | 1               | 2               |
|     | # 6                       | 34     | 27           | 26                        | 7                    | 17               | 24                  | 2                   | 3                   | 1               | 6               |
|     | # 7                       | 37     | 24           | 18                        | 4                    | 11               | 15                  | 2                   | 0                   | 3               | 5               |
| TOT | 265                       | 179    | 149          | 36 <sup>b</sup>           | 87                   | 123 <sup>d</sup> | 8                   | 29 <sup>b</sup>     | 10                  | 47 <sup>f</sup> |                 |
|     | (37 ± 6)                  |        |              | (24.1)                    | (58.3)               | (82.5)           | (5.3)               | (19.4)              | (6.7)               | (31.5)          |                 |

All'interno della stessa colonna, lettere differenti indicano una differenza statisticamente significativa: a ≠ b: p<0.05; c ≠ d: p<0.001; e ≠ f: p<0.01(Chi-square test).

<sup>+</sup> hpf: ore di coltura post-fertilizzazione; dpf: giorni di coltura post-fertilizzazione. \* Le percentuali sono calcolate sugli oociti fertilizzati.

Di seguito, questa maggiore velocità nello sviluppo embrionale è stata confermata anche nelle maggiori percentuali di blastocisti sviluppatasi al 7° giorno di coltura nelle capre trattate con melatonina rispetto al gruppo controllo (19.4 vs 8.6%;  $p < 0.05$ ). infine, la produzione totale di blastocisti era significativamente maggiore nel gruppo trattato con melatonina rispetto al controllo (31.5 vs 16.3%;  $p < 0.01$ ), evidenziando così la maggiore competenza allo sviluppo degli oociti ottenuti da capre trattate con melatonina.

Le blastocisti ottenute dai due gruppi sperimentali non hanno mostrato differenza significative in termini di ri-espansione e schiusa dopo vitrificazione. In particolare, nel gruppo trattato con melatonina, di 47 blastocisti vitrificate, 19 (40.4%) hanno mostrato una completa ri-espansione della cavità blastocelica entro 8 ore di coltura in vitro, e 11 (24.9%) si sono ri-espanso nelle seguenti 8 ore. Nel gruppo controllo, invece, di 17 blastocisti vitrificate, 5 (29.4%) hanno mostrato una completa ri-espansione della cavità blastocelica entro 8 ore di coltura in vitro, e 5 (17%) si sono ri-espanso nelle seguenti 8 ore.

L'espressione genica è stata quantificata per un panel di geni coinvolti in importanti processi di sviluppo, come la formazione della cavità blastocelica (acquaporina 3, Aqp3; Na/K ATPasi, Atp1a1; Barcroft e coll., 2003; Edashige e coll., 2006; Betts e coll., 1998), il controllo del ciclo cellulare (Ccmd1; Ozawa e coll., 2004), attività chaperonasica (90-kDa heat shock protein  $\beta$ , Hsp90 $\beta$ ; Loones e coll., 1997) e la costituzione del citoscheletro (E-caderina, E-cad; actina, Act1). La quantità relativa dei trascritti è stata normalizzata sulla base dei livelli di mRNA di Act1. Non sono state riscontrate differenze significative nella espressione dei geni studiati tra i due gruppi sperimentali (figura 2).

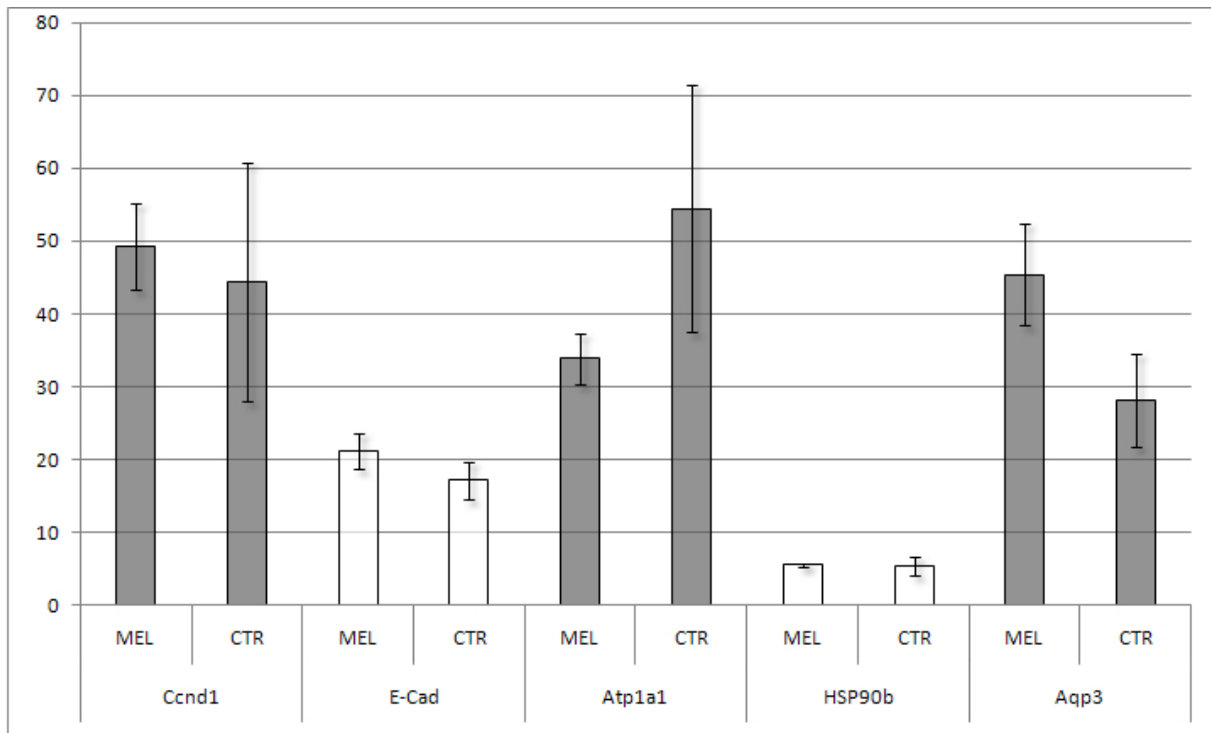


Fig. 2. Espressione relativa dell'mRNA di Ccnd1, E-Cad, Atp1a1, HSP90b e Aqp3 in blastocisti sottoposte a vitrificazione e riprostino della temperatura e successivamente coltivate in vitro fino alla ri-espansione della cavità blastocelica. Gli embrioni sono stati prodotti in vitro in seguito a maturazione, fertilizzazione e coltura di oociti ottenuti da capre di razza trattate con un impianto sottocutaneo di melatonina (MEL) o non trattate (CTR) durante l'anaestros stagionale. I valori di abbondanza relativa sono espressi come  $10^{\Delta\Delta\text{CT}}/\text{CP}$  e mostrano il valore medio di  $A \pm \text{SEM}$  di tre replicati per ogni gruppo.

## Discussione

Da questo studio possono essere tratte tre principali conclusioni. In primo luogo, è stato evidenziato per la prima volta che il trattamento con melatonina porta a delle modificazioni nelle caratteristiche di sviluppo dei follicoli; in particolare, modifica il pattern di sviluppo dell'ondata follicolare aumentando il turnover del follicolo dominante. In secondo luogo, gli oociti contenuti all'interno di questi follicoli hanno mostrato una maggiore qualità quando paragonati a quelli

ottenuti da animali controllo, garantendo, infine, una maggiore competenza allo sviluppo fino allo stadio di blastocisti.

L'indagine ultrasonografica della dinamica follicolare ha mostrato che il trattamento con melatonina provoca una riduzione della durata delle ondate follicolari, velocizzando l'emergenza del follicolo dominante. In studi precedenti, è stato evidenziato che la melatonina regola la secrezione pulsatile di GnRH da parte dell'ipotalamo, influenzando di rimando la secrezione di LH (Bronson e coll., 1995) e favorendo lo sviluppo follicolare. Nonostante l'intenso sforzo di ricerca portato avanti negli ultimi 20 anni, i bersagli precisi dell'azione della melatonina nel controllo dell'attività riproduttiva devono essere ancora completamente caratterizzati. L'effetto della melatonina sulla secrezione di GnRH non sembra essere relazionato ad una azione diretta sui neuroni GnRH secernenti (Bernard e coll., 1999; Brown e coll., 2001); la melatonina regolerebbe la secrezione di GnRH attraverso due meccanismi complementari: una modificazione nella sensibilità al feed-back negativo esercitato dagli steroidi ed una modulazione steroide-indipendente sulla secrezione di GnRH (Goldman e coll., 1999). Dati recenti suggeriscono che la kisspeptina potrebbe essere il link mancante tra la melatonina e l'asse ipotalamo-ipofisi ovaie e che negli animali a riproduzione stagionale la melatonina potrebbe agire sulle cellule KiSS-1 per modulare l'attività riproduttiva (Revel e coll., 2007). Considerando che la kisspeptina esercita un forte stimolo sulla secrezione di LH/FSH (Thompson e coll., 2004; Messenger e coll., 2005), l'attivazione di questo pathway endocrino potrebbe aver creato un ambiente ormonale più favorevole allo sviluppo follicolare, e quindi alla maturazione degli oociti, nella capre trattate con melatonina. Durante l'anaestro, la secrezione di LH diminuisce, in contrapposizione a quanto avviene durante la stagione riproduttiva quando la secrezione di LH raggiunge frequenze ed ampiezza sufficienti per controllare efficacemente la dinamica follicolare (Goodman e coll., 1988). Inoltre, la presenza di un follicolo in accrescimento potrebbe supportare in maniera indiretta gli effetti della melatonina

sullo sviluppo follicolare, e quindi sulla secrezione degli steroidi e sulla loro funzione, come suggerito in studi precedenti (Goldman e coll., 1999; Gonzalez-Bulnes e coll., 2004). Allo stesso tempo, non possiamo completamente escludere una azione diretta della melatonina a livello ovarico, come suggerito in precedenti studi (Nakamura e coll., 2003; Tamura e coll., 1998; Brzezinski e coll., 1987; Ronnberg e coll., 1990).

La modificazione del pattern di sviluppo follicolare causata dalla somministrazione di melatonina è stata accompagnata da un incremento nella qualità dei loro oociti, confermando così recenti dati (Tamura e coll., 2008). Nel presente studio, il cleavage rate e la produzione totale di blastocisti era significativamente maggiori negli animali trattati con melatonina rispetto al gruppo controllo (31.5 vs 16.3;  $p < 0.01$ ). I dati riguardanti la produzione embrionale in vitro nelle capre durante l'anaestro stagionale sono limitati; un unico studio riporta che la produzione totale di blastocisti in vitro oscilla tra il 20 ed il 24% in capre trattate con FSH durante l'anaestro (Graff t al., 2000). Studi riguardanti la produzione embrionale in vivo hanno evidenziato che il trattamento con melatonina nelle donatrici aumenta la fertilità, la qualità embrionale e la prolificità dopo protocolli di stimolazione ovarica (Forcada e coll., 1995; Luther e coll., 2005; Forcada e coll., 2006). I nostri risultati, al contrario di studi precedenti sulla pecora (Luther e coll., 2005), indicano che il trattamento con melatonina, oltre a portare a maggiori percentuali di produzione embrionale, causa un acceleramento nella formazione dello zigote e della blastocisti in vitro. La velocità della prima divisione embrionale è considerata un marker della competenza embrionale (Lechniak e coll., 2008); inoltre, le blastocisti che si sviluppano più rapidamente sono quelle di maggiore qualità e con maggiore criotolleranza (Leoni e coll., 2006). D'altra parte, la qualità degli embrioni che hanno raggiunto lo stadio di blastocisti, valutata come criotolleranza ed in seguito alle analisi di espressione genica (Leoni e coll., 2008), non ha mostrato differenze significative nei due gruppi sperimentali.

Gli effetti della melatonina sulla qualità degli oociti e sulla produzione di blastocisti, come pure sul turnover follicolare, potrebbero essere messi in relazione sia a fattori sistemici che ovarici. I primi, come precedentemente descritto, sarebbero mediati dalla secrezione di LH (Bronson e coll., 1995; Revel e coll., 2007). Oussaid e coll. (1999) hanno evidenziato che la temporaneo soppressione della secrezione di LH influisce negativamente sulla competenza degli oociti in pecore cicliche; una più prolungata soppressione dell'LH, come avviene durante l'anaestro stagionale, potrebbe avere effetti ancora più manifesti sulla competenza allo sviluppo degli oociti. In uno studio precedente, abbiamo evidenziato che la somministrazione di una singola dose di GnRH antagonista porta a deficienze nella maturazione degli oociti e limita la loro capacità di sviluppo; questo effetto è verosimilmente legato ad un insufficiente apporto di LH (Berlinguer e coll., 2006). In uno studio effettuato sulla specie umana, è stato dimostrato che livelli preovulatori ridotti di LH, uno scenario equivalente a quello delle capre in anaestro stagionale, sono associati a minori percentuali di fertilizzazione in vitro degli oociti (Verpoest e coll., 2000). Il trattamento con melatonina, attraverso modificazioni nella frequenza dei pulse di LH (Bronson e coll., 1995), potrebbe aver contribuito nel creare un ambiente follicolare più favorevole, considerando che l'LH è il principale stimolo per la secrezione steroidea ovarica ed è quindi essenziale per la maturazione finale dell'oocita (Sidhu e coll., 1995).

La maggiore qualità dell'oocita ottenuta in capre trattate con melatonina potrebbe essere mediata anche da un effetto locale, intrafollicolare. La melatonina raggiunge tutti i tessuti. Elevati livelli di melatonina sono stati ritrovati nel fluido follicolare umano (Brzezinski e coll., 1987; Ronnberg e coll., 1990) e queste concentrazioni erano maggiori nei follicoli maturi rispetto a quelli atresici (Nakamura e coll., 2003). Il principale ruolo della melatonina all'interno del follicolo, come suggerito da Tamura e coll. (2008), potrebbe essere quello di agire come antiossidante, riducendo così i danni a carico del DNA dell'oocita. Le proprietà antiossidanti della melatonina sono state



studiate approfonditamente (Tan e coll., 2007; Leon e coll., 2005), e sono state spesso chiamate in causa nel giustificare i suoi effetti benefici nello sviluppo embrionale in vitro, come riscontrato nel bovino (Papie e coll., 2007). Differenti autori suggeriscono che la riduzione nella specie reattivo ossigenate (ROS) potrebbe essere una via attraverso la quale la melatonina esercita un effetto positivo nella maturazione in vitro dell'ocita (Manjunatha e coll., 2007; Kang e coll., 2008). Studi dettagliati sugli effetti protettivi della melatonina contro gli stress ossidativi hanno dimostrato che questi sono particolarmente efficaci a livello dei mitocondri (Jou e coll., 2007). L'accumulo dei danni ossidativi potrebbe ridurre il numero di mitocondri intatti e funzionali, e quindi i livelli di ATP, aumentando inoltre la produzione di ROS a livello della catena di trasporto degli elettroni. Questo, a sua volta, potrebbe ridurre il rapporto intracellulare di GSH/GSSG, che favorisce alterazioni nella omeostasi del calcio intracellulare (Dumollard e coll., 2007). Tutte queste variabili potrebbero avere effetti all'interno dell'ocita sulle fibre del citoscheletro, sull'equilibrio tra l'attività protein kinasica e fosfatasica, e sulla sintesi, e degradazione delle proteine,, dell'RNA e del DNA (May-Panloup e coll., 2007). D'altra parte, in questo studio gli effetti locali e sistemici della melatonina potrebbe aver agito in maniera sinergica. L'aumentata frequenza dei pulse di liberazione dell'LH, testimoniata da una più veloce fase di crescita del follicolo dominante, e la protezione dell'ocita dagli stress ossidativi potrebbero aver contribuito al raggiungimento di una maggiore qualità del gamete. Inoltre, possiamo anche ipotizzare che la melatonina abbia un diretto effetto benefico sulla maturazione del follicolo e dell'ocita, considerando la presenza di recettori per la melatonina sulle cellule della granulosa (Yie e coll., 1995; Brzezinski e coll., 1992).

In conclusione, il trattamento in vivo con melatonina in preparazione del recupero degli oociti, stimola la fase di crescita del follicolo dominante, aumentando così il turnover follicolare. Allo stesso tempo, sebbene non influenzi la risposta ovarica all'FSH, la melatonina aumenta la qualità dell'ocita, valutata in termini di cinetica di sviluppo embrionale e produzione totale di blastocisti

in vitro. Di conseguenza, questo studio potrebbe gettare le basi per la formulazione di nuovi protocolli per la produzione embrionale in vitro, dato che il fattore limitante nella proporzione di oociti che si sviluppano a blastocisti in un sistema di produzione embrionale in vitro è proprio la qualità intrinseca dell'oocita. Il trattamento con melatonina potrebbe così fornire uno strumento utile nell'aumentare la competenza allo sviluppo di oociti di bassa qualità.

## ***Bibliografia***

1. Arendt J (2005) Melatonin in humans: it's about time. *J Neuroendocrinol* 17, 537–538.
2. Barcroft LC, Offenberg H, Thomsen P, Watson AJ. Aquaporin proteins in murine trophoctoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Dev Biol* 2003; 15:342–354.
3. Barrell GK, Thrun LA, Brown ME, Viguie C e Karsch FJ (2000) Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the Ewe. *Biol Reprod* 63, 769–774.
4. Berlinguer F, Gonzalez-Bulnes A, Succu S e coll. GnRH antagonist enhance follicular growth in FSH-treated sheep but affect developmental competence of oocytes collected by ovum pick-up. *Theriogenology* 2006; 65:1099–1109.
5. Bernard DJ, Abuav-Nussbaum R, Horton TH, Turek FW. Photoperiodic effects on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) content and the GnRH-immunoreactive neuronal system of male Siberian hamsters. *Biol Reprod* 1999; 60:272–276.
6. Betts DH, Barcroft LC, Watson AJ. Na/K-ATPase mediated 86Rb<sup>p</sup> uptake and asymmetrical trophoctoderm localization of alpha1 and alpha3 Na/K-ATPase isoforms during bovine preattachment development. *Dev Biol* 1998;197:77–92.
7. Bronson FH. Seasonal variation in human reproduction: environmental factors. *Q Rev Biol* 1995; 70:141–164.
8. Brown DI, Garyfallou VT, Urbanski HF. Photoperiodic modulation of GnRH mRNA in the male Syrian hamster. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 89:119–125.
9. Brzezinski A, Fibich T, Cohen M e coll. Effects of melatonin on progesterone production by human granulosa lutein cells in culture. *Fertil Steril* 1992; 58:526–529.
10. Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ e coll. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:865–867.
11. Carlberg C (2000) Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 917, 387–396.
12. Chen G, Huo Y, Tan DX, Liang Z, Zhang W e Zhang Y (2003) Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 73, 19–26.

13. Claustrat B, Brun J e Chazot G (2005) The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 9, 11–24.
14. Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ e Deng MH (1994) Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 1824–1828.
15. Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007; 77:21–49.
16. Edashige K, Tanaka M, Ichimaru N e coll. Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biol Reprod* 2006; 74:625–632.
17. Forcada F, Abecia JA, Cebrian-Perez JA e coll. The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high prolificacy Rasa Aragonesa ewes. *Theriogenology* 2006; 65:356–365.
18. Forcada F, Zarazaga L, Abecia JA. Effect of exogenous melatonin and plane of nutrition after weaning on estrous activity, endocrine status and ovulation rate in Salz ewes lambing in the seasonal anestrus. *Theriogenology* 1995; 43:1179–1193.
19. Goldman BD. The circadian timing system and reproduction in mammals. *Steroids* 1999; 64:679–685.
20. Gonzalez-Bulnes A, Carrizosa JA, Urrutia B e coll. Oestrous behaviour and development of preovulatory follicles in goats induced to ovulate using the male effect with and without progesterone priming. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:745–750.
21. Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Garcia-Garcia RM e coll. Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goats. *Theriogenology* 2004; 61:977–985.
22. Gonzalez-Bulnes A, Souza CJ, Campbell BK, Baird DT. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Anim Reprod Sci* 2004; 84:107–119.
23. Goodman RL. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. in: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neil J eds., Raven Press, New York, 1988; pp. 1929–1968.
24. Graff KJ, Meintjes M, Han Y e coll. Comparing follicle stimulating hormone from two commercial sources for oocyte production from out-of-season dairy goats. *J Dairy Sci* 2000; 83:484–487.
25. Hardeland R e Poeggeler B (2003) Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 34, 233–241.

26. Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K e coll. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *J Pineal Res* 2000; 28:48–51.
27. Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y e coll. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-Omethyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136:7–13.
28. Itoh MT, Ishizuka B, Kuribayashi Y e coll. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:402–408.
29. Jimé'nez-Macedo AR, Anguita B, Izquierdo D e coll. Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilised by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology* 2006; 66:1065–1072.
30. Jou MJ, Peng TI, Yu PZ e coll. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res* 2007; 43:389–403.
31. Kang JT, Koo OJ, Kwon DK e coll. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *J Pineal Res* 2008. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00602.x.
32. Katska-Ksiazkiewicz L, Opiela J, Ryn' ska B. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology* 2007; 68:736–744.
33. Lechniak D, Pers-Kamczyc E, Pawlak P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reprod Biol* 2008; 8:23–42.
34. Lee C, Do BR, Lee Y e coll. Ovarian expression of melatonin Mel1a receptor mRNA during mouse development. *Mol Reprod Dev* 2001; 59:126–132.
35. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G e coll. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38: 1–9.
36. Leoni G, Bogliolo L, Berlinguer F e coll. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. *Cryobiology* 2002; 45:204–212.
37. Leoni GG, Berlinguer F, Succu S e coll. A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Mol Reprod Dev* 2008; 75:373–382.

38. Leoni GG, Succu S, Berlinguer F e coll. Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. *Anim Reprod Sci* 2006; 92:373–383.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method. *Methods* 2001; 25:402–408.
40. Loones MT, Rallu M, Mezger V, Morange M. HSP gene expression and HSF2 in mouse development. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53:179–190.
41. Luther JS, Redmer DA, Reynolds LP e coll. Ovarian follicular development and oocyte quality in anestrous ewes treated with melatonin, a controlled internal drug release (CIDR) device and follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 2005; 3:2136–2146.
42. Malpaux B, Tricoire H, Mailliet F, Daveau A, Migaud M, Skinner DC, Pelletier J e Chemineau P (2002) Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod Suppl* 59, 167–179
43. Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PSP e coll. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim*. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00982.x.
44. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C e Reiter RJ (2005) Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N<sup>1</sup>-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol* 165, 139–149.
45. May-Panloup P, Chretien MF, Malthiery Y, Reynier P. Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007; 77:51–83.
46. Menchaca A, Vilarin~o M, Crispo M e coll. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology* 2007; 68:1111–1117.
47. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D e coll. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:1761–1766.
48. Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R (1994). "Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance". *Neurochem. Int.* 24 (2): 101–46.

49. Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, Kato H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril* 2003; 80:1012–1016.
50. Niles LP, Wang J, Shen L e coll. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 156:107–110.
51. Oussaid B, Mariana JC, Poulin N e coll. Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil* 1999; 117:71–77.
52. Ozawa M, Matsuzuka T, Hirabayashi M, Kanai Y. Redox status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biol Reprod* 2004; 71:291–296.
53. Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchalska E, Modlinski JA. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. *J Pineal Res* 2007; 43:321–326.
54. Peyrot F, Ducrocq C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 2008; 45:235–246.
55. Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P, Casteilla L e Penicaud L (2003) Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* 144, 5347–5352.
56. Reiter RJ, Paredes SD, Korkmaz A e coll. Melatonin combats molecular terrorism at the mitochondrial level. *Interdisc Toxicol* 2008; 1:137–149.
57. Revel FG, Ansel L, Klosen P e coll. Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8:57–65.
58. Rönnberg L, Kauppila A, Leppäluoto J e coll. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:492–496.
59. Robert C, McGraw S, Massicotte L e coll. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2002; 67:1465–1472.
60. Rodríguez-Osorio N, Kim IJ, Wang H e coll. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. *J Pineal Res* 2007; 43:283–288.

61. Rosenkrans CF, Zeng GQ, Mcnamara GT e coll. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; 49:459–462.
62. Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S e coll. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003; 18:821–825.
63. Scheer FA (2005) Potential use of melatonin as adjunct antihypertensive therapy. *Am J Hypertens* 18, 1619–1620.
64. Sidhu KS, Cheema S. Effect of luteinizing hormone and estradiol on in vitro maturation of follicular oocytes in goat (*Capra hircus*). *Acta Vet Hung* 1995; 43:89–93.
65. Soares JM, Masana MI, Ersahin C, Dubocovich ML. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306:694–702.
66. Tamarkin L, Baird CJ e Almeida OF (1985) Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 227, 714–720.
67. Tamura H, Nakamura Y, Takiguchi S e coll. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. *J Pineal Res* 1998; 25:135–141.
68. Tamura H, Takasaki A, Miwa I e coll. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* 2008; 44:280–287.
69. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM e Reiter RJ (2003) Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res* 34, 249–259
70. Tan DX, Manchester LC, Terron MP e coll. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; 42:28–42.
71. Thompson EL, Patterson M, Murphy KG e coll. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 2004; 16:850–858.
72. Verpoest WM, Cahill DJ, Harlow CR, Hull MG. Relationship between midcycle luteinizing hormone surge quality and oocyte fertilization. *Fertil Steril* 2000; 73:75–77.



73. Vijayalaxmi Thomas CR Jr, Reiter RJ e Herman TS (2002) Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 20, 2575–2601.
74. Wehr TA. Photoperiodism in humans and other primates: evidence and implications. *J Biol Rhythms* 2001; 16:348–364.
75. Yie SM, Brown GM, Liu GY e coll. Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production. *Hum Reprod* 1995; 10:50–55.

## Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model

**Abstract:** The role of melatonin in modulating mammalian reproduction is of particular interest; however, its effects on ovarian follicles and their oocytes still remain to be characterized. This study determined the influence of melatonin treatment on follicular growth patterns and on in vitro oocyte developmental competence. In a first experiment, the effects of melatonin supplementation on follicular dynamics were evaluated using daily transrectal ultrasonographies for 21 days, in 7 multiparous Sarda goats receiving a subcutaneous implant of 18 mg of melatonin and in 5 control untreated does. Melatonin caused more follicular waves ( $5.2 \pm 0.2$  versus  $4 \pm 0.3$ ;  $P < 0.05$ ) as the waves were shortened at around 2 days when compared with the non-melatonin treated control goats ( $P < 0.001$ ). Oocyte developmental competence was evaluated in a second experiment by applying procedures for in vitro embryo production. There were no significant differences in the total number of oocytes obtained from 6 control ( $n = 192$ ) and 7 melatonin-treated ( $n = 265$ ) goats given follicle stimulating hormone to induce follicular development. Differences in oocyte developmental competence between the two groups became evident after in vitro fertilization and culture; melatonin increased the rate of cleaved oocytes in comparison with control animals (82.5 versus 63.4%;  $P < 0.001$ ), advanced timing of embryo development and enhanced blastocyst output (31.5 versus 16.3%;  $P < 0.01$ ). However, blastocyst quality, as evaluated by cryotolerance and gene expression analysis, was not found to be different between the groups. In conclusion, in vivo melatonin treatment is beneficial for increasing ovarian follicle turnover and improving oocyte developmental competence and kinetics of the blastocyst.

Fiammetta Berlinguer<sup>1</sup>, Giovanni G. Leoni<sup>2</sup>, Sara Succu<sup>2</sup>, Antonio Spezzigu<sup>1</sup>, Manuela Madeddu<sup>1</sup>, Valentina Satta<sup>2</sup>, Daniela Bebbere<sup>1</sup>, Ignacio Contreras-Solis<sup>3,4</sup>, Antonio Gonzalez-Bulnes<sup>3</sup> and Salvatore Naitana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Biology, University of Sassari, Sassari, Italy; <sup>2</sup>Department of Physiological, Biochemical and Cellular Science, University of Sassari, Sassari, Italy; <sup>3</sup>Department of Animal Reproduction, INIA, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Institute of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Central University of Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela

**Key words:** anestrous, blastocyst, follicular growth patterns, goats, in vitro developmental competence, melatonin, oocyte

Address reprint requests to Fiammetta Berlinguer, Department of Animal Biology, University of Sassari, Via Vienna, 2; 07100 Sassari, Italy. E-mail: berling@uniss.it

Received December 18, 2008; accepted February 18, 2009.

### Introduction

Reproductive activity is governed, in most of the animal species and to some degree even in humans, by seasonal variations in the frequency of conception, although seasonality in humans is an open debate. Some researches indicate that humans have the capacity to reproduce continuously, unless inhibited by environmental influences such as nutrition, temperature or photoperiod [1]. Photoperiodism via the circadian melatonin rhythm registers changes in the annual cycle of day-length and this signal is used to synchronize seasonal reproductive fluctuations [2].

Melatonin also acts directly on the ovary [3, 4]. Melatonin receptors have been found in the ovaries of rats, mice, and humans [5–7]. High levels of melatonin, influenced by seasonal variations [8], has been found in human follicular fluid in concentrations which are threefold higher than serum levels [9, 10]. Although it has been assumed that melatonin in ovarian follicles is derived from the general circulation, it may also be synthesized in the ovary as

melatonin precursor and synthesizing enzyme activities have been detected both in rat [11] and human ovaries [12]. In vitro studies have demonstrated that melatonin stimulates progesterone production by ovarian granulosa cells in several mammalian species and acts synergistically with human chorionic gonadotrophin to increase the production of progesterone [8, 13]. Finally, melatonin has also been successfully tested for promoting in vitro embryo development in mice [14], buffaloes [15], heifers [16], and sows [17, 18]. Thus, melatonin treatment may be useful for infertility treatments [19].

Currently, many aspects of the in vivo actions of melatonin treatment on follicles and their oocytes still remain to be characterized. Therefore, this study was undertaken to examine the effects of melatonin on ovarian follicular growth patterns and on in vitro oocyte developmental competence in anestrous goats. The screening of follicular dynamics by real-time ultrasonography [20, 21] and the production of in vitro embryos [22, 23] are well established for this species and we used animals in their



anestrous season so major changes in steroid and gonadotrophin levels could be avoided. Effects from exogenous melatonin on blastocyst quality, evaluated in terms of cryotolerance, and expression of a panel of genes related to developmental ability in pre-implantation embryos were also investigated.

## Materials and methods

### Animals and experimental design

All the animals used were adult multiparous Sarda goats housed outdoors with indoor access, and fed with a live-weight maintenance ration, at the experimental facilities of the Department of Animal Biology at the University of Sassari, Italy (latitude 40°43'N). These facilities meet the requirements of the European Union for Scientific Procedure Establishments. The experiments were performed during March and May, the seasonal anestrous period (late January–late August) described for this breed at this latitude.

Two consecutive trials were conducted to determine the effects of melatonin treatment during the seasonal anestrous season on follicular dynamics and oocyte developmental competence. In both experiments, does were randomly assigned to either a group receiving a subcutaneous melatonin implant (18 mg melatonin, Melovine®, CEVA VETEM S.p.A., Milano, Italy) at the base of the ear or a control group not receiving implants.

In the first experiment, the effects of melatonin supplementation on follicular dynamics was evaluated in 7 melatonin-treated and 5 control does. Follicular dynamics were evaluated by daily transrectal ultrasonographies performed from day 7 (day 0 = day of insertion of the melatonin implants) to day 27 (i.e. 21 days, the estimated duration of a cycle during seasonal breeding).

The second experiment arose from the results of the first trial, and was conducted to determine possible effects of *in vivo* melatonin supplementation on oocyte quality, as evaluated by its developmental competence. Follicular development was stimulated in 7 melatonin-treated and 6 control goats by the administration of 175 I.U. of FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Bio 98, Milano, Italy) administered, in 6 equal doses every 12 hr, from days 28–30 after insertion of the melatonin implants. At day 31, 12 hr after the last FSH injection, ovaries were collected by ovariectomy and processed for oocyte recovery and *in vitro* embryo production. Thereafter, developmental competence was assessed in terms of blastocysts output and cryotolerance after vitrification and thawing. Finally, a panel of gene transcripts whose expression has been proven to be correlated to embryo developmental competence [24] was determined, by real-time PCR, in *in vitro* produced blastocyst.

### Ultrasonographic evaluation of follicle dynamics

Ovaries were examined by transrectal ultrasonography using a real-time B-mode scanner (Aloka SSD 500, Aloka Co., Tokyo, Japan) fitted to a 7.5 MHz linear-array probe. Scanning was performed as previously validated in our

laboratory for goats [20, 25]. In brief, observations were conducted with the goat placed in dorsal recumbence on a metallic cradle as used for laparoscopy. After introducing a hydrosoluble contact gel into the rectum, the transducer was introduced perpendicularly to the abdomen wall. When the urinary bladder was surpassed and the uterine horns were located, the probe was rotated laterally 90° clockwise and 180° counter-clockwise to observe both ovaries and their structures. Each ovary was scanned several times from different angles to image all follicles  $\geq 3$  mm. The largest diameter of each of these follicles was measured and its position was recorded on a diagram of each ovary.

### Oocyte *in vitro* maturation, fertilization and culture

Ovaries and, thereafter, oocytes and embryos derived from the two different groups were kept separated throughout the procedures. All reagents and media were from Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise specified. Ovaries were placed in Dulbecco's PBS at a temperature between 25°C and 35°C. After washing in fresh medium, ovaries were sliced using a micro-blade and the follicle content was released in medium TCM199 (with Earle's salts and bicarbonate) supplemented with 25 mmol Hepes, penicillin and streptomycin and 0.1% (w/v) of polyvinyl alcohol (PVA). The cumulus–oocyte complexes (COCs) that presented 4–10 layers of granulosa cells and oocytes with a uniform cytoplasm, homogenous distribution of lipid droplets in the cytoplasm and with an outer diameter of about 90  $\mu$ m (mean) were selected for the experimental procedure. The selected COCs, after three washes in the same fresh medium, were *in vitro* matured in TCM199 supplemented with 10% estrous goat serum, 10  $\mu$ L/mL of FSH/LH and 100  $\mu$ M of cysteamine. COCs were put, in groups of 30–35, in 600  $\mu$ L of the maturation medium in a four-well Petri dish (Nunclon, Nalgene Nunc International, Denmark), layered with 300  $\mu$ L mineral oil and cultured for 24 hr in 5% CO<sub>2</sub> in air at 39°C.

After maturation, the COCs were partially stripped of the granulosa cells and fertilized *in vitro* at 39°C and 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> atmosphere in four-well Petri dishes (Nunclon). Frozen-thawed spermatozoa from the same ejaculate of one buck were used across all experimental procedures. Semen has been previously cryopreserved in Tris-based extender (Tris 375 mM, citric acid 124 mM, glucose 41 mM) supplemented with egg yolk 20% (pH 7; osmolality 375 mOsm/kg) and glycerol (4%); it was cooled to 4°C, frozen in 0.25 mL pellets on dry ice and then plunged into liquid nitrogen. Thawing was carried out by plunging a sterilized glass falcon tube containing the pellet in a 39°C water bath for 20 s. Synthetic oviduct fluid (SOF) containing 3% bovine serum albumin (BSA-fraction V) supplemented with 25 mM Hepes (sperm-SOF) was used for sperm preparation. For IVF, SOF medium was supplemented with 10% estrous goat serum, 20  $\mu$ g/mL heparin and 1  $\mu$ g/mL hipotaurine (IVF-SOF). Percoll gradients were prepared as described by Rosenkrans et al. [26]. In brief, 100% Percoll solution was mixed with a 10 $\times$  salt solution (NaCl 2.889 g; KCl 0.238 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.116 g; CaCl<sub>2</sub> 0.112 g; Hepes 0.163 g; 50 mL of milli-Q water) to form 90% Percoll solution. A 45% Percoll solution was



prepared from this by addition of an equal volume of sperm-SOF. The gradient was formed by pipetting 1 mL of 90% Percoll solution into a 15 mL conical tube and then overlaying it with 1 mL of 45% Percoll solution.

Frozen-thawed semen was placed onto the top of the 45% layer and then centrifuged at 800 g at room temperature for 15 min through the gradient. After removal of supernatant, the resulting pellet was transferred into a sterilized glass conical tube below 1 mL of warmed IVF-SOF and incubated at 39°C in a humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub> in air for 15 min. Swim-up derived motile spermatozoa were diluted in IVF-SOF at a 1 × 10<sup>6</sup> spermatozoa/mL final concentration and incubated for 45 min at 39°C under 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. For IVF, spermatozoa were co-incubated under mineral oil in four wells Petri dishes with a mean of 30 matured oocytes/well in the same atmosphere condition.

After 26 hr, presumptive zygotes were mechanically denuded of their cumulus cells and cultured in four-well Petri dishes containing SOF + essential and non-essential amino acids at oviduct concentration + 0.4% BSA under mineral oil in maximum humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> to blastocyst stage. At 26 and 42 hr post-insemination the number of cleaved oocytes, showing two distinct blastomeres, was recorded. Thereafter, culture dishes were observed daily starting from the sixth day of culture and oocyte cleavage and evolution to blastocysts were recorded. As early cleavage is considered as a marker of embryo competence [27, 28], we analyzed the kinetic of the first embryonic division in the two experimental groups.

#### Blastocyst vitrification and warming

Vitrification and warming media were prepared using PBS supplemented with 20% (v/v) FCS as base media. Embryos were vitrified according to a simple method developed in our laboratory [29]. Briefly, blastocysts were put into 200 µL drops of 1.4 M glycerol for 5 min, then into 200 µL drops of 1.4 M glycerol and 3.6 M ethylene glycol for 5 min before being transferred into a 15 µL column of 3.4 M glycerol and 4.6 M ethylene glycol, and loaded into the center of 0.25 mL plastic insemination straws using a fine glass capillary pipette. In the straws, the embryos and vitrification media were separated from two columns of 0.5 M sucrose solution. After sealing, the straws were transferred directly into LN<sub>2</sub> and kept in it.

For warming to a biological temperature, the straws were transferred from LN<sub>2</sub> into a water bath at 35°C for 10 s. The content of each straw was expelled into a Petri dish and stirred gently to facilitate the mixture of the two solutions. The embryos were retrieved and transferred into 200 µL drops of 0.25 M sucrose solution supplemented with 20% FCS or 0.1% PVA for 3 min to allow for removal of intracellular cryoprotectants. Embryos were held 10 min in corresponding media of PBS containing 20% FCS or 0.1% PVA for rehydration and equilibration.

For determining in vitro viability of the embryos, these were cultured in TCM199 with 10% FCS in humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in air at 39°C. To assess differences in embryo quality between the two groups, we determined blastocyst cryotolerance after vitrification and

warming, in terms of timing of re-expansion within 8 hr of in vitro post-warming culture. The embryos that re-expanded the blastocoelic cavity were considered to be viable [28], as this parameter represents a reliable indicator of in vitro produced blastocysts quality [24]. Thereafter, the embryos were examined at 12 hr intervals for 60 hr.

#### Gene expression analysis

The mRNA samples were prepared from pools of three vitrified/warmed re-expanded blastocyst. Re-expanded embryos were removed from culture, added to 2 mL of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. The poly(A) RNA was isolated with oligo(dT)<sub>25</sub> attached magnetic beads (DynaL A.S. Oslo, Norway) following manufacturer's instruction.

Ten µL of Lysis Buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM DTT) were immediately added to each sample. Samples were vortexed, briefly centrifuged, incubated at room temperature for 10 min and added with 10 µL of Dynabeads oligo (dT)<sub>25</sub>. Tubes were incubated for 5 min at 25°C, the tubes were shaken gently and put into a Dynal magnetic separator for 2 min. After removal of the supernatant, poly(A)<sup>+</sup> RNAs were washed once with 40 µL of Washing Buffer A (10 mM TrisHCl pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% LiDS) and three times with Washing Buffer B (10 mM TrisHCl pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA). Poly(A)<sup>+</sup> RNAs were then eluted from the magnetic beads by incubation in 11 µL of DEPC-treated water at 65°C for 2 min, and aliquots were immediately used for Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

Reverse-transcription reactions were performed in a final volume of 20 µL consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM dNTPs, 2.5 µM of Random Hexamer primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20 U of RNase OUT<sup>TM</sup> (Invitrogen) and 100 U of SuperScript<sup>TM</sup> III RT (Invitrogen). The reaction tubes were kept at 25°C for 10 min, then at 42°C for 1 hr and finally at 70°C for 15 min to inactivate the reaction. A tube without RNA and one with RNA, but without reverse transcriptase, were used as negative controls.

#### Quantitative real time-polymerase chain reaction

The quantification of β-actin, heat shock protein 90β (HSP90 β), cyclin b1 (Cnd1), Na/K-ATPase (Atp1a1), Type I cadherin (E-Cad) and aquaporin 3 (Aqp3) transcripts in melatonin-treated (n = 4) and control (n = 5) embryos was carried out by Real-Time PCR in a BioRad iCycler<sup>TM</sup> (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PCRs were performed in 25 µL reaction volume containing 12.5 µL 2× Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen), 0.025 nM Fluorescein Reference Standard (Molecular Probes – Invitrogen Detection Technologies, Leiden, the Netherlands), 200 nM of each primer and cDNA equivalent to 0.1 embryo.

The PCR protocol involved two incubation steps (50°C for 5 min and 95°C for 2 min) followed by 40 cycles of amplification program [95°C for 15 s, gene specific

| Gene           | GenBank accession number | Sequence  | Annealing temperature | Location  | Size (bps) |
|----------------|--------------------------|---|-----------------------|-----------|------------|
| HSP90 $\beta$  | AB072369                 | 5'tggagatcaacctgacca3'<br>5'cttctcgttgaggatccc3'    | 56°C                  | 1959–2101 | 143        |
| Ccnd1          | L26548                   | 5'cagtgtatgacaggaatgc3'<br>5'cgtagtccagcatagttagt3' | 56°C                  | 1089–1222 | 134        |
| $\beta$ -actin | NM_001009784             | 5'ttctcgggtatggatcctg3'<br>5'ggatgatcctcctgcatcc3'  | 60°C                  | 532–678   | 162        |
| Atp1a1         | X02813                   | 5'gctgacttggcatctgcaa3'<br>5'cattccaggcagtaggaaa3'  | 58°C                  | 3052–3180 | 129        |
| E-Cad          | NM_001002763             | 5'tgtgactgtgatggatcgt3'<br>5'acccttctctccgaacaag3'  | 58°C                  | 2056–2207 | 155        |
| Aqp3           | AF123316                 | 5'gggtgccattgtctctcc3'<br>5'acgaggagaatggaagt3'     | 60°C                  | 500–618   | 119        |

Table 1. Information on the primers used for amplification

annealing temperature (Table 1) for 30 s, 72°C for 30 s], a melting curve program (65°C–95°C, starting the fluorescence acquisition at 65°C and taking measurements every 10 s interval, until the temperature reached 95°C) and finally a cooling step to 4°C. Fluorescence data were acquired during the 72°C extension steps. The PCR products were then analyzed by generating a melting curve to check the specificity and identity of the amplification product. To minimize handling variation, samples and standard curves were run on the same plate, using a PCR master mix containing all reaction components apart from the sample.

The sizes of the PCR products were further confirmed by gel electrophoresis on a standard ethidium bromide stained 2% agarose gel and visualized by exposure to ultraviolet light. The PCR products were sequenced (Applied Biosystems, Model 3130 xl Genetic Analyzer, Foster City, CA 94404, USA) after purification and sequences were confirmed by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

### Statistical analyses

Ultrasonographic data were summarized to characterize patterns of ovarian follicular development during the period of study. First, all follicles present on the ovaries were classified by their largest diameter in four categories: total follicles ( $\geq 3$  mm), small (3–3.4 mm), medium (3.5–4.4 mm) and large ( $\geq 4.5$  mm). Thereafter, data on individual growth of follicles were used to characterize follicular waves on the basis of (a) wave onset (emergence): day in which follicles were firstly detected at 3 mm; (b) growth phase (length): defined as the time taken by a single follicle to grow from 3 mm to its maximum diameter; (c) regression phase: the time taken by a single follicle to regress from its maximum size until the day that it reach its smallest size; (d) wave end: day when the dominant follicle ending its regressing phase; (e) wave duration (total length): time taken by a single follicle to grow from 3 mm to its maximum diameter and to completely regress to its minimum size. Effects of day and wave of follicular development on individual characteristics of dominant follicle and on number and size of remaining follicles throughout the study were assessed by ANOVA.

The chi-square test, or Fisher exact test when appropriate, was used to determine differences on oocyte developmental competence and blastocysts re-expansion and hatching after vitrification/warming procedures.

The relative quantification of the target genes expression was performed with the 2-ddCt method [30] normalizing the target genes expression with the transcripts levels of the endogenous  $\beta$ -actin gene [31]. After testing for normality and equal variance using respectively the Kolmogorov–Smirnov and Levene tests, the transcript data were analyzed with ANOVA.

Statistical analysis was performed using the statistical software program Statgraphic Centurion XV (version 15.2.06 for Windows; StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA) and a probability of  $P \leq 0.05$  was considered to be the minimum level of significance. All results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

### Results

The ultrasonographic study indicated that both the melatonin-treated and control ovaries showed a well-defined wave-like pattern of follicle dynamics (Fig. 1); however, there were significant differences between groups in the characteristics of the follicular waves (Table 2). Melatonin treatment caused more waves during the period of study ( $5.2 \pm 0.2$  versus  $4 \pm 0.3$ ;  $P < 0.05$ ) because waves were shortened at around 2 days when compared with the controls ( $P < 0.001$ ). These differences in total length of the waves were mainly caused by a more rapid growth phase of the dominant follicles ( $P < 0.005$ ), as differences in regression phase length were not statistically significant. On the other hand, the maximum diameters of the dominant follicles of each wave were similar between groups.

There were no significant differences in the total number of oocytes obtained from control ( $n = 192$ ) and melatonin-treated ( $n = 265$ ) animals (Table 3). Differences in oocyte developmental competence between the two groups became evident after in vitro fertilization and culture; melatonin increased the rate of cleaved oocytes in comparison with the controls (82.5 versus 63.4 %, respectively;  $P < 0.001$ ) and advanced timing of cleavage. Oocytes collected from melatonin-treated does underwent cleavage within 26 hr of post-fertilization culture at a higher rate than in the

Melatonin influences follicle and oocyte development

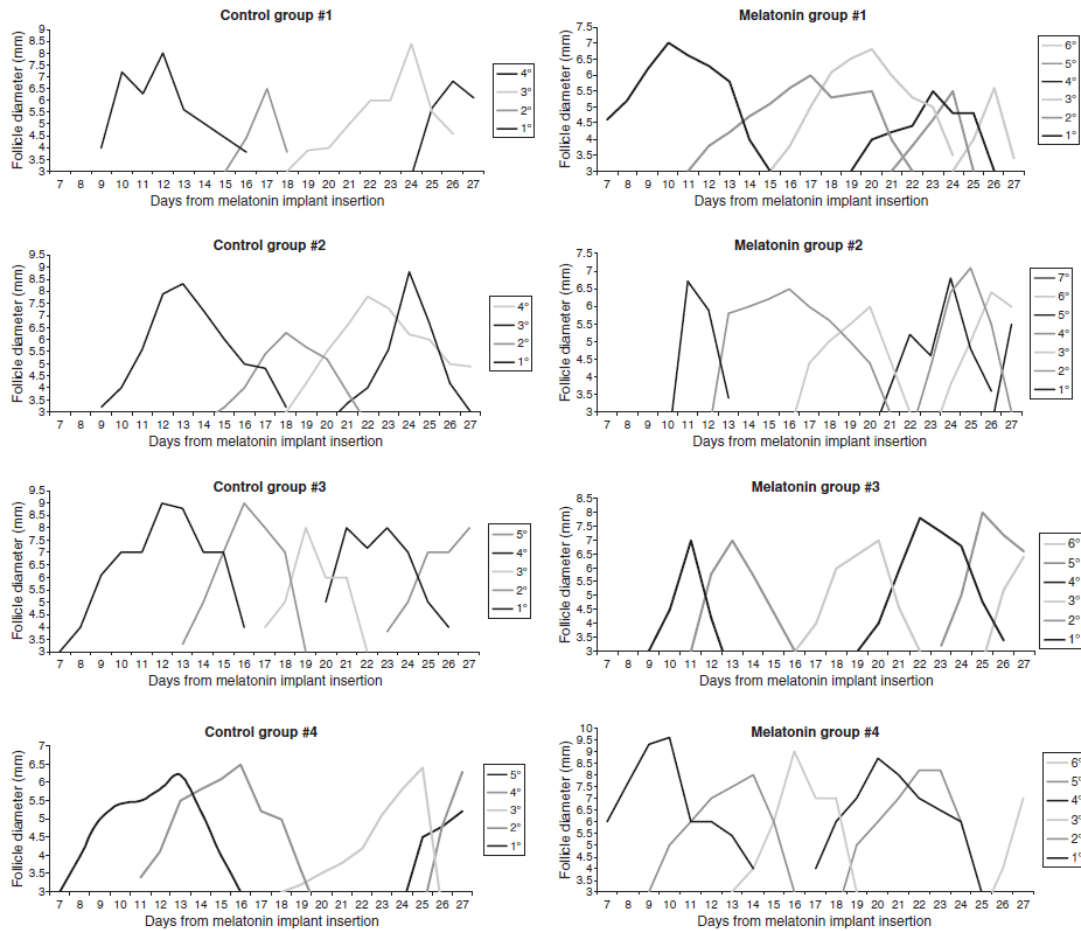


Fig. 1. Wave-like pattern of follicle dynamics in Sarda goats treated with a subcutaneous implant of melatonin (melatonin treatment) or untreated (control) during seasonal anoestrus.

Table 2. Characteristics of the follicular waves in Sarda goats treated with a subcutaneous implant of melatonin (MEL) or left untreated (CTR) during seasonal anestrus

|                                     | CTR<br>(mean ± S.E.)   | MEL<br>(mean ± S.E.)   |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Number of follicular waves          | 4 ± 0.3 <sup>a</sup>   | 5.2 ± 0.2 <sup>b</sup> |
| Follicular wave length (days)       | 8.7 ± 0.4 <sup>c</sup> | 6.9 ± 0.3 <sup>d</sup> |
| Maximum diameter reached by FD (mm) | 7.4 ± 0.2              | 7 ± 0.2                |
| DF growth rates (mm/day)            | 0.9 ± 0.1              | 1.1 ± 0.1              |
| DF regression rates (mm/day)        | 1.3 ± 0.2              | 1.4 ± 0.1              |
| DF growth phase (days)              | 5.1 ± 0.3 <sup>e</sup> | 4 ± 0.2 <sup>f</sup>   |
| DF regression phase (days)          | 3.6 ± 0.3              | 2.9 ± 0.2              |

In the same row, different superscripts indicate statistical difference (ANOVA a ≠ b:  $P < 0.05$ ; c ≠ d:  $P = 0.001$ ; e ≠ f:  $P = 0.005$ ). DF, dominant follicles.

controls (24.1 versus 11.5%, respectively,  $P < 0.05$ ). Thereafter, such faster developmental rate was also observed in the blastocysts rate; after melatonin treatment

a higher percentage of embryos had developed to blastocyst stage at day 7 post-fertilization (19.4 versus 8.6%;  $P < 0.05$ ). Finally, total blastocysts output was significantly higher after melatonin treatment than in controls (31.5 versus 16.3;  $P < 0.01$ ), showing a higher in vitro developmental competence in oocytes collected from melatonin-treated goats.

Blastocyst obtained from melatonin-treated and control animals did not differ in terms of re-expansion rates. For the melatonin group, of 47 vitrified/warmed blastocysts, 19 (40.4%) re-expanded within 8 hr of in vitro culture and 11 re-expanded in the following 8 hr (17%). On the other hand, for controls, of 17 vitrified/warmed blastocysts, 5 (29.4%) re-expanded within 8 hr of in vitro culture and 5 re-expanded in the following 8 hr (17%).

Gene expression was quantified for a panel of genes involved in important developmental processes such as blastocoel formation aquaporin 3, Aqp3; Na/K ATPase, Atp1a1 [32–34], cell cycle control Cnd1: [35], chaperon-like activity (90-kDa heat shock protein  $\beta$ , Hsp90 $\beta$ : [36],



Table 3. In vitro developmental competence of oocyte recovered from Sarda goats treated with a subcutaneous implant of melatonin (MEL) or left untreated (CTR) during seasonal anoestrus

|     |     | Oocytes                    |              | Embryos (%)* |                        |                        |                        |                         |                      |                        |                        |
|-----|-----|----------------------------|--------------|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
|     |     | Follicles<br>(mean ± S.E.) | IVM          | Fertilized   | Cleavage               |                        |                        | Blastocyst yield        |                      |                        |                        |
|     |     |                            |              |              | 26° hpf                | 42° hpf                | TOT                    | 6° dpf                  | 7° dpf               | 8° dpf                 | TOT                    |
| CTR | 1   | 30                         | 17           | 16           | 1                      | 9                      | 10                     | 1                       | 0                    | 0                      | 1                      |
|     | 2   | 25                         | 15           | 13           | 0                      | 2                      | 2                      | 0                       | 0                    | 1                      | 1                      |
|     | 3   | 58                         | 29           | 25           | 4                      | 14                     | 18                     | 1                       | 4                    | 1                      | 6                      |
|     | 4   | 36                         | 27           | 23           | 4                      | 12                     | 16                     | 2                       | 4                    | 2                      | 8                      |
|     | 5   | 23                         | 9            | 9            | 1                      | 5                      | 6                      | 0                       | 1                    | 0                      | 1                      |
|     | 6   | 20                         | 20           | 18           | 2                      | 12                     | 14                     | 0                       | 0                    | 0                      | 0                      |
|     | TOT | 192 (32 ± 6.4)             | 117          | 104          | 12 <sup>a</sup> (11.5) | 54 (51.9)              | 66 <sup>c</sup> (63.4) | 4 (3.8)                 | 9 <sup>a</sup> (8.6) | 4 (3.8)                | 17 <sup>e</sup> (16.3) |
| MEL | 1   | 38                         | 17           | 15           | 3                      | 10                     | 13                     | 1                       | 3                    | 2                      | 6                      |
|     | 2   | 39                         | 29           | 19           | 5                      | 9                      | 14                     | 0                       | 3                    | 0                      | 3                      |
|     | 3   | 25                         | 17           | 14           | 5                      | 8                      | 13                     | 2                       | 6                    | 1                      | 9                      |
|     | 4   | 73                         | 42           | 39           | 10                     | 20                     | 30                     | 1                       | 13                   | 2                      | 16                     |
|     | 5   | 19                         | 23           | 18           | 2                      | 12                     | 14                     | 0                       | 1                    | 1                      | 2                      |
|     | 6   | 34                         | 27           | 26           | 7                      | 17                     | 24                     | 2                       | 3                    | 1                      | 6                      |
|     | 7   | 37                         | 24           | 18           | 4                      | 11                     | 15                     | 2                       | 0                    | 3                      | 5                      |
|     |     | TOT                        | 265 (37 ± 6) | 179          | 149                    | 36 <sup>b</sup> (24.1) | 87 (58.3)              | 123 <sup>d</sup> (82.5) | 8 (5.3)              | 29 <sup>b</sup> (19.4) | 10 (6.7)               |

\*Percentages are calculated on fertilized oocytes.

Within the same column, different superscript indicate statistical difference (chi-square test: a ≠ b: P < 0.05; c ≠ d: P < 0.001; e ≠ f: P < 0.01).

hpf, hours of culture post-fertilization; dpf, days of culture post-fertilization.

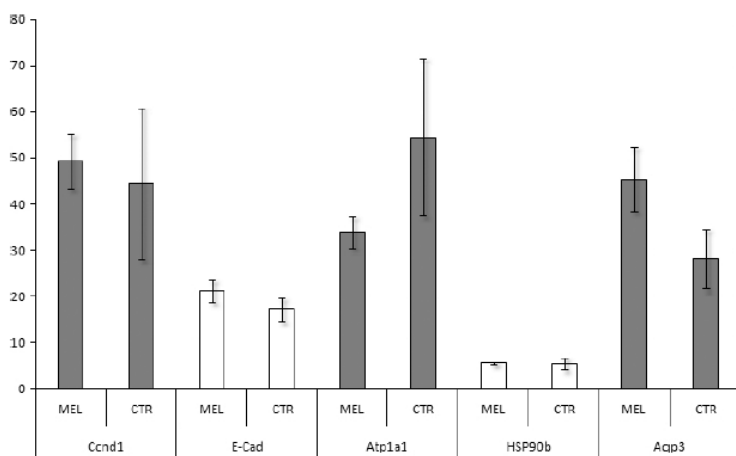


Fig. 2. Relative mRNA expression of Cnd1, E-Cad, Atp1a1, HSP90b and Acp3 in vitrified/warmed and in vitro cultured re-expanded blastocysts. Embryos were in vitro produced by maturation, fertilization and culture of oocytes derived from Sarda goats treated with a subcutaneous implant of melatonin (MEL) or untreated (CTR) during seasonal anoestrus. Relative abundance values are expressed as  $\hat{A} \pm SEM$  of the three replicates for each group.

and cytoskeletal constitution (E caderin, E-cad; actin, Act1). The transcript relative quantity was normalized on the basis of Act 1 mRNA levels. We detected transcripts of all the analyzed genes in both experimental groups. The normalized quantity of Acp3, Atp1a1, Cnd1, Hsp90 $\beta$ , and E-cad did not differ between the two groups of blastocysts (Fig. 2).

### Discussion

Three main conclusions can be drawn from our study. First, we are reporting for the first time that melatonin treatment affects follicle features; it modifies the wave growth pattern by increasing the turnover of dominant follicles. Second, the oocytes inside these follicles have increased quality when compared with control untreated

females and, third, developmental competence to the blastocyst stage is also improved.

The ultrasonographic assessment of follicle dynamics showed that melatonin treatment shortened follicular waves by reducing the period of emergence of the dominant follicle. In previous studies, melatonin has been proposed to regulate the pulsatile secretion of GnRH from the hypothalamus, thereby influencing LH secretion [1] and favoring follicle development. Despite intensive research during the past two decades, however, the precise targets for melatonin action on the control of reproduction remain to be identified. The effect of melatonin on GnRH secretion appears not to be related to a direct effect on GnRH neurons [37, 38]; melatonin might regulate GnRH secretion via two complementary mechanisms: a change in the steroid negative feedback on GnRH release and a steroid-independent modulation of GnRH



secretion [39]. Recent data suggest that kisspeptin may be the missing link between melatonin and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, and that in seasonal breeders melatonin could act on the KiSS-1 cells to modulate reproductive activity [for review see: 40]. Considering that kisspeptins potently elicits LH/FSH secretion [41, 42], the activation of this endocrine pathway may have created a more suitable hormonal milieu for follicle growth, and hence oocyte maturation, in melatonin-treated does. In anestrus, LH secretion is diminished, as opposed to the breeding season when the pulsatile release of LH is at frequencies and amplitudes appropriate for controlling follicle dynamics [43]. Furthermore, the presence of an active growing follicle may indirectly support effects of melatonin on follicular function, and therefore on steroid secretion and function, as suggested in previous studies [39, 44]. At the same time, we cannot aside off evidences addressing direct effects of melatonin on the ovary [3, 4, 9, 10].

Improvement of follicle features by administration of melatonin was followed thereafter by improvement of the quality of their oocytes, confirming recent data [19]. In the current study, cleavage rates and total blastocysts output were significantly higher in melatonin-treated does than in control ones (31.5 versus 16.3;  $P < 0.01$ ). Data concerning in vitro embryo production are limited for anestrus goats; a single study reports that the overall in vitro blastocyst development rates range from 20% to 24% in anestrus does treated with FSH [45]. Studies regarding in vivo embryo production have shown that melatonin treatment of embryo donor increases fertility, embryo quality and prolificacy after ovarian superovulation protocols [46–48]. Our results, in contrast to previous studies in sheep [47], also indicate that melatonin treatment, besides inducing higher developmental rates, advances timing of formation of zygotes and blastocysts in vitro. Early cleavage is considered as a marker of embryo competence for review see: [49]; fast developing blastocysts are those with the higher quality and cryotolerance [28]. On the other hand, the quality of the embryos reaching the blastocyst stage, as evaluated by cryotolerance and gene expression analysis [24], was not found to be different in melatonin and control group.

Melatonin effects on oocyte and blastocyst output may be related, like effects on follicle turnover, to both systemic and ovarian factors. Systemic effects, as detailed above, would be regulated by LH secretion [1, 40]. Oussaid et al. [50] showed that the temporary suppression of LH affects oocyte developmental competence in cyclic ewes; a more prolonged suppression of LH, such as during anestrus, may show even more detrimental effects on developmental competence of oocytes. In a previous study, we reported that the injection of a single dose of GnRH antagonist leads to weakness in oocyte maturation and limitations in their developmental competence; such effect being likely because of LH release deficiencies [51]. In a study performed in humans it was found that reduced preovulatory levels of LH, equivalent to the scenario taking place in anestrus does, are associated with impaired in vitro fertilization of the oocytes [52]. Melatonin treatment, through modifications in LH pulse frequency [1], may have contributed in creating a more suitable follicular environment as LH is the primary drive

for ovarian steroid secretion and, thus, LH is essential for final oocyte maturation [53].

The enhanced oocyte quality obtained in melatonin-treated does may be also linked to a local, intrafollicular effect. Melatonin enters all tissues. High levels of melatonin have been found in human follicular fluid [9, 10] and such concentrations were found to be higher in mature follicles than in small atretic follicles [3]. The main role of melatonin within the follicle, as suggested by Tamura et al. [19], may be to act as a free radical scavenger which would reduce oocyte DNA damage. The antioxidant properties of melatonin have been extensively studied [54, 55] and the indole may have utility as a potential disease preventing agent [54, 56, 57]. The scavenger activity of melatonin or of its metabolites may account for its beneficial effect on in vitro embryo development, as found in bovine embryos under high oxygen environment [16]. Different authors suggest that the reduction of reactive oxygen species (ROS) could be an aspect of the mechanism by which melatonin exerts its beneficial effects during oocyte in vitro maturation [15, 18]. Detailed studies on the protective effects of melatonin against oxidative stress have found that such effects are particularly effective in the mitochondria, as it seemingly targets these organelles [58]. Accumulated oxidative damage to mitochondria may both decrease the number of functionally intact mitochondria and hence ATP levels and increase the production of ROS by the electron transport chain. This, in turn, may reduce the ratio of intracellular GSH/GSSG which contributes to perturbations of intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis [59]. All these variables may have effects on oocyte cytoskeletal fibers, balance of protein kinase/phosphatase activity, and synthesis, processing and degradation of proteins and RNA and DNA [60]. However, in this study, systemic and ovarian effects of melatonin may have acted synergistically. The enhanced LH pulse frequency, supported by faster growth phase of the dominant follicle, and the provided oxidative stress protection to the oocyte may have contributed to the higher oocyte quality. Moreover, we can also speculate that melatonin has a direct beneficial effect on follicle and oocyte maturation, considering the presence of melatonin receptors on granulosa cells [8, 13].

In conclusion, in vivo melatonin treatment prior to oocyte collection hastened dominant follicle growth phase, thus increasing ovarian follicle turnover. At the same time, although not affecting ovarian response to FSH, melatonin improved oocyte quality as evaluated by in vitro developmental kinetics and blastocyst output. Thus, this study may establish a basis for new protocols for in vitro embryo production; the key factor limiting the proportion of oocytes that develop to blastocysts within an in vitro embryo production system is the intrinsic quality of the oocyte itself. Melatonin treatments may provide a useful tool in improving the developmental competence of poor quality oocytes.

### Author contributions

FB participated in the design of the study, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. GGL participated in drafting the manuscript and supervised the

gene expression analysis. SS and MM carried on the experiments on oocyte developmental competence and embryo cryopreservation. AS and ICS carried on the ovarian ultrasonographic scanning to evaluate follicular growth pattern. ICS also contributed to the performance of the statistical analysis. VS and DB performed the gene expression analysis. AGB conceptualized the idea, helped in drafting the manuscript and revising it critically for important intellectual content. SN conceived the study, participated in its design and coordination, and helped in drafting the manuscript. All co-authors provided inputs during final manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

This work was supported by grants "Progetti di ricerca ed innovazione al di sotto della soglia de minimis" from P.O.R. Sardegna 2000/2006, Asse 3 – Risorse Umane, Misura 3.13 – Ricerca e sviluppo tecnologico delle Imprese e territorio and by PRIN from MIUR.

## References

- BRONSON FH. Seasonal variation in human reproduction: environmental factors. *Q Rev Biol* 1995; **70**:141–164.
- WEHR TA. Photoperiodism in humans and other primates: evidence and implications. *J Biol Rhythms* 2001; **16**:348–364.
- NAKAMURA Y, TAMURA H, TAKAYAMA H, KATO H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril* 2003; **80**:1012–1016.
- TAMURA H, NAKAMURA Y, TAKIGUCHI S et al. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. *J Pineal Res* 1998; **25**:135–141.
- SOARES JM, MASANA MI, ERSAHIN C, DUBOCOVICH ML. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **306**:694–702.
- LEE C, DO BR, LEE Y et al. Ovarian expression of melatonin Mela receptor mRNA during mouse development. *Mol Reprod Dev* 2001; **59**:126–132.
- NILES LP, WANG J, SHEN L et al. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999; **156**:107–110.
- YIE SM, BROWN GM, LIU GY et al. Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production. *Hum Reprod* 1995; **10**:50–55.
- BRZEZINSKI A, SEIBEL MM, LYNCH HJ et al. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; **64**:865–867.
- RÖNNBERG L, KAUPPILA A, LEPPÄLUOTO J et al. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **71**:492–496.
- ITOH MT, ISHIZUKA B, KUDO Y et al. Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **136**:7–13.
- ITOH MT, ISHIZUKA B, KURIBAYASHI Y et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod* 1999; **5**:402–408.
- BRZEZINSKI A, FIBICH T, COHEN M et al. Effects of melatonin on progesterone production by human granulosa lutein cells in culture. *Fertil Steril* 1992; **58**:526–529.
- ISHIZUKA B, KURIBAYASHI Y, MURAI K et al. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *J Pineal Res* 2000; **28**:48–51.
- MANJUNATHA BM, DEVARAJ M, GUPTA PSP et al. Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim*. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00982.x.
- PAPIS K, POLESZCZUK O, WENTA-MUCHALSKA E, MODLINSKI JA. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. *J Pineal Res* 2007; **43**:321–326.
- RODRIGUEZ-OSORIO N, KIM IJ, WANG H et al. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. *J Pineal Res* 2007; **43**:283–288.
- KANG JT, KOO OJ, KWON DK et al. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *J Pineal Res* 2008. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00602.x.
- TAMURA H, TAKASAKI A, MIWA I et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* 2008; **44**:280–287.
- GONZALEZ-BULNES A, CARRIZOSA JA, URRUTIA B et al. Oestrous behaviour and development of preovulatory follicles in goats induced to ovulate using the male effect with and without progesterone priming. *Reprod Fertil Dev* 2006; **18**:745–750.
- MENCHACA A, VILARIÑO M, CRISPO M et al. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology* 2007; **68**:1111–1117.
- JIMÉNEZ-MACEDO AR, ANGUITA B, IZQUIERDO D et al. Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilised by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. *Theriogenology* 2006; **66**:1065–1072.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZ L, OPIELA J, RYŃSKA B. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology* 2007; **68**:736–744.
- LEONI GG, BERLINGUER F, SUCCU S et al. A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Mol Reprod Dev* 2008; **75**:373–382.
- GONZALEZ-BULNES A, SANTIAGO-MORENO J, GARCIA-GARCIA RM et al. Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goats. *Theriogenology* 2004; **61**:977–985.
- ROSENKRANS CF, ZENG GQ, MCNAMARA GT et al. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; **49**:459–462.
- SALUMETS A, HYDEN-GRANSKOG C, MAKINEN S et al. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003; **18**:821–825.
- LEONI GG, SUCCU S, BERLINGUER F et al. Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. *Anim Reprod Sci* 2006; **92**:373–383.
- LEONI G, BOGLIOLO L, BERLINGUER F et al. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. *Cryobiology* 2002; **45**:204–212.



30. LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; **25**:402-408.
31. ROBERT C, MCGRAW S, MASSICOTTE L et al. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2002; **67**:1465-1472.
32. BARCROFT LC, OFFENBERG H, THOMSEN P, WATSON AJ. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate trans-epithelial water movements during cavitation. *Dev Biol* 2003; **15**:342-354.
33. EDASHIGE K, TANAKA M, ICHIMARU N et al. Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biol Reprod* 2006; **74**:625-632.
34. BETTS DH, BARCROFT LC, WATSON AJ. Na/K-ATPase-mediated 86Rb<sup>+</sup> uptake and asymmetrical trophectoderm localization of alpha1 and alpha3 Na/K-ATPase isoforms during bovine preattachment development. *Dev Biol* 1998; **197**:77-92.
35. OZAWA M, MATSUZUKA T, HIRABAYASHI M, KANAI Y. Redox status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biol Reprod* 2004; **71**:291-296.
36. LOONES MT, RALLU M, MEZGER V, MORANGE M. HSP gene expression and HSF2 in mouse development. *Cell Mol Life Sci* 1997; **53**:179-190.
37. BERNARD DJ, ABUAV-NUSSBAUM R, HORTON TH, TUREK FW. Photoperiodic effects on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) content and the GnRH-immunoreactive neuronal system of male Siberian hamsters. *Biol Reprod* 1999; **60**:272-276.
38. BROWN DI, GARYFALLOU VT, URBANSKI HF. Photoperiodic modulation of GnRH mRNA in the male Syrian hamster. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; **89**:119-125.
39. GOLDMAN BD. The circadian timing system and reproduction in mammals. *Steroids* 1999; **64**:679-685.
40. REVEL FG, ANSEL L, KLOSEN P et al. Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; **8**:57-65.
41. THOMPSON EL, PATTERSON M, MURPHY KG et al. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 2004; **16**:850-858.
42. MESSEGER S, CHATZIDAKI EE, MA D et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:1761-1766.
43. GOODMAN RL. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. in: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neil J eds., Raven Press, New York, 1988; pp. 1929-1968.
44. GONZALEZ-BULNES A, SOUZA CJ, CAMPBELL BK, BAIRD DT. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Anim Reprod Sci* 2004; **84**:107-119.
45. GRAFF KJ, MENTJES M, HAN Y et al. Comparing follicle stimulating hormone from two commercial sources for oocyte production from out-of-season dairy goats. *J Dairy Sci* 2000; **83**:484-487.
46. FORCADA F, ZARAZAGA L, ABECIA JA. Effect of exogenous melatonin and plane of nutrition after weaning on estrous activity, endocrine status and ovulation rate in Salz ewes lambing in the seasonal anestrus. *Theriogenology* 1995; **43**:1179-1193.
47. LUTHER JS, REDMER DA, REYNOLDS LP et al. Ovarian follicular development and oocyte quality in anestrus ewes treated with melatonin, a controlled internal drug release (CIDR) device and follicle stimulating hormone. *Theriogenology* 2005; **3**:2136-2146.
48. FORCADA F, ABECIA JA, CEBRIAN-PEREZ JA et al. The effect of melatonin implants during the seasonal anestrus on embryo production after superovulation in aged high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes. *Theriogenology* 2006; **65**:356-365.
49. LECHNIAK D, PERS-KAMCZYC E, PAWLAK P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reprod Biol* 2008; **8**:23-42.
50. OUSSAID B, MARIANA JC, POULIN N et al. Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil* 1999; **117**:71-77.
51. BERLINGUER F, GONZALEZ-BULNES A, SUCCU S et al. GnRH antagonist enhance follicular growth in FSH-treated sheep but affect developmental competence of oocytes collected by ovum pick-up. *Theriogenology* 2006; **65**:1099-1109.
52. VERPOEST WM, CAHILL DJ, HARLOW CR, HULL MG. Relationship between midcycle luteinizing hormone surge quality and oocyte fertilization. *Fertil Steril* 2000; **73**:75-77.
53. SIDHU KS, CHEEMA S. Effect of luteinizing hormone and estradiol on in vitro maturation of follicular oocytes in goat (*Capra hircus*). *Acta Vet Hung* 1995; **43**:89-93.
54. TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; **42**: 28-42.
55. LEON J, ACUNA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G et al. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; **38**: 1-9.
56. PEYROT F, DUCROCQ C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 2008; **45**:235-246.
57. REITER RJ, PAREDES SD, KORKMAZ A et al. Melatonin combats molecular terrorism at the mitochondrial level. *Interdisc Toxicol* 2008; **1**:137-149.
58. JOU MJ, PENG TI, YU PZ et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res* 2007; **43**:389-403.
59. DUMOLLARD R, DUCHEN M, CARROLL J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007; **77**:21-49.
60. MAY-PANLOUP P, CHRETIEN MF, MALTHIERY Y, REYNIER P. Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007; **77**:51-83.

## Esperimento 3

*Effetto della supplementazione glucogenica sulla funzionalità follicolare*

## **Esperimento 3. Effetto della supplementazione glucogenica sulla funzionalità follicolare**

### ***Relazione tra nutrizione e riproduzione***

Gli effetti della nutrizione sulla riproduzione sono ben conosciuti e sono stati ampiamente studiati sia nei ruminanti (Lucy e coll., 2003) che nelle specie monogastriche (l'Anson e coll., 1991; Hazeleger e coll., 2005). La nutrizione influenza tutta la catena degli eventi riproduttivi, dalla gametogenesi alla pubertà, sia nel maschio che nella femmina. La ragione di questa stretta relazione tra la nutrizione e la riproduzione è quella di assicurare che gli eventi riproduttivi siano dipendenti dalla disponibilità alimentare. Questa dipendenza è essenziale al fine di assicurare il successo riproduttivo, attraverso la sincronizzazione della lattazione e della crescita del piccolo, entrambi processi che richiedono un elevato dispendio energetico, con un periodo dell'anno in cui si prevede una elevata disponibilità di alimenti ad alto contenuto energetico. Se questa sincronizzazione non dovesse avvenire, la sopravvivenza del piccolo, ed in casi estremi anche quella della madre, verrebbe messa in pericolo.

La riproduzione comporta un notevole investimento energetico per la femmina, e le conseguenze di un errore sono serie e possono mettere a rischio la sopravvivenza sia del piccolo che della madre. Nel maschio, invece, l'investimento energetico è trascurabile rispetto a quello della femmina, e le conseguenze di un errore potrebbero al massimo portare ad un dispendio energetico seguito dalla produzione di un numero inferiore di nuovi nati, senza però pregiudicarne la sopravvivenza. Nel caso dell'ariete, il sistema riproduttivo risponde ad i segnali

nutrizionali facendo in modo che la qualità del materiale seminale corrisponda alla disponibilità energetica.

Per la pecora, la risposta dell'asse riproduttivo ai segnali nutrizionali è molto più complessa. La prima risposta dell'asse riproduttivo è se avviare gli eventi riproduttivi o meno; in caso positivo, viene settato il numero di ovulazioni, in modo da poter dar vita a uno o due agnelli. Nella pecora la popolazione follicolare è molto sensibile ai segnali nutrizionali e sia la follicologenesi che l'ovulazione possono essere prontamente incrementate attraverso un aumento dell'intake energetico.

Sebbene la stretta interdipendenza tra nutrizione stagionale e riproduzione sia un fattore critico per la sopravvivenza della specie nel suo ambiente naturale, in seguito alla domesticazione questa sincronizzazione è diventata una delle cause principali di diminuzione delle produzioni. Così, la pecora e la capra possiedono potenti meccanismi fisiologici che limitano la riproduzione al periodo autunnale e le nascite alla stagione primaverile, la più favorevole per la sopravvivenza del piccolo. D'altra parte, nei sistemi di produzione commerciale questi periodi dal punto di vista dell'allevatore potrebbero non coincidere con il momento migliore per far riprodurre il gregge. La manipolazione della riproduzione attraverso l'utilizzo della nutrizione è uno strumento di management poco costoso, e permette di controllare il numero di ovulazioni anche in sistemi di produzione estensivi ed in ambienti marginali e semi-aridi, che caratterizzano molte regioni del Mediterraneo (Martin e coll., 2004).

La maggior parte degli ormoni metabolici e dei nutrienti che aiutano a mantenere l'omeostasi energetica dell'organismo hanno anche un effetto sul sistema riproduttivo. Di conseguenza, sono state descritte numerose associazioni tra lo stato metabolico e la riproduzione. Gli effetti di un bilancio energetico negativo si manifestano principalmente a livello ipotalamo-ipofisario (Wade e

coll., 2005) e sono caratterizzati da ipoglicemia, ipoinsulinemia, soppressione delle IGF-I plasmatiche, ed elevati livelli di GH. Queste modificazioni sono associate all'inibizione della pulsatilità del GnRH, anovulazione ed anaestro nella femmina. Al momento, non si ritiene che il bilancio energetico negativo abbia un effetto diretto a livello ovarico nella pecora (Lozana e coll., 2003; Kiyama e coll., 2004).

Al contrario, un bilancio energetico positivo porta ad un aumento nelle concentrazioni plasmatiche di leptina ed insulina ed un aumento nell'uptake di glucosio; queste modificazioni sembrano avere un effetto diretto a livello ovarico e sono associate con un aumento nella follicologenesi e nella tasso di ovulazione nella pecora. Il bilancio energetico positivo è anche associato ad alterazioni nel metabolismo epatico degli steroidi (Parr e coll., 1993), che possono portare ad alterazioni nel meccanismo di feedback negativo esistente tra l'ovaio ed il sistema ipotalamo-ipofisario, e quindi in teoria ad un aumento della follicologenesi. Al momento non si ritiene che il bilancio energetico positivo abbia un effetto stimolatorio diretto sull'asse ipotalamo-ipofisario (Wade e coll., 2005).

Se il bilancio energetico positivo persiste, porterà inevitabilmente ad un incremento del peso corporeo. D'altra parte, l'effetto stimolatorio della nutrizione sulla follicologenesi può rendersi evidente ben prima che si abbia un incremento del peso corporeo. L'analisi descrittiva degli effetti della nutrizione sul peso corporeo ha portato ad una classificazione degli effetti nutrizionali sulla tasso ovulatoria (figura 1).

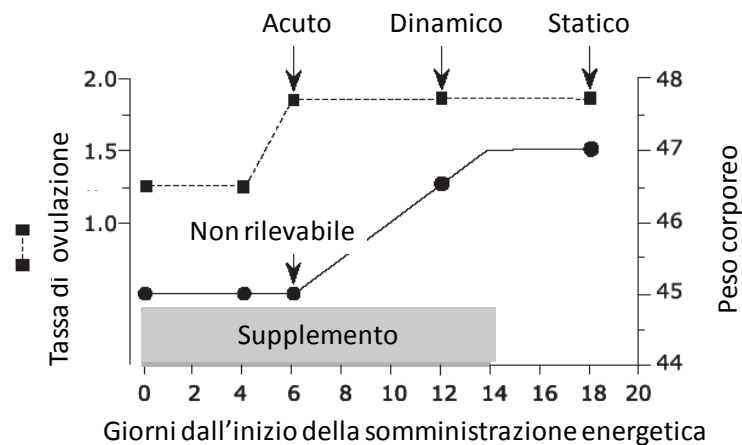


Figura 1. Influenza “acuta”, “dinamica” e “statica” della nutrizione sulla tassa ovulatoria nella pecora.

L’effetto “acuto” o “immediato” si verifica in assenza di modificazioni del peso corporeo, quello “dinamico” è invece associato ad un incremento ponderale, che poi si mantiene costantemente elevato durante l’effetto “statico”. Tali effetti possono essere così schematizzati:

- “effetto immediato”, che riflette nell’arco di pochi giorni (4-6 giorni) l’esito dell’apporto di nutrienti che non si traducono in variazioni di peso o di condizione corporea. Gli studi sull’effetto statico hanno evidenziato una correlazione positiva tra peso corporeo e tasso di ovulazione, ma solo al di sopra di una soglia minima di peso che dipende dalla razza considerata; al di sopra di tale soglia sia Lindsay e coll. che Morley e coll. hanno rispettivamente evidenziato, nella razza Merino, incrementi del tasso di ovulazione dell’1,2% e del 2% per ogni Kg addizionale di peso corporeo;



- “effetto dinamico”, esercitato dalle variazioni del peso corporeo e del BCS nel periodo precedente la monta o l’inseminazione (2-3 settimane), che rappresenta le variazioni dello stato nutrizionale degli animali nel medio periodo;

- “effetto statico” dovuto al peso corporeo (peso vivo al netto del contenuto digestivo) ed al BCS delle pecore alla monta o all’inseminazione, che riflettono lo stato nutrizionale degli animali, con particolare riferimento al bilancio energetico;

Gli effetti dinamici - che nella pratica derivano dall’applicazione della tecnica alimentare del flushing - sono risultati meno ripetibili di quelli statici. Il peso corporeo e lo stato nutrizionale degli animali alla monta influenzerebbe il numero di follicoli (diametro maggiore di 2 mm) sensibili all’azione dell’FSH per l’accrescimento finale; il flushing, invece, agirebbe sui follicoli che hanno già avviato tale processo. Lindsay e Martin ipotizzano che questi effetti altro non sono che il frutto di un unico meccanismo di controllo del tasso di ovulazione, in cui effetto statico e dinamico sono la stessa risposta fisiologica misurata in tempi diversi rispetto all’inizio dell’integrazione alimentare. Tutto sarebbe legato al bilancio nutrizionale netto, dato dalla somma delle fonti nutritive endogene (processi catabolici a carico delle sostanze di riserva) ed esogene, derivanti dall’utilizzazione degli alimenti.

Il legame tra il sistema metabolico e quello riproduttivo coinvolge più ormoni metabolici e nutrienti, che sono parte integrante del sistema di utilizzazione degli alimenti e dell’omeostasi metabolica dell’organismo. Molti sistemi ormonali che rispondono ai segnali nutrizionali hanno anche una influenza sull’ovaio, e tra questi sistemi numerosi gruppi di ricerca stanno cercando di identificare quello che rappresenta il legame tra nutrizione e follicolo. Tra di essi, vengono sicuramente presi in considerazione il sistema insulina-glucosio, le IGF e la leptina.

I meccanismi che mediano gli effetti nutrizionali sulla follicologenesi sono probabilmente caratterizzati da specifici segnali nutrizionali che informano il sistema riproduttivo dell'esistenza delle appropriate condizioni energetiche per la riproduzione. In altre parole, sia per la spermatogenesi che per la follicologenesi, la nutrizione agisce come un segnale metabolico per il sistema riproduttivo.

#### *Effetti intra-follicolari della supplementazione energetica*

Le azioni intra-follicolari del sistema insulina-glucosio, delle IGF e della leptina sono state tutte inequivocabilmente dimostrate nella pecora. Sia l'infusione di glucosio che la somministrazione di lupino influenzano tutti questi sistemi intra-follicolari (Muñoz-Gutiérrez e coll., 2002).

Il sistema intra-follicolare insulina-glucosio è stimolato dai trattamenti di supplementazione nutrizionale. Si osserva innanzitutto una aumentata espressione delle proteine GLUT-1 e GLUT-4 nelle cellule della teca e della granulosa, e un maggiore uptake di glucosio da parte dell'ovaio (Williams e coll., 2001). Gli effetti riproduttivi dell'infusione di glucosio o della somministrazione di lupino si traducono nella soppressione della secrezione di estradiolo durante la fase follicolare, con conseguente stimolazione della follicologenesi ed aumento della tasso ovulatoria per rimozione del feedback negativo sulla liberazione di FSH.

Anche il sistema leptina è presente all'interno del follicolo, come dimostrato dalla presenza dell'mRNA per la sintesi della leptina e del suo recettore (ObRb) (Muñoz-Gutiérrez e coll., 2005). L'infusione di glucosio o la somministrazione di lupino portano ad un aumento del numero di follicoli che esprime l'mRNA per il recettore della leptina. Una serie di esperimenti (Kendall e coll., 2004) ha poi dimostrato che la leptina inibisce la secrezione di estradiolo in vivo e stimola la follicologenesi durante la fase follicolare del ciclo estrale. L'effetto inibitorio della leptina sulla

secrezione follicolare di estradiolo è stato osservato in seguito alla somministrazione di basse dosi (2 µg), e non ad alte dosi (20 µg) di leptina (Kendall e coll., 2004).

Il sistema IGF-I è uno stimolatore estremamente potente della proliferazione follicolare e della secrezione steroidea da parte dei follicoli in quasi tutte le specie. Quando la concentrazione ematica di IGF-I è bassa, come durante un periodo di bilancio energetico negativo, la follicologenesi e la secrezione steroidea sono soppresse, come si osserva nella vacca dopo il parto (Bondy e coll., 1993). D'altra parte, quando la concentrazione di IGF-I è elevata, la sua azione sul follicolo deve essere controllata, al fine di evitare una possibile iperstimolazione ovarica. Dato che il circuito di feedback che controlla la secrezione epatica di IGF-I non include l'ovaio, le sue azioni intra-follicolari devono essere controllate localmente. Da questo punto di vista è importante notare che i follicoli di specie monoovulatorie, come l'uomo, l'ovino ed il bovino, non producono all'interno del follicolo quantitativi significativi di IGF-I (Mazerbourg e coll., 2003; Hastie e coll., 2006). La produzione follicolare di IGF-I sembra essere limitata ai piccoli mammiferi, come i roditori, che presentano un ciclo estrale molto breve e in cui le frequenti ovulazioni richiedono una rapida follicologenesi (Hernandez e coll., 1995), ed ai grandi mammiferi con tassi ovulatorie molto alte, come il suino (Zhou e coll., 1996). Nella pecora, si ritiene che l'effetto della supplementazione energetica sul sistema IGF sia quello di controllare la biodisponibilità dell'IGF-I all'interno del follicolo, grazie all'azione dell'IGF-II e delle insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP 2, 4 e 5). La supplementazione energetica porta, infatti, ad un aumento dell'espressione delle IGFBP2, riducendo la biodisponibilità di IGF-I all'interno del follicolo (Muñoz-Gutiérrez e coll., 2004).

#### *Effetti sistemici della supplementazione energetica*

Le evidenze sperimentali indicanti che il follicolo sia il primo sito di azione della manipolazione nutrizionale della follicologenesi stanno progressivamente aumentando. D'altra parte bisogna contemporaneamente tenere in considerazione l'importanza delle gonadotropine e dei feedback negativi in questo processo. In particolare, l'FSH ed il circuito di feedback negativo dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, sono fattori critici nel regolare la risposta follicolare alla stimolazione nutrizionale. L'effetto della nutrizione sulle concentrazioni plasmatiche di FSH è molto probabilmente rapido e transitorio, e non comporta variazioni al di fuori del range normale di concentrazione. Di conseguenza, rimane difficile da dimostrare e poco chiaro. Questa è probabilmente la ragione principale per cui si ritiene che l'azione positiva della supplementazione energetica sulla follicologenesi sia dovuta quasi unicamente ad un effetto locale di inibizione della secrezione di estradiolo da parte dei follicoli. L'effetto della nutrizione sulla produzione di inibina follicolare non è stato ancora studiato e non ci sono dati pubblicati al riguardo. Questa è sicuramente una omissione non trascurabile che merita ulteriori studi.

### ***Scopo del lavoro***

Nella specie ovina il miglioramento dell'efficienza riproduttiva e dei tassi di ovulazione può essere raggiunto attraverso differenti metodi, che includono sia trattamenti con ormoni esogeni che modificazioni del regime alimentare somministrato. In quest'ultimo caso in particolare, una supplementazione nutrizionale di 4-6 giorni, quindi a breve termine, al momento della selezione del follicolo dominante può portare già ad un significativo miglioramento dell'efficienza riproduttiva. Questo effetto è conosciuto come effetto nutrizionale immediato od acuto, o come effetto lupino, dato che è stato ottenuto per la prima volta in seguito alla somministrazione di grani di lupino (*Lupinus angustifolius*). In realtà il lupino è un alimento altamente proteico, con

oltre il 30% di proteine grezze e oltre il 6% di zuccheri semplici. Negli anni successivi l'effetto nutrizionale immediato è stato oggetto di numerosi studi, che hanno impiegato differenti fonti energetiche, come i grani di lupino (Williams e coll. 2001, Munoz-Gutierrez e coll. 2002), il mais (Letelier e coll. 2008), aminoacidi e glucosio (Munoz-Gutierrez e coll. 2002) ed ormoni metabolici come l'insulina.

I meccanismi alla base dell'influenza positiva dell'effetto nutrizionale immediato sulla tasso di ovulazione e sulla prolificità sono stati oggetto di numerosi studi (Scaramuzzi e coll. 2006); in generale i dati ottenuti suggeriscono che l'azione degli inputs nutrizionali a livello ovarico sia molto più rilevante degli effetti sui centri encefalici regolanti la sfera riproduttiva (Martin e coll. 2004). I risultati di un recente studio (Letelier e coll., 2008) indicano che la somministrazione di una miscela gluconeogenetica per 5 giorni modifica il tasso di ovulazione, incrementando sia il numero che la competenza allo sviluppo dei follicoli ovarici. Questi risultati giustificherebbero il più alto tasso di ovulazione ottenuto in seguito all'utilizzo di substrati altamente energetici. La prolificità nei ruminanti, come in molte altre specie, può essere incrementata sia da una maggiore tasso di ovulazione che da un miglioramento della qualità degli embrioni prodotti e quindi da un aumento della loro possibilità di sopravvivenza ed impianto. D'altra parte, non ci sono studi sui possibili effetti della somministrazione di substrati glucogenici sulla qualità degli oociti e degli embrioni. Queste informazioni sarebbero importanti al fine di stabilire in maniera conclusiva i meccanismi intrinseci dell'aumentata prolificità in seguito all'effetto nutrizionale immediato. D'altra parte, se l'effetto immediato migliora la competenza dei follicoli, è possibile che allo stesso modo migliori la competenza degli oociti all'interno degli stessi follicoli. È noto, infatti, che gli oociti necessitano un metabolismo di tipo ossidativo ed un limitato metabolismo del glucosio, ma grazie al loro legame metabolico con le cellule del cumulo, la disponibilità del glucosio ed il suo

metabolismo da parte delle cellule somatiche potrebbe avere un impatto significativo sulla competenza meiotica ed allo sviluppo dell'ocita (Thompson e coll., 2007).

Di conseguenza, lo studio portato avanti nella presente sperimentazione aveva l'obiettivo di determinare l'influenza della supplementazione glucogenica sulla competenza allo sviluppo dell'ocita. A questo scopo sono stati utilizzati due gruppi di pecore Sarde adulte a cui veniva somministrato o meno un substrato altamente energetico per 5 giorni durante il trattamento a base di FSH esogeno. L'effetto nutrizionale immediato è stato valutato studiando il pattern di sviluppo follicolare, in modo da poterlo correlare successivamente con la funzionalità degli oociti, e la competenza allo sviluppo in vitro degli oociti prelevati alla fine del trattamento. La miscela energetica è costituita per la maggior parte da glicerolo (70 %), da glicole propilenico o 1,2 propandiolo (20%) e da acqua (10%) per diminuirne la viscosità.

## ***Materiali e Metodi***

### **Animali e disegno sperimentale**

Al fine di questo studio sono state utilizzate 22 pecore adulte (4-5 anni) di razza Sarda. Durante il periodo di studio alle pecore veniva somministrata una razione alimentare di mantenimento (AFRC 1993; 46 g di sostanza secca per Kg di peso metabolico; BW<sup>0.75</sup>). Gli esperimenti sono stati portati avanti durante l'anaestro stagionale, tra marzo e maggio, e tutti gli animali del gruppo non erano ciclici, come confermato dal mancato riscontro di corpi lutei al momento dell'esame ecografico.

Il trattamento di iperstimolazione ovarica per il recupero degli oociti è stato quindi preceduto da un protocollo di induzione dell'estro, come precedentemente descritto (Gonzalez-Bulnes e coll., 2005; Berlinguer e coll., 2007). In particolare, il ciclo è stato sincronizzato in tutti gli animali mediante l'inserzione di spugne intravaginali impregnate di progestageni (45 mg di fluorgestone

acetato; Chronogest®, Intervet International, Boxmeer, The Netherlands) e mantenute in situ per 6 giorni. Al momento della rimozione della spugna l'ovulazione è stata indotta attraverso la somministrazione di 300 IU di eCG (Folligon®, Intervet International, Boxmeer, The Netherlands). La stimolazione ovarica allo sviluppo follicolare ed il recupero degli oociti sono stati portati avanti nella successiva fase luteinica. Sei giorni dopo la rimozione delle spugne (giorno 0 del periodo sperimentale) le pecore sono state pesate ( $34.8 \pm 3$  kg) ed è stato determinato il body condition score ( $2.7 \pm 0.3$ ; 1 = emaciato, 5 = obeso). Il gregge è stato quindi diviso casualmente in due gruppi. Nel gruppo GLU, alle pecore venivano somministrati due volte al giorno per via orale 200 ml di una miscela glucogenetica per 4 giorni (dal giorno 7 al giorno 10 del periodo sperimentale). La formulazione glucogenica conteneva il 70% di glicerolo, il 20% di propandiole ed il 10% di acqua. Al gruppo di pecore controllo (CTR) venivano somministrati 200 ml di acqua secondo le stesse modalità.

Gli effetti del trattamento sul metabolismo del glucosio sono stati determinati dal giorno 7 al giorno 11 mediante il prelievo di campioni ematici ogni 12 ore, in coincidenza con il momento del trattamento orale. Il sangue è stato prelevato in provette eparinizzate; in seguito a centrifugazione a  $1500 \times g$  per 15 minuti veniva rimosso il plasma e stoccato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi. Alla fine del trattamento glucogenico (giorno 11) le pecore sono state nuovamente pesate ( $35 \pm 2.7$  Kg) ed è stato determinato il body condition score ( $2.8 \pm 0.4$ ); non sono state rilevate differenze significative rispetto al giorno 0. Dal giorno 8 al giorno 10 dopo la rimozione delle spugne, lo sviluppo follicolare è stato stimolato in entrambi i gruppi sperimentali mediante la somministrazione di 175 UI di FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Bio 98, Milano, Italy), somministrate in 6 dosi uguali ogni 12 ore. L'effetto del trattamento glucogenico e/o della somministrazione di FSH sulla dinamica e funzionalità follicolare è stato valutato dal giorno 6 al giorno 11 mediante scanning ecografico delle ovaie e determinazione dei livelli serici di

estradiolo. Al giorno 11, 12 ore dopo l'ultima somministrazione di FSH, le ovaie sono state prelevate mediante ovariectomia e processate per il recupero degli oociti e la produzione di embrioni in vitro. La competenza degli oociti è stata determinata in base alla produzione di blastocisti.

## **Valutazione morfometrica dei follicoli e dinamica di accrescimento dei corpi lutei**

Come precedentemente descritto

## **Determinazione dei livelli di glucosio ed estradiolo**

La concentrazione di glucosio è stata determinata mediante un analizzatore automatico (Screen Point, Hospitex Diagnostics, Sesto Fiorentino, Italy), secondo le istruzioni della casa di produzione. La sensibilità era pari a 10 mg/dl e i coefficienti di variabilità inter- ed intra-analisi erano pari a 1.3 e 1.2% rispettivamente.

La concentrazione plasmatica di estradiolo è stata misurata mediante il metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico grazie all'utilizzo di appositi kits (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel-Wellsee, Germany). La sensibilità era pari a 1.4 pg/ml e il coefficiente di variabilità intra-analisi erano pari a 5.7% rispettivamente.

## **Maturazione, fertilizzazione e coltura in vitro degli oociti**

Come precedentemente descritto

## **Analisi statistica**

La valutazione delle modificazioni nel peso corporeo e nel body condition score all'inizio ed alla fine del trattamento glucogenetico è stata effettuata mediante ANOVA unidirezionale.

I dati ecografici ed i livelli ormonali sono stati valutati contemporaneamente al fine di valutare il pattern di crescita dei follicoli. Tutti i follicoli visualizzati ecograficamente venivano classificati in base al loro diametro maggiore e quindi raggruppati come follicoli totali ( $\geq 2$  mm), grandi ( $\geq 5.5$

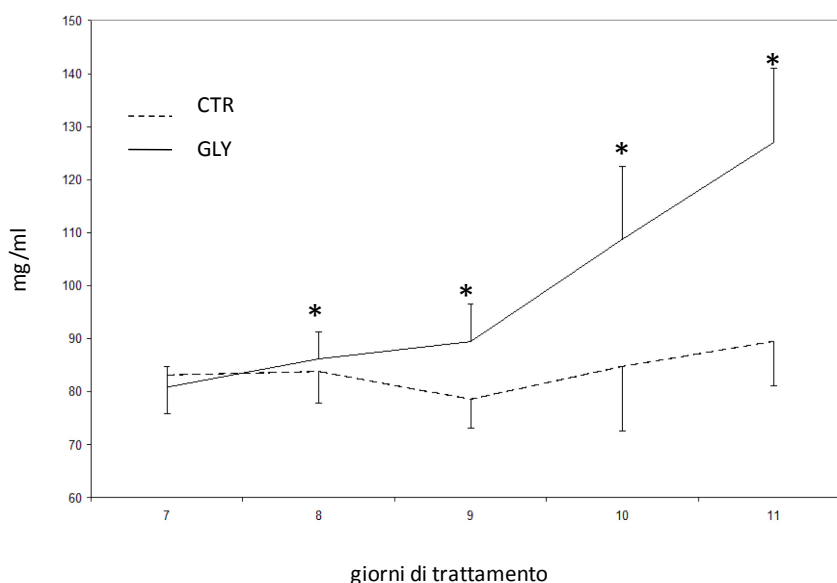


mm), medi (3.5–5.4 mm) e piccoli (2–3.4 mm). Quindi la variazione nella dinamica follicolare e nelle concentrazioni di glucosio ed estradiolo è stata determinata mediante ANOVA unidirezionale, seguita eventualmente dal Kruskal–Wallis test, quando il test di Levene mostrato una varianza non omogenea.

Le differenze nella competenza alla sviluppo degli oociti sono state determinate mediante test del  $\chi^2$ . Tutti i risultati sono espresso come media  $\pm$  S.E.M. e una probabilità  $P < 0.05$  veniva considerata significativa.

## Risultati

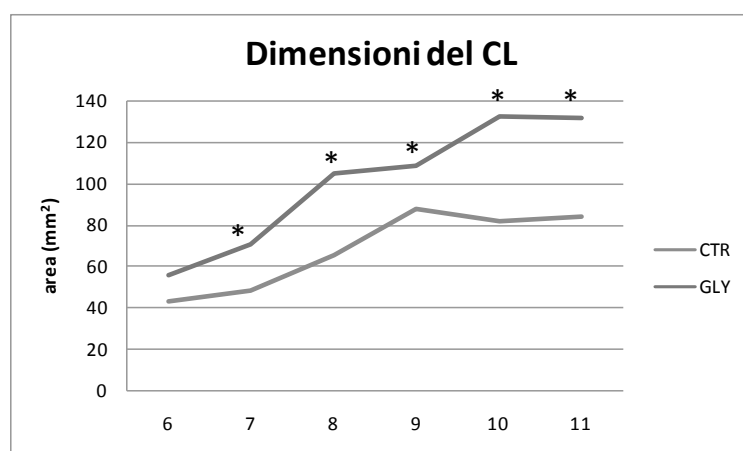
I livelli plasmatici di glucosio all’inizio del trattamento glucogenico erano comparabili tra i due gruppi (figura 1). Dopo il primo giorno di somministrazione, invece, i livelli di glucosio aumentarono significativamente nel gruppo trattato, per mantenersi poi a livelli statisticamente maggiori rispetto al gruppo controllo per tutta la durata del trattamento.



**Figura 1.** Livelli plasmatici di glucosio determinati in pecore trattate con una miscela glucogenica (GLY) e controllo (CTR) in seguito a stimolazione ovarica con FSH esogeno durante il periodo anaestrale.

\* Indica una differenza statisticamente significativa:  $p < 0.05$  (ANOVA unidirezionale)

Il diametro medio del corpo luteo ha mostrato un progressivo aumento in entrambi i gruppi durante le osservazioni ecografiche, effettuate dal giorno 6 al giorno 11 di trattamento ed equivalenti approssimativamente al periodo tra il 5° ed il 10° giorno dopo l'ovulazione (figura 2). D'altra parte, è significativo notare che i corpi lutei erano mediamente di maggiori dimensioni nel gruppo trattato durante tutto il periodo (da  $56.0 \pm 13.2$  a  $131.0 \pm 20.0$ ,  $P < 0.05$  nel gruppo trattato e da  $43.2 \pm 12.0$  a  $83.7 \pm 24.6$ ,  $P < 0.05$  nel gruppo controllo;  $P < 0.05$ ).



**Figura 2.** Dimensioni medie dei corpi lutei secondo quando rilevato all'osservazione ecografica in pecore trattate con una miscela glucogenica (GLY) e controllo (CTR) in seguito a stimolazione ovarica con FSH esogeno durante il periodo anaestrale.

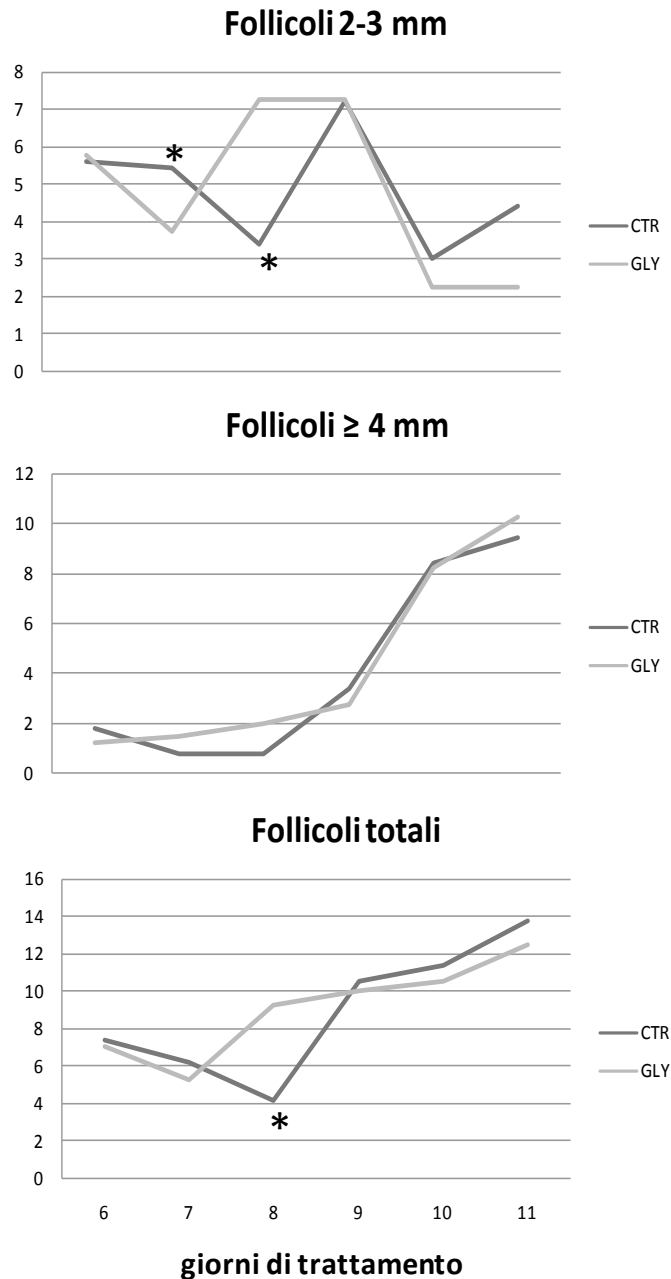
\* Indica una differenza statisticamente significativa:  $p < 0.05$  (ANOVA unidirezionale)

Al momento della prima osservazione ecografica al giorno 6 del trattamento, non sono state riscontrate significative differenze tra pecore trattate e non trattate nel numero totale di follicoli  $\geq 2$  mm ( $7.0 \pm 0.7$  e  $7.4 \pm 1.2$ , rispettivamente). In seguito, il trattamento glucogenico, iniziato al giorno 7, ha portato dopo 24 ore ad un aumento nel numero di follicoli di 2-3 mm; nelle pecore controllo non è stata riscontrata invece alcuna differenza nel numero di follicolo di 2-3 mm tra il

giorno 7 ed il giorno 8. La somministrazione di FSH (giorni 8-10) ha portato poi ad un significativo aumento, in entrambi i gruppi, nel numero dei follicoli totali  $\geq 2$  mm (da  $5.3 \pm 0.7$  a  $12.5 \pm 1.9$ ,  $P < 0.005$  nel gruppo trattato e da  $6.2 \pm 0.4$  a  $13.8 \pm 2.5$ ,  $P < 0.005$  nel gruppo controllo). Anche se le modificazioni nel numero totale di follicoli erano comparabili tra i due gruppi, le dinamiche di accrescimento della popolazione follicolare mostravano comunque delle differenze (figura 3).

Come illustrato nella tabella 1, non sono state riscontrate differenze nel numero di oociti recuperati dal gruppo controllo ( $n=184$ ;  $16.7 \pm 6.2$ ) e dal gruppo trattato ( $n=190$ ;  $17.3 \pm 4.8$ ).

D'altra parte, le differenze nella competenza allo sviluppo degli oociti provenienti dai due gruppi di pecore è apparsa evidente dopo la fertilizzazione e la coltura in vitro. Le percentuali di fertilizzazione, infatti, erano significativamente maggiori nel gruppo trattato rispetto a quello controllo (87.8 vs 78.4 %;  $p < 0.05$ ). Inoltre, sebbene non siano state riscontrate differenze nelle percentuali di divisioni embrionarie, la produzione totale di blastocisti erano significativamente maggiore nel gruppo trattato rispetto a quello controllo (63.6 vs 51.1 %;  $p < 0.01$ ), suggerendo così una maggiore competenza per gli oociti recuperati dalle pecore trattate con la miscela glucogenica. È importante sottolineare che nel gruppo trattato è stata anche rilevata una più rapida cinetica di sviluppo embrionale, come testimoniato dalla maggior percentuale di blastocisti sviluppatasi al giorno 6 di coltura post-fertilizzazione nel gruppo trattato rispetto a quello controllo (29.1 vs 6.1%;  $p < 0.0001$ ).



**Figura 3.** Numero medio dei follicoli di 2-3 mm, ≥ 4 mm e totali secondo quando rilevato all'osservazione ecografica in pecore trattate con una miscela glucogenica (GLY) e controllo (CTR) in seguito a stimolazione ovarica con FSH esogeno durante il periodo anaestrale.

\* Indica una differenza statisticamente significativa:  $p < 0.05$  (ANOVA unidirezionale)

Tabella 1. Competenza allo sviluppo in vitro di oocite recuperate a pecore trattate con una miscela glucogenica (GLY) e controllo (CTR) in seguito a stimolazione ovarica con FSH esogeno durante il periodo anaestrale.

|     | Oociti recuperati (mean ± SE) | Oociti            |                   | Divisi TOT                 | Embrioni (%)**      |                           |                     |              |                           |
|-----|-------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|--------------|---------------------------|
|     |                               | IVM               | Fertilizzati (%)* |                            | 6° dpf <sup>+</sup> | 7° dpf <sup>+</sup>       | 8° dpf <sup>+</sup> | TOT          |                           |
| CTR | # 1                           | 18                | 17                | 16                         | 15                  | 0                         | 8                   | 4            | 12                        |
|     | # 2                           | 22                | 21                | 19                         | 14                  | 2                         | 3                   | 3            | 8                         |
|     | # 3                           | 19                | 18                | 17                         | 12                  | 2                         | 3                   | 0            | 5                         |
|     | # 4                           | 14                | 14                | 14                         | 14                  | 0                         | 1                   | 3            | 4                         |
|     | # 5                           | 17                | 15                | 15                         | 12                  | 0                         | 2                   | 6            | 8                         |
|     | # 6                           | 22                | 19                | 15                         | 15                  | 1                         | 8                   | 2            | 11                        |
|     | # 7                           | 23                | 19                | 8                          | 7                   | 0                         | 3                   | 0            | 3                         |
|     | # 8                           | 19                | 18                | 11                         | 11                  | 3                         | 1                   | 0            | 4                         |
|     | # 9                           | 3                 | 2                 | 1                          | 1                   | 0                         | 1                   | 0            | 1                         |
|     | # 10                          | 19                | 18                | 11                         | 11                  | 0                         | 9                   | 0            | 9                         |
|     | # 11                          | 8                 | 6                 | 4                          | 4                   | 0                         | 2                   | 0            | 2                         |
|     | Tot                           | 184<br>(16.7±1.7) | 167               | 131 <sup>a</sup><br>(78.4) | 116<br>(88.5)       | 8 <sup>c</sup><br>(6.1)   | 41<br>(31.3)        | 18<br>(13.7) | 67 <sup>e</sup><br>(51.1) |
| GLY | # 1                           | 15                | 15                | 15                         | 14                  | 3                         | 6                   | 5            | 14                        |
|     | # 2                           | 22                | 18                | 17                         | 15                  | 13                        | 0                   | 0            | 13                        |
|     | # 3                           | 19                | 19                | 18                         | 15                  | 0                         | 1                   | 5            | 6                         |
|     | # 4                           | 21                | 19                | 18                         | 17                  | 2                         | 7                   | 2            | 11                        |
|     | # 5                           | 23                | 20                | 19                         | 15                  | 7                         | 6                   | 0            | 13                        |
|     | # 6                           | 19                | 17                | 17                         | 10                  | 0                         | 1                   | 6            | 7                         |
|     | # 7                           | 10                | 9                 | 8                          | 8                   | 2                         | 3                   | 2            | 7                         |
|     | # 8                           | 9                 | 8                 | 7                          | 7                   | 1                         | 3                   | 0            | 4                         |
|     | # 9                           | 21                | 18                | 17                         | 17                  | 14                        | 1                   | 0            | 15                        |
|     | # 10                          | 13                | 12                | 7                          | 6                   | 1                         | 0                   | 0            | 1                         |
|     | # 11                          | 18                | 17                | 8                          | 7                   | 2                         | 3                   | 0            | 5                         |
|     | TOT                           | 190<br>(17.3±1.7) | 172               | 151 <sup>b</sup><br>(87.8) | 131<br>(86.7)       | 44 <sup>d</sup><br>(29.1) | 32<br>(21.1)        | 20<br>(13.2) | 96 <sup>f</sup><br>(63.6) |

All'interno della stessa colonna, apici differenti indicano valori statisticamente differente (Chi-square test: a ≠ b: p<0.05; c ≠ d: p<0.0001; e ≠ f: p<0.01). <sup>+</sup> hpf: ore di coltura post-fertilizzazione; dpf: giorni di coltura post-fertilizzazione.

\* La percentuale è calcolata sugli oociti IVM.

\*\* La percentuale è calcolata sugli oociti fertilizzati.

## ***Discussione***

Lo studio portato avanti nella presente tesi di laurea ha permesso di confermare che una supplementazione energetica acuta modifica le dinamiche di accrescimento follicolare, aumentando la quota di reclutamento dei follicoli di piccole dimensioni e stimolandone uno sviluppo fino a dimensioni maggiori. La somministrazione di dosi superovulatorie di FSH ha poi annullato le differenze nella dinamica follicolare tra pecore trattate e controllo; d'altra parte gli oociti ottenuti da pecore trattate con la miscela glucogenica hanno mostrato una maggiore competenza allo sviluppo rispetto al gruppo controllo, come testimoniato dal più alto numero di blastocisti ottenute in seguito a maturazione, fertilizzazione e coltura in vitro.

L'aumento nel reclutamento follicolare osservato nel presente studio a partire dalla prima somministrazione della miscela glucogenica conferma i dati riscontrati da Letelier e coll. (2008). In generale si ritiene che il follicolo sia il primo sito di azione della manipolazione nutrizionale della follicologenesi. Molti sistemi ormonali che rispondono ai segnali nutrizionali hanno anche una influenza sull'ovaio, e tra questi sistemi numerosi gruppi di ricerca stanno cercando di identificare quello che rappresenta il legame tra nutrizione e follicolo. Tra di essi, vengono sicuramente presi in considerazione il sistema insulina-glucosio, le IGF e la leptina. Il sistema intra-follicolare insulina-glucosio è stimolato dai trattamenti di supplementazione nutrizionale. Si osserva innanzitutto una aumentata espressione delle proteine GLUT-1 e GLUT-4 nelle cellule della teca e della granulosa, e un maggiore uptake di glucosio da parte dell'ovaio (Williams e coll., 2001). Gli effetti riproduttivi dell'infusione di glucosio o della somministrazione di lupino si traducono nella soppressione della secrezione di estradiolo durante la fase follicolare, con conseguente stimolazione della follicologenesi ed aumento della tasso ovulatoria per rimozione del feedback negativo sulla liberazione di FSH. Anche il sistema leptina è presente all'interno del follicolo, come

dimostrato dalla presenza dell'mRNA per la sintesi della leptina e del suo recettore (ObRb) (Muñoz-Gutiérrez e coll., 2005). L'infusione di glucosio o la somministrazione di lupino portano ad un aumento del numero di follicoli che esprime l'mRNA per il recettore della leptina. Una serie di esperimenti (Kendall e coll., 2004) ha poi dimostrato che la leptina inibisce la secrezione di estradiolo in vivo e stimola la follicologenesi durante la fase follicolare del ciclo estrale.

Il sistema IGF-I è uno stimolatore estremamente potente della proliferazione follicolare e della secrezione steroidea da parte dei follicoli in quasi tutte le specie. Nella pecora, si ritiene che l'effetto della supplementazione energetica sul sistema IGF sia quello di controllare la biodisponibilità dell'IGF-I all'interno del follicolo, grazie all'azione dell'IGF-II e delle insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP 2, 4 e 5). La supplementazione energetica porta, infatti, ad un aumento dell'espressione delle IGFBP2, riducendo la biodisponibilità di IGF-I all'interno del follicolo (Muñoz-Gutiérrez e coll., 2004).

L'effetto finale dell'attivazione di questi sistemi intra-follicolari si traduce in una diminuzione della secrezione di estradiolo da parte dei follicoli, con conseguente riduzione del feedback negativo sulla liberazione di FSH, ed aumento della follicologenesi.

La supplementazione energetica ha portato alcuni follicoli di dimensioni minori di 2 mm ad accrescersi fino a 2-3 mm ed entrare nel pool di follicoli gonadotropino-sensibili, e allo stesso tempo ha stimolato l'accrescimento dei follicoli di 2-3 mm. Di conseguenza, sembra che la maggior parte delle pecore trattate fosse all'inizio di un'ondata follicolare al momento della prima somministrazione di FSH. Questa situazione rappresenta lo scenario migliore per iniziare un trattamento di iperstimolazione ovarica dato che questi follicoli hanno potuto accrescersi in maniera continua durante il periodo di sviluppo finale stimolato dall'FSH esogeno.

Come dimostrato in un precedente studio portato avanti dal nostro laboratorio nella stessa razza e con lo stesso protocollo (Berlinguer e coll., 2007), il trattamento con FSH determina un incremento sia nel numero totale di follicoli  $\geq 2\text{mm}$  che nel numero di follicoli  $\geq 4\text{mm}$ . Questa ultima categoria follicolare risulta essere quella più competente per ottenere buoni tassi di produzione embrionale (Veiga-Lopez e coll., 2008). Non sono state riscontrate differenze nella risposta superovulatoria tra pecore trattate e controllo e di conseguenza anche il numero di oociti recuperati era comparabile tra i due gruppi. Osservando i risultati ottenuti nel gruppo controllo in termini di percentuali di oociti divisi e blastocisti prodotte abbiamo rilevato che essi risultano comparabili ai risultati ottenuti precedentemente dal nostro laboratorio utilizzando la stessa razza ovina e lo stesso protocollo (Berlinguer e coll., 2007). È universalmente riconosciuto che i follicoli che si accrescono sotto lo stimolo delle gonadotropine esogene presentano una minore funzionalità, e gli oociti da essi prelevati risultano meno competenti allo sviluppo in embrioni di buona qualità. Studi precedenti hanno evidenziato che gli oociti prelevati da donatrici stimolate con FSH sono di minori dimensioni e portano a percentuali minori di maturazione in vitro (Driancourt, 2001), che a sua volta comporta una maggiore incidenza di deficienza nel processo di maturazione e di sviluppo embrionale (Rubianes e coll., 1997).

I risultati riportati nel presente studio dimostrano, invece, l'influenza positiva svolta dal trattamento glucogenetico sulla qualità degli oociti. In particolare, la somministrazione della miscela energetica ha migliorato la capacità degli oociti di portare avanti il processo di fertilizzazione, ed di successivo sviluppo embrionale, portando quindi ad un significativo aumento nel numero totale di blastocisti prodotte. È importante sottolineare, inoltre, che nel gruppo trattato si è osservata anche una più veloce cinetica di sviluppo embrionale, come testimoniato dal più alto numero di blastocisti sviluppatasi al 6° giorno di coltura post-fertilizzazione rispetto al



gruppo controllo. Questo dato è particolarmente significativo considerato che le blastocisti più precoci sono considerate quelle di migliore qualità (Leoni e coll., 2006).

L'effetto positivo del trattamento glucogenetico sulla competenza allo sviluppo dei follicoli e degli oociti potrebbe essere il risultato di una azione locale diretta sull'ovaio, come suggerito da differenti studi (Williams e coll. 2001; Muñoz-Gutierrez e coll. 2002). È stato, infatti, riportato che il glucosio può avere un impatto significativo sulla competenza allo sviluppo dell'oocita attraverso il legame metabolico tra la cellula uovo e le cellule della granulosa che formano il cumulo ooforo (Thompson e coll., 2007).

Le cellule del cumulo consumano rilevanti quantità di glucosio, specialmente durante le ultime fasi di maturazione dell'oocita. In particolare, il consumo di glucosio da parte delle cellule somatiche è 23 volte maggiore rispetto a quello dell'oocita, che invece consuma più ossigeno (Thompson e coll., 2007). Buona parte del glucosio viene convertito in lattato, dimostrando l'elevato metabolismo anaerobico delle cellule del cumulo (Sutton e coll., 2003). Nella fase finale di maturazione dell'oocita, quando avviene l'espansione delle cellule del cumulo, aumenta ulteriormente l'uptake di glucosio, ma questo non viene più convertito primariamente a lattato, e viene invece utilizzato per la sintesi di acido ialuronico, essendone il principale substrato (Sutton-McDowall e coll., 2004). Di conseguenza una elevata disponibilità di glucosio nel liquido follicolare sarebbe indispensabile per il corretto metabolismo delle cellule del cumulo, e quindi dell'oocita.

Considerando anche i risultati ottenuti in precedenti studi che hanno dimostrato una migliore competenza dei follicoli in pecore trattate con una miscela glucogenetica (Letelier e coll., 2008), possiamo assumere che un elevato livello energetico abbia una influenza positiva sullo sviluppo generale dei follicoli.

Lo studio degli effetti del trattamento glucogenetico sulla competenza dei follicoli e degli oociti era certamente l'obiettivo principale della presente tesi di laurea. D'altra parte, non possiamo

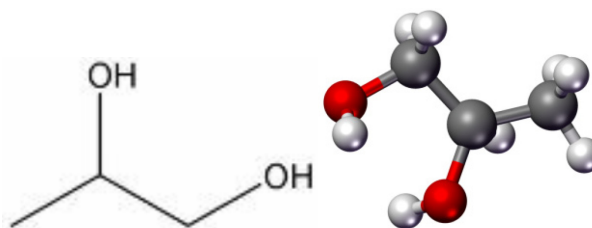
non considerare gli altri risultati osservati nel corso del presente studio. Durante le osservazioni ecografiche è stato osservato, infatti, che la supplementazione energetica svolge un ruolo positivo sulla dinamica di accrescimento dei corpi lutei (CL), che sono risultati di maggiori dimensioni nel gruppo trattato rispetto a quello controllo. È stato dimostrato che le cellule luteiniche esprimono l'mRNA per il trasportatore del glucosio (GLUT1, 3 e 4; Nishimoto e coll., 2006), e che l'uptake di glucosio diminuisce significativamente durante la fase di regressione del CL (Chase e coll. 1992). Questo risultato è particolarmente interessante, considerato che una migliore funzionalità del tessuto luteinico ha un effetto sicuramente positivo sulla fertilità, e quindi potrebbe avere un riscontro positivo nel management riproduttivo del gregge. Al tempo stesso, però, l'effetto positivo della supplementazione energetica sui follicoli e sugli oociti potrebbe essere di tipo indiretto, mediato cioè dalla presenza di più alti livelli di progesterone. Nelle pecore la risposta al trattamento di superovulazione è determinata sia dallo stato follicolare che dalla presenza del corpo luteo, in altre parole dallo stadio del ciclo estrale e dell'ondata di accrescimento follicolare, all'inizio del trattamento con gonadotropine esogene (Gonzalez-Bulnes e coll., 2005). I migliori risultati in termini di numero e qualità degli embrioni vengono ottenuti, infatti, quando il trattamento con FSH inizia all'inizio della fase luteinica del ciclo estrale (Gonzalez-Bulnes e coll., 2005; Berlinguer e coll., 2007), al momento dell'emergenza della prima ondata di accrescimento follicolare, quando i follicoli sono cioè in grado di rispondere al meglio all'FSH esogeno. Inoltre, la presenza del CL diminuisce gli effetti deleteri che i follicoli dominanti esercitano sulla restante corte follicolare, e permette così ad un maggior numero di follicoli di accrescersi e raggiungere maggiori dimensioni (Vazquez e coll., 2009).

In conclusione, lo studio portato avanti nella presente tesi di laurea ha permesso di dimostrare che il trattamento glucogenetico migliora la qualità degli oociti, come valutato dalla cinetica di

sviluppo embrionale e dalla produzione totale di blastocisti in vitro. Questi risultati sono importanti per determinare gli effetti intrinseci di una dieta ad elevato contenuto energetico sulla prolificità e gettano allo stesso tempo le basi per lo sviluppo di tabelle nutrizionali specifiche da applicare all'interno dei protocolli di riproduzione assistita.

## ***Allegato. Metabolismo del glicole monopropilenico e del glicerolo nei ruminanti***

Il **glicole monopropilenico** (o 1,2 propandiolo) si presenta come un liquido incolore, inodore, quasi insapore, a reazione neutra, non



corrosivo e perfettamente solubile in acqua. La qualità USP (United States Pharmacopea) garantisce, a seguito della doppia distillazione, la forma chimicamente pura del composto e l'assenza di sostanze inquinanti con caratteristiche organolettiche non gradite agli animali. La sua somministrazione alle bovine è particolarmente indicata nella profilassi, nel trattamento degli stati di sofferenza epatica e nel periodo del periparto, dove elevati sono i rischi di incorrere in stati di chetosi più o meno clinicamente manifesti. Secondo alcuni ricercatori le proprietà antichetotiche del glicole eserciterebbero influenza positiva sulla risposta immunitaria dell'animale, con positivi riflessi sui casi di mastiti e sulle cellule somatiche nel latte. La migliore disponibilità energetica (il glicole propilenico ha un proprio valore energetico di 2,85 UFL) e la salvaguardia della funzionalità epatica negli animali trattati, sono quindi alla base delle migliori performance produttive osservate. I dosaggi giornalieri consigliati sono di 0,2 kg durante lo steaming up e di 0,2-0,5 kg nelle primissime fasi di lattazione diminuendo gradatamente le dosi all'aumentare dell'ingestione di sostanza secca. Il mantenimento di dosaggi inferiori anche per periodi più prolungati assicura comunque maggiori performance produttive specialmente nelle buone lattifere. La sua inclusione nei mangimi complementari come ingrediente ne comporta una migliore conservabilità ed una minore polverosità. Miscelato all'acqua di bevanda svolge anche un'utile azione antigelo nelle condotte idriche.

Il glicole propilenico (PG) è stato utilizzato nel trattamento della chetosi dal 1950 (Johnson,1954; Maplesden, 1954) ed è usato ancora oggi (Bahaa e coll, 1997;. McClanahan e coll, 1998). Tuttavia, negli ultimi anni, l'interesse ad utilizzare PG come additivo per mangimi è cresciuto tra gli allevatori di bovine da latte ed i veterinari. Grazie a quest'ultimi il PG inizia a trovare spazio anche negli allevamenti di ovini da latte che praticano un attento management della riproduzione oppure anche nelle aziende problema come terapia della tossiemia gravidica. Risulta evidente una maggiore offerta di prodotti provenienti dalle aziende produttrici di mangimi, che in virtù del loro contenuto PG, garantiscono di aumentare la produzione di latte, prevenire la chetosi e migliorare la riproduzione. Il glicole monopropilenico, nel metabolismo dei ruminanti, è un composto ad azione glucogenica e viene metabolizzato sia a livello ruminale che epatico.

Esperimenti con pecore e vacche hanno dimostrato che circa la metà di PG infuso (Range 100-910 g), scompare dal rumine entro 1-2 h, e che una percentuale dell'80-90% viene eliminata entro 3 ore (Emery e coll, 1964, 1967;. Clapperton e Czerkawski, 1972). E' evidente che il PG scompare rapidamente dal rumine e ciò avviene tramite tre diversi percorsi: l'assorbimento, la fermentazione o passaggio diretto verso l'intestino. PG sembra essere molto o completamente digeribile dal momento che un percentuale inferiore a 0,1 % di PG somministrato alle vacche da latte (range 200-2.200 g al giorno) è stata rilevata nelle feci (Emery e coll., 1964, 1967). Così, le modalità più importanti in cui il PG scompare dal rumine sono la via dell'assorbimento e la fermentazione.

Acidi grassi a catena corta: studi in vitro su fluidi ruminali di pecora hanno evidenziato che i principali prodotti della fermentazione di PG sono il propanolo ed il propionato (Czerkawski e Breckenridge, 1973). Smeriglio e coll. (1964) e Clapperton e Czerkawski (1972) hanno rilevato che il PG portava ad un aumento della concentrazione di acido lattico nel rumine di pecore e bovine.

Diverse indagini affermano che è il propionato il prodotto finale predominante della fermentazione del PG (Emery e coll, 1964;. Clapperton e Czerkawski, 1972; Ruddick, 1972; Czerkawski e Breckenridge, 1973). Emery e coll. (1967) ha calcolato sulla base di un prova con una mucca che riceve 400 g di PG che il PG è stato convertito in propionato nel rumine in un rapporto di 0,2 h-1 e assorbito dalla rumine in un rapporto di 0,42 h-1 e ha concluso che PG è stata prevalentemente assorbita da il rumine senza alterazione. Un esperimento con due pecore ha pure indicato che la maggioranza dei PG somministrata viene assorbita e metabolizzata direttamente come nelle bovine (Clapperton e Czerkawski, 1972). Tuttavia, il numero degli animali presi in considerazione negli studi di Al Emery e coll. (1967) e Clapperton e Czerkawski (1972) è limitato e quindi i risultati dovrebbero essere preso con cautela. La metabolizzazione principali extra-ruminale di PG è stato contestato da Kristensen e coll. (2002) che ha condotto un esperimento in cui aveva svuotato e lavato il rumine ed il reticolo di una bovina prima di infondere direttamente in rumine 463 g di PG. Questo studio ha dimostrato che il PG si è accumulato nel plasma sanguigno e aveva un basso tasso di metabolismo, infatti solo una percentuale di circa 1% di PG assorbito è stato metabolizzato in lattato. Da questo studio, Kristensen e coll. (2002) ha suggerito che in normali condizioni ruminali il PG è metabolizzato prevalentemente nel rumine, e non nel fegato. Sia nelle vacche che nelle manze la somministrazione di PG porta ad una più alta percentuale di propionato nel rumine degli acidi grassi volatili (AGV) che è indicativo di sostanziale metabolizzazione intraruminale di PG (Tabella 2). I fattori che determinano se il PG è assorbito direttamente dal rumine o fermentato nel rumine producendo propionato non sono ben stabiliti. Tuttavia, una prova in vitro con fluido ruminale di pecora suggerisce che razioni alimentari con un elevato rapporto foraggi /concentrati portano ad una minore conversione di PG in propionato rispetto ad alimenti con un basso rapporto foraggio/concentrato (Czerkawski e Breckenridge, 1973).

Melassati di polpe di barbabietola da zucchero, in particolare, hanno indotto la conversione di PG a propionato, probabilmente perché la fibra altamente digeribile in questo alimento ha stimolato la crescita di certi microbi con la capacità di fermentare rapidamente PG a propionato (Czerkawski e Breckenridge, 1973). Il PG ha un effetto significativo sulla fermentazione ruminale, provocando una diminuzione del rapporto molare acetato/propionato. Inoltre il PG ha effetti contrastanti butirrato, dal momento che alcuni studi hanno riportato una diminuzione significativa (Emery e coll, 1964; Grummer e coll, 1994.) mentre altri non hanno trovato alcun cambiamento nella proporzione di butirrato e AGV nel rumine (Cozzi e coll, 1996; Christensen e coll, 1997; Shingfield e coll, 2002a). Grummer e coll. (1994) e Cozzi e coll. (1996) non hanno trovato alcuna relazione coerente tra la dose di PG e la risposta in rumine degli AGV (Tabella 2). In generale, è difficile mettere in relazione la risposta degli AGV prodotti nel rumine con le componenti delle diete utilizzate nei diversi studi. La risposta relativamente grande degli AGV ruminali in seguito all'integrazione di PG nello studio di Grummer e coll. (1994) potrebbe essere collegato al fatto che il giovenche erano alimentati in maniera restrittiva, a differenza degli animali utilizzati negli altri studi di cui alla Tabella 2.

L'effetto del PG sul pH ruminale di vacche fresche in lattazione non è stata studiata, ma somministrazione di PG in dosi 200-688 g al giorno non ha alcun effetto sul pH ruminale in vacche da latte a metà lattazione (tabella 2). A causa dell'aumento della percentuale di propionato nel rumine, ci si può aspettare una diminuzione del pH ruminale come risposta ad una integrazione con PG. Tuttavia, la mancanza di diminuzione del pH ruminale può essere collegato alla mancanza di effetto del PG sulle concentrazioni totali di AGV (Dhiman e coll,1993; Cozzi , 1996; Shingfield e coll, 2002).

Tabella 2. Effetto del glicole propilenico (PG) sulla fermentazione e sul Ph nel rumine di vacche e manze (Nielsen et. al., 2004).

| Reference                        | PG-dose (g per day) | Allocation method <sup>d</sup> | Number of cows | Days in milk            | Time of sampling <sup>b</sup> | Acetate (mol/100 mol) | Propionate (mol/100 mol) | Butyrate (mol/100 mol) | Acetate/propionate     | Rumen pH   |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|------------|
| Shingfield et al. (2002a)        | 0                   |                                | 32             | 61                      | 4-5 h post-PG                 | 67.4 a (100)          | 17.0 a (100)             | 11.9 (100)             | 4.0 a (100)            | 7.05 (100) |
|                                  | 210                 | P                              | 32             |                         |                               | 66.5 b (99)           | 17.8 b (105)             | 11.7 (98)              | 3.7 b (93)             | 7.06 (100) |
| Christensen et al. (1997)        | 0                   |                                | 8              | Dry cows and heifers    | 4 h post-PG                   | 67.0 a (100)          | 18.3 a (100)             | 8.5 (100)              | 3.8 a (100)            | -          |
|                                  | 336 <sup>c</sup>    | O                              | 8              |                         |                               | 59.8 c (89)           | 25.4 c (139)             | 8.5 (100)              | 2.3 c (60)             |            |
|                                  | 336 <sup>c</sup>    | C                              | 8              |                         |                               | 59.8 c (89)           | 25.4 c (139)             | 8.6 (101)              | 2.4 c (63)             |            |
| Cozzi et al. (1996)              | 0                   |                                | 8              |                         |                               | 62.2 b (93)           | 22.6 b (123)             | 8.5 (100)              | 2.8 b (74)             |            |
|                                  | 0                   |                                | 3              | 125                     | 0, 2, 4, 6 and 8 h post-PG    | 67.4 (100)            | 17.8 (100) <sup>d</sup>  | 10.8 (100)             | 3.8 (100) <sup>d</sup> | 6.51 (100) |
|                                  | 200                 | TMR                            | 3              |                         |                               | 65.3 (97)             | 19.5 (110) <sup>d</sup>  | 11.3 (105)             | 3.4 (89) <sup>d</sup>  | 6.52 (100) |
| Grunmer et al. (1994)            | 400                 | TMR                            | 3              |                         |                               | 63.5 (94)             | 21.1 (119) <sup>d</sup>  | 11.2 (104)             | 3.1 (80) <sup>d</sup>  | 6.53 (100) |
|                                  | 0                   |                                | 8              | Feed-restricted heifers | 4 h post-PG                   | 69.1 a (100)          | 16.9 a (100)             | 7.5 a (100)            | 4.1 a (100)            | -          |
|                                  | 307                 | O                              | 8              |                         |                               | 51.6 b (75)           | 33.5 b (198)             | 6.0 b (80)             | 1.6 b (39)             |            |
| Dhiman et al. (1993)             | 613                 | O                              | 8              |                         |                               | 54.0 b (78)           | 26.9 b (159)             | 6.2 b (83)             | 2.0 b (49)             |            |
|                                  | 919                 | O                              | 8              |                         |                               | 49.1 b (71)           | 25.4 b (150)             | 5.5 b (73)             | 2.0 b (49)             |            |
|                                  | 0                   |                                | 20             | 119                     | 3 h post-PG                   | 66.8 a (100)          | 18.3 a (100)             | -                      | 3.6 a (100)            | 6.83 (100) |
| Dhiman et al. (1993)             | 688 <sup>e</sup>    | TMR                            | 20             |                         |                               | 63.5 b (95)           | 23.6 b (129)             | -                      | 2.5 b (70)             | 6.90 (101) |
|                                  | 0                   |                                | 20             | 119                     | 5 h post-PG                   | 66.1 a (100)          | 18.1 a (100)             | -                      | 3.7 a (100)            | 6.72 (100) |
| Emery et al. (1964) <sup>f</sup> | 688 <sup>e</sup>    | TMR                            | 20             |                         |                               | 61.5 b (93)           | 22.9 b (127)             | -                      | 2.7 b (73)             | 6.81 (101) |
|                                  | 0                   |                                | 1              | -                       | -                             | 64.6 a (100)          | 19.1 a (100)             | 16.2 a (100)           | 3.4 (100)              | -          |
|                                  | 2347                | P                              | 1              |                         |                               | 57.0 b (88)           | 30.3 b (159)             | 12.6 b (78)            | 1.9 (56)               |            |

Figures in parentheses are relative values compared to control groups. Values with different letters (a, b, c) within column and reference differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup> P: PG poured on feed; C: PG mixed with concentrates; O: PG administered orally; TMR: PG mixed with TMR.

<sup>b</sup> Time of rumen sample collection compared to time of PG-allocation.

<sup>c</sup> Mean dose of all animals, but dose was 2.5 ml/kg of body weight<sup>0.73</sup>.

<sup>d</sup> Linear effect of PG ( $P < 0.10$ ).

<sup>e</sup> Mean dose of all animals, but dose was 5% of individual forage intake.

<sup>f</sup> The same cow served as treatment and control cow, i.e. rumen samples were collected during and after allocation of PG in this cow.

N.L. Nielsen, K.L. Ingwersen / Animal Feed Science and Technology 115 (2004) 191-213

Un esperimento con radioattivo marcato C14 ha indicato che il PG è metabolizzato a glucosio attraverso carbossilazione del piruvato in ossalacetato (Emery e coll., 1967). Come già accennato, Kristensen e coll. (2002) ha riferito che una percentuale dell'1% della dose assorbita di PG è stata convertita in lattato nelle vacche infuse con 463 g di PG. Huff (1961) ha dimostrato che il PG può essere convertito in lattatoaldehyde nel fegato di conigli, che poi può essere convertito in lattato. Il lattato è un substrato comune alla gluconeogenesi nei ruminanti e entra tramite piruvato, che viene convertito in ossalacetato (Fig. 4). Diversi esperimenti con altre specie animali hanno anche dimostrato che il PG è principalmente ossidato a lattato e piruvato (Ruddick, 1972). Inoltre, il PG, che è metabolizzato a propionato nel rumine può anche essere convertito in glucosio attraverso la gluconeogenesi nel fegato (Fig. 4). Nelle vacche con chetosi è bassa la concentrazione epatica di ossalacetato che rappresenta il metabolita chiave nel determinare l'ingresso dell'acetyl-CoA (coenzima A) nel ciclo-TCA (Acido tricarbossilico) o chetogenesi (Krebs, 1966; Baird e coll., 1968,



1972.). Il modo in cui il PG può prevenire la chetosi è dovuto in parte per l'aumento dell'ossidazione dell'acetil-CoA nel ciclo TCA e in parte incrementando la disponibilità di glucosio per la bovina (Fig. 1). Infatti, l'aumento della produzione di glucosio stimola la secrezione di insulina dal pancreas, che porta ad una diminuzione della mobilitazione degli acidi grassi dai tessuti adiposi e, quindi, il substrato per la chetogenesi epatica (Brockman e Laarveld, 1986; Holtenius e Holtenius, 1996).

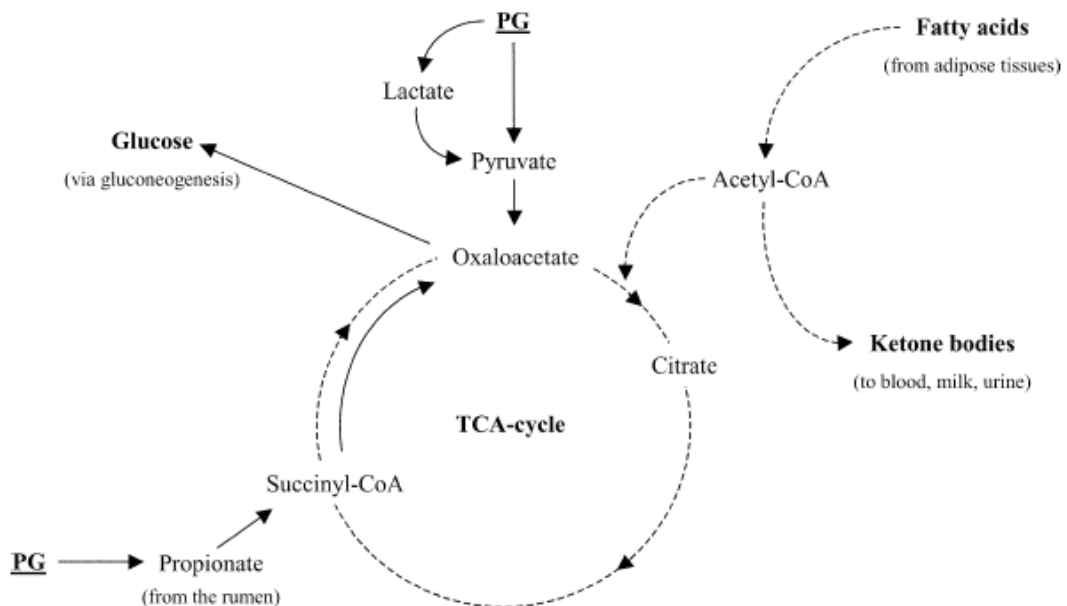
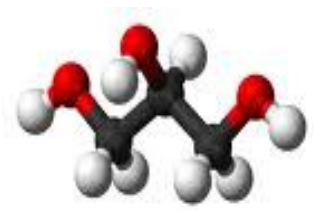
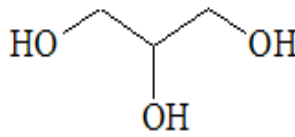


Fig. 1. Metabolismo del Glicole propilenico e sue interazioni con la chetogenesi nel fegato del bovino. La via gluconeogenica è rappresentata dalla linee continue.

Il **glicerolo** (altri sinonimi E422, glicerina, 1,2,3-propantriolo, triidrato di glicerile) è un alcool alifatico trivalente, avente la formula  $C_3H_8O_3$



( $CH_2OHCHOHCH_2OH$ ) con due funzioni alcooliche primarie e una secondaria. Il peso molecolare è di circa 90 dalton. Il glicerolo si presenta come un liquido limpido o leggermente ambrato, sciropposo, untuoso al tatto, praticamente inodore, di sapore dolciastro e caldo, caratteristico, con reazione neutra alla cartina tornasole. A 20 °C ha densità di 1,26 circa; indice di rifrazione 1,470-1,475; a pressione ordinaria bolle a 290° con parziale decomposizione. Il glicerolo puro è molto igroscopico e, per esposizione all'aria umida, può assorbire acqua fino al 25% in peso; è miscibile con l'acqua e con il glicole propilenico mentre è insolubile in etere etilico, oli fissi e volatili.

La glicerina è una molecola naturalmente presente in tutti gli oli e grassi vegetali ed animali. Oli e grassi rappresentano chimicamente dei glicerinesteri di acidi grassi più complessi. Il contenuto di glicerina varia a seconda del tipo di olio o di grasso. Il contenuto più alto di glicerina (circa il 17%) si trova nell'olio di cocco, mentre nella maggior parte degli oli e grassi il contenuto di glicerina è intorno al 10% (es, nell'olio di colza). La glicerina è un componente naturale degli alimenti, per cui le vie metaboliche di utilizzo sono da tempo conosciute: durante la digestione viene utilizzata direttamente come fonte energetica, oppure utilizzata per la sintesi epatica del glucosio (gluconeogenesi). Originariamente, la glicerina si otteneva solamente come sottoprodotto della saponificazione dei grassi. Quando, negli anni '40, presero piede i detersivi sintetici e, negli USA, diminuì la produzione di sapone a base di acidi grassi, non vi fu sufficiente glicerina per soddisfare la crescente richiesta del mercato. In quel periodo vennero perciò sviluppati i primi processi tecnici su base petrolchimica e alla fine degli anni '80 furono messi a punto procedimenti di

produzione di carburanti ecologici (biodiesel) a partire da olio di colza e girasole in grado di ottenere come prodotti aggiuntivi grosse quantità di glicerolo. Oggi la glicerina viene impiegata in numerosi settori, come ad esempio nella produzione di materie plastiche (resine alchiliche, schiume poliuretatiche), nell'industria alimentare (produzione di liquori, sciroppi, conserve), nell'industria cosmetica (creme, dentifrici), nell'industria farmaceutica (sciroppi, lassativi) etc.

La somministrazione di glicerolo nel trattamento degli stati di chetosi è stata presa in considerazione fino dagli anni '60, ma non è mai stata applicata su larga scala a causa degli elevati costi della materia prima. Moderne metodologie di produzione e l'apertura di nuovi mercati hanno permesso un aumento di produzione e una costante diminuzione del prezzo del glicerolo, ora molto competitivo in confronto alle sostanze ad azione antichetoniche comunemente utilizzate (glicole propilenico, acido propionico e i suoi sali). Di conseguenza, solo di recente la ricerca scientifica si è avvicinata al glicerolo come sostanza ad azione neoglucogenica impostando prove di campo in grado di confermare con i numeri le nostre supposizioni.

In una recente prova (Kohno, Murayama, Sawamukai e Sato, 2004) sono stati valutati i parametri ematici di 20 vacche in stato di chetosi trattate con somministrazioni orali di glicerolo (500 e 1000 ml). I risultati ottimali sono stati ottenuti con la somministrazione di soli 500 ml sia riguardo l'evoluzione della glicemia nelle ore successive alla somministrazione, che nella diminuzione del tenore di acido Beta-idrossibutirrico. Infatti con la somministrazione di 1000 ml si raggiunge una glicemia seppur nettamente superiore di quella delle vacche controllo, non trattate, resta sempre inferiore a quella delle vacche che hanno ricevuto metà dose. Anche la diminuzione del beta-idrossibutirrato è meno pronunciata. Tutto ciò si spiega col fatto che dopo una certa quantità il glicerolo non viene metabolizzato e si accumula nel circolo ematico come glicerolo libero, e necessita quindi di un maggiore sforzo organico per essere metabolizzato anche se dopo 24

raggiunge gli stessi livelli ematici delle vacche che hanno ricevuto 500 ml. Oltre ai risultati riportati, i ricercatori segnalano un aumento dell'ingestione da parte degli animali trattati e un aumento del numero delle contrazioni ruminali a testimonianza di un ripristino della ruminazione. Un altro studio del 2003 (J. Goff e R. Horst, National Animal Disease Center USDA-Agricultura1 Research Service) conferma che il glicerolo può essere convertito in glucosio nel fegato della bovina. Il glicerolo assorbito entra nel meccanismo neoglucogenico a livello di *diidrossiacetone fosfato* e *3-fosfogliceraldeide* è quindi ad un livello biochimico più vicino al glucosio rispetto ai tradizionali precursori quali propionato e glicole propilenico. Nelle bovine da latte il glicerolo trova impiego quale apportatore energetico e precursore degli zuccheri ad azione antichetonica, in alternativa a glicole propilenico e propionati ai cui dosaggi si fa perciò riferimento: rispetto a questi il glicerolo manifesta una appetibilità decisamente superiore. Durante il periodo invernale, le basse temperature lo rendono molto vischioso e difficile da manipolare.

## ***Bibliografia***

1. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. An ultrasound-aided study of temporal relationships between the patterns of LH/FSH secretion, development of ovulatory-sized antral follicles and formation of corpora lutea in ewes. *Theriogenology* 2000a; 54: 229-245.
2. Berlinguer F, Gonzalez-Bulnes A, Succu S, Leoni G, Mossa F, Bebbere D, Ariznavarreta C, Tresguerres JA, Veiga-Lopez A, Naitana S. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. *Domest Anim Endocrinol.* 2007 May;32(4):303-14.
3. Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002;66:38–43.
4. Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995;41:54–62.
5. Bondy CA, Chin E, Zhou J. Significant species differences in local IGF-I -II gene expression. *Adv Exp Med Biol* 1993, 343:73–77.
6. Campbell BK. Factors affecting ovulation rate in sheep and cattle. PhD thesis University of Sydney, 1988.
7. Campbell BK., Dobson H., Baird DT., Scaramuzzi RJ. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in the ewe. *J Reprod Fertil* 1999; 117:355-367.
8. Cevolani D.. Gli alimenti per la vacca da latte. Edagricole 2005
9. Chase CC Jr, Del Vecchio RP, Smith SB e Randel RD. In vitro metabolism of glucose by bovine reproductive tissues obtained during the estrous cycle and after calving. *Journal of Animal Science*1992; 70:1498–1508.
10. Crowe MA, Kelly P, Driancourt MA, Boland MP, Roche JF. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers. *Biol Reprod.* 2001; 64:368-74.
11. Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology.* 2001 Apr 1;55(6):1211-39

12. Driancourt MA., Webb R., Fry RC. Does follicular dominance occur in ewes? *J Reprod Fertil* 1991; 93:63-70.
13. Fry RC, Driancourt MA. Relationship between follicular stimulation hormone, follicle growth and ovulation rate in sheep. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8:279-286.
14. Gibbons JR., Wiltbank MC., Ginther OJ. Functional interrelationship between follicles greater than 4 mm and the FSH surge in heifers. *Biol Reprod* 1997; 57:1066-1073.
15. Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod* 2000;62:920–7.
16. Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentration during the estrus cycles in the ewes. *Theriogenology* 1995; 43:689-703.
17. Gonzalez-Bulnes A, Berlinguer F, Cocero MJ, Garcia-Garcia RM, Leoni G, Naitana S, Rosati I, Succu S, Veiga-Lopez A. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances in vivo and in vitro blastocysts output in sheep. *Theriogenology* 2005; 64: 1392-1403.
18. Hastie PM, Haresign W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2006, 92:284–299.
19. Hazeleger W, Soede N, B Kemp B. The effect of feeding strategy during the prefollicular phase on subsequent follicular development in the pig. *Domest Anim Endocrinol* 2005, 29: 362–370.
20. Hernandez ER. Regulation of the genes for insulin-like growth factor (IGF) I and II and their receptors by steroids and gonadotropins in the ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995, 53: 219–221.
21. Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, e coll. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005;63:1149–66.
22. l'Anson H, Foster DL, Foxcroft GR, Booth PJ. Nutrition and reproduction. *Oxf Rev Reprod Biol* 1991, 13: 239–311.
23. Kendall NR, Scaramuzzi RJ, Baird DT, Webb R, Campbell BK. Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction* 2004, 128: 757–765.

24. Kiyama Z, Alexander BM, Van Kirk EA, Murdoch WJ, Hallford DM, Moss GE. Effects of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes. *J Anim Sci* 2004, 82: 2548–2557.
25. Leoni GG, Succu S, Berlinguer F, Rosati I, Bebbere D, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2006 May;92(3-4):373-83.
26. Letelier C, Mallo F, Encinas T, Ros JM, Gonzalez-Bulnes A. Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory follicles without effects on ghrelin secretion. *Reproduction.* 2008 Jul;136(1):65-72.
27. Lozana JM, Lonergran P, Boland MP, O'Callaghan D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and postfertilization development. *Reproduction* 2003, 125: 543–553.
28. Lucy MC. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction Suppl* 2003, 61: 415–427.
29. Martin GB, Milton JTB, Davidson RH, Banchemo Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci* 2004, 82–83: 231–245.
30. Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P. The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? a comparative species study. *Reprod Domest Anim* 2003, 38: 247–258.
31. Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, e coll. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003;59:651–74.
32. Mihm M., Good TEM., Ireland JLH., Knight PG., Roche JF. Decline in serum FSH alters key intrafollicular growth factor involved in the selection of the dominant follicle in heifers. *Biol Reprod* 1997; 57:1328-1337.
33. Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction* 2002, 124: 721–731.
34. Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I insulin like growth factor receptor (IGF-IR) and insulin like growth

- factor binding protein 2 (IGFBP2) in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine or supplementary feeding with lupin grain. *Reproduction* 2004, 128: 1–11.
35. Muñoz-Gutiérrez M, Finlay P, Adam CL, Wax G, Campbell BK, Kendall NR, Khalid M, Forsberg M, Scaramuzzi RJ. The effect of leptin on folliculogenesis and the follicular expression of mRNA encoding aromatase, IGF-IR, IGFBP-2, IGFBP-4, IGFBP-5, leptin receptor and leptin in ewes. *Reproduction* 2005, 130: 869–881.
36. N.I. Nielsen, K.L. Ingvarstsen. Propylene glycol for dairy cows a review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Animal Feed Science and Technology* 115 (2004) 191–213.
37. Nishimoto H, Matsutani R, Yamamoto S, Takahashi T, Hayashi KG, Miyamoto A, Hamano S, Tetsuka M. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol.* 2006 Jan;188(1):111-9.
38. Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Res Vet Sci* 1993, 55: 306–310.
39. Picton HM, Tsonis CG, Mc Neilly AS. FSH causes a time dependent stimulation of preovulatory follicular growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotropin releasing hormone agonist. *J Endocr* 1990; 126:297-307.
40. Picton HM., Mc Neilly AS. Evidence to support a follicle stimulation hormone threshold theory for follicle selection in ewes chronically treated with gonadotropin releasing hormone agonist. *J Reprod Fertil* 1991; 93:43-51.
41. Robert C, Barnes FL, Hue I, Sirard MA. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2000;57:167–75.
42. Robert C, Gagne D, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger rna associated with bovine oocyte developmental competence. *Biol Reprod* 2001;64:1812–1820.
43. Rubianes E, Ungerfeld R, Viñoles C, Rivero A, Adams GP. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology.* 1997 Jun;47(8):1479-88.
44. Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Muñoz-Gutiérrez M, Somchit A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod. Nutr. Dev.* 46 (2006) 339–354.



45. Sirard MA, Picard L, Dery M, Coenen K, Blondin P. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology* 1999;51:699–708.
46. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006 Jan 7;65(1):126-36.
47. Stock AE and Fortune JE. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth phase of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 1993, 132:1108-1114.
48. Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*. 2003 Jul;126(1):27-34.
49. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction*. 2004 Sep;128(3):313-9.
50. Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007;64:179-90.
51. Tsonis CG, Cahill LP, Carson RS, Findlay JK. Identification at the onset of luteolysis of follicle capable of ovulation in the ewe. *J Reprod Fertil* 1984; 70:609-614.
52. Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *J Anim Sci* 1995;73:3141–51.
53. Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 2003;60:923–32.
54. Vázquez MI, Forcada F, Casao A, Sosa C, Palacín I, Abecia JA. Effects of melatonin and undernutrition on the viability of ovine embryos during anestrus and the breeding season. *Anim Reprod Sci*. 2009 May;112(1-2):83-94.
55. Veiga-Lopez A, Encinas T, McNeilly AS, Gonzalez-Bulnes A. Timing of preovulatory LH surge and ovulation in superovulated sheep are affected by follicular status at start of the FSH treatment. *Reprod Domest Anim*. 2008 Feb;43(1):92-8.
56. Wade GN, Jones JE. Neuroendocrinology of nutritional infertility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, 287: R1277–R1296.

57. Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J Reprod Fertil* 1999; suppl 54:33-48.
58. Williams SA, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ. The effect of oral administration of a glucogenic mixture on ovulation rate and characterisation of GLUT1 and GLUT4 in sheep ovarian follicles. *J Reprod Fertil* 2001, 122: 947–956.
59. Zhou J, Adesanya OO, Vatzias G, Hammond JM, Bondy CA. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology* 1996, 137: 4893–4901.

## Conclusioni generali

L'ecografia real-time ha guadagnato enorme popolarità negli ultimi anni sia come utile diagnostico così come uno strumento di ricerca in veterinaria e scienze animali. Reports sulle diverse applicazioni dell'ecografia, i continui miglioramenti della qualità delle immagini, la disponibilità di ecografi portatili e la relativa riduzione dei costi hanno portato alla sua piena accettazione da parte del veterinario professionista. Come ausilio diagnostico, l'ecografia è ben adatta per la pratica clinica della specie bovina, in particolare per l'esame dell'apparato riproduttore. La tecnica è non invasiva, relativamente semplice ed efficace, sicura sia per il paziente che per l'operatore, portatile e ultrarapido, dal momento che l'immagine ultrasonografica facilita l'interpretazione immediata e la diagnosi nella maggior parte dei casi. Anche se il primo lavoro sull'applicazione degli ultrasuoni per la diagnosi di gravidanza fu fatto negli ovini già negli anni '60 (Lindahl, 1966). L'elevato costo delle attrezzature ha contribuito alla riluttanza della professione veterinaria ad adottarlo.

Il contrario avveniva per la medicina umana in cui l'ecografia trovava grande diffusione come strumento clinico tanto da divenire indispensabile in numerose discipline. L'interesse per l'ecografia tra i veterinari e i ricercatori ha cominciato a crescere nei primi anni Ottanta, a seguito delle pubblicazioni di Chaffaux nel 1982 e successivamente di Ghinter nel 1989 che trattavano dell'utilità della tecnica nello studio dell'apparato riproduttore nella bovina. Da quel momento, iniziò una crescita importante dell'applicazione dell'ecografia in real-time negli animali da reddito. Negli ultimi 20 anni sono state diverse le applicazioni dell'ecografia nell'ambito della riproduzione nella specie bovina:

## **I. Apparato riproduttore femminile**

- \* follicular dynamics during
  - a) estrous cycle (Pierson e Ghinter, 1987; Sirois e Fortune, 1988)
  - b) pregnancy (Guilbault e coll., 1986 ; Pierson e Ghinter, 1986)
  - c) postpartum period (Rajamehndran e coll., 1990; Savio e coll. 1990)
  - d) superovulation (Grasso e coll., 1989; Pierson e Ghinter, 1988)
- \* ovulation process (Larsson, 1987 ; Rajamehndran e coll., 1989)
- \* corpus luteum morphology and growth (Sprecher e coll., 1988; Pieterse e coll., 1990)
- \* normal uterine status (Reeves e coll., 1984)
- \* pregnancy diagnosis and detection of early embryonic death (Chaffaux e coll 1986)
- \* fetal imaging (Kahn 1989; Kahn, 1990)
- \* fetal sex (Currant e Ghinter, 1991)
- \* uterine involution (Okano e Tomizuka, 1987)
- \* cystic ovarian conditions (Farin e coll., 1990)
- \* changes during induced embryo mortality (Kastelic e Ghinter, 1989)
- \* pathological conditions of the reproductive system (Semambo e coll. 1992; Edmondson e coll., 1986)

## **II. Apparato riproduttore maschile**

- \* testicular tissue (Pechman e coll., 1987 ; Sidibe e coll. 1992 )
- \* status of accessory sex glands (Weber, 1988)

## **III. Altre applicazioni**

- \* collection of oocytes from in situ ovarian follicles (Pieterse e coll 1988)
- \* artificial insemination training (Beal e coll., 1989)

Ulteriori lavori, decisamente più recenti, riguardo l'uso degli ultrasuoni in medicina veterinaria ed in particolare nella diagnostica e nella ricerca dell'apparato riproduttore degli animali da reddito hanno contribuito sempre più alla diffusione della tecnica e quindi a produrre un'enorme quantità

di informazioni scientifiche che si rinnovano di continuo. E' impossibile per i medici tenere il passo di tutte le informazioni pubblicate. Questo accade perché nonostante l'ecografo sia diventato uno strumento accessibile a tutti, non tutti i veterinari che si occupano di animali da reddito ritengono sia uno strumento fondamentale per la redditività delle aziende considerandolo quindi come un costo aggiuntivo superfluo piuttosto che un investimento. La differenza tra un "artigiano" e un imprenditore, sta nella capacità di differenziare costi ed investimenti.

La diagnosi di gravidanza ultrasonografica insieme al sessaggio fetale è la tecnica ecografica che più affascina allevatori e veterinari. Pensiamo si possa anche affermare che questo esame sia quello che, più di ogni altro, attira verso l'ultrasonografia tecnici e allevatori.

Attualmente circa il 23% dei veterinari che si occupano di ginecologia bovina (Gnemmi 2010), lavora con l'ecografo; di questi oltre l'85% utilizza questo strumento esclusivamente per la diagnosi precoce di gravidanza. L'ultrasonografia deve però essere inserita all'interno di un programma di gestione riproduttiva, al di fuori del quale perde di significato, trasformandosi in uno sterile gioco di prestigio. Purtroppo non esistono dati pubblicati riguardo l'uso dell'ecografia nei piccoli ruminanti a livello internazionale però posso affermare con certezza ciò che accade in Sardegna, regione che possiede circa l'85% del patrimonio ovi-caprino nazionale, in cui l'ultrasonografia è riuscita a trovare spazio nelle varie aziende dal 2003. Dopo circa 7 anni dalla sua prima comparsa purtroppo solo il 3-4% dei veterinari liberi professionisti sfruttano l'ecografia nella gestione della riproduzione ovina. Dopo 4 anni di ricerca con l'ultrasonografia e libera professione apprezzo ancora di più le parole del **Dott. Gianni Gnemmi** (DMV, PhD, Dipl ECBHM, socio AABP) mio docente in numerosi corsi pratici di ultrasonografia buiatica che affermava: "In 15 anni di lavoro nella gestione riproduttiva bovina è stato sempre molto facile convincere gli allevatori, circa i benefici di questa tecnica! .... Sono gli allevatori che pagano! E' stata invece un

impresa talvolta impossibile convincere a i Veterinari!...Sono loro, OGGI a comprare le unità ecografiche!”. Il collega sottolinea “oggi” perché la categoria dei veterinari già in altre nazioni europee (Francia, Olanda) si hanno lasciato sfuggire dalle mani l’opportunità di usare l’ecografia nella ginecologia dei ruminanti, sempre più affidata a laici, che vanno di poco oltre alla sola diagnosi di gravidanza ed al sessaggio embrionale. Ritornando ai piccoli ruminanti, **Ivan L. Lindahl**, il padre della diagnosi di gravidanza nella pecora scrisse su NATURE del 5 novembre del 1966: *“Un metodo con cui poter diagnosticare la gravidanza con rapidità e accuratezza nella prima metà della gestazione della pecora potrebbe avere un considerevole valore per l’industria ovina. La diagnosi precoce di gravidanza permetterebbe agli allevatori di dare un’adeguata integrazione alimentare alle pecore gravide e di riconoscere subito le pecore vuote per un controllo razionale dell’infertilità.”*. Lindahl, nel Maryland, col suo “Echo-Trace Model SSD-2” con sonda da 2,25 MHz effettuava la diagnosi di gravidanza con le pecore in stazione chiuse in un piccolo travaglio, dopo tricotomia nella regione addominale tra la mammella e l’ombelico veniva applicato dell’olio di semi di mais direttamente sulla cute leggermente a destra della linea alba sui cui veniva successivamente fatta aderire la sonda. Spettacolari i risultati ottenuti, infatti Lindahl riusciva ad effettuare diagnosi di gravidanza a 60 giorni con una precisione del 95% (verificata tramite laparotomia esplorativa) e riusciva ad esaminare una media di 50 pecore all’ora.

Attualmente la diagnosi di gravidanza per via trans-addominale effettuata grazie all’ausilio di sonde convex da 3,5-5MHz ci consentono di effettuare una diagnosi precisa a 35-40 gg, con sonde microconvex con frequenza 5-10 MHz possiamo fare diagnosi di gravidanza a 22-25 gg se si acquisisce una buona manualità. Gli stessi risultati della microconvex li posso ottenere con una sonda lineare 5-7,5 MHz endocavitaria per grossi animali (bovini e cavalli). Tuttavia il gold standard della diagnosi di gravidanza per i piccoli ruminanti resta la sonda lineare ad alta frequenza 7,5-10 MHz di tipo prostatico, usata normalmente nella medicina umana che oltre a

consentire una precosissima diagnosi di gravidanza 17-18 gg permette di effettuare la cosiddetta **diagnosi di non-gravidanza**, elemento decisamente più significativo ai fini di un corretto management della riproduzione (Gnemmi G, 2010). Infatti il termine “diagnosi di non gravidanza” racchiude in se tutta la valutazione dell’apparato riproduttore femminile (vagina, utero e ovaie) in situazione di non gravidanza. Quindi questo tipo di tecnica per via transrettale ci permette un’attenta valutazione delle ovaie, consentendo la valutazione dello stato riproduttivo degli animali (anastro, fase follicolare, fase luteinica) e dello stato sanitario di vagina, cervice ed utero. Oltre questo importante riscontro pratico e clinico, l’ecografia endocavitaria ha aperto le porte agli studi della dinamica di accrescimento follicolare nella bovina prima e nei piccoli ruminanti più recentemente. Attualmente, grazie alla più svariata tipologia di ecografi, che dai portatili è ormai giunta agli ultraportatili (<2Kg di peso) è possibile effettuare gli esami ecografici in diverse condizioni sul campo. All’aperto, sotto il sole con l’ausilio di visori, oppure nelle comode sale di mungitura dove per la semplice diagnosi di gravidanza si può arrivare ad effettuare dalle 250 alle 300 diagnosi all’ora. Ci son voluti 40 anni per superare di circa 7 volte la media di Lindahl.

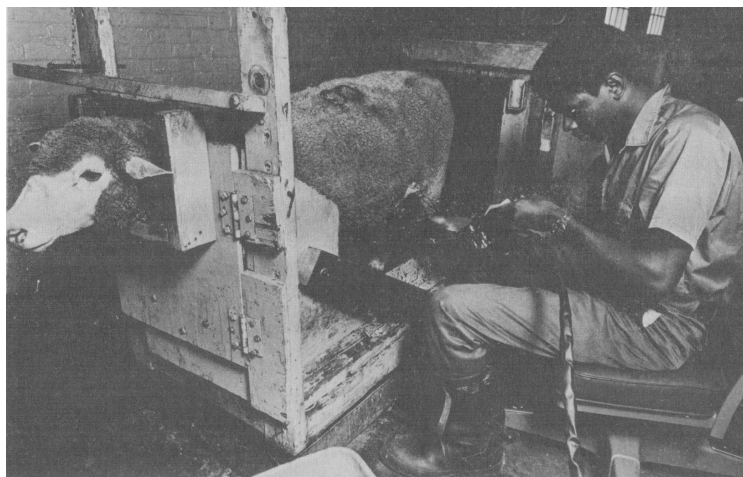


Figura 1. Diagnosi di gravidanza nella pecora tramite ecografia, in stazione. ( Ivan L. Lindahl, 1976)

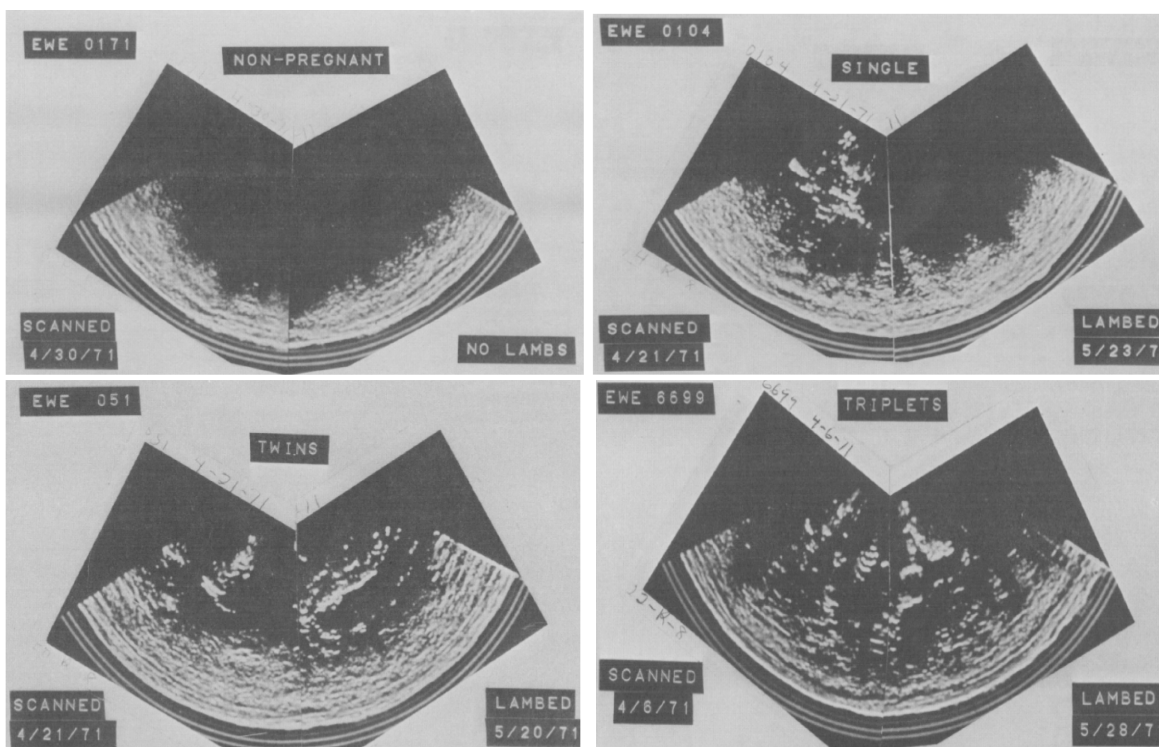


Figura 2. Immagini ecografiche stampate con stampante Polaroid, ritagliate e riunite per avere un'immagine continua della parte destra e sinistra dell'utero. Si apprezza l'ecografia di una pecora non gravida, una gravidanza singola, una gemellare ed una con tre feti. (Lindahl IL, 1976)



## ***Bibliografia***

1. Beal WE, Edwards RB, Kearnan JM. Use of B-mode, linear array ultrasonography for evaluating the technique of bovine artificial insemination. *J Dairy Sci* 1989; 72: 2198-2202.
2. Chaffaux S, Reddy GNS, Valon F, Thibier M. Transrectal real-time ultrasound scanning for diagnosing pregnancy and for monitoring embryonic mortality in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 1986; 10:
3. Chaffaux S, Valon F, Martinez J. Evolution de l'image echographique du produit de conception chez la vache. *Bull Acad Vet Fr* 1982; 55: 213-221.
4. Curran S, Ginther OJ. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology* 1991; 36: 809-814.
5. Edmondson AJ, Fissore RA, Pashen RL, Bondurant RH. The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. 1. Normal and pathological ovarian structures. *Anim Reprod Sci* 1986; 12: 157-165.
6. Farin PW, Youngquist RS, Parfet JR, Gaverick HA. Diagnosis of luteal and follicular ovarian cysts in dairy cows by sector scan ultrasonography. *Theriogenology* 1990; 34: 633-642.
7. Gnemmi G e Colloton J, Corso avanzato di ultrasonografia bovina, Premosello Chiovenda 6-9 febbraio 2010.
8. Grasso F, Guilbault LA, Roy GL, Lussier JG. Ultrasonic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology* 1989; 31: 1209-1220.
9. Guilbault LA, Dufour IJ, Thatcher WW, Drost M, Haibel GK. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil* 1986; 78: 127-135.
10. Kahn W. Sonographic fetometry in the bovine. *Theriogenology* 1989; 31: 1105-1121.
11. Kahn W. Sonographic imaging of the bovine fetus. *Theriogenology* 1990; 33: 385-396.
12. Kastelic JP, Ginther OJ. Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 194: 922-928.
13. Larsson B. Determination of ovulation by ultrasound examination and its relation to LH-peak in heifers. *J Vet Med [A]* 1987; 34:193-200.
14. Lindahl IL. Detection of pregnancy in sheep by means of ultrasound. *Nature* 1966; 212: 642-643.

15. Okano A, Tomizuka T. Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow. *Theriogenology* 1987; 27: 369-377.
16. Pechman RD, Eilts BE. B-mode ultrasonography of the bull testicle. *Theriogenology* 1987; 27: 43 1-441.
17. Pierson RA, Ginther OJ. Follicular populationis during the estrous cycle in heifers. 1. Influence of day. *Anim Reprod Sci* 1987; 14: 1-65-176.
18. Pierson RA, Ginther OJ. Ovarian follicular populations during early pregnancy in heifers. *Theriogenology* 1986; 26: 649-659.
19. Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 1988; 29: 21-37.
20. Pieterse MC, Szenci O, Willemse AH, Bajcsy CSA, Dieleman SJ, Taverne MAM. Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear array real time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. *Theriogenology* 1990; 33: 697-707.
21. Rajamahendran R, Robinson J, Desbottes S, Walton JSW. Temporal relationships among estrus, body temperature, milk yield, progesterone and luteinizing hormone levels, and ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 1989; 31: 1173-1182.
22. Rajamahendran R, Taylor C. Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. *Anim Reprod Sci* 1990; 22: 171-180.
23. Reeves JJ, Rantanen NW, Hauser M. Transrectal real-time ultrasound scanning of the cow reproductive tract. *Theriogenology* 1984; 21: 485-494.
24. Savio JD, Boland MP, Hynes N, Roche JF. Resumption of follicular activity in the early post partum period of dairy cows. *J Reprod Fertil* 1990; 88: 569-576.
25. Semambo DKN, Boyd JS, Taylor DJ, Ayliffe TR, Oinran, SN. Ultrasonographic study of early embryonic loss induced by *Actinomyces pyogenies* in cattle. *Vet Rec* 1992; 131: 7-12.
26. Sidibe M, Franco LA, Fredriksson G, Madej A, Malmgren L. Effects on testosterone, LH and cortisol concentrations, and on testicular ultrasonic appearance, of induced testicular degeneration in bulls. *Proc 12th Int Congr Anim Reprod and AI* 1992; 1: 162-164.
27. Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 1988; 39: 308-3 17.
28. Sprecher DJ, Nebel RL. B-mode ultrasonic morphology of bovine follicular and luteal ovarian cysts. *Agri-Pract* 1988; 9 (2, Jan/Feb):5-8.

29. Weber JA, Hilt CJ, Woods GL. Ultrasonic appearance of bull accessory sex glands. *Theriogenology* 1988; 29: 1347-1353. 33.

## Ecografie sul campo



## **Pubblicazioni**

---

**241**

*Antonio Spezzigu, Utilizzo dell'ultrasonografia nei piccoli ruminanti per la caratterizzazione della dinamica follicolare al fine di identificare fattori ovarici in grado di influenzare la qualità dell'ocita, Tesi di Dottorato in Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Sassari.*

Research

Open Access

## Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model

Fiammetta Berlinguer\*<sup>1</sup>, Manuela Madeddu<sup>1</sup>, Valeria Pasciu<sup>2</sup>, Sara Succu<sup>1</sup>, Antonio Spezzigu<sup>1</sup>, Valentina Satta<sup>3</sup>, Paolo Mereu<sup>3</sup>, Giovanni G Leoni<sup>3</sup> and Salvatore Naitana<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Department of Animal Biology, University of Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy, <sup>2</sup>Presidenza, Biblioteca Veterinaria, Faculty of Veterinary Medicine, University of Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy and <sup>3</sup>Department of Physiological, Biochemical and Cellular Science, University of Sassari, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy

Email: Fiammetta Berlinguer\* - [berling@uniss.it](mailto:berling@uniss.it); Manuela Madeddu - [mmadeddu@uniss.it](mailto:mmadeddu@uniss.it); Valeria Pasciu - [vpasciu@uniss.it](mailto:vpasciu@uniss.it); Sara Succu - [succus@uniss.it](mailto:succus@uniss.it); Antonio Spezzigu - [antospezzigu@tiscali.it](mailto:antospezzigu@tiscali.it); Valentina Satta - [vsatta@uniss.it](mailto:vsatta@uniss.it); Paolo Mereu - [pmereu@uniss.it](mailto:pmereu@uniss.it); Giovanni G Leoni - [gioleoni@uniss.it](mailto:gioleoni@uniss.it); Salvatore Naitana - [snaitana@uniss.it](mailto:snaitana@uniss.it)

\* Corresponding author

Published: 9 November 2009

Received: 2 September 2009

*Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7:125 doi:10.1186/1477-7827-7-125

Accepted: 9 November 2009

This article is available from: <http://www.rbej.com/content/7/1/125>

© 2009 Berlinguer et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

Currently, the assessment of sperm function in a raw or processed semen sample is not able to reliably predict sperm ability to withstand freezing and thawing procedures and in vivo fertility and/or assisted reproductive biotechnologies (ART) outcome. The aim of the present study was to investigate which parameters among a battery of analyses could predict subsequent spermatozoa in vitro fertilization ability and hence blastocyst output in a goat model. Ejaculates were obtained by artificial vagina from 3 adult goats (*Capra hircus*) aged 2 years (A, B and C). In order to assess the predictive value of viability, computer assisted sperm analyzer (CASA) motility parameters and ATP intracellular concentration before and after thawing and of DNA integrity after thawing on subsequent embryo output after an in vitro fertility test, a logistic regression analysis was used. Individual differences in semen parameters were evident for semen viability after thawing and DNA integrity. Results of IVF test showed that spermatozoa collected from A and B lead to higher cleavage rates ( $0 < 0.01$ ) and blastocysts output ( $p < 0.05$ ) compared with C. Logistic regression analysis model explained a deviance of 72% ( $p < 0.0001$ ), directly related with the mean percentage of rapid spermatozoa in fresh semen ( $p < 0.01$ ), semen viability after thawing ( $p < 0.01$ ), and with two of the three comet parameters considered, i.e tail DNA percentage and comet length ( $p < 0.0001$ ). DNA integrity alone had a high predictive value on IVF outcome with frozen/thawed semen (deviance explained: 57%). The model proposed here represents one of the many possible ways to explain differences found in embryo output following IVF with different semen donors and may represent a useful tool to select the most suitable donors for semen cryopreservation.

Page 1 of 9

(page number not for citation purposes)



## Background

During the last decade several molecular and cellular markers have been proposed as tools to evaluate sperm fertility *in vitro* in raw or processed semen samples, but with highly variable results [reviewed in Refs. [1,2]].

Energy metabolism is a key factor supporting sperm function. ATP is one of the basic components in a sperm cell and is used not only as a energy source but also for protein phosphorylation in cell signalling and as a cofactor regulating protein function [3]. The functional integrity of mitochondria is believed to be important for sperm survival in the female genital tract or during assisted reproductive biotechnologies (ART) [4]. In sperm, ATP production supports multiple cellular activities and biochemical events required for successful fertilization to occur, such as capacitation [5,6], acrosome reaction [7] and motility [3]. Recently, sperm oxygen consumption has been correlated with bull fertility and measurement of total ATP formation has been proposed as a test for bull fertilizing ability after freezing and thawing [8]. We reported for vulture spermatozoa that an higher ATP intracellular concentration in fresh semen was followed by a higher survival *in vitro* after cryopreservation [9]. Furthermore, ATP values correlated positively with sperm viability both before and after cryopreservation [9]. Sperm metabolic activity, measured by mitochondrial function in frozen/thawed samples, has been positively correlated with *in vivo* fertility in stallions [10] and bulls [11].

Sperm motility is essential for normal fertilization, and it is currently the most common parameter of "sperm quality", acting as an indirect measure of metabolic activity and sperm viability. Sperm motility after thawing and washing provided the most significant information for predicting donor sperm fertility potential, compared with fresh and thawed specimens used for insemination without any previous preparation protocol [12]. In addition studies showed that very low sperm motility was a good predictor of poor fertilization in IVF or ICSI [13,14]. Computer-assisted semen analysis (CASA) provides objective and reproducible data on a number of sperm motion parameters and it should enhance the value of motility assessment to fertility prognosis. In recent years there has been an increase in the use of these systems to evaluate semen quality [15-17] resulting in high correlations between several CASA motility parameters and the *in vivo* fertility of sperm from different species [in horses: [18]; in boar: [16]; in bulls: [19]].

Among other sperm tests, evaluation of DNA integrity has been considered important as early embryo development depends on the presence of normal DNA. After cryopreservation spermatozoa are particularly susceptible to DNA damage since freezing and thawing procedures lead

to significant reduction in the level of spermatozoa anti-oxidant [20]. Therefore the assessment of DNA integrity is of high value in determining frozen/thawed semen quality. Significant relationship has been recorded between this parameter and fertility for bull frozen-thawed semen used for conventional AI [21,22].

Considering that combining different sperm function tests allows more accurate prediction of fertility [18], the aim of the present study was to investigate which parameters among a battery of analyses could predict subsequent spermatozoa *in vitro* fertilization ability and hence blastocyst output. To carry out our experiments we used Sarda goats as a model, since semen freezing and thawing procedures are well established for this species [23].

## Methods

### Chemicals

All chemicals in this study were purchased from Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA) unless stated otherwise.

### Animals and semen collection

All experimental procedures were carried out during goat breeding season (October - November) at the experimental facilities of the Department of Animal Biology at the University of Sassari, Italy (latitude 40°43' N). These facilities meet the requirements of the European Union for Scientific Procedure Establishments. This study followed ethical guidelines for care and use of agricultural animals for research. Ejaculates were obtained by artificial vagina from three adult Sarda male goats aged 2 years, maintained in an outdoor environment and fed a live-weight maintenance ration. Bucks were kept isolated in separated pens, but with visual contact between each others. Semen collection was repeated every 10 days, and 5 samples from each male were utilized for this study. Samples from each male were kept separated throughout all experimental procedures to highlight individual differences in sperm quality and freezability. Volume, concentration and total sperm output were recorded for each ejaculate collected. Volume was determined using a graduated micropipette, and concentration was evaluated by spectrophotometry using visible light after calculating a standard curve specific for this species. Total sperm output was calculated by multiplying this two parameters.

### Semen cryopreservation

Semen was diluted up to  $400 \cdot 10^6$  sperm/mL in Tris-based extender (Tris 375 mM, citric acid 124 mM, glucose 41 mM) supplemented with egg yolk 20% (pH 7; osmolality 375 mOsm/kg) and glycerol (4%); it was cooled to 4°C over a period of 2 hr and equilibrated for 20 min before freezing. Finally, semen was frozen in pellet form (0.25 mL) on dry ice and then plunged into liquid nitrogen.

Thawing was carried out by plunging a sterilized glass falcon tube containing the pellet in a 39°C water bath for 20 s.

The content of the Falcon tube was then emptied into a conical tube containing 3 mL of warmed synthetic oviduct fluid (SOF) supplemented with an antibiotic solution of streptomycin-penicillin (50 µg/mL - 50 IU/mL) and 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA). Semen was centrifuged at 900·g for 3 min maintaining a constant temperature (35°C) to remove the freezing medium, the sperm pellet was then re-suspended in fresh medium and aliquots used for all the experimental procedures.

#### Semen evaluation

The parameters analyzed included different semen molecular and cellular features, measured both before and after thawing, such as viability, motility parameters, ATP intracellular levels, and DNA integrity, which was evaluated only after thawing. An IVF test was performed to assess cryopreserved semen fertilizing ability.

#### Viability and motility parameters assessment

*In vitro* viability was assessed both before and after thawing by eosin-nigrosin stain [24].

Sperm motility parameters were assessed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system (Sperm Class Analyzer, S.C.A. v 3.2.0, Microptic S.L., Barcelona, Spain) with setting of 25 frames acquired to avoid sperm track overlapping, minimum contrast 10, minimum velocity of average path 30 µm/s, progressive motility > 80% straightness. This system has a specific set-up for goat sperm evaluation. For each sample, 5 µL subsample of sperm suspension was loaded into a pre-warmed analysis chamber with a depth of 10 µm (Makler Counting chamber, Sefi-Medical Instruments Ltd., Biosigma S.r.l., Italy) and a minimum of 500 sperm per subsample were analyzed in at least four different microscopic fields.

Sperm motility was assessed at 37°C at 40× using a phase contrast microscope. The percentage of progressive motile (P motile), and non progressive motile (NP motile) sperm, average velocity values of sperm (%; rapid, medium, slow and static), average path velocity (VAP, mm/s; the average velocity of the smoothed cell path), curvilinear velocity (VCL, mm/s; the average velocity measured over the actual point to point track followed by the cell), straight-line velocity (VSL, mm/s; the average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of the track), linearity index (LIN, %; the average value of the ratio VSL/VCL), straightness index (STR, %; the average value of the ratio VSL/VAP), amplitude of lateral head displacement (ALH, mm; the mean width of the head oscillation as the sperm swim), beat cross-frequency

(BCF, Hz; the frequency of sperm head crossing the average path in either direction) and wobble (WOB = (VAP/VCL) × 100, %; a measure of the oscillation of the actual trajectory about its spatial average path) were evaluated.

#### Extraction and measurement of intracellular ATP

Determination of intracellular ATP concentration was performed by the enzymatic assay as described by Zinellu et al. [25]. Briefly, 50 µL of fresh semen and 150 µL of frozen semen, (approximately 1.5 × 10<sup>9</sup> cells/mL) were washed twice with 0.1 mL of cold physiological solution. For the extraction of nucleotides, 0.1 mL of ice-cold 0.6 M perchloric acid were added to each Eppendorf tube containing spermatozoa and kept for 15 min; after the suspension was centrifuged in an Eppendorf Microfuge (3 minutes at 10000 rpm) and the supernatant was neutralized with 15 µL of 3.5 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> [26]. After one successive centrifugation in a Microfuge (3 min at 10000 rpm), the supernatant was analyzed spectrophotometrically with enzymatic assay.

ATP levels were measured spectrophotometrically at 340 nm using NADH-linked enzyme-coupled assays. The enzymatic spectrophotometric ATP assay was carried out at 37°C with a Beckman DU-7 spectrophotometer, and performed using the coupling enzymes, glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) and hexokinase (HK). Addition of excess HK (2 µL from 2 mg/mL) and G6PD (2 µL from 1 mg/mL) in the presence of excess glucose (8 µL from 18 mg/mL) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP<sup>+</sup>) (8 µL from 20 mg/mL) to perchloric extract (25 µL) and to 400 µL of TRAP buffer (0.1 M, pH 7.6), the reaction begins and ATP was determined from the formation of NADPH.

#### DNA integrity assessment

DNA damage was assessed only in frozen/thawed spermatozoa by single-cell gel electrophoresis (comet assay). Analysis of the shape and length of "comet" tail, just like the DNA content in the tail, gives an assessment of DNA damage. The neutral comet assay allows the detection of double-strand breaks by subjecting lysed cell nuclei to an electrophoretic field at neutral pH [27], here performed according to the method described by Sakkas et al. [28], with slight modifications. Briefly, sperm suspension (30 µL) was diluted in low-melting-point agarose (80 µL; 1% w/v). A 100-µL mixture of sperm-agarose was immediately pipetted onto 1% w/v normal-melting-point agarose-coated slides. Slides were immersed in ice-cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X, and 10 mM dithiothreitol [DTT]; pH = 10) for 1 h at 4°C. Slides were then immersed in lysing solution supplemented with proteinase K (10 µg/mL). Incubation was performed during 1 h at 37°C. After this step, slides were rinsed in PBS and then placed in a horizontal electro-



phoresis tank filled with freshly prepared electrophoresis neutral buffer (Tris-acetate-EDTA [TAE], pH 7.3). Electrophoresis was performed at 10 V and 6 mA for 20 min. Following electrophoresis, the slides were neutralized with Tris-HCl buffer (pH 7.5) for 5 min and then fixed in methanol.

Slides were stained with propidium iodide (PI), mounted with a coverslip and analyzed under an epifluorescence microscope. Digital comet images were captured with an Olympus microscope equipped with a CCD camera and Olympus CellF software. Fifty comets were measured per replicate sample (i.e., slide circle) using CASP software (Comet Assay Software Project 1.2.2). Scored parameters included tail DNA %, Olive tail moment, and comet length ( $\mu\text{m}$ ). Tail DNA % is a measurement of the proportion of total DNA that is present in the tail. The Olive tail moment is a global comet parameter expressed as [(tail mean  $\times$  head mean)  $\times$  (% tail DNA/100)] and used to quantify DNA damage [29]. The comet length is defined as the distance in micrometers between the right and left edges of the comet.

#### *In vitro fertilization test*

Ovaries were recovered at the local slaughterhouse and placed in Dulbecco's PBS at a temperature between 25°C and 35°C. After washing in fresh medium, ovaries were sliced using a micro-blade and the follicle content was released in medium TCM199 (with Earle's salts and bicarbonate) supplemented with 25 mmol Hepes, penicillin and streptomycin and 0.1% (w/v) of polyvinyl alcohol (PVA). The cumulus-oocyte complexes (COCs) comprised of 4-10 layers of granulosa cells and oocytes with a uniform cytoplasm, homogenous distribution of lipid droplets in the cytoplasm and with an outer diameter of about 90  $\mu\text{m}$  (mean) were selected for the experimental procedure. The selected COCs, after three washes in the same fresh medium, were *in vitro* matured in TCM199 supplemented with 10% estrous goat serum, 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  of FSH/LH and 100  $\mu\text{m}$  of cysteamine. COCs were put in groups of 30-35, in 600  $\mu\text{L}$  of the maturation medium in a four-well Petri dish (Nunc, Nalgene Nunc International, Denmark), layered with 300  $\mu\text{L}$  mineral oil and cultured for 24 hr in 5%  $\text{CO}_2$  in air at 39°C.

After maturation, the COCs were partially stripped of the granulosa cells and fertilized *in vitro* at 39°C and 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  and 90%  $\text{N}_2$  atmosphere in four-well Petri dishes (Nunc). Synthetic oviduct fluid (SOF) containing 3% bovine serum albumin (BSA-fraction V) supplemented with 25 mm Hepes (sperm-SOF) was used for sperm preparation. For IVF, SOF medium was supplemented with 10% estrous goat serum, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparin and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hipotaurine (IVF-SOF). Percoll® gradients were prepared as described by Rosenkrans et al. [30]. In

brief, 100% Percoll® solution was mixed with a 10  $\times$  salt solution (NaCl 2.889 g; KCl 0.238 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.116 g;  $\text{CaCl}_2$  0.112 g; Hepes 0.163 g; 50 mL of milli-Q water) to form 90% Percoll® solution. A 45% Percoll® solution was prepared from this by addition of an equal volume of sperm-SOF. The gradient was formed by pipetting 1 mL of 90% Percoll® solution into a 15 mL conical tube and then overlaying it with 1 mL of 45% Percoll® solution.

Frozen-thawed semen was placed onto the top of the 45% layer and then centrifuged at 2400 rpm at room temperature for 15 min through the gradient. After removal of supernatant, the resulting pellet was transferred in a sterilized conical glass tube below 1 mL of warmed IVF-SOF and incubated at 39°C in a humidified atmosphere at 5%  $\text{CO}_2$  in air for 15 min. Swim-up derived motile spermatozoa were diluted in IVF-SOF at a  $1 \times 10^6$  spermatozoa/mL final concentration and incubated for 45 min at 39°C under 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$  and 90%  $\text{N}_2$ . For IVF, spermatozoa were co-incubated under mineral oil in four wells Petri dishes with a mean of 30 matured oocytes/well in the same atmosphere condition.

After 26 hrs, presumptive zygotes were mechanically denuded of their cumulus cells and cultured in four-well Petri dishes containing SOF + essential and non-essential amino acids at oviduct concentration + 0.4% BSA under mineral oil in maximum humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$ , 90%  $\text{N}_2$  to blastocyst stage. At 40 h post-fertilization, uncleaved oocytes were stained with 1% lacmoid in fixing solution to evaluate chromatin configuration [31]. Oocytes showing decondensing sperm chromatin or pronuclei were classified as fertilized and added to the number of cleaved oocyte to calculate fertilization rates. Culture dishes were observed daily starting from the sixth day of culture and evolution to blastocysts was recorded.

#### **Statistical analysis**

Statistical analysis were performed using the statistical software program Statgraphic Centurion XV (version 15.2.06 for Windows; StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) and a probability of  $P = 0.05$  was considered to be the minimum level of significance. Differences in individual ejaculate traits and sperm parameters per male were studied by performing an ANOVA analysis. Differences in cleavage rate and embryo output per male were evaluated by performing a  $\chi^2$  test. In order to assess the predictive value of viability, CASA parameters and ATP intracellular concentration before and after thawing and of DNA integrity after thawing on subsequent embryo output after an *in vitro* fertility test, a logistic regression analysis was used. The dependent variable Y embryo output was expressed as a percentage (embryo obtained from each male over the number of fer-

tilized oocytes) and the independent variables X were the means of sperm parameters (viability, motility and ATP intracellular concentration before and after thawing and DNA integrity after thawing) calculated for each ejaculate.

**Results**

Table 1 summarized ejaculate traits recorded in three adult bucks during the breeding season. Total sperm output, which reflects differences found in both volume and concentration, was significantly lower in B compared with A and C.

As summarized in table 2, individual differences in semen parameters were evident only for semen viability after thawing. Freezing process significantly reduced semen viability in all the samples analyzed ( $p < 0.0001$ ), but semen collected from A maintained a higher viability compared with B ( $p < 0.05$ ), while C did not differ from the others.

The analysis of CASA parameters did not reveal any difference among the 3 individuals in the sperm motility pattern showed both before and after thawing. The percentage of non progressive motile spermatozoa increased after thawing in C, while no differences were recorded between fresh and frozen semen in A and B. In the same way, VCL increased after thawing in A, while no differences were recorded between fresh and frozen semen in the others.

ATP intracellular concentration showed a wide range of variability both in fresh and frozen samples. Considering inter-individual variations, results approached significance in fresh samples ( $p = 0.0518$ ); in particular, semen collected from B showed lower ATP concentration compared with C, while A did not differ from the others. Freezing and thawing significantly reduced ATP intracellular concentration in samples collected from C ( $p < 0.05$ ), while no difference between fresh and frozen samples were detected in A and B. Furthermore, no difference was found between the three individuals in ATP intracellular concentration after thawing.

DNA integrity, as evaluated by the comet assay, was assessed only in frozen semen (table 3). While no differ-

ence was found among the three individuals in percentage tail DNA, olive tail moment was lower in B than in A and C ( $p < 0.01$ ). In addition, comet length was significantly higher in C than in A and B ( $p < 0.01$ ).

Result of the *in vitro* fertility test are summarized in table 4. Spermatozoa collected from A and B lead to higher cleavage rates ( $p < 0.01$ ) and blastocysts output ( $p < 0.05$ ) compared with C (table 4). In addition, a faster embryo developmental kinetic was observed when oocytes were fertilized with spermatozoa collected from A and B compared with C, as revealed by the higher number of expanded blastocyst obtained on day 7 post-fertilization.

Logistic regression analysis, after a stepwise forward selection of the factors, reported one model with high percentage of concordance between a set of the considered variables and *in vitro* embryo output. The model explained a deviance of 72% ( $p < 0.0001$ ), directly related with the mean percentage of rapid sperm in fresh semen ( $p < 0.01$ ), semen viability after thawing ( $p < 0.01$ ), and with two of the three comet parameters considered, i.e tail DNA percentage ( $p < 0.0001$ ) and comet length ( $p < 0.0001$ ). ATP levels neither before nor after thawing could be related to subsequent *in vitro* embryo output. On the other hand, it should be pointed out that considering tail DNA percentage and comet length alone the model could explain a deviance of 57%.

**Discussion**

This study aimed to investigate which parameters among a battery of analyses could predict frozen/thawed spermatozoa fertility, as evaluated by the IVF test, in a goat model. *In vitro* fertilization has been reported to be one of the most adequate parameters for semen fertility prediction since it evaluates the spermatozoa-oocyte interactions occurring during *in vivo* fertilization, allowing measurement of different endpoints in the early stages of the embryo development [2]. In addition, *in vitro* fertilization assays provide the advantage of being able to culture subsequent zygotes, providing information on the genetic normalcy of the sperm [32]. Semen from bulls, boars and rams has been tested and statistically significant relationship between IVF fertility and fertility *in vivo* was found both in retrospective studies [33,34] and prospectively [35].

Three main conclusion can be drawn from the current study; first, DNA integrity represents a factor able to strongly influence *in vitro* embryo outcome with frozen/thawed semen; second, the combination of a few sperm function parameters, such as percentage of rapid spermatozoa in fresh semen, viability after thawing and comet parameters (tail DNA percentage and comet length) allows an accurate prediction of subsequent *in vitro*

**Table 1: Ejaculate traits recorded in three adult male goats (A, B and C) during the breeding season.**

|   | Volume (µL)                  | Concentration (sperm × 10 <sup>6</sup> /mL) | Total sperm output (sperm × 10 <sup>6</sup> ) |
|---|------------------------------|---|---|
| A | 891.2 ± 567.3 <sup>a</sup>   | 1787.06 ± 515.5 <sup>a</sup>                | 1584.7 ± 1134.4 <sup>a</sup>                  |
| B | 461.3 ± 227.9 <sup>b</sup>   | 1815.13 ± 801.4 <sup>a</sup>                | 833.8 ± 474.5 <sup>b</sup>                    |
| C | 689.4 ± 370.8 <sup>a,b</sup> | 2373.9 ± 607.7 <sup>b</sup>                 | 1543.7 ± 725.8 <sup>a</sup>                   |

<sup>a, b</sup> Within the same column: a ≠ b  $p < 0.05$  (ANOVA one way).

**Table 2: Analysis of several cellular and molecular parameters in fresh and frozen/thawed semen collected from three adult male goats (A, B and C).**

|   |               | A                         |                          | B                       |                         | C                         |                             |
|---|---------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|   |               | Fresh                     | Frozen                   | Fresh                   | Frozen                  | Fresh                     | Frozen                      |
| Viability (%)   |               | 80.4 ± 6.6                | 60.2 ± 7.9 <sup>a</sup>  | 74.4 ± 9.1              | 48.9 ± 11 <sup>β</sup>  | 75.5 ± 9.7                | 54.7 ± 11.2 <sup>α, β</sup> |
| CASA motility parameters*                               | NP motile (%) | 58.2 ± 4.9                | 58.2 ± 14.2              | 50.5 ± 6.9              | 57.8 ± 1.6              | 54 ± 12 <sup>a</sup>      | 68 ± 8 <sup>b</sup>         |
|   | P motile (%)  | 31.7 ± 5.3                | 25.7 ± 9.3               | 32.4 ± 10.7             | 19.6 ± 11.3             | 27.2 ± 10.6               | 20.4 ± 6                    |
|   | Rapid (%)     | 65.8 ± 16.4               | 49.7 ± 15.8              | 60.8 ± 22.8             | 45.4 ± 12               | 56.4 ± 19.2               | 47.3 ± 4.5                  |
|   | Medium (%)    | 12.4 ± 8.6                | 15.3 ± 5.6               | 9.6 ± 6.4               | 13.8 ± 5.3              | 13.4 ± 10.3               | 18 ± 3.7                    |
|   | Slow (%)      | 11.8 ± 7.7 <sup>a</sup>   | 18.9 ± 3.1 <sup>b</sup>  | 12.7 ± 8.5 <sup>a</sup> | 23.8 ± 6.1 <sup>b</sup> | 13.2 ± 5.7 <sup>c</sup>   | 22.8 ± 1.8 <sup>d</sup>     |
|   | Static (%)    | 10 ± 5                    | 16.1 ± 17                | 16.9 ± 12               | 17 ± 7                  | 16.9 ± 13.4               | 11.9 ± 3                    |
|   | VAP (μm/sec)  | 76.8 ± 23.6               | 57.9 ± 9.5               | 69.1 ± 28.9             | 49.8 ± 12.1             | 67 ± 23.6                 | 50.5 ± 7.8                  |
|   | VCL (μm/sec)  | 105.5 ± 23.4 <sup>a</sup> | 83.1 ± 12.1 <sup>b</sup> | 96 ± 27.5               | 74.2 ± 23               | 94.6 ± 22.3               | 76.3 ± 9.3                  |
|   | VSL (μm/sec)  | 53.5 ± 17.4               | 41 ± 7.8                 | 50.3 ± 23.5             | 34.9 ± 14.8             | 47 ± 18.1                 | 34.2 ± 6.6                  |
|   | LIN (%)       | 50.1 ± 9.4                | 49.7 ± 8.1               | 50.9 ± 13.7             | 46.2 ± 8.6              | 48.7 ± 10.2               | 44.6 ± 5.6                  |
|   | STR (%)       | 69.4 ± 5.4                | 70.9 ± 6.1               | 71.5 ± 6.7              | 69 ± 5.7                | 69.6 ± 7.3                | 67.3 ± 4.4                  |
|   | WOB (%)       | 71.8 ± 10                 | 69.8 ± 6.1               | 70.4 ± 14.2             | 66.5 ± 6.5              | 69.5 ± 9.6                | 66.1 ± 4.8                  |
|   | ALH (μm)      | 3.3 ± 0.5                 | 3.4 ± 0.5                | 3.2 ± 0.7               | 3.6 ± 0.4               | 3.8 ± 0.6                 | 3.5 ± 0.4                   |
|   | BCF (Hz)      | 8.7 ± 1.3                 | 8.2 ± 0.8                | 9.6 ± 1.9               | 7.9 ± 1.3               | 8.9 ± 1.9                 | 7.9 ± 1.4                   |
| ATP concentration (nmolATP/10 <sup>9</sup> spermatozoa) |               | 107.4 ± 50.61             | 48 ± 37                  | 66.5 ± 28.9             | 27.5 ± 29.5             | 147.8 ± 55.5 <sup>a</sup> | 62.7 ± 45.4 <sup>b</sup>    |

\*P motile: progressive motile sperm; NP motile: non progressive motile sperm; rapid, medium, slow and static: average velocity values of sperm (%); VAP: average path velocity (mm/s); VCL: curvilinear velocity (mm/s); VSL: straight-line velocity (mm/s); LIN: linearity index (%);STR: straightness index (%); ALH: amplitude of lateral head displacement (mm); BCF: beat cross-frequency (Hz); WOB: wobble (%).

<sup>α, β</sup> Within the same row but among different groups different superscripts indicate statistical difference (ANOVA one way): α ≠ β p < 0.05.

a, b, c, d, Within the same row and group different superscripts indicate statistical difference (ANOVA one way): a ≠ b p < 0.05; c ≠ d p < 0.01.

embryo output; and third sperm energetic status, as evaluated by ATP intracellular levels, cannot be related to ART outcome.

Considerable effort is being invested in identifying markers for functional sperm capacity that can more accurately predict fertility. DNA integrity represents an important parameter in the evaluation of frozen/thawed semen functionality. Although DNA repair occurs in developing sperm [36], it is terminated as transcription and translation cease post-spermiogenesis [37]. As a result, sperm have no mechanism to repair DNA damage incurred during their transit and storage in the epididymis, post-ejaculation or during freezing procedures. In particular, freezing seems to affect chromatin structure [38,39], and

DNA damage from cryopreservation in semen from infertile men has been detected using the comet assay [40].

In the present study, considering that individual differences emerged among the three donors in the degree of DNA damage after thawing, we found a high predictive value of comet parameters in frozen/thawed semen on subsequent in vitro embryo output. IVF experiments with gamma irradiated sperm showed that sperm with severe DNA damage remained functionally intact at the level of membrane and organelle and motility parameters [41]. In fact, the DNA damaged sperm showed normal zona pellucida binding characteristics and even the fertilization and cleavage rates of the fertilized oocytes remained normal. However, about all four to eight cell embryo stages initiated apoptosis [41,42]. Thus, the reproductive failure, caused by DNA aberrations, appears not at the level of fertilization but at the onset of embryonic DNA expression, when the paternal genome exerts a major influence [43]. Thus, in assisted conception cycles in humans, preimplantation development is negatively correlated with DNA damage assessed by a variety of methods including in situ nick translation [44], comet assay [45], TUNEL [46,47] and sperm chromatin structure assay (SCSA) [48,49]. In IVF procedures a negative correlation with fertilization, kinetic of embryo development and implantation rate were correlated with higher sperm DNA fragmentation in sperm samples [50]. Other authors failed to find a predic-

**Table 3: Differences in comet parameters in frozen/thawed spermatozoa collected from three adult male goats (A, B and C).**

|   | Tail DNA % | Olive tail moment      | Comet length (μm)        |
|---|------------|------------------------|--------------------------|
| A | 13.6 ± 1.9 | 6 ± 0.9 <sup>a</sup>   | 99.7 ± 1.5 <sup>a</sup>  |
| B | 10.2 ± 1.8 | 1.9 ± 0.8 <sup>b</sup> | 99.3 ± 1.5 <sup>a</sup>  |
| C | 14.9 ± 1.8 | 5.2 ± 0.9 <sup>a</sup> | 110.9 ± 1.5 <sup>b</sup> |

<sup>a, b</sup> Within the same column different superscripts indicate statistical difference: (ANOVA one way) a ≠ b p < 0.01. Data are expressed as mean ± SE.



**Table 4: Differences in *in vitro* cleavage rates and blastocyst output obtained after *in vitro* fertilization of goat oocytes with cryopreserved semen obtained from three adult male goats (A, B and C).**

| Male | n   | Oocyte Fertilization (%) | Cleavage (%)            | Expanded blastocyst (%) |                       |                         | total                  |
|------|-----|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
|      |     |                          |                         | 7 dpf                   | 8 dpf                 | 9 dpf                   |                        |
| A    | 460 | 362 (78.7)               | 226 (62.4) <sup>a</sup> | 10 (4.4) <sup>a</sup>   | 19 (8.4) <sup>c</sup> | 13 (5.7) <sup>c</sup>   | 42 (37.2) <sup>a</sup> |
| B    | 440 | 358 (81.4)               | 194 (54.2) <sup>b</sup> | 7 (3.6) <sup>a</sup>    | 17 (8.8) <sup>c</sup> | 8 (4.1) <sup>c, d</sup> | 32 (33) <sup>a</sup>   |
| C    | 440 | 352 (80.0)               | 176 (50.0) <sup>b</sup> | 1 (0.5) <sup>b</sup>    | 7 (4.0) <sup>d</sup>  | 4 (2.3) <sup>d</sup>    | 12 (13.6) <sup>b</sup> |

Dpf = days post-fertilization

<sup>a, b, c, d</sup> Within the same column: Chi square test: a ≠ b p < 0.01; c ≠ d p < 0.05.

tive value on the outcome of intra-uterine insemination (IUI), IVF and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of spermatozoa DNA integrity, as evaluated by the SCSA when measured after density gradient centrifugation [51], and concluded on the basis of previous study [52], that the prognostic ability of SCSA is limited to analyses performed on neat semen.

In the current study we assessed DNA integrity after freezing and thawing and found a high prognostic value of this parameter on subsequent *in vitro* embryo output. In addition, the deviance explained by the logistic regression model rose from 57% to 72% when other two factor were included, i.e percentage of rapid spermatozoa in fresh semen and semen viability after thawing.

Semen viability after thawing reflects the ability of spermatozoa to withstand freezing and thawing procedures, i.e in some terms sperm freezability. It is well known that this parameter is highly subjective and likely to be related to genetic differences [53]. On the other hand, CASA parameters evaluated both before and after thawing were excluded by the model, a part from percentage of rapid spermatozoa in fresh semen. This parameter may reflect overall ejaculate quality.

There have been many reports that poor motility is associated with low IVF fertilization rates [e.g. [54-56]]. For many years, the assessment of motility has been regarded as one of the most informative aspects of semen analysis [57].

Following the introduction of CASA, a wide variety of parameters have been found to be associated with fertilization rates *in vitro*. Those selected as the best predictors include: linearity in semen and percentage spermatozoa in insemination medium with velocities between 10 and 20 μm/sec [58], % progressively motile in semen or ALH and VAP in medium (zona free hamster oocytes; [59]), % spermatozoa with rapid motility; % sperm motile and VCL all in prepared spermatozoa [56]; VCL [55]; and % of progressive motile spermatozoa (hamster oocyte test; [60]). It should be considered that many of the sperm motility measurements derived from CASA analysis are

significantly correlated with each other [58] and there are significant variations in IVF and measurement techniques between laboratories. It is not surprising that whereas it is almost universally acknowledged that sperm motility is an important factor in predicting IVF outcome, the parameter taken as the best index should vary between studies.

In the present study we did not find any predictive value of spermatozoa energetic status, as evaluated by ATP intracellular concentration before and after thawing, on IVF outcome. In other studies, sperm oxygen consumption has been correlated with bull fertility and measurement of total ATP formation has been proposed as a test for bull fertilizing ability after freezing and thawing [8]. We reported for Griffon vulture spermatozoa that a higher ATP intracellular concentration in fresh semen was followed by a longer survival *in vitro* after cryopreservation [9]. Furthermore, ATP values correlated positively with sperm viability both before and after cryopreservation [9]. It can be speculated that this parameter may provide useful information if measured at different time points after thawing since it could reflect semen ability to restore ATP intracellular level after the severe energetic loss caused by cryopreservation.

In conclusion, the model proposed here represent one of the many possible ways to explain differences found in embryo output following IVF with different goat semen donors. In our system, DNA integrity, as evaluated by a high sensible method such as the comet assay, has a high predictive value on IVF outcome with frozen/thawed semen (deviance explained: 57%). Besides, adding to the model other two factors, such as of rapid spermatozoa in fresh semen and viability after thawing a 72% of deviance in embryo out put could be explained. This model may represent a useful tool to select the most suitable donors for semen cryopreservation.

#### Competing interests

To the authors' best knowledge, no competing interests of any nature arise from the current publication.

### Authors' contributions

FB participated in the design of the study, carried out experimental analysis, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. MM performed the semen collection and analyses, and helped drafting the manuscript. VP performed the comet assays and the ATP analyses. SS, AS and VS helped in sample collection and in drafting of the manuscript and participated in the design of the study. PM helped performing the comet assays and the ATP analyses. GGL participated in the design of the study and performed the statistical analysis. SN conceived the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All co-authors provided inputs during final manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

We would like to thank Regione Autonoma della Sardegna (Special Project Biodiversity) for the financial support provided. Further, we would like to thank Dr. Francisco Marco Jiménez for helpful suggestions in the revision of the manuscript.

### References

- Garrido N, Remohi J, Martínez-Conejero JA, García-Herrero S, Pellicer A, Meseguer M: Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online* 2008, 17:855-865.
- Rodríguez-Martínez H, Barth AD: In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007, 64:39-54.
- Miki K: Energy metabolism and sperm function. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007, 65:309-325.
- Silva PF, Gadella BM: Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006, 65:958-978.
- Travis AJ, Jorgez CJ, Merdiushev T, Jones BH, Dess DM, Diaz-Cueto L, Storey BT, Kopf GS, Moss SB: Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. *J Biol Chem* 2001, 276:7630-7636.
- 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, 121:1129-1137.
- Mukai C, Okuno M: Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 2004, 71:540-547.
- Garrett LJ, Revell SG, Laese HJ: Adenosine triphosphate production by bovine spermatozoa and its relationship to semen fertilizing ability. *J Androl* 2008, 29:449-458.
- Madeddu M, Berlinguer F, Ledda M, Leoni GG, Satta V, Succu S, Rotta A, Pasciu V, Zinellu A, Muzzeddu M, Carru C, Naitana S: Ejaculate collection efficiency and post-thaw semen quality in wild-caught Griffon vultures from the Sardinian population. *Reprod Biol Endocrinol* 2009, 19:7-18.
- Kirk ES, Squires EL, Graham JK: Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2005, 64:1422-1439.
- Mocé E, Graham JK: In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci* 2008, 105:104-118.
- Marcus-Braun N, Braun G, Potashnik G, Har-Vardi I: Effect of cryopreservation on quality and fertilization capacity of human sperm. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004, 116:63-66.
- Freeman MR, Archibong AE, Mrotek JJ, Whitworth CM, Weitzman GA, Hill GA: Male partner screening before in vitro fertilization: preselecting patients who require intracytoplasmic sperm injection with the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 2001, 76:1113-1118.
- Strassburger D, Friedler S, Raziel A, Schachter M, Kasterstein E, Ronel R: Very low sperm count affects the result of intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2000, 17:431-436.
- Mortimer ST: CASA-practical aspects. *J Androl* 2000, 21:515-524.
- Holt C, Holt WV, Moore HD, Reed HC, Curmook RM: Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl* 1997, 18:312-323.
- Foote RH: Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci* 2003, 75:119-139.
- Wilhelm KM, Graham JK, Squires EL: Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* 1996, 46:559-578.
- Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH: Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 1998, 49:871-879.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C: Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000, 55:282-288.
- Januskauskas A, Johansson A, Rodriguez-Martinez H: Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 2003, 60:743-758.
- Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez JF, Pérez-Garnelo S, Moreira P, Pintado Sanjuanbenito B, Gutiérrez-Adán A, de la Fuente Martínez J: Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 2005, 64:232-241.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S: Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000, 62:113-141.
- Pintado B, de la Fuente J, Roldan ER: Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 3 or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J Reprod Fertil* 2008, 118:145-152.
- Zinellu A, Sotgia S, Pasciu V, Madeddu M, Leoni GG, Naitana S, Deiana L, Carru C: Intracellular adenosine 5'-triphosphate, adenosine 5'-diphosphate, and adenosine 5'-monophosphate detection by short-end injection capillary electrophoresis using methylcellulose as the effective electroosmotic flow suppressor. *Electrophoresis* 2008, 29:3069-3073.
- Balestri F, Giannecchini M, Sgarrella F, Carta MC, Tozzi MG, Camici M: Purine and pyrimidine nucleosides preserve human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions. *Neurochem Int* 2007, 50:517-523.
- Lewis SE, Agbaje IM: Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis* 2008, 23:163-170.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzarro D: Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 2002, 66:1061-1067.
- Olive PL, Durand RE, Banath JP, Johnston PJ: Analysis of DNA damage in individual cells. *Methods Cell Biol* 2001, 64:235-249.
- Rosenkrans Cf, Zeng Gq, Mcnamara Gt, Schoff PK, First NL: Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993, 49:459-462.
- Palomo MJ, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT: Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 1999, 51:927-40.
- Eid LN, Lorton SP, Parrish JJ: Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol Reprod* 1994, 51:1232-1237.
- Larsson B, Rodríguez-Martínez H: Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci* 2000, 60:327-336.
- Sellés E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S: Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Domest Anim* 2003, 38:66-72.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Håård MG, Rodríguez-Martínez H: Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *Int J Androl* 1999, 22:253-260.



36. Van Loon AA, Den Boer PJ, Schans GP Van der, Mackenbach P, Grootegeed JA, Baan RA, Lohman PH: Immunochemical detection of DNA damage induction and repair at different cellular stages of spermatogenesis of the hamster after in vitro or in vivo exposure to ionizing radiation. *Exp Cell Res* 1991, 193:303-309.
37. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE: Seeds of concern. *Nature* 2004, 432:48-52.
38. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W: Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl* 1999, 22:155-162.
39. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE: Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001, 76:892-900.
40. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE: Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001, 16:1191-1199.
41. Bordignon V, Smith LC: Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol Reprod* 1999, 61:1513-1520.
42. Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM: DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 2006, 27:176-188.
43. Tesarik J, Greco E, Mendoza C: Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004, 19:611-615.
44. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A: Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998, 13:11-19.
45. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR: The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002, 17:990-998.
46. Ahmadi A, Ng SC: Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999, 14:2279-2285.
47. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF: Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997, 56:602-607.
48. Erenpreiss J, Bungum M, Spano M, Elzanaty S, Orbidans J, Giwercman A: Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod* 2006, 21:2061-2064.
49. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ: Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003, 79:1597-1605.
50. Garrido N, Meseguer M, Remohi J, Simón C, Pellicer A: Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod* 2005, 20:1028-1034.
51. Bungum M, Spano M, Humaidan P, Eleuteri P, Rescia M, Giwercman A: Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART. *Hum Reprod* 2008, 23:4-10.
52. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A: Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007, 22:174-179.
53. Thurston LM, Watson PF, Holt WV: Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation? *Cryo Letters* 2002, 23:255-262.
54. Parinaud J, Richoille G, Moutaffian H, Vieitez G, Mieuisset R: Are the characteristics of spermatozoa in the insemination medium useful for predicting in-vitro fertilization results? *Int J Androl* 1996, 19:103-108.
55. De Geyter C, De Geyter M, Koppers B, Nieschlag E: Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum Reprod* 1998, 13:2512-2520.
56. Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W: In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril* 1998, 70:305-314.
57. Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C: Sperm motility. *Fertil Steril* 1980, 34:197-215.
58. Liu DY, Clarke GN, Baker HW: Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl* 1991, 12:231-239.
59. Aitken J: On the future of the hamster oocyte penetration assay. *Fertil Steril* 1994, 62:17-19.
60. Ford WC, Williams KM, Harrison S, Rees JM, Ray BD, McLaughlin EA, Hull MG: Value of the hamster oocyte test and computerised measurements of sperm motility in predicting if four or more viable embryos will be obtained in an IVF cycle. *Int J Androl* 2001, 24:109-119.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

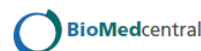
"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
http://www.biomedcentral.com/info/publishing\_adv.asp



## ***In vitro* production and cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment**

Giovanni Giuseppe Leoni<sup>A,D</sup>, Sara Succu<sup>A</sup>, Valentina Satta<sup>A</sup>, Mereu Paolo<sup>A</sup>, Luisa Bogliolo<sup>B</sup>, Daniela Bebbere<sup>C</sup>, Antonio Spezzigu<sup>C</sup>, Manuela Madeddu<sup>C</sup>, Fiammetta Berlinguer<sup>C</sup>, Sergio Ledda<sup>B</sup> and Salvatore Naitana<sup>C</sup>

<sup>A</sup>Department of Physiological, Biochemical and Cellular Sciences, V. Vienna 2, 07100 Sassari, Italy.

<sup>B</sup>Department of Veterinary Pathology and Clinic, V. Vienna 2, 07100 Sassari, Italy.

<sup>C</sup>Department of Animal Biology, University of Sassari, V. Vienna 2, 07100 Sassari, Italy.

<sup>D</sup>Corresponding author. Email: gioneoni@uniss.it

**Abstract.** This study compares the developmental capacity and cryotolerance of embryos produced from oocytes of stimulated prepubertal and adult Sarda goats. Twelve prepubertal and 13 adult goats were each given 110 and 175 IU FSH, respectively, and cumulus–oocyte complexes (COCs) were collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU). After *in vitro* maturation, fertilisation and culture (IVMFC), blastocysts were vitrified, warmed and blastocoel re-expansion and gene expression were evaluated. Prepubertal goats produced a higher COCs number than adults (mean  $\pm$  s.e.m.,  $89.67 \pm 5.74$  and  $26.69 \pm 3.66$ , respectively;  $P < 0.01$ ). Lower developmental competence was demonstrated in the prepubertal oocytes as shown by a higher number of COCs discarded before IVM (21.1% and 14.7% for prepubertals and adults, respectively;  $P < 0.01$ ) and IVF (23.4% v. 9.1%;  $P < 0.01$ ) and by the lower cleavage (55.6% and 70.3%, respectively;  $P < 0.01$ ) and blastocyst rates (24.2% and 33.9%, respectively;  $P < 0.05$ ). Compared with the adult, prepubertal vitrified/warmed blastocysts showed significantly ( $P < 0.05$ ) lower *in vitro* viability, as determined by the re-expansion rate (62.5% and 40.3%). No differences were observed in the time required for blastocoel re-expansion or in cyclin B1, E-cadherin, Na/K ATPase, HSP90 $\beta$  and aquaporin 3 messenger RNA quantity. These results show that *in vitro*-produced embryos produced from prepubertal goat oocytes have a lower developmental rate and cryotolerance compared with their adult counterparts. However, we can assume that the quality of re-expanded embryos does not differ between the two groups.

### **Introduction**

Use of prepubertal animals has been established as improving selection by reducing the generation interval (Kelly *et al.* 2005; Morton 2008). A major factor that limits the application of this technique is the lower developmental competence of prepubertal oocytes compared with their adult counterparts (calf: Armstrong *et al.* 1992; goat: Martino *et al.* 1994; lamb: Ledda *et al.* 1996). Several studies have demonstrated that prepubertal goat oocytes have structural and functional limits that suggest a delay in the oocyte growing phase. The presence of severe cytoplasm organelle abnormalities, such as an altered distribution of cortical granules and mitochondria (Velilla *et al.* 2004, 2006) and microtubule and microfilament disorganisation (Velilla *et al.* 2005) supports this hypothesis. These factors could be responsible for the low fertilisation rates and high polyspermic incidence observed in *in vitro*-matured and fertilised prepubertal goat oocytes (Izquierdo *et al.* 1998; Urdaneta *et al.* 2004). Furthermore, prepubertal goat oocytes present alterations in key molecule concentrations and activity such as total

RNA content, p34 (cdc2) and cyclin B1 expression and maturation promoting factor (MPF) activity (Anguita *et al.* 2007a, 2008). These results suggest that prepubertal oocytes undergo incomplete maturation due to cytoplasmic (Leoni *et al.* 2007a) or nuclear deficiencies (Ptak *et al.* 2006) that would determine the low blastocyst output and quality.

A large amount of data is available on the structure and functional properties of the prepubertal goat oocyte. On the other hand, data on the biology of the *in vitro*-derived embryos is lacking. The ability to evaluate the developmental potential of the blastocyst provides a means for ensuring a high success rate for assisted reproductive technologies (ART) in small ruminants (Cognié *et al.* 2004; Morton 2008). Several researchers have highlighted that subjective microscopic evaluation of embryo morphology is not directly related to the identification of embryos with a higher developmental competence (Maddox-Hyttell *et al.* 2003; van Soom *et al.* 2003; Guerif *et al.* 2007). Additional evaluation criteria such as speed of the first cell cycles (Fenwick *et al.* 2002), timing of cleavage

(Salumets *et al.* 2003), blastocyst development (van Soom *et al.* 1997), expression of genes involved in development (Rizos *et al.* 2003; Knijn *et al.* 2005; Wrenzycki *et al.* 2007) and embryo cryotolerance (Berlinguer *et al.* 2004) have also been used for assessment of embryo quality. Cryotolerance is usually assessed by morphological evaluation of blastocoel re-expansion rate during an *in vitro* culture period after thawing (Berlinguer *et al.* 2004). Recently we reported that the time required for blastocyst re-expansion after vitrification and warming is accurately related to several markers (hatching rate, total cell number, peroxide status, apoptotic index, protein synthesis, expression of genes related to cell injury repair and pregnancy rates) used for assessing embryo quality (Leoni *et al.* 2008). Therefore, the blastocyst's ability to quickly restore its functionality in terms of blastocoelic cavity re-expansion after vitrification and warming can be considered a reliable marker of embryo quality and developmental potential both *in vitro* and *in vivo* (Leoni *et al.* 2008).

The aim of the present study was to estimate the *in vitro* developmental competence of prepubertal goat oocytes compared with adult ones after FSH treatment. In order to assess embryo quality, time required for blastocoel cavity re-expansion was determined after vitrification and warming. Furthermore, the expression of a panel of genes involved in early embryo development (blastocoel formation (aquaporin 3 (Aqp3), Edashige *et al.* 2006; Na/K ATPase (Atp1a1), Betts *et al.* 1998; E-cadherin (E-cad), Larue *et al.* 1994), cell cycle control (cyclin B1 (Cnd1), Ozawa *et al.* 2004) and cold-shock reaction, such as chaperone-like activity (90-kDa heat shock protein  $\beta$  (Hsp90 $\beta$ ), Loones *et al.* 1997)) was quantified. This panel of genes has previously been used to assess vitrified-thawed blastocyst quality (Leoni *et al.* 2008).

#### Materials and methods

Unless specified, chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

#### Animals and treatments

Animal care and experimental protocols were performed according to appropriate ethical and legal standards and were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Sassari.

Cumulus-oocyte complexes (COCs) used in this study were recovered from 12 prepubertal (35–45 days of age, bodyweight 7–11 kg) and 13 adult (3–6 years of age, bodyweight 35–45 kg) multiparous Sarda goats in three replicate laparoscopic oocyte-pickup (LOPU) sessions during the non-breeding season (March–April). In each replicate session, four prepubertal and three to four adult goats were held, COCs recovered from each experimental group and processed in parallel.

Animals were maintained outdoors with access to indoor facilities at the experimental farm of the Department of Animal Biology at the Veterinary faculty of the University of Sassari, Italy (latitude 40°43'N), and were fed a live-weight maintenance ration throughout the experimental procedure. In prepubertal does, follicular development was stimulated by the administration of 110 IU of FSH (Folltropin; Bioniche Animal Health,

Bio 98, Milano, Italy) administered in four equal doses given every 12 h. Adult does were treated with 175 IU of FSH administered in six equal doses given every 12 h. Twelve hours after the last FSH administration, donors were sedated with acepromazine maleate, anaesthetised with pentothal sodium and secured in a cradle in dorsal recumbency. LOPU was carried out as previously described (Berlinguer *et al.* 2004). A single LOPU session was carried out in each goat. All follicles  $\geq 1$  mm in diameter were aspirated with a 5-mL syringe and a 22-gauge needle. The collection medium was HEPES-buffered TCM-199 supplemented with 0.1% PVA, 15 IU mL<sup>-1</sup> heparin and antibiotics. Following aspiration, COCs were recovered from the aspirate using a stereomicroscope.

#### Assessment of *in vitro* developmental competence

COCs derived from prepubertal and adult animals were kept separate throughout the *in vitro* procedures. COCs that had 4–10 layers of granulosa cells, a uniform cytoplasm, homogeneous distribution of lipid droplets in the cytoplasm and an outer diameter  $>135$   $\mu$ m were selected for the experimental procedures. The selected COCs were washed three times in collection medium. COCs were then placed into four-well culture dishes (Nunc; Nalgene Nunc International, Roskilde, Denmark) ( $n = 30$ – $35$  per well) containing 600  $\mu$ L maturation medium (TCM-199 supplemented with 10% oestrus goat serum, 10  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> FSH/LH and 100  $\mu$ M cysteamine) and covered with 300  $\mu$ L mineral oil and cultured for 26 h in 5% CO<sub>2</sub> in air at 39°C.

*In vitro* fertilisation procedures were similar to those previously described (Berlinguer *et al.* 2009). Briefly, after maturation, COCs were partially stripped of cumulus cells and assessed for polar body extrusion under a stereomicroscope (20 $\times$  magnification). COCs ( $n = 30$  per well) were placed into IVF-SOF medium (SOF medium supplemented with 10% oestrus goat serum, 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> heparin and 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> hypotaurine) and covered with mineral oil.

Semen preparation was performed according to Rho *et al.* (2001) with some modifications (Berlinguer *et al.* 2009). Briefly, a discontinuous Percoll gradient (45% and 90%) was prepared using synthetic oviduct fluid (SOF) containing 3% bovine serum albumin (BSA-fraction V) supplemented with 25 mM Hepes (sperm-SOF). Frozen-thawed spermatozoa pellets from the same ejaculate of one buck were thawed at 39°C for 20 s. Thawed semen was layered on the top of the Percoll gradient and then centrifuged at 900g at room temperature for 15 min. After removal of the supernatant, the resulting pellet was layered below 1 mL of warmed IVF-SOF medium (swim-up) and incubated for 15 min at 39°C in a humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub> in air. After swim-up, motile spermatozoa were diluted in IVF-SOF at a final concentration of  $1 \times 10^6$  spermatozoa mL<sup>-1</sup> and incubated for 45 min at 39°C under 5% CO<sub>2</sub> : 5% O<sub>2</sub> : 90% N<sub>2</sub>. Spermatozoa were then co-incubated with the prepared COCs for 24 h at 39°C in 5% CO<sub>2</sub> : 5% O<sub>2</sub> : 90% N<sub>2</sub> as previously described (Leoni *et al.* 2007b).

After IVF, presumptive zygotes were cultured in four-well culture dishes containing SOF supplemented with 0.4% BSA (v/v) and essential and non-essential amino acids at oviducal concentration under mineral oil in a humidified atmosphere



Table 1. Information on the primers used for real-time PCR

| Gene           | GenBank accession number | Sequence   | Annealing temperature | Size (bps) |
|----------------|--------------------------|--|-----------------------|------------|
| HSP90 $\beta$  | AB072369                 | 5' tggagatcaacctgacca 3'<br>5' ctctcgttgaggatccc 3'      | 56°C                  | 143        |
| Ccnd1          | L26548                   | 5' cagtgtatgacaggaatgc 3'<br>5' cgtagtcagcatagttagt 3'   | 56°C                  | 134        |
| $\beta$ -actin | NM_001009784             | 5' ttctgggatggatcctg 3'<br>5' ggtgatctctctgcatcc 3'      | 60°C                  | 162        |
| Atp1a1         | X02813                   | 5' gctgacttggtcatctgcaa 3'<br>5' cattccagggcagtaggaaa 3' | 58°C                  | 129        |
| E-cad          | NM_001002763             | 5' tgtgactgtgatggatcgt 3'<br>5' acctctctctccgacaag 3'    | 58°C                  | 155        |
| Aqp3           | AF123316                 | 5' ggggtcccattgtctctcc 3'<br>5' acgaggagaatgtgaattg 3'   | 60°C                  | 119        |

5% CO<sub>2</sub> : 5% O<sub>2</sub> : 90% N<sub>2</sub>. At 40 h after fertilisation the number of cleaved oocytes showing two distinct blastomeres was recorded. Uncleaved oocytes were removed and fixed with methanol and stained with acetolacmoid to determine fertilisation and polyspermy rates. Embryos were cultured up to the blastocyst stage (Days 6–9; Day 0 = Day of IVF) and then vitrified.

#### Assessment of blastocyst cryotolerance

Vitrification and warming media were prepared using PBS supplemented with 20% (v/v) FCS as a base medium. Blastocysts were vitrified by first exposing them to 1.4 M glycerol for 5 min and then 1.4 M glycerol plus 3.6 M ethylene glycol for 5 min before being transferred into a 15- $\mu$ L column of 3.4 M glycerol and 4.6 M ethylene glycol and then loading into the centre of 0.25-mL plastic insemination straws using a fine glass capillary pipette. In the straw the embryos and vitrification media were separated from two columns of 0.5 M sucrose solution and after sealing the straws were plunged directly into liquid nitrogen.

For warming, straws were transferred from liquid nitrogen into a water bath at 35°C for 10 s. The contents of each straw were expelled into a Petri dish and stirred gently to facilitate the mixture of the two solutions (as described above). The embryos were retrieved and transferred into 0.25 M sucrose solution supplemented with 20% FCS for 3 min to allow for removal of intracellular cryoprotectants. Embryos were held 10 min in corresponding media of PBS containing either 20% FCS or 0.1% PVA for rehydration and equilibration.

To determine viability, embryos were placed into TCM-199 supplemented with 10% FCS and cultured in humidified atmosphere 5% CO<sub>2</sub> in air at 39°C. During the first 16 h of culture, blastocyst quality was determined according to the speed of blastocoel cavity re-expansion; fast re-expansion (complete re-expansion of the blastocoel cavity within 8 h of culture) and slow re-expansion (complete re-expansion of the blastocoel cavity between 8 and 16 h of culture) (Leoni *et al.* 2008).

#### Gene expression evaluation

Re-expanded embryos were removed from culture, added to 2 mL of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water, snap frozen

in liquid nitrogen and stored at –80°C until analysis. The poly(A) RNA was isolated with oligo(dT)<sub>25</sub>-conjugated magnetic beads (Dyna A.S., Oslo, Norway) following the manufacturer's instruction: 10  $\mu$ L of lysis buffer (100 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM DTT) were immediately added to each frozen sample. After vortexing, brief centrifugation and incubation at room temperature for 10 min, 10 mL of pre-washed Dynabeads oligo(dT)<sub>25</sub> were added to each sample. After 5 min of incubation at 25°C, the tubes were shaken gently and put into a Dynal magnetic separator for 2 min. After removal of the supernatant, poly(A) mRNAs were washed once with 40 mL of washing buffer A (10 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% LiDS) and three times with washing buffer B (10 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA). Poly(A) mRNAs were then eluted from the magnetic beads by incubation in 11 mL of DEPC-treated water at 65°C for 2 min and aliquots were immediately used for Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Reverse transcription reactions were performed in a final volume of 20  $\mu$ L consisting of 50 mM TRIS-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM dNTPs, 2.5 mM random hexamer primers (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 20 U Rnase OUT (Invitrogen) and 100 U of SuperScript III RT (Invitrogen). The reaction tubes were kept at 25°C for 10 min, then at 42°C for 1 h and finally at 70°C for 15 min to inactivate the reaction. The quantification of all gene transcripts was carried out by Real-Time PCR in a BioRad iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Three replicate PCR experiments were conducted for all genes of interest to control the reproducibility of results. PCRs were performed in 25- $\mu$ L reaction volume containing 12.5  $\mu$ L 2 Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen), 0.025 nM fluorescein reference standard (Molecular Probes – Invitrogen Detection Technologies, Leiden, The Netherlands), 200 nM of each primer (Table 1) and cDNA equivalent to 0.1–0.5 embryos. The PCR protocol involved two incubation steps (50°C for 5 min and 95°C for 2 min) followed by 40 cycles of amplification (95°C for 15 s, 56 or 60°C for 30 s, 72°C for 30 s), a melting curve program (65–95°C, starting the fluorescence acquisition at 65°C and taking measurements every 10 s, until the temperature reached 95°C) and finally a cooling step to 48°C. Fluorescence data was acquired during the 72°C extension steps.

**Table 2.** Differences in collection, maturation, fertilisation and embryo development of oocytes derived from FSH-treated prepubertal and adult Sarda goats (3 replicates)Within the same column different superscripts indicate statistical difference:  $\chi^2$  test, a v. b ( $P < 0.01$ ); c v. d ( $P < 0.05$ )

| Experimental group       | Collected COCs<br>(COCs per animal)     | Oocytes                   |                           |                           | Blastocysts <sup>B</sup> |
|--------------------------|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                          |   | Matured                   | Fertilized                | Cleaved <sup>A</sup>      |                          |
| Prepubertal ( $n = 12$ ) | 1076 ( $89.67 \pm 18.30$ ) <sup>a</sup> | 700 (65.06%) <sup>a</sup> | 536 (76.57%) <sup>a</sup> | 298 (55.59%) <sup>a</sup> | 72 (24.16%) <sup>c</sup> |
| Adult ( $n = 13$ )       | 347 ( $26.69 \pm 3.66$ ) <sup>b</sup>   | 296 (85.30%) <sup>b</sup> | 269 (90.87%) <sup>b</sup> | 189 (70.26%) <sup>b</sup> | 64 (33.86%) <sup>d</sup> |

<sup>A</sup>Percentages are calculated on fertilised oocytes.<sup>B</sup>Percentages are calculated on cleaved oocytes.**Table 3.** Blastocoel cavity re-expansion after vitrification–warming and *in vitro* culture in prepubertal and adult goat blastocysts (3 replicates)Within the same column different superscripts indicate statistical difference:  $\chi^2$  test, a v. b =  $P < 0.05$ 

| Experimental group | Vitrified blastocysts | Total re-expansion      | Re-expanded |                |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|-------------|----------------|
|                    |                       |                         | Within 8 h  | From 8 to 16 h |
| Prepubertal        | 72                    | 29 (40.3%) <sup>a</sup> | 18 (62.1%)  | 11 (37.9%)     |
| Adult              | 64                    | 40 (62.5%) <sup>b</sup> | 24 (60.0%)  | 16 (40.0%)     |

The PCR products were then analysed by generating a melting curve, to check the specificity, and by gel electrophoresis on 2% high-resolution agarose, to verify the exact length of the PCR products.

#### Statistical analysis

Data were analysed using MINITAB Release 12.1 software package. Differences between prepubertal and adult oocytes at maturation, fertilisation, time of first cleavage and developmental capacity up to blastocyst stage and different times of re-expansion after vitrification and warming were determined by the  $\chi^2$  test. Differences in oocyte numbers collected from prepubertal and adult ovaries were evaluated by ANOVA. The relative quantification of target gene expression was performed with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak and Schmittgen 2001) normalising target gene expression with transcript levels of the endogenous  $\beta$ -actin gene (Robert *et al.* 2002). After testing for normality and equal variance using, respectively, the Kolmogorov–Smirnov and Levene tests, the transcript data were analysed with ANOVA. All results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

#### Assessment of *in vitro* developmental competence

Data on the ovarian responses and developmental potential of both prepubertal and adult goat oocytes are presented in Table 2. In three replicate experiments, gonadotrophin-treated prepubertal does produced significantly ( $P < 0.001$ ) more oocytes than adult does (mean  $\pm$  s.e.m.;  $89.67 \pm 18.3$  and  $26.69 \pm 3.66$  oocytes per animal, respectively). After selection for IVM and IVF a higher number of COCs were discarded in the prepubertal does compared with the adult group ( $P < 0.01$ ). After staining

with aceto-lacmoid a significant ( $P < 0.01$ ) increase in polyspermic rates in prepubertal oocytes was observed compared with the adult oocytes (13.6% and 1.4%, respectively). The significantly ( $P < 0.01$ ) lower cleavage rate in prepubertal oocytes (55.9%) compared with the adult (70.26%) was probably related to this high rate of polyspermic oocytes. After 6 to 9 days of embryo culture (6–8 days in adults and 7–9 days in prepubertals), a significantly ( $P < 0.05$ ) lower rate of cleaved prepubertal oocytes (24.16%) reached the blastocyst stage compared with their adult counterparts (33.86%).

#### Assessment of blastocyst cryotolerance

Blastocyst re-expansion rates after vitrification, warming and 16 h of *in vitro* culture are summarised in Table 3. The percentage of prepubertal blastocysts that re-expanded after the vitrification process was significantly ( $P < 0.05$ ) lower compared with the adult (40.3% and 62.5%, respectively). However, there was no difference in the time required for complete blastocoel cavity re-expansion between the two groups. In fact, 62.1% of prepubertal and 60% of adult blastocysts completely re-expanded their blastocoel cavity within the first 8 h of *in vitro* culture after vitrification and warming.

#### Gene expression analysis

The transcript relative quantity was normalised on the basis of actin (Act 1) mRNA levels. Transcripts of all the analysed genes (Aqp3, Atp1a1, E-cad, Ccnd1, Hsp90 $\beta$ ) were detected in both prepubertal and adult blastocysts. No differences were observed in mRNA abundance between prepubertal and adult vitrified–warmed blastocysts that had completely re-expanded their blastocoel cavity (Fig. 1).

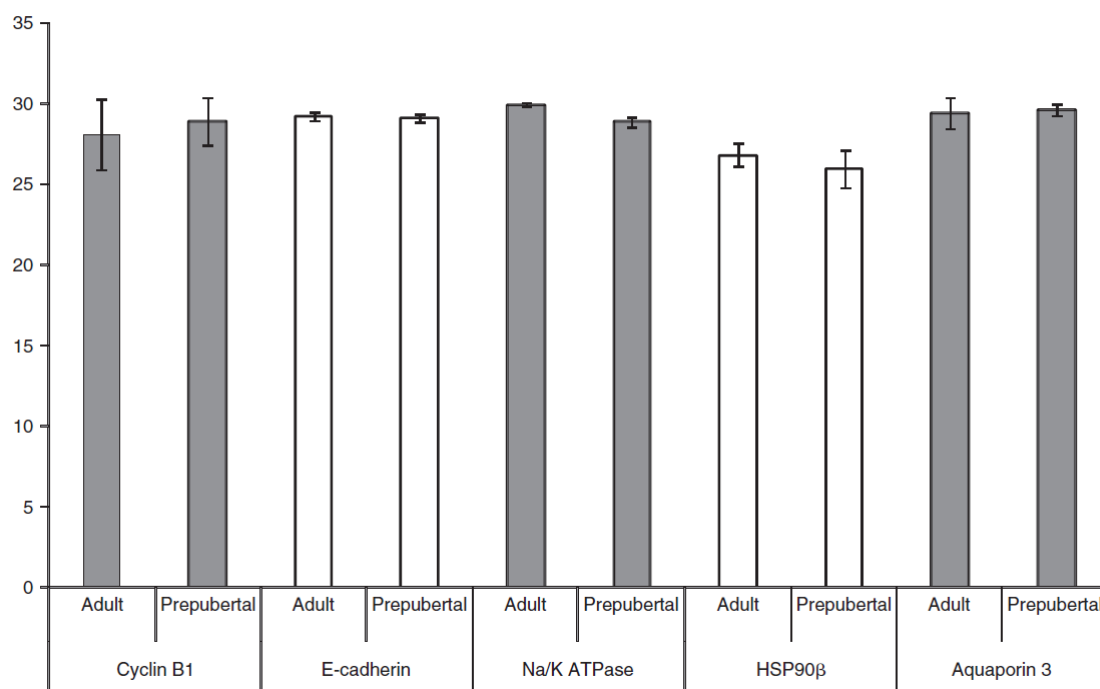


Fig. 1. Semiquantitative evaluation of cyclin B1, E-cadherin, Na/K ATPase, HSP90 $\beta$  and aquaporin 3 mRNA in vitrified-warmed-re-expanded blastocysts derived from prepubertal and adult oocytes.

## Discussion

Three main conclusions can be drawn from the present study. First, we are reporting for the first time differences in the quality, assessed by cryotolerance, of *in vitro*-produced blastocysts derived from oocytes collected by LOPU from prepubertal and adult goats after FSH treatment. Second, the oocytes obtained from prepubertal does have impaired developmental competence when compared with their adult counterparts and, third, vitrification can be used as a tool to select *in vitro*-produced prepubertal goat embryos that have a developmental capacity similar to those of adult animals.

We found that, like adults, prepubertal Sarda goats present a high variation in ovarian response to gonadotrophin treatment as observed in the number of oocytes recovered per animal (range 22 to 229). In 3- to 5-month-old goats of standard breed, Koeman *et al.* (2003) obtained  $25 \pm 2.8$  oocytes per animal after a single treatment of gonadotrophins followed by LOPU. Using the same protocol, a higher number of oocytes was recovered from 2-3-month-old ( $49.7 \pm 24$  oocytes per animal) (Baldassarre *et al.* 2002) compared with 3-5-month-old goats, indicating a pronounced follicular response in prepubertal goats stimulated younger than 3 months of age. Although we used a multiple treatment stimulation protocol and a different goat breed, our results confirm this theory as we obtained a mean number of  $89.67 \pm 18.3$  oocytes from goats 35-45 days of age. It has been observed that in sheep the number of growing follicles increases

significantly from 4 to 8 weeks of age, declines from 8 to 12 weeks of age and remains constant until 33 weeks of age (Kennedy *et al.* 1974). We hypothesised that in prepubertal goats, like in lambs (Ledda *et al.* 1999), a hormone stimulation treatment applied during the phase of follicular development when the number of growing follicles on the prepubertal ovary peaks would improve the efficiency of the response.

Our data indicates that prepubertal goat oocytes are susceptible to higher degeneration rates compared with adult oocytes. Anguita *et al.* (2007a) compared developmental competence of prepubertal goat oocytes with diameter and showed a higher rate of incompetent oocytes with a diameter  $<100 \mu\text{m}$ . It has also been demonstrated that 8- to 16-cell goat embryos derived from oocytes having a diameter  $<125 \mu\text{m}$  have an apoptosis rate of  $>20\%$  (Jimenez-Macedo *et al.* 2007). In adult goats, Crozet *et al.* (1995) found a direct and positive relationship between follicular diameter and embryo development, concluding that oocytes derived from follicles  $>5 \text{ mm}$  have increased blastocyst developmental competence. Prepubertal goat ovaries contain a large number of small follicles ranging between 2.5 and 3 mm in diameter (Martino *et al.* 1994), therefore, we hypothesise that a high number of recovered oocytes may be derived from follicles with a low meiotic competence and viability (Anguita *et al.* 2007b).

Confirming previous studies, we found that the prepubertal goat oocyte had (1) low *in vitro* fertilisation rates, (2) high



polyspermy rates (Urdaneta *et al.* 2004; Jimenez-Macedo *et al.* 2007) and (3) limited blastocyst developmental competence (Anguita *et al.* 2007a).

It has been universally accepted that the developmental phases that drive the fertilised oocyte to embryonic genome activation are controlled by maternal factors stored in the oocyte during its growing phase (Gosden 2002). An incomplete development of the prepubertal oocyte could thus be the basis for their lower developmental competence compared with the adult (Sirard *et al.* 2006). Alteration in the expression of several developmentally important genes has been observed in embryos of other ruminant species (Oropeza *et al.* 2004; Leoni *et al.* 2006). The use of large FSH doses during hormonal stimulation has been proposed as a way to attenuate many of the abnormalities exhibited during prepubertal embryo development (Morton *et al.* 2005). Otherwise, the selection of prepubertal oocytes with a diameter larger than 135  $\mu$ m has been correlated with a higher meiotic and developmental competence and a more suitable cytoplasmic environment in terms of MPF activity and total RNA and protein content (Anguita *et al.* 2007a, 2008). Our data demonstrates that, even after FSH treatment and oocyte selection on the basis of observed cytoplasm abnormalities during maturation and fertilisation, prepubertal oocytes yield lower cleavage and blastocyst rates compared with their adult counterparts.

Generally, *in vitro*-produced blastocysts derived from prepubertal oocytes are morphologically indistinguishable from the adult (for review see Morton 2008) confirming that morphological criteria are unsuitable for evaluation of embryo quality. To compare the quality of *in vitro*-produced blastocysts derived from oocytes collected from FSH-treated prepubertal and adult goats, we evaluated their cryotolerance in terms of the rate at which blastocoelic cavity re-expansion occurred after vitrification and warming, calculated on the total number of vitrified blastocysts. Our results show that a lower percentage of prepubertal-derived blastocysts re-expand after vitrification and warming compared with those derived from the adult (40.3% and 62.5%, respectively), suggesting that the lower quality of the prepubertal-derived embryo is probably inherited by the oocyte cytoplasm. The incomplete development of both nuclear (Ptak *et al.* 2006) and cytoplasmic (Leoni *et al.* 2006; Anguita *et al.* 2008) oocyte compartments could be responsible for the reduced cryotolerance of the cells of prepubertal-derived embryos.

The transcripts and proteins stored in the cytoplasm of the oocyte are of fundamental importance for ensuring the progression of early embryo development until the embryonic genome is activated at the fourth or fifth cell cycle (Meirelles *et al.* 2004; Bebbere *et al.* 2008) and have been related to oocyte and embryo quality (Brevini Gandolfi and Gandolfi 2001; Gosden 2002). We speculate that embryos that failed to re-expand their blastocoel cavity after vitrification and warming were derived from low-quality oocytes, perhaps reflecting a lack of molecular elements needed to actively overcome vitrification injuries. The success of the cryopreservation of vitrified-warmed blastocysts is related to their capacity to quickly repair injuries by refolding damaged molecules and to complete resumption of new DNA synthesis after vitrification (Leoni *et al.* 2003).

In a previous study (Leoni *et al.* 2008) we found that the ability of the blastocyst to quickly restore its functionality in

terms of blastocoelic cavity re-expansion after vitrification and warming can be considered as a reliable marker for embryo quality and developmental potential both *in vitro* and *in vivo*. In the present study, differences in the time required for blastocoel re-expansion between prepubertal and adult embryos did not reach statistical significance. Furthermore, we quantitatively assessed in re-expanded vitrified-thawed blastocysts from adult and prepubertal goats, messenger RNA of genes involved in blastocoel formation (Aqp3, Edashige *et al.* 2006; Atp1a1, Betts *et al.* 1998; E-cad, Larue *et al.* 1994), thermal-dependent block of embryo development (Ccmd1, Ozawa *et al.* 2004) and chaperon-like activity (Hsp90 $\beta$ 1, Loones *et al.* 1997). We did not find a difference in mRNA abundance between prepubertal and adult vitrified-warmed blastocysts that restored their blastocoelic cavity, corroborating the theory that prepubertal and adult vitrified-thawed re-expanded blastocysts have the same developmental potential.

From this data we assume that vitrification and warming procedures can be used as a tool to select prepubertal embryos that have the ability to positively overcome the injuries incurred as a result of vitrification procedures. However, embryo transfer experiments are needed to evaluate their ability to further develop *in vivo*.

### Conclusion

In conclusion, our data indicates that stimulated prepubertal goats produce oocytes with a lower developmental competence in terms of number and quality of *in vitro*-produced blastocysts, as assessed by cryotolerance. On the other hand, the quality of vitrified blastocysts that positively overcome cryopreservation injuries did not differ between prepubertal and adult groups, suggesting the use of vitrification as a non-invasive method for selecting prepubertal goat embryos that have similar *in vitro* development potential to their adult counterparts. However, further studies are needed to confirm that vitrified-warmed prepubertal embryos have the same ability as their adult counterparts to develop to term after transfer into synchronised recipients.

### Acknowledgements

This work was supported by RAS, special project P5A: Centro di Biodiversità animale. S. Succu received a grant from Fondazione Banco di Sardegna. We are grateful to Dr J. Kelly for his critical reading of the manuscript.

### References

- Anguita, B., Jimenez-Macedo, A. R., Izquierdo, D., Mogas, T., and Paramio, M. T. (2007a). Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 67, 526–536. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.09.003
- Anguita, B., Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D., and Van Soom, A. (2007b). Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology* 67, 537–549. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.09.004
- Anguita, B., Paramio, M. T., Jiménez-Macedo, A. R., Morató, R., Mogas, T., and Izquierdo, D. (2008). Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 103, 290–303. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2006.12.018

- Armstrong, D. T., Holm, P., Irvine, B., Petersen, B. A., Stubbings, R. B., McLean, D., Stevens, R., and Seemark, R. F. (1992). Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology* **38**, 667–678. doi:10.1016/0093-691X(92)90029-Q
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris, A., and Karatzas, C. N. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology* **57**, 275–284. doi:10.1016/S0093-691X(01)00671-9
- Bebbere, D., Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Leoni, G. G., Tore, S., Succu, S., Berlinguer, F., Naitana, S., and Ledda, S. (2008). Expression pattern of zygote arrest 1 (ZAR1), maternal antigen that embryo requires (MATER), growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) genes in ovine oocytes and *in vitro*-produced preimplantation embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **20**, 908–915. doi:10.1071/RD08095
- Berlinguer, F., Leoni, G., Bogliolo, L., Pintus, P. P., Rosati, I., Ledda, S., and Naitana, S. (2004). FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology* **61**, 1477–1486. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2003.08.005
- Berlinguer, F., Leoni, G. G., Succu, S., Spezzigu, A., Madeddu, M., Satta, V., Bebbere, D., Contreras-Solis, I., Gonzalez-Bulnes, A., and Naitana, S. (2009). Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. *J. Pineal Res.* **46**, 383–391. doi:10.1111/J.1600-079X.2009.00674.X
- Betts, D. H., Barcroft, L. C., and Watson, A. J. (1998). Na/K-ATPase-mediated 86Rb<sup>+</sup> uptake and asymmetrical trophoctoderm localization of alpha1 and alpha3 Na/K-ATPase isoforms during bovine preattachment development. *Dev. Biol.* **197**, 77–92. doi:10.1006/DBIO.1998.8874
- Brevini Gandolfi, T. A. L., and Gandolfi, F. (2001). The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology* **55**, 1255–1276. doi:10.1016/S0093-691X(01)00481-2
- Cognié, Y., Poulin, N., Locatelli, Y., and Mermillod, P. (2004). State-of-the-art production, conservation and transfer of *in vitro*-produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* **16**, 437–445. doi:10.1071/RD04029
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M., and Dubos, M. P. (1995). Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* **103**, 293–298. doi:10.1530/JRF.0.1030293
- Edashige, K., Tanaka, M., Ichimaru, N., Ota, S., Yazawa, K., et al. (2006). Channel-dependent permeation of water and glycerol in mouse morulae. *Biol. Reprod.* **74**, 625–632. doi:10.1095/BIOLREPROD.105.045823
- Fenwick, J., Platteau, P., Murdoch, A. P., and Herbert, M. (2002). Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos *in vitro*. *Hum. Reprod.* **17**, 407–412. doi:10.1093/HUMREP/17.2.407
- Godsen, R. G. (2002). Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **186**, 149–153. doi:10.1016/S0303-7207(01)00683-9
- Guerif, F., Le Gouge, A., Giraudeau, B., Poindron, J., Bidault, R., Gasnier, O., and Royere, D. (2007). Limited value of morphological assessment at Days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum. Reprod.* **22**, 1973–1981. doi:10.1093/HUMREP/DEM100
- Izquierdo, D., Villamediana, P., Palomo, M. J., Mogas, T., and Paramio, M. T. (1998). Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* **49**, 1501–1513. doi:10.1016/S0093-691X(98)00096-X
- Jimenez-Macedo, A. R., Paramio, M. T., Anguita, B., Morato, R., Romaguera, R., Mogas, T., and Izquierdo, D. (2007). Effect of ICSI and embryo biopsy on embryo development and apoptosis according to oocyte diameter in prepubertal goats. *Theriogenology* **67**, 1399–1408. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.03.003
- Kelly, J. M., Kleemann, D. O., and Walker, S. K. (2005). Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week-old lambs. *Theriogenology* **63**, 1876–1890. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.09.010
- Kennedy, J. P., Worthington, C. A., and Cole, E. R. (1974). The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb. *J. Reprod. Fertil.* **36**, 275–282. doi:10.1530/JRF.0.0360275
- Knijn, H. M., Wrenzycki, C., Hendriksen, P. J., Vos, P. L., Zeinstra, E. C., van der Weijden, G. C., Niemann, H., and Dieleman, S. J. (2005). *In vitro* and *in vivo* culture effects on mRNA expression of genes involved in metabolism and apoptosis in bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **17**, 775–784. doi:10.1071/RD05038
- Koeman, J., Keefer, C. L., Baldassarre, H., and Downey, B. R. (2003). Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology* **60**, 879–889. doi:10.1016/S0093-691X(03)00090-6
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., and Kemler, R. (1994). E-cadherin null-mutant embryos fail to form a trophoctoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8263–8267. doi:10.1073/PNAS.91.17.8263
- Ledda, S., Bogliolo, L., Leoni, G., Calvia, P., and Naitana, S. (1996). Influence of vasoactive intestinal peptide (VIP), atrial natriuretic peptide (ANP) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on *in vitro* maturation of prepubertal and adult sheep oocytes. *Zygote* **4**, 343–348. doi:10.1017/S0967199400003361
- Ledda, S., Bogliolo, L., Leoni, G., and Naitana, S. (1999). Production and lambing rate of blastocysts derived from *in vitro*-matured oocytes after gonadotropin treatment of prepubertal ewes. *J. Anim. Sci.* **77**, 2234–2239.
- Leoni, G., Berlinguer, F., Rosati, I., Bogliolo, L., Ledda, S., and Naitana, S. (2003). Resumption of metabolic activity of vitrified-warmed ovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **64**, 207–213. doi:10.1002/MRD.10251
- Leoni, G. G., Succu, S., Berlinguer, F., Rosati, I., Bebbere, D., Bogliolo, L., Ledda, S., and Naitana, S. (2006). Delay on the *in vitro* kinetic development of prepubertal ovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **92**, 373–383. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.05.027
- Leoni, G. G., Bebbere, D., Succu, S., Berlinguer, F., Mossa, F., Galioto, M., Bogliolo, L., Ledda, S., and Naitana, S. (2007a). Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **74**, 249–257. doi:10.1002/MRD.20442
- Leoni, G. G., Rosati, I., Succu, S., Bogliolo, L., Bebbere, D., Berlinguer, F., Ledda, S., and Naitana, S. (2007b). A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of *in vitro*-produced ovine blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.* **42**, 299–304. doi:10.1111/J.1439-0531.2006.00783.X
- Leoni, G. G., Berlinguer, F., Succu, S., Bebbere, D., Mossa, F., Madeddu, M., Ledda, S., Bogliolo, L., and Naitana, S. (2008). A new selection criterion to assess good-quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 373–382. doi:10.1002/MRD.20754
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods* **25**, 402–408. doi:10.1006/METH.2001.1262
- Loones, M. T., Rallu, M., Mezger, V., and Morange, M. (1997). HSP gene expression and HSF2 in mouse development. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**, 179–190. doi:10.1007/PL00000590
- Maddox-Hyttell, P., Gjørret, J. O., Vajta, G., Alexopoulos, N. I., Lewis, I., et al. (2003). Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Reprod. Suppl.* **61**, 103–116.
- Martino, A., Mogas, T., Palomo, M. J., and Paramio, M. T. (1994). Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* **41**, 969–980. doi:10.1016/0093-691X(94)90512-H
- Meirelles, F. V., Caetano, A. R., Watanabe, Y. F., Ripamonte, P., Carambula, S. F., Merighe, G. K., and Garcia, S. M. (2004). Genome

- activation and developmental block in bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **82–83**, 13–20. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.05.012
- Morton, K. M. (2008). Developmental capabilities of embryos produced *in vitro* from prepubertal lamb oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* **43**, 137–143. doi:10.1111/J.1439-0531.2008.01153.X
- Morton, K. M., Catt, S. L., Maxwell, W. M., and Evans, G. (2005). An efficient method of ovarian stimulation and *in vitro* embryo production from prepubertal lambs. *Reprod. Fertil. Dev.* **17**, 701–706. doi:10.1071/RD04105
- Oropeza, A., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Hadel, K. G., and Niemann, H. (2004). Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. *Biol. Reprod.* **70**, 1634–1643. doi:10.1095/BIOLREPROD.103.025494
- Ozawa, M., Matsuzuka, T., Hirabayashi, M., and Kanai, Y. (2004). Redox status of the oviduct and CDC2 activity in 2-cell stage embryos in heat-stressed mice. *Biol. Reprod.* **71**, 291–296. doi:10.1095/BIOLREPROD.103.022152
- Ptak, G., Matsukawa, K., Palmieri, C., Della Salda, L., Scapolo, P. A., and Loi, P. (2006). Developmental and functional evidence of nuclear immaturity in prepubertal oocytes. *Hum. Reprod.* **21**, 2228–2237. doi:10.1093/HUMREP/DEL184
- Rho, G. J., Hahnel, A. C., and Betteridge, K. J. (2001). Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos *in vitro*. *Theriogenology* **56**, 503–516. doi:10.1016/S0093-691X(01)00581-7
- Rizos, D., Gutiérrez-Adan, A., Pérez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P., and Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* **68**, 236–243. doi:10.1095/BIOLREPROD.102.007799
- Robert, C., McGraw, S., Massicotte, L., Pravetoni, M., Gandolfi, F., and Sirard, M. A. (2002). Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. *Biol. Reprod.* **67**, 1465–1472. doi:10.1095/BIOLREPROD.102.006320
- Salumets, A., Hyden-Granskog, C., Makinen, S., Suikkari, A. M., Tiitinen, A., and Tuuri, T. (2003). Early cleavage predicts the viability of human embryos in elected single embryo transfer procedures. *Hum. Reprod.* **18**, 821–825. doi:10.1093/HUMREP/DEG184
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., and Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **65**, 126–136. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.09.020
- Urdaneta, A., Jimenez, A. R., Paramio, M. T., and Izquierdo, D. (2004). Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote* **12**, 277–284. doi:10.1017/S0967199404002874
- van Soom, A., Ysebaert, M. T., and de Kruif, A. (1997). Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **47**, 47–56. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<47::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q
- van Soom, A., Mateusen, B., Leroy, J., and De Kruif, A. (2003). Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod. Biomed. Online* **7**, 664–670.
- Velilla, E., Izquierdo, D., Rodriguez-Gonzalez, E., Lopez-Bejar, M., Vidal, F., and Paramio, M. T. (2004). Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. *Mol. Reprod. Dev.* **68**, 507–514. doi:10.1002/MRD.20111
- Velilla, E., Rodriguez-Gonzalez, E., Vidal, F., and Paramio, M. T. (2005). Microtubule and microfilament organization in immature, *in vitro*-matured and *in vitro*-fertilized prepubertal goat oocytes. *Zygote* **13**, 155–165. doi:10.1017/S0967199405003229
- Velilla, E., Rodriguez-Gonzalez, E., Vidal, F., Izquierdo, D., and Paramio, M. T. (2006). Mitochondrial organization in prepubertal goat oocytes during *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 617–626. doi:10.1002/MRD.20426
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., and Niemann, H. (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* **68**(Suppl. 1), S77–S83. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.04.028

Manuscript received 20 January 2009, accepted 21 June 2009



## Abstract P106

### Effect of Ageing on Follicle and Corpora Lutea Dynamics in Sheep

A Spezzigu<sup>1</sup>, I Contreras-Solis<sup>2</sup>, F Berlinguer<sup>1</sup>, S Succu<sup>1</sup>, GG Leoni<sup>1</sup>, M Madeddu<sup>1</sup>, A Gonzalez-Bulnes<sup>2</sup> and S Naitana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sassari University, Italy; <sup>2</sup>Department of Anim. Reprod., INIA, Madrid, Spain

This study aimed to investigate deficiencies in ovulatory follicle (OF) growth of aged sheep (Gonzalez-Bulnes 2004, *Endocrinology* 145:2858–2864) that lead to inadequacies in corpora lutea (CL) development. Oestrus cycle (OC) was synchronized with two cloprostenol doses in nine Sarda ewes aged 10–12 years and in six ewes aged 4–5 years. Ovarian ultrasonography was performed every 24 h from second cloprostenol dose to oestrus detection (F phase) and every 48 h during the subsequent luteal phase. During the F phase no differences were recorded between aged and adult sheep in OF growth rates ( $0.7 \pm 0.1$  vs  $0.6 \pm 0.2$  mm/day), final diameter ( $6.4 \pm 0.2$  vs  $5.8 \pm 0.3$  mm) and in the number of  $\geq 4$  mm follicles ( $2.8 \pm 0.4$  vs  $3.3 \pm 0.4$ ). The number of subordinate follicles  $\leq 3$  mm decreased in adult sheep (from  $7 \pm 0.6$  to  $5.3 \pm 0.6$ ;  $p < 0.05$ ), whilst remained stable in aged sheep (from  $6.8 \pm 0.7$  to  $5.3 \pm 0.9$ ). No differences were found in ovulation rate ( $1.8 \pm 0.2$  vs  $1.7 \pm 0.2$ ) and duration of the induced OC ( $17 \pm 0.3$  vs  $17.1 \pm 0.3$  days). Aged ewes showed smaller CL areas ( $89.8 \pm 6.2$  vs  $110.9 \pm 7.7$  mm<sup>2</sup>;  $p < 0.001$ ) and reduced growth rates ( $16 \pm 2.3$  vs  $20.4 \pm 3.2$  mm<sup>2</sup>/day) compared to adult ones. In adult ewes, CL reached maximum area between days 11 ( $156.7 \pm 16.4$  mm<sup>2</sup>) before starting to regress on day 15 ( $95.4 \pm 15.2$  mm<sup>2</sup>). In aged ewes the maximum area was reached on day 9 ( $121.7 \pm 12.3$  mm<sup>2</sup>) and regression started on day 13 ( $98.7 \pm 14.3$  mm<sup>2</sup>;  $p < 0.001$ ). Current results give evidence of reduced functionality of OF in terms of dominance, and CL in aged sheep (Supported by RAS Special Project Biodiversity).



# Viability, motility and ATP levels in fresh and frozen Sarda buck spermatozoa during the breeding season

Madeddu M<sup>1</sup>, Pasciu V<sup>1</sup>, Spezzigu A<sup>1</sup>, Succu S<sup>2</sup>, Satta V<sup>2</sup>, Berlinguer F<sup>1</sup>, Leoni GG<sup>2</sup>, Naitana S<sup>1</sup>.



<sup>1</sup>Dpt Animal Biology, <sup>2</sup>Dpt Physiological, Biochemical and Cellular Science, Veterinary Medicine Faculty, University of Sassari - ITALY.

## INTRODUCTION

Energy metabolism is a key factor supporting cell functions and male gamete requires exceptionally more ATP than other cell types in order to sustain its high queue activity.

## AIM

The aim of this study was to evaluate the relationships between ATP concentration, viability and motility in fresh and frozen-thawed buck spermatozoa during the breeding season.

During the breeding season, semen was collected by artificial vagina from three bucks originating from native stocks in Ogliastra area of Sardinia (fig. 1-3).



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

Fig. 1-3 Artificial vagina collection semen: approaching phases of bucks to immobilized goat.

## MATERIALS AND METHODS

Semen was cryopreserved in Tris-based extender (Tris 375 mM, citric acid 124 mM, glucose 41 mM) supplemented with egg yolk 20% (pH 7; osmolality 375 mOsm/Kg), glycerol (4%), and cooled to 4 C, frozen in 0.25 ml pellets on dry ice (fig. 4) and then plunged into liquid nitrogen. Thawing was carried out by plunging a sterilized glass falcon containing the pellet in a 39 C water bath for 20s.

Fig. 4. Semen pellets on dry ice



Fresh and frozen/thawed semen samples from the three males were evaluated for

viability by PI fluorescent staining (fig.5)

progressive motility by Sperm Class Analyzer (v. 3.2.0. Microptics S.L., Barcelona, Spain) (fig.6)

ATP levels were measured spectrophotometrically at 340 nm using NADH-linked enzyme-coupled assays modified for being adapted to our system.

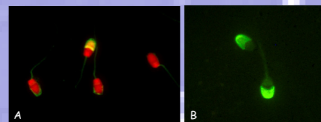


Fig. 5. Sperm viability evaluation: red colour, evidenced after PI staining indicates dead sperm (A); green colour indicates live sperm (B).

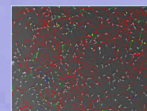


Fig. 6. Sperm progressive motility :

Rapid progressive motility (type 1)

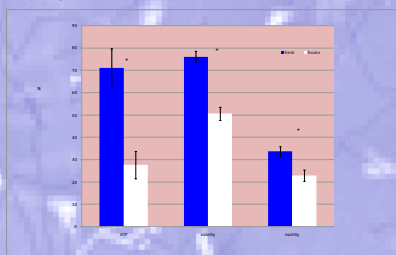
Slow progressive motility (type 2)

Non progressive motility (type 3)

Immotile

## RESULTS

ATP levels, progressive motility and viability do not differ between subjects nor between ejaculates in both fresh and frozen semen. Comparing fresh and frozen samples (ANOVA; mean SE) we evidenced that cryopreservation significantly decrease ATP levels (70.9 6.1 vs 27.5 8.7 nmoles/spz), viability (75.9 3.0 vs 50.5 2.9%) and motility (33.6 2.1 vs 22.8 2.6%) in fresh and frozen respectively (graph. 1). Multiple correlation test shows a positive relationship between viability and both ATP and progressive motility (table 1).



Graph. 1. (\*) indicates statistical differences (ANOVA: P < 0.001)

Multiple regression analysis evidenced a weak (R-squared= 32.3%) but statistically significant relationship between both ATP levels and viability on progressive motility rates (P=0.0076)

|          | Viability | ATP    |
|----------|-----------|--------|
| ATP      | 0,4821    |        |
|          | 0,0094    |        |
| Motility | 0,566     | 0,3186 |
|          | 0,0017    | 0,0984 |

Tab. 1. Multiple correlation test showing pearson product moment correlations between viability, ATP concentration and motility (p values are red)

## CONCLUSIONS

In conclusion our data show that cryopreservation negatively affects viability, motility and ATP contents of buck sperm. On the other way, ATP and viability are directly related to motility rates in both fresh and frozen spermatozoa.

Supported by "Progetti di Ricerca e innovazione al di sotto della soglia de minimis" P.O.R. Sardegna 2000/2006, Asse 3 - Risorse Umane, Misura 3.13 - Ricerca e sviluppo tecnologico nelle imprese e territorio





# Evaluation of the ovarian reserve in prepubertal ewes is predictive of in vitro embryo yield



Leoni GG,<sup>1</sup>Berlinguer F, <sup>1</sup>Succu S, <sup>1</sup>Spezzigu A, Satta V, <sup>1</sup>Bebbere D, <sup>2</sup>Pallares P, <sup>2</sup>Gonzales-Bulnes A, <sup>1</sup>Naitana S.

Dept of Physiological, Biochemical and Cell Sciences, <sup>1</sup>Dept. of Animal Biology, Veterinary Faculty, University of Sassari v. Vienna 2, 07100 Sassari (Italy) <sup>2</sup>Dept. of Animal Reproduction, INIA, Spain

## AIM

To investigate if differences observed in post-natal ovarian follicular development in sheep could be related to differences in oocyte quality and in the ovarian reserve

## Experiment 1: ovaries evaluation and Exogenous FSH Ovarian Reserve Test

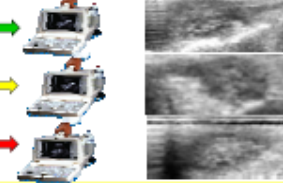
### EVALUATION OF EXPERIMENTAL GROUPS



### EFORT

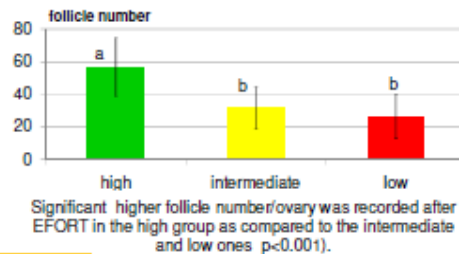
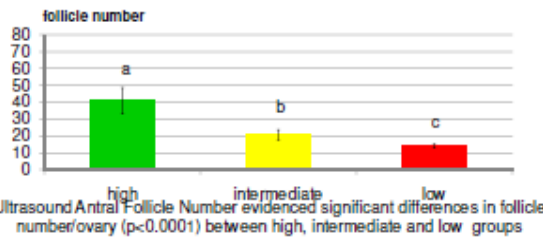


### Ultrasound Antral Follicle Count



DAY 0

DAY 1

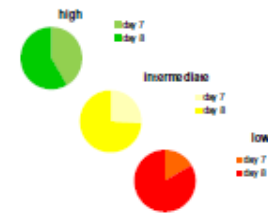
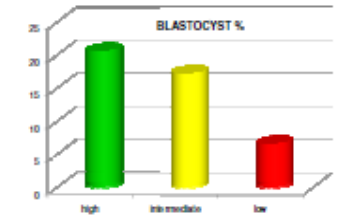
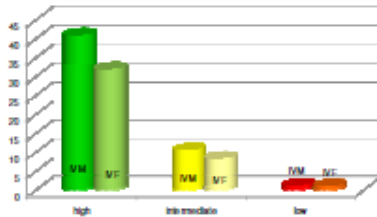
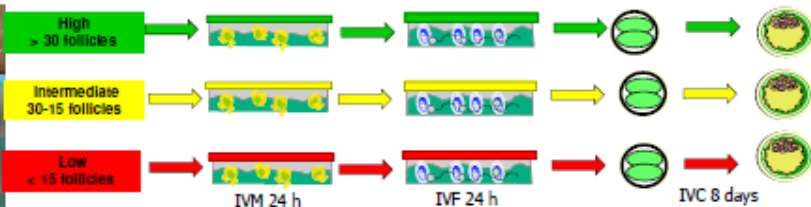
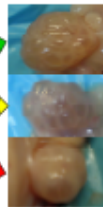


## Experiment 2: in vitro developmental competence

SLAUGHTERED



30-40 days old



A faster developmental rate was observed in the high compared to the intermediate and low groups ( $p < 0.05$ ).

## CONCLUSIONS

This study evidenced that ovarian status deeply influences oocyte quality as soon as a few weeks after birth. Further studies are needed to investigate whether differences recorded in ovarian reserve could eventually predict reproductive performance after puberty.

## Immagini ecografiche

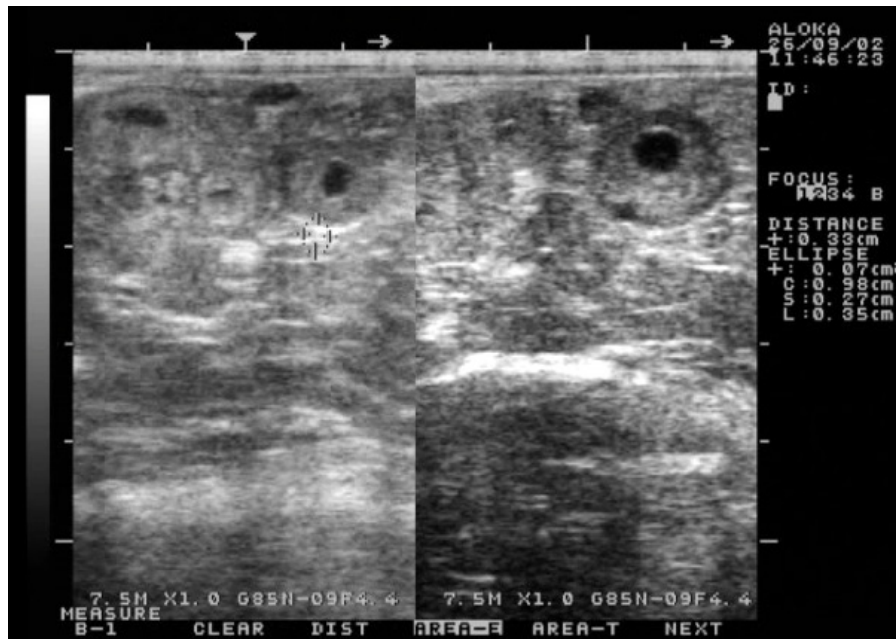


Foto 1. Ovaio di pecora in 2 sezioni diverse in modo da evidenziare la presenza di 2 CL cavitari. Sezioni corna uterine alla destra dell'ovaio.



Foto 2. Pecora: corpi lutei.

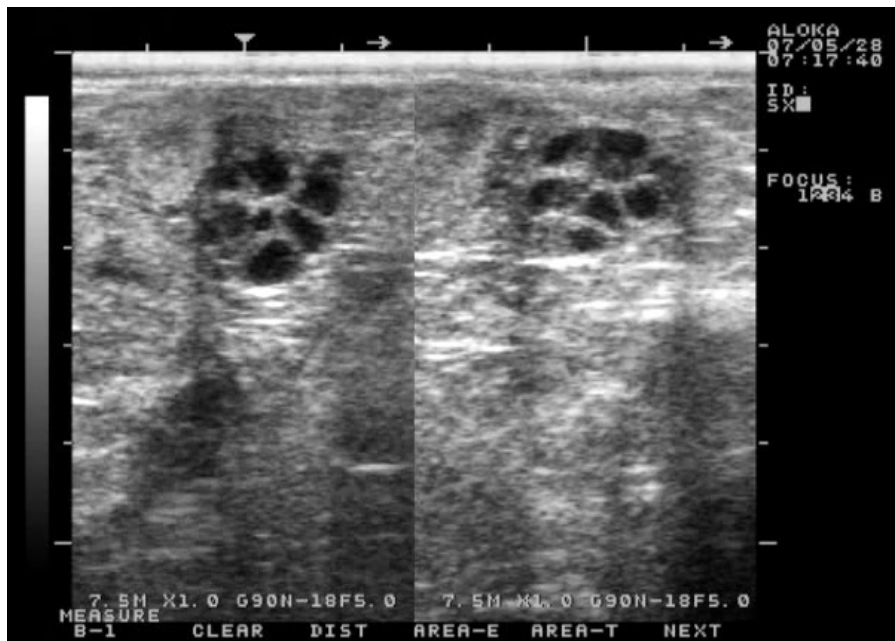


Foto 3. Pecora: ovaie in seguito a somministrazione di una miscela glucogenetica e iperstimolazione con FSH esogeno.

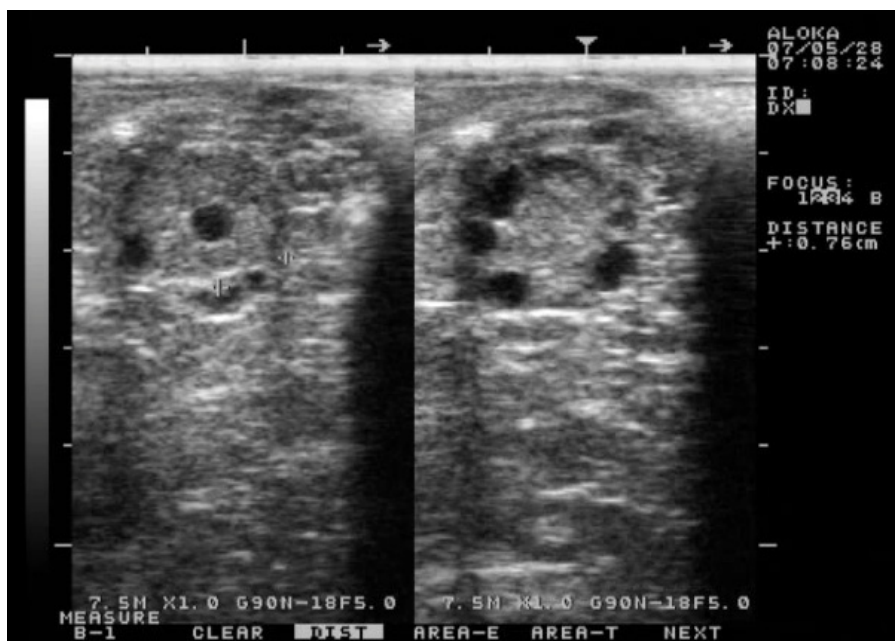


Foto 4. Pecora: ovaio in due sezioni diverse, a sx CL cavitario mentre a dx attorno ad una piccola sezione di CL sono presenti follicoli in diverso stadio di accrescimento.

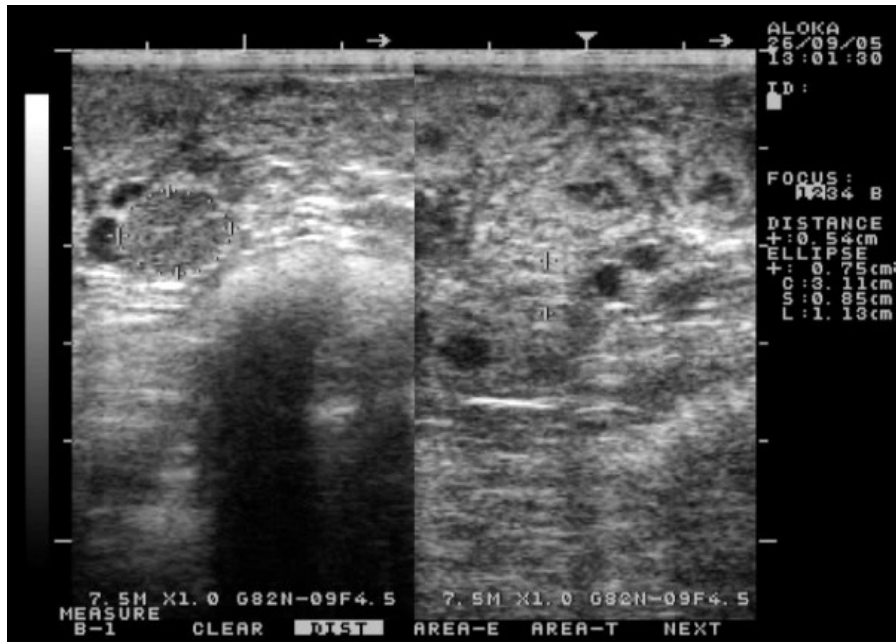


Foto 5. Pecora: CL ovaio di sx con piccola cicatrice centrale, 2 follicoli da 4 mm circa nell'ovaio di dx. Siamo a metà della fase luteinica del ciclo, ci sono follicoli in accrescimento ma anche in regressione.



Foto 6. Pecora: piccolo ovaio con 1 follicolo da 4mm

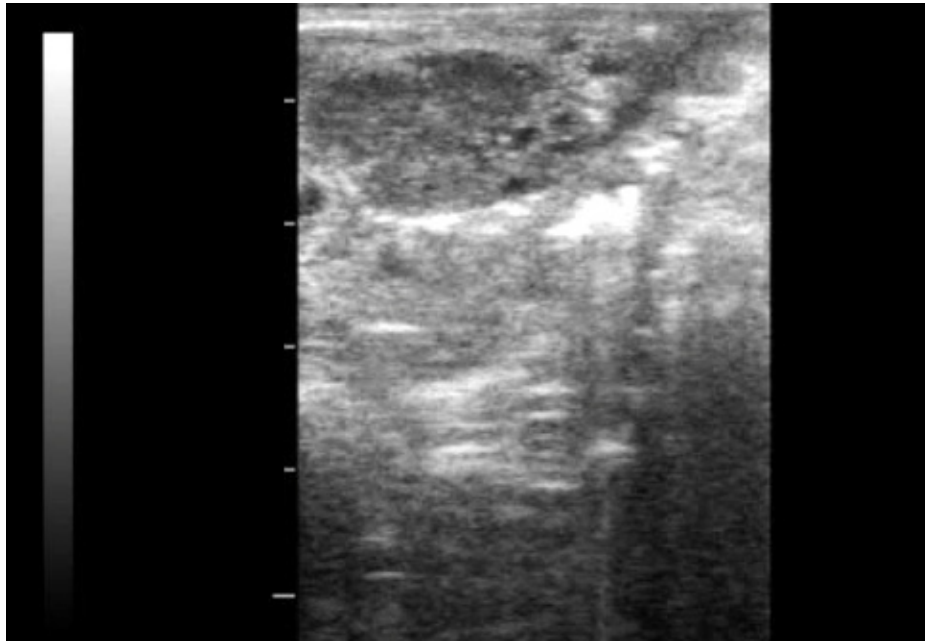


Foto 7. Pecora: 3 CL, ovviamente l'immagine non coglie i diametri massimi di tutti i CL contemporaneamente.



Foto 8. Pecora: CL con cicatrice centrale, residuo di una precedente cavità.



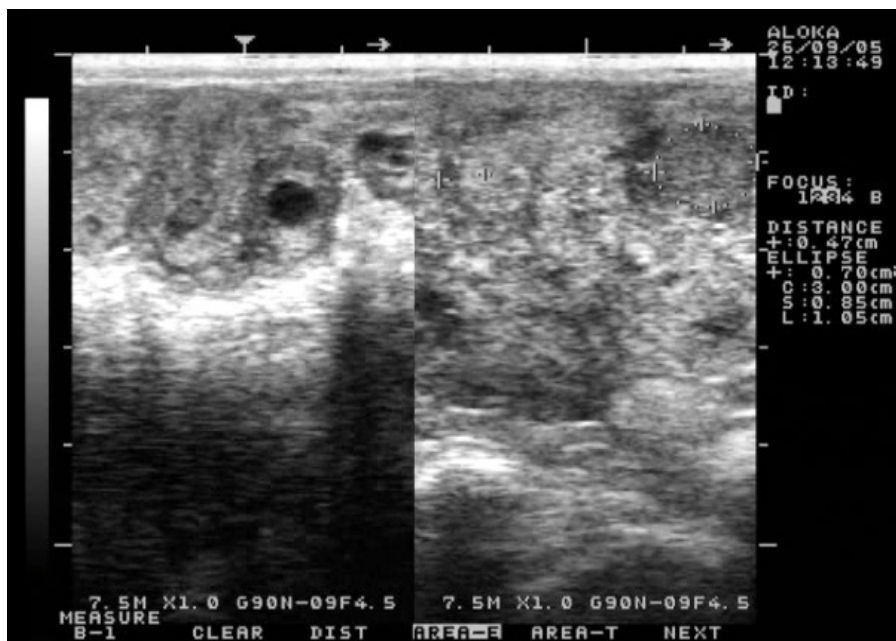


Foto 9. Pecora: CL nell'ovaio di dx con piccoli follicoli, follicolo da 5 mm nell'ovaio di sx. Utero compatto e privo di liquido, fase luteinica del ciclo estrale.



Foto 10. Capra: ovaio con 2 follicoli >5mm e 3 <4 mm

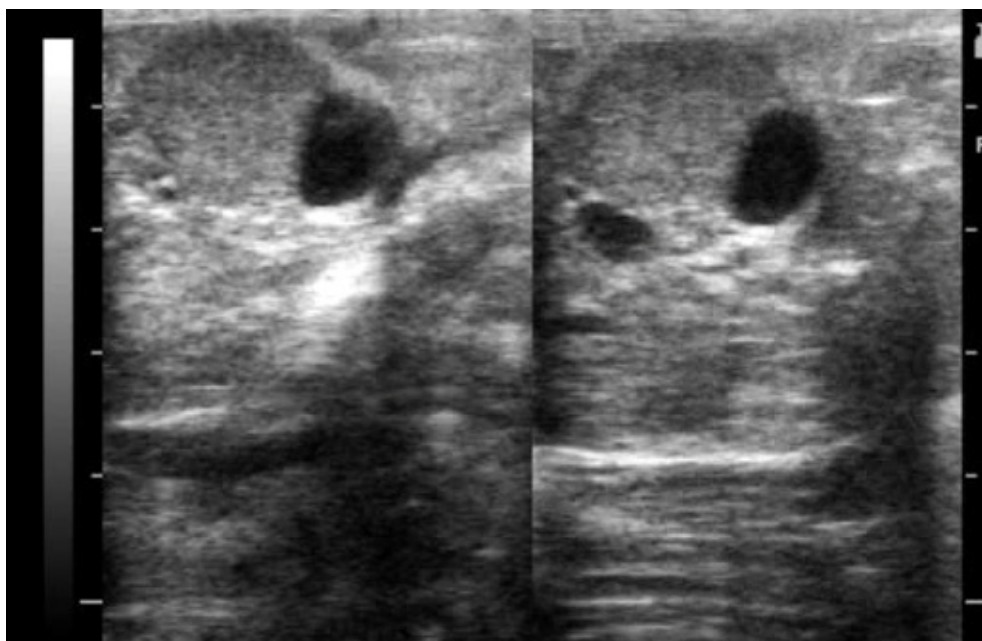


Foto 11. Capra: CL e follicoli, stesso ovaio a dx e sx.



Foto 12. Capra: 2 CL in regressione nello stesso ovaio in 2 sezioni diverse.

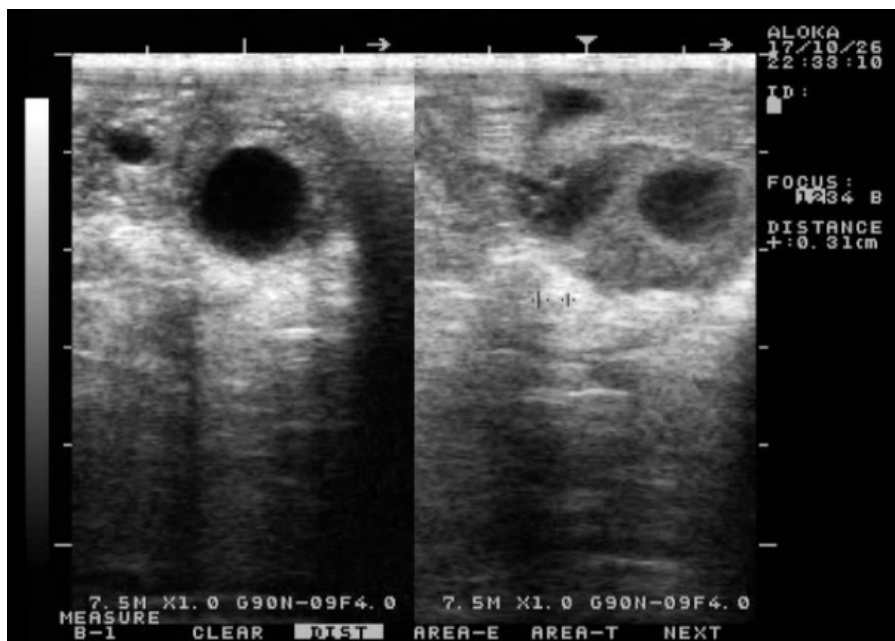


Foto 13. Capra: 3 follicoli preovulatori nello stesso ovaio, la sezione a dx vuole solo evidenziare la presenza dei 2 dei 3 follicoli che in questa sezione non sono al loro diametro massimo che è di 10 mm.

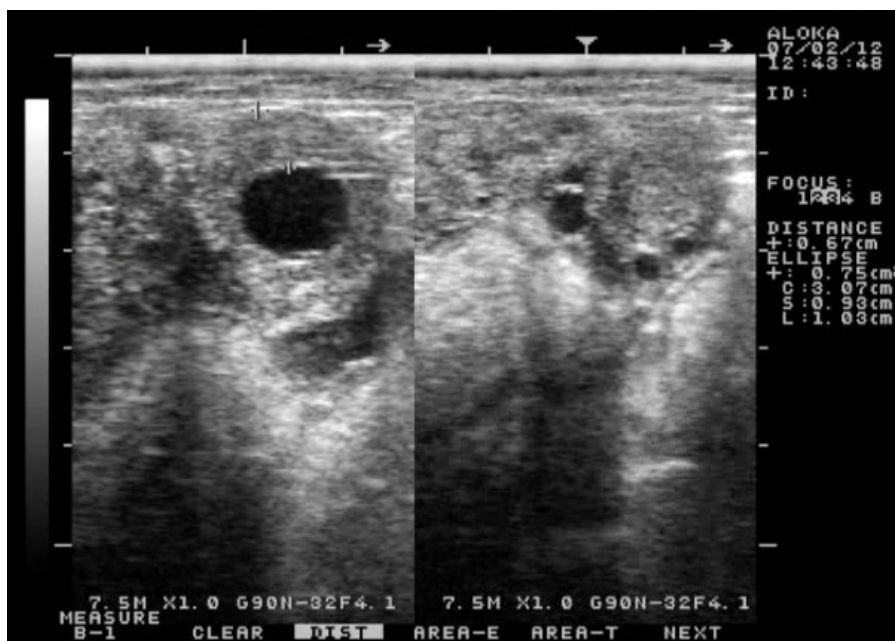


Foto 14. Capra: Cisti follicolare con teca in fase di luteinizzazione. A dx stesso ovaio ma diversa sezione: si nota una sezione della cisti di solo tessuto luteinico e attorno diversi follicoli in fase di accrescimento.



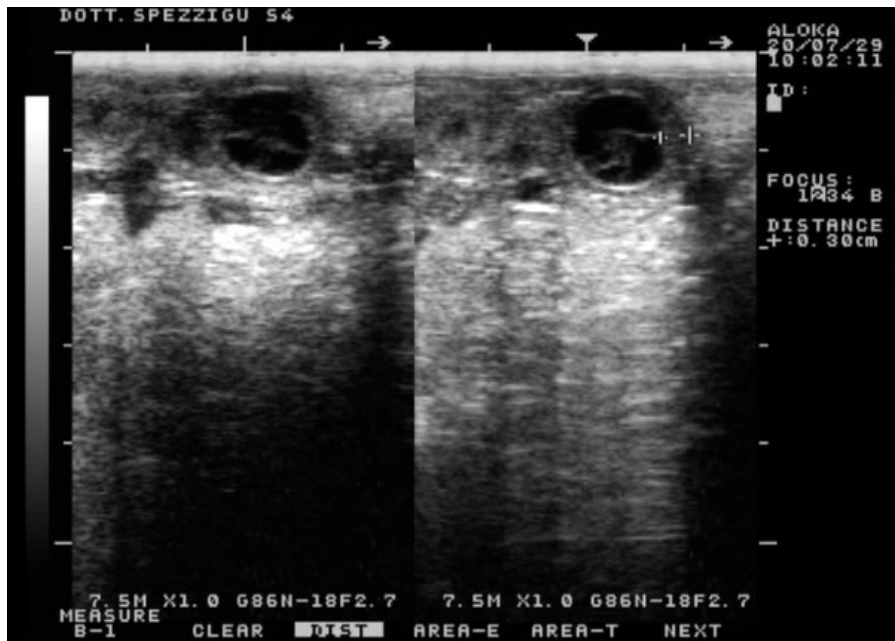


Foto 15. Pecora: cisti follicolare con inizio di luteinizzazione dal centro della cisti; le due sezioni evidenziano che si tratta di un principio di luteinizzazione piuttosto che una struttura policistica.

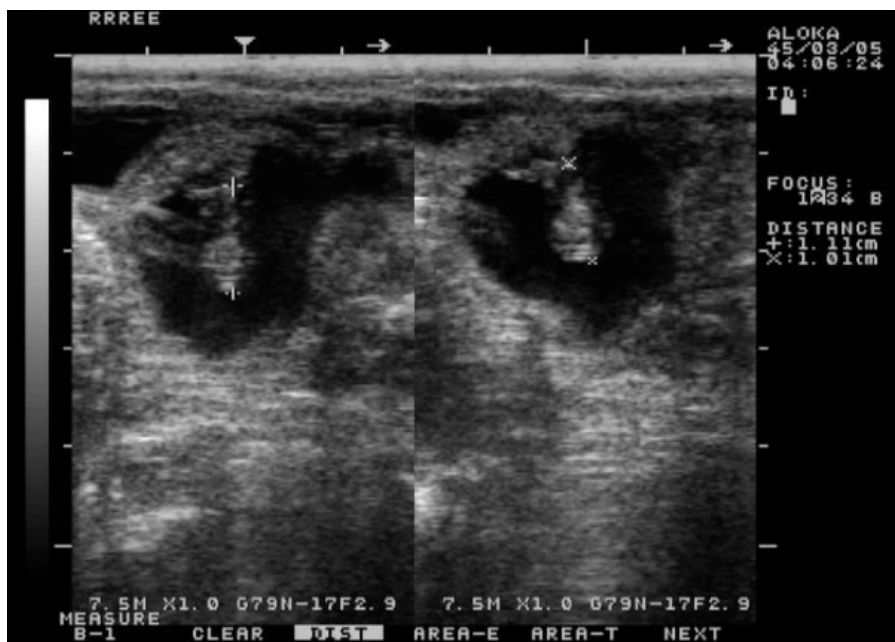


Foto 16. Pecora: gravidanza di 25-26 gg

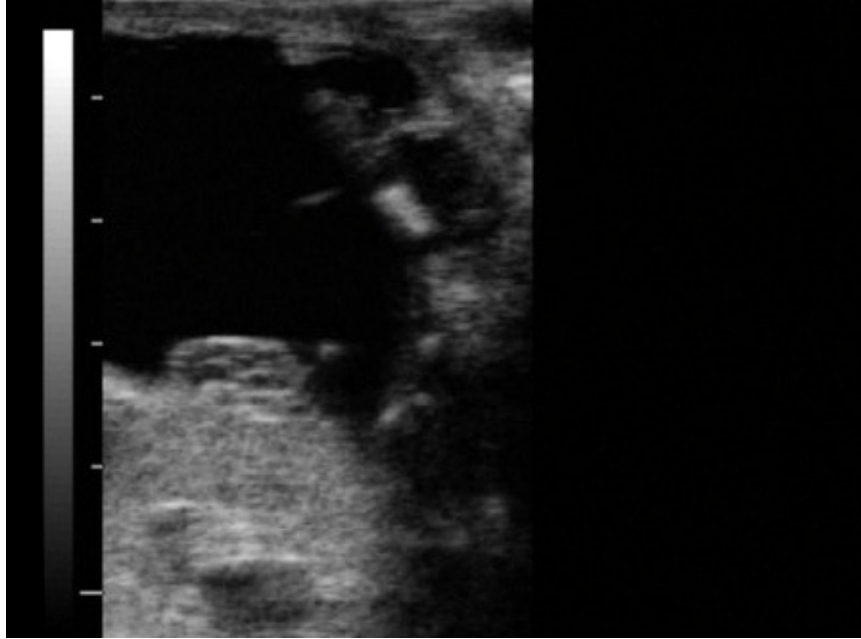


Foto 17. Pecora: sezione trasversale del cordone ombelicale alla sua emergenza dalla cavità addominale di un feto di circa 50 gg. Si notano i vasi che compongono il cordone stesso.

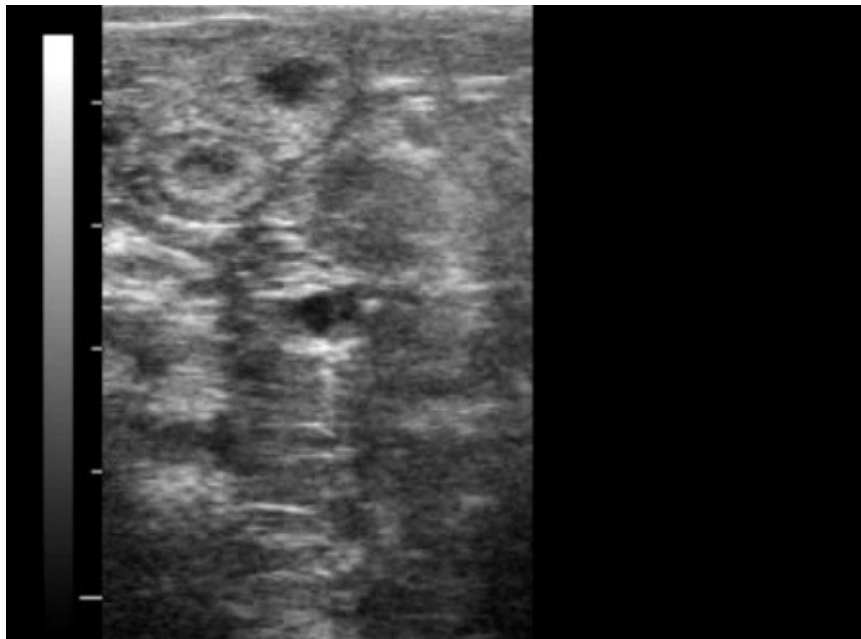


Foto 18. Pecora: presenza di un CL di buona qualità e circa 5 mm di liquido nel lume uterino del corno ipsilaterale; questa immagine è consistente con una diagnosi di gravidanza precoce (17 gg). La sezione dell'utero inferiore contiene poco liquido.

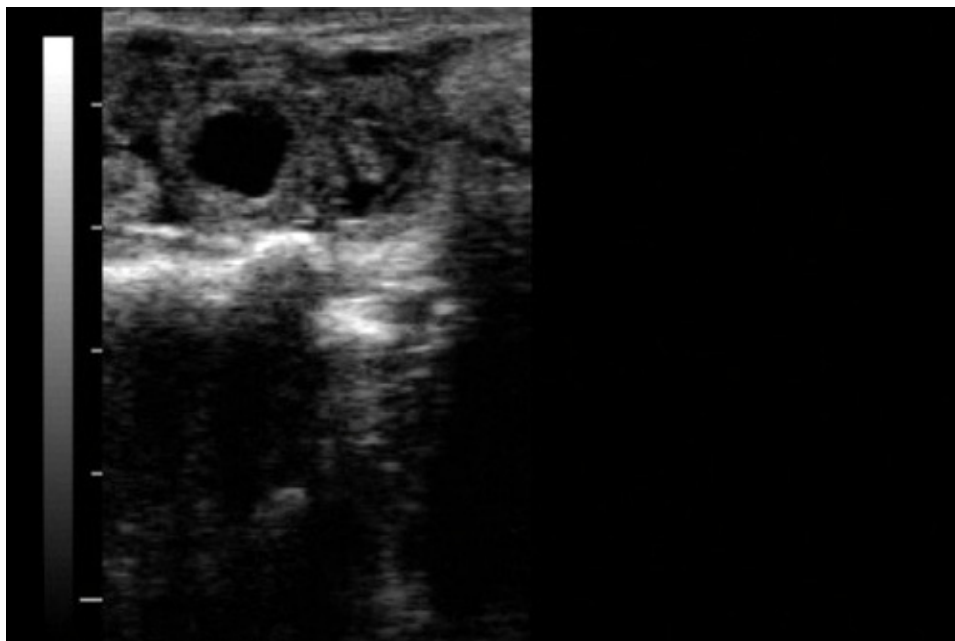


Foto 19. Pecora: gravidanza di 22 giorni nella sezione del corno di dx, mentre a sx 8mm circa di liquido endoluminale.



Foto 20. Pecora: gravidanza gemellare di circa 30gg.



Foto 21. Pecora: cordone ombelicale in tutto il suo tragitto, dalla parete uterina sino al feto, di circa 40 gg.

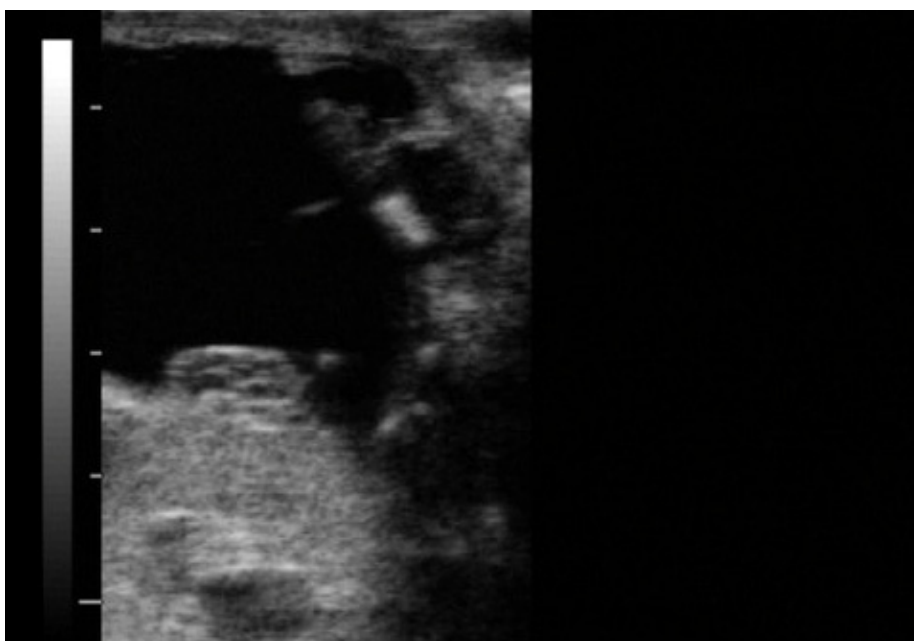


Foto 22. Pecora: sezione trasversale del cordone ombelicale alla sua emergenza dalla cavità addominale di un feto di circa 50 gg. Si notano i vasi che compongono il cordone stesso.



Foto 23. Pecora: gravidanza di 19 gg con CL gravidico a sx.

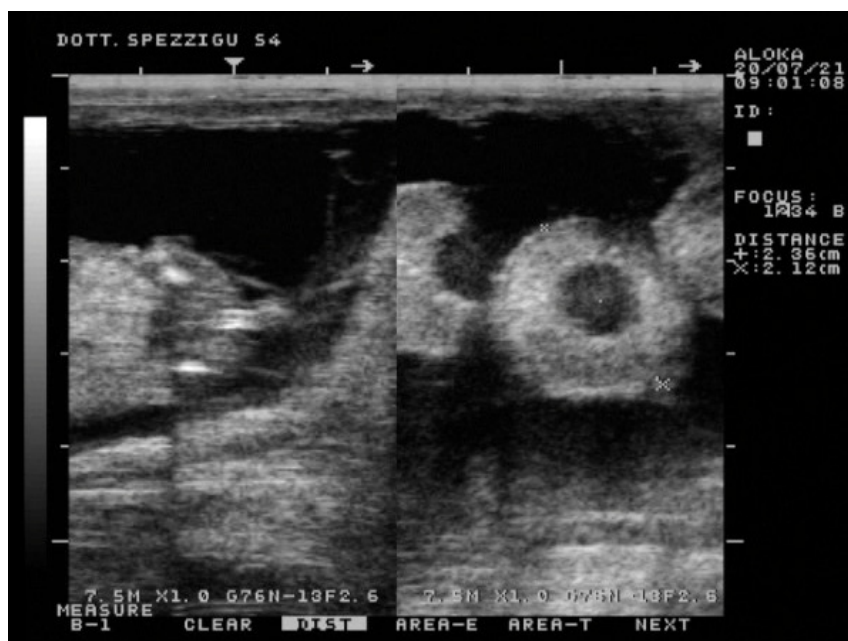


Foto 24. Pecora: sessaggio fetale a 45 gg di gravidanza. È visibile il tubercolo genitale femminile alla base della coda. A dx i placentomi presentano ancora la cavità centrale, che nella pecora, a differenza della capra, scompare con il progredire della gravidanza.