

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**

**Dottorato di Ricerca in
Produzione e Sanità degli Alimenti di Origine Animale
XXI ciclo – 2005/2008**

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell’Ambiente e
delle Produzioni Animali

TESI DI DOTTORATO

*Aneuploidie in spermatozoi ed ovociti maturati in vitro in bovini di
razza Frisona Italiana e Bruna italiana mediante microdissezione
cromosomica e ibridazione fluorescente in situ (FISH)*

*Aneuploidy in sperm and in vitro matured oocytes in Italian Friesian and Italian
Brown cattle by chromosome microdissection and fluorescent in situ
hybridization (FISH)*

Dott. Davide Nicodemo

Relatore:
Prof. Dino Di Berardino

Coordinatore:
Prof.^{ssa} Maria Luisa Cortesi

Sommario

Le aneuploidie sono responsabili di sbilanciamenti genetici che impediscono il normale processo di sviluppo dell'embrione e sono tra le cause principali di mortalità embrionale e fetale. Negli animali domestici esiste una quasi totale mancanza di dati rispetto all'incidenza di aneuploidie nelle cellule germinali, nonostante l'importanza che queste rivestono sia dal punto di vista zootecnico, in quanto causa di riduzione della fertilità, sia dal punto di vista biomedico, come modello da cui derivare informazioni utili nella ricerca applicata all'uomo.

Sempre più studi hanno messo in luce la relazione che esiste tra ambiente di vita (esposizione ad inquinanti, fitofarmaci, molecole tossiche) e incidenza di anomalie cromosomiche nelle cellule germinali e gli animali domestici sono sempre più frequentemente esposti a molecole inquinanti attraverso l'alimentazione e l'ambiente di allevamento. Per tali ragioni è fondamentale conoscere l'incidenza di base di aneuploidie nelle cellule germinali, al fine di programmare indagini volte ad identificare e rimuovere possibili cause di riduzione della fertilità. A tal fine è stata sviluppata una metodica di ibridazione fluorescente in situ utilizzando sonde 'painting' cromosoma-specifiche prodotte tramite microdissezione cromosomica e DOP-PCR per investigare l'assetto cromosomico di spermatozoi (cromosomi X e Y) ed ovociti (cromosomi X e 5) in due delle principali razze da latte, la Frisona Italiana e la Bruna Italiana. L'incidenza media di aneuploidie e diploidie negli spermatozoi è stata dello 0.110% e 0.050% nella Frisona e dello 0.078% e 0.062% nella Bruna. Gli ovociti diploidi sono stati complessivamente il 14.4% (11.2% nella Frisona e 18.4% nella Bruna) e gli aneuploidi il 2.2% (2% nella Frisona e 2.5% nella Bruna). Gli ovociti sembrano quindi essere maggiormente soggetti ad eventi di non-disgiunzione; ulteriori studi sono necessari, in vivo, per chiarire gli effetti del sistema di coltivazione in vitro sulla frequenza di anomalie cromosomiche.

Abstract

Germ cell aneuploidy is one of the most important causes of embryonic and foetal mortality in mammals. Despite its great impact on fertility, limited information is available - so far- on the frequency of aneuploidy in sperm and oocytes of domestic animal species, and even less information is available on breeds or genetic types. Since chemical pollutants and management factors are known to affect the frequency of aneuploidy in the germ cells of animals exposed to such a substances through feedstuff or farm environment, it is important to determine the basic frequencies of aneuploidy in the male and female germ cells of each species, breed or genetic type in order to identify and remove possible causes of reduced fertility. We developed a fluorescence *in situ* hybridization method using chromosome-specific painting probes produced by chromosome microdissection and DOP-PCR to investigate the chromosomal content of sperm (chromosomes X and Y) and oocytes (chromosomes X and 5) in two cattle breeds: the Italian Friesian and Italian Brown. Out of more than 5.000 sperm per bull and 10 bulls for each breed analyzed, aneuploid and diploid sperm had, respectively, a frequency of 0.110 % and 0.050 % in the Italian Friesian and 0.078 % and 0.062 % in the Italian Brown breeds. Out of 100 *in vitro* matured oocytes for each breed, on the average, diploidy affected 11.2 % and 18.4 % in the Italian Friesian and Brown, respectively, whereas disomy for chromosome X and 5 had a frequency of 2 % in the Italian Friesian and 2.5 % in the Italian Brown breeds.

Further studies are needed to expand our knowledge on the frequency of aneuploidy in sperm and oocytes of our domestic animal species, breeds or genetic types, in order to establish a baseline level, useful for monitoring future trends of aneuploidy, in relation to climatic changes and environmental hazards, thus increasing the reproductive and productive efficiency of the productive unit.

INDICE

1. Introduzione e analisi della letteratura	pag. 5
1.1 Anomalie cromosomiche	pag. 5
1.1.1 Anomalie cromosomiche strutturali	pag. 5
1.1.2 Anomalie cromosomiche numeriche	pag. 9
1.1.3 Mosaicismo e chimerismo	pag. 12
1.2 Cenni sull'incidenza di anomalie cromosomiche nell'uomo	pag. 13
1.3 Le anomalie cromosomiche negli animali domestici	pag. 17
1.3.1 Anomalie cromosomiche negli animali adulti	pag. 17
1.3.2 Anomalie cromosomiche negli embrioni	pag. 22
1.3.3 Anomalie cromosomiche negli spermatozoi	pag. 26
1.3.4 Anomalie cromosomiche negli ovociti	pag. 29
1.4 Meccanismi di formazione delle anomalie cromosomiche	pag. 33
1.5 Cause principali nella genesi delle anomalie cromosomiche	pag. 39
2. Obiettivo della ricerca	pag. 44
3. Materiali e metodi	pag. 45
3.1 Soggetti esaminati	pag. 45
3.2 Preparazione delle sonde painting cromosoma specifiche	pag. 46
3.3 Maturazione in vitro di ovociti di bovino	pag. 52
3.4 Decondensazione dei nuclei spermatici	pag. 54
3.5 Ibridazione fluorescente in situ su piastre metafasiche mitotiche, spermatozoi decondensati e meiosi ovocitarie	pag. 55
3.6 Osservazione al microscopio e raccolta dei dati	pag. 58
3.7 Analisi statistica	pag. 59
4. Risultati	pag. 61
4.1 Produzione delle sonde e ottimizzazione del metodo FISH	pag. 61
4.2 Anomalie cromosomiche negli spermatozoi	pag. 63
4.3 IVM e anomalie cromosomiche negli ovociti	pag. 68
5. Discussione	pag. 72
6. Conclusioni e sviluppi futuri	pag. 80
7. Bibliografia	pag. 81

1. INTRODUZIONE E ANALISI DELLA LETTERATURA

1.1 Anomalie cromosomiche

Le anomalie cromosomiche vengono generalmente classificate in due gruppi: alterazioni nella struttura e alterazioni nel numero dei cromosomi (Griffiths, 2004). Esistono poi altre condizioni in cui il normale assetto cromosomico viene ad essere modificato solo in una parte delle cellule che compongono un individuo, a causa della contemporanea presenza di più popolazioni cellulari con un diverso status cromosomico; in questo caso si parla di mosaicismo e di chimerismo. In base alla loro origine, inoltre, le anomalie cromosomiche si distinguono in costituzionali e acquisite. Le prime originano durante la gametogenesi o le fasi iniziali di sviluppo embrionale e interessano tutte o la maggior parte delle cellule di un organismo; quelle acquisite hanno origine durante la vita adulta, interessano le cellule derivanti da un singolo clone cellulare e hanno generalmente una distribuzione limitata all'interno di singole parti del corpo (McFadden e Friedman, 1997).

1.1.1 Anomalie strutturali

Le anomalie strutturali originano in seguito a rotture dei cromosomi quando durante il processo di riparazione le estremità coinvolte vengono riunite in modo inappropriato. I riarrangiamenti strutturali vengono divisi in quattro categorie principali, a seconda del numero di rotture che le generano, del numero di cromosomi coinvolti e di come le rotture vengono riunite tra loro; le 4 categorie sono: delezioni, duplicazioni, inversioni e traslocazioni.

Le delezioni consistono nella perdita di una parte di un cromosoma e vengono classificate come terminali, se avvengono nella parte finale del cromosoma, e interstiziali, quando, in seguito alla rottura di un cromosoma in due punti, avviene la perdita del frammento intermedio e i punti di rottura vengono saldati tra di loro. Se il frammento cromosomico deletato è privo di centromero non si aggancerà ai microtubuli e verrà perso nel corso della

successiva divisione cellulare. Sempre a seguito di due rotture possono originarsi delle duplicazioni quando il segmento staccato viene inserito, anziché sul cromosoma originale, sul suo omologo; si genereranno invece delle inversioni quando il segmento libero subisce una rotazione di 180° prima di essere risaldato con il cromosoma originale. Le inversioni, quindi, non comportano perdita di materiale genetico, ma possono determinare la perdita di funzionalità di geni importanti se i punti di rottura da cui hanno origine ricadono all'interno della struttura di un gene o nelle regioni regolatrici della trascrizione. Le inversioni possono essere di due tipi: pericentriche, se il segmento che subisce la rotazione include il centromero, e paracentriche, se non lo comprende. Le delezioni comportano una perdita parziale di materiale genetico, ma sono quasi sempre letali poiché, per assicurare una normale vitalità, la maggior parte dei geni deve essere presente in duplice copia (Griffiths, 2004). Anche le duplicazioni possono portare ad errori dello sviluppo, sebbene la presenza soprannumeraria di alcuni geni sia più tollerata rispetto alla mancanza di una copia di un gene. Un'altra classe di anomalie cromosomiche strutturali sono le traslocazioni. Al pari delle inversioni, anche queste non comportano nessuna perdita o acquisizione di materiale genetico e vengono pertanto definite riarrangiamenti bilanciati. Le traslocazioni possono essere di due tipi: reciproche e Robertsoniane (dette anche fusioni centriche). La traslocazione reciproca consiste in uno scambio bidirezionale di materiale genetico tra due cromosomi non omologhi e avviene sempre in seguito a rotture del DNA, in seguito alle quali si formano dei frammenti di cromosoma liberi i quali, a causa di errori nel processo di riparazione, vengono saldati in maniera errata ad un altro cromosoma danneggiato non omologo, dando origine, in questo modo, a due cromosomi derivati. Nella traslocazione Robertsoniana, invece, due cromosomi acrocentrici si uniscono nella zona centromerica, formando un nuovo cromosoma metacentrico o submetacentrico. In seguito al verificarsi di una traslocazione Robertsoniana, il numero totale di cromosomi sarà $2n-1$, anche se non vi sarà perdita di materiale genetico; tuttavia, in un recente lavoro (Di Meo et al., 2006), è stato dimostrato che nella traslocazione

Robertsoniana 1;29 del bovino (che rappresenta quella a maggiore diffusione ed è considerata la più antica) avviene la perdita di alcune sequenze satellite centromeriche (SAT), ed in particolare delle sequenze SAT I da entrambi i cromosomi interessati, gran parte delle sequenze SAT IV dal crom. 29 e parte delle sequenze SAT III dal crom. 1.

Come detto le traslocazioni sono riarrangiamenti bilanciati e non sono generalmente associati a cambiamenti fenotipici evidenti; in genere si osserva una diminuzione della fertilità a causa della formazione di gameti geneticamente sbilanciati. In particolare i problemi riproduttivi sono dovuti a disturbi durante la sinapsi e la segregazione dei cromosomi nel corso della meiosi (Switonski e Stranzinger, 1998; Villagomez e Pinton, 2008). Durante la profase della meiosi I i cromosomi omologhi vanno incontro ad un completo appaiamento, detto sinapsi, formando un'unica struttura che prende il nome di bivalente. Nei portatori di traslocazione reciproca 4 cromosomi (2 normali e 2 derivati) si appaieranno, formando una singola struttura quadrivalente. Dopo la formazione della sinapsi avverranno i fenomeni del crossing-over e della ricombinazione e successivamente i cromosomi migreranno ai 2 poli e segregheranno nelle 2 cellule figlie. Nei soggetti portatori di traslocazione reciproca la segregazione dei cromosomi può essere di 3 tipi: alternata, adiacente-1 e adiacente-2. In seguito a segregazione alternata verranno prodotti 2 tipi di gameti: normali e bilanciati. I normali ereditano i 2 cromosomi non traslocati, i bilanciati entrambi i cromosomi traslocati; di conseguenza, in caso di segregazione alternata, non si avrà perdita o acquisizione di materiale genetico e gli embrioni derivanti dalla fecondazione con un gamete normale di sesso opposto saranno geneticamente bilanciati, anche se potranno essere portatori della traslocazione. Nel caso della segregazione adiacente-1 e adiacente-2, invece, verranno prodotti esclusivamente gameti sbilanciati, in quanto ogni gamete riceverà una copia del cromosoma normale e una copia del cromosoma traslocato. In seguito alla fecondazione con un gamete normale si produrrà uno zigote geneticamente sbilanciato che frequentemente andrà incontro a morte nel corso dello sviluppo, spesso prima dell'impianto in utero (King et

al., 1981). Il risultato della segregazione adiacente sarà quindi l'aborto nelle specie monoovulatriche e una riduzione nel numero di nati per parto in quelle poliovulatriche. Nel caso invece della traslocazione Robertsoniana, i cromosomi interessati formeranno una struttura trivalente composta dal cromosoma derivato dalla fusione centrica e dai 2 cromosomi normali omologhi. La segregazione potrà essere alternata, con la formazione di un gamete normale e uno bilanciato, o adiacente, che porterà alla formazione unicamente di gameti sbilanciati (Fig. 1)

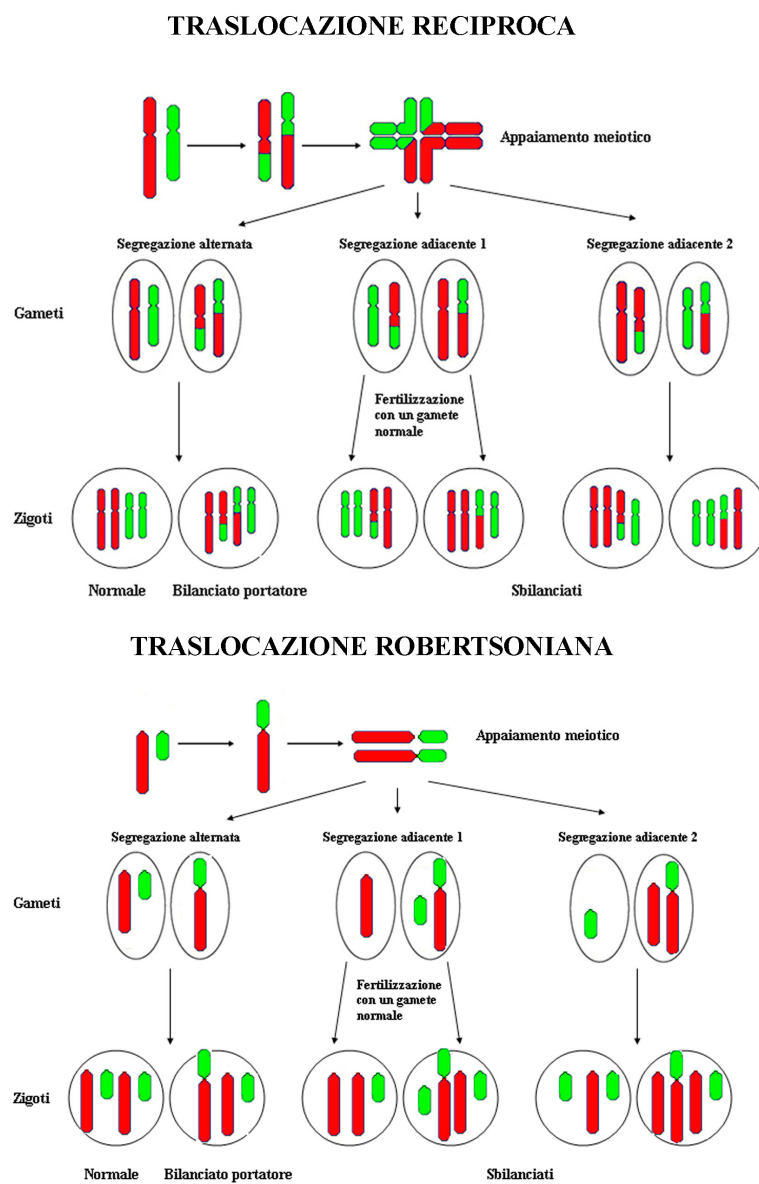


Figura 1 – Segregazione meiotica in soggetti portatori di traslocazione reciproca e robertsoniana e assetto cromosomico degli zigoti dopo fecondazione con un gamete normale.

1.1.2 Anomalie cromosomiche numeriche

Le anomalie cromosomiche numeriche possono essere di 2 tipi: variazioni nel numero di interi assetti cromosomici (cambiamenti di ploidia) e variazioni nel numero di uno o pochi cromosomi; in quest'ultimo caso si parla di aneuploidia. Normalmente le cellule germinali hanno un solo set aploide (n) di cromosomi, mentre le cellule somatiche hanno 2 set completi di cromosomi e perciò sono diploidi ($2n$). Se cellule somatiche hanno un solo set (n) di cromosomi si parlerà di monoploidia; si avrà invece poliploidia quando sono presenti più assetti cromosomici: triploidia ($3n$), tetraploidia ($4n$), pentaploidia ($5n$) e così via. Una condizione particolare è la mixoploidia che consiste nella presenza contemporanea di cellule con un differente grado di ploidia. Negli animali superiori le variazioni nel numero di assetti cromosomici sono sempre letali nella fase embrionale, poiché viene a mancare il bilanciamento genico necessario per un corretto sviluppo dell'individuo.

Il termine aneuploidia indica una variazione di uno o pochi cromosomi; in questa categoria di anomalie cromosomiche rientrano la monosomia ($2n-1$), la trisomia ($2n+1$), la nullisomia ($2n-2$). Anche le aneuploidie degli autosomi sono generalmente letali nel corso della vita embrionale o fetale, tranne che in poche eccezioni come, ad esempio nell'uomo, le trisomie dei cromosomi 21, 13 e 18; tuttavia anche queste ultime portano a gravi alterazioni del fenotipo e sono spesso causa di morte precoce. La ragione principale di ciò risiede nel concetto di bilanciamento genetico: in linea di massima la quantità di trascritto prodotta da un gene è direttamente proporzionale al numero di copie di quel gene presenti in una cellula. La quantità di proteina prodotta dipende quindi in maniera diretta dal numero di copie del gene presenti. Se vengono alterati i normali rapporti tra i prodotti di vari geni, si potranno generare degli sbilanciamenti nelle vie metaboliche cellulari che porteranno ad alterazioni nella fisiologia generale dell'individuo. Nel caso della trisomia 21 dell'uomo sono stati identificati su questo cromosoma dei geni 'maggiori' la cui presenza in triplice copia è responsabile di gran parte delle alterazioni fenotipiche osservabili; a questi effetti si aggiungono quelli

cumulativi derivanti dallo sbilanciamento genetico di molti geni 'minori' (Griffiths, 2004). Nel caso della monosomia eventuali alleli recessivi deleteri, potranno essere espressi a causa dell'assenza dell'allele dominante.

Diverso è il caso delle aneuploidie che interessano i cromosomi sessuali, generalmente più tollerate. La sindrome di Turner, ad esempio, consiste in una monosomia del cromosoma X; questa, pur essendo compatibile con la vita, produce un fenotipo caratteristico. Gli individui affetti sono delle femmine sterili, hanno una statura inferiore alla media e spesso presentano una membrana di pelle che si estende tra il collo e le spalle. Individui con cariotipo XXY, invece, sono affetti dalla Sindrome di Klinefelter; fenotipicamente sono maschi sterili, con testicoli sottosviluppati e statura generalmente superiore alla media; in circa il 50% dei casi, poi, si osserva un certo grado di sviluppo delle mammelle. Al contrario, gli individui con cariotipo XYY sono maschi generalmente fertili; durante la meiosi, infatti, il cromosoma X si appaia in modo normale con uno dei due cromosomi Y, mentre l'altro non si appaierà; in questo modo il processo meiotico non viene disturbato.

Copie in eccesso del cromosoma X, in caso di trisomia (XXX), tetrasomia (XXXX) ecc., sono generalmente tollerate e gli individui con tale anomalia sono fertili, poiché anche in questo caso il processo meiotico si svolge regolarmente. Il fenotipo di questi individui è generalmente normale e non si osservano grosse alterazioni; questo avviene grazie ad un normale meccanismo chiamato di compensazione del dosaggio basato sull'inattivazione delle copie in eccesso del cromosoma X. Nelle specie con sistema di determinazione del sesso XY, infatti, i geni housekeeping (cioè quelli che si esprimono ad un livello più o meno costante lungo tutta la vita dell'individuo) presenti sul cromosoma X vengono espressi ad un livello uguale sia nelle femmine che nei maschi (compensazione di dose). Nelle femmine quindi un solo cromosoma X è trascrizionalmente attivo, mentre l'altro va incontro ad un processo di inattivazione; allo stesso modo negli individui con trisomia X, un cromosoma resterà attivo, mentre gli altri due saranno inattivati. Questo è anche il motivo per cui i maschi XXY

subiranno in maniera ridotta gli effetti della presenza di un cromosoma X in eccesso, dal momento che questo verrà inattivato. Ma allora, se le femmine XXX sono fenotipicamente normali, perchè non lo sono anche i maschi XXY? Perchè alcuni geni presenti sul cromosoma X sfuggono, normalmente, al processo di inattivazione e vengono trascritti da entrambi i cromosomi; nei maschi XXY questi geni verranno trascritti ad un livello doppio rispetto ad un maschio XY, mentre nelle femmine XXX saranno espressi ad un livello solo 1.5 volte superiore rispetto ad una femmina XX. Poiché i geni presenti sul cromosoma X sono responsabili del fenotipo femminile, questo spiega perchè i maschi XXY hanno un fenotipo che presenta alcune caratteristiche femminili (ad esempio testicoli sottosviluppati e presenza di mammelle). Tutti i casi di aneuploidia descritti, e che sono responsabili della maggior parte degli aborti embrionali e fetali, nonché di disturbi della fertilità nel caso delle aneuploidie dei cromosomi sessuali, derivano quasi sempre dall'unione di un gamete normale con uno geneticamente sbilanciato. La causa primaria va quindi ricercata nelle variazioni numeriche o strutturali dell'assetto genetico delle cellule germinali dei genitori.

Nel caso delle cellule germinali (con assetto aploide n), le anomalie numeriche comprendono la nullisomia ($n-1$), la disomia ($n+1$) e la diploidia ($2n$). Le anomalie delle cellule germinali verranno dettagliatamente trattate successivamente, essendo l'argomento di studio del presente lavoro di tesi.

1.1.3 Mosaicismo e chimerismo

Il mosaicismo e il chimerismo rappresentano due condizioni molto simili che implicano la presenza contemporanea di più popolazioni cellulari con diverso assetto cromosomico nello stesso individuo. Il mosaicismo ha origine da un singolo zigote in seguito ad una non-disgiunzione di una coppia di cromosomi nel corso della mitosi, mentre il chimerismo deriva da due o più zigoti differenti (Basrur et al., 1970; Malan et al., 2006). Il mosaicismo, in modo particolare quello legato ai cromosomi sessuali, viene frequentemente osservato in soggetti vivi. Il chimerismo può stabilirsi solo in alcuni organi o in tutto il corpo, a seconda del meccanismo alla base della sua formazione. Un individuo totalmente chimerico può originare dalla fusione, dopo la fecondazione, di due distinti embrioni, o dalla fecondazione di un ovocita e di uno dei due globuli polari da parte di due distinti spermatozoi, che daranno origine a due zigoti che successivamente si fonderanno per dare vita ad un unico embrione. Negli animali domestici, soprattutto nei bovini, individui chimerici possono derivare dalla formazione di anastomosi tra i vasi sanguigni nella placenta quando si instaura una gravidanza gemellare con sessi eterogametici (Marcum, 1974). Questa fusione consente una circolazione di cellule dal sangue di un individuo a quello dell'altro. A seguito di questo passaggio gli individui risultanti avranno, in proporzioni variabili, sia cellule XX che XY e pertanto saranno delle chimere. Tuttavia gli effetti di queste connessioni vascolari saranno molto diverse tra i due sessi. Nel bovino, circa il 92% delle femmine nate in parto gemellare con un maschio saranno freemartin, sterili e con un grado di mascolinizzazione degli organi genitali esterni ed interni variabile (Marcum, 1974; Padula, 2005), mentre generalmente i maschi non avranno ripercussioni. Questo è dovuto al fatto che le anastomosi placentali si instaurano generalmente nel corso della seconda o terza settimana di vita embrionale, prima delle differenziazione sessuale che avviene intorno al 45° giorno di vita (Ruvinsky e Spicer, 1999); poiché la differenziazione gonadica inizia circa una settimana prima nei maschi rispetto alle femmine, queste ultime risentiranno dell'effetto sia del testosterone che

dell'ormone anti-Mulleriano, che determineranno l'atrofia o la completa mancanza dei dotti Mulleriani nelle femmine (Vigier et al., 1984).

1.2 Cenni sull'incidenza di anomalie cromosomiche nell'uomo

Le anomalie cromosomiche sono tra le cause principali di aborti embrionali e fetali. La figura 2 riporta la sintesi dei risultati di un lavoro di Sankaranarayanan del 1979 nel quale vengono analizzate le principali anomalie che interessano l'uomo. Sulla base di tale sintesi si evince che:

- circa il 15% dei concepimenti termina con un aborto spontaneo;
- la metà di questi è dovuta ad anomalie cromosomiche, quasi tutte numeriche (trisomie 50%, monosomie del cromosoma X 18%, triploidie 17% e tetraploidie 6%);
- circa il 6% dei bambini che muoiono dopo la nascita sono portatori di anomalie cromosomiche, il 75% delle quali è rappresentata da aneuploidia di un autosoma;
- lo 0,6% dei nati vivi presenta anomalie cromosomiche; il 35% di queste è rappresentato da aneuploidie dei cromosomi sessuali (incidenza sui nati vivi dello 0,22%), il 23% da trisomie autosomiche (incidenza sui nati vivi dello 0,14%) in modo particolare del cromosoma 21, il 41% da anomalie strutturali (incidenza sui nati vivi dello 0,25%);
- le anomalie numeriche sono quasi sempre letali nel corso della vita embrionale e fetale: la loro incidenza si riduce drasticamente dal 7,4% al concepimento allo 0,36% alla nascita; queste ultime sono rappresentate in modo particolare dalle aneuploidie dei cromosomi sessuali, che come detto precedentemente sono più tollerate, e da quelle del cromosoma 21.

Va inoltre precisato che sfuggono a questi calcoli tutti quelle aneuploidie che determinano morte embrionale nei primissimi giorni dal concepimento, per cui l'embrione viene riassorbito o espulso senza che la gravidanza venga diagnosticata. Per questo l'incidenza delle

aneuploidie che sono causa di disturbi riproduttivi è maggiore di quella che si evince dai dati esaminati: è stato stimato che circa il 30 % degli ovociti umani fecondati hanno una anomalia cromosomica numerica (Hassold e Hunt,2001). A tal proposito alcune indicazioni vengono fornite da studi condotti in vitro, anche se il sistema di coltura potrebbe influenzare lo sviluppo dell'embrione e, di conseguenza, il suo assetto cromosomico. In uno studio il 36% degli embrioni prodotti in vitro è risultato cromosomicamente anormale (Angell et al., 1986). I dati derivanti dalla PGD (diagnosi genetica preimpianto), inoltre, indicano che circa il 50% degli embrioni derivanti da fecondazione in vitro (IVF) hanno un numero anormale di cromosomi (Ogilvie, 2008).

Poiché la gran parte delle aneuploidie osservabili in embrioni, feti e adulti derivano dalla fecondazione tra un gamete normale e uno geneticamente sbilanciato, numerosi studi hanno indagato l'incidenza di aneuploidie nelle cellule germinali umane nel tentativo di ricercare le cause e i meccanismi di formazione delle aneuploidie . Si è quindi capito che solo una piccola percentuale delle trisomie (es. 3% per il cromosoma 21, 3% per la trisomia XXY, 18% per la trisomia XXX) deriva da errori nel corso delle prime divisioni mitotiche che avvengono nelle prime fasi di sviluppo embrionale. Fa eccezione la trisomia per il cromosoma 7, per la quale gli errori in mitosi sono responsabili nel 57% dei casi (Hassold e Hunt, 2001); la restante percentuale dei casi di trisomia derivano invece da casi di non disgiunzione cromosomica nel corso della gametogenesi maschile o femminile. L'incidenza di base di aneuploidie negli spermatozoi umani, in soggetti sani, varia mediamente tra il 2% e il 4% (Shi e Martin, 2000); alcuni studi riportano valori più elevati, intorno al 7% (Egozcue et al., 2000). Esiste una comunque una grande variabilità individuale (1-17%) nella frequenza di spermatozoi disomici in uomini con cariotipo normale (Pacchierotti et al., 2007). Oltre che differenze interindividuali esistono anche differenze intercromosomiali; la frequenza di base di disomia, per la maggior parte degli autosomi varia tra lo 0.10% e lo 0.15%, mentre è maggiore per i cromosomi 14, 21 e 22. Per il cromosoma 21, in uomini sani, è di circa lo 0.29-0.35%, mentre

la disomia per i cromosomi sessuali ha un'incidenza di circa lo 0.26% (Hassold, 1998; Rubes et al., 2005; Shi e Martin, 2000). Negli ovociti l'incidenza di aneuploidie è molto maggiore; circa il 20-25% degli ovociti contiene un cromosoma sopranumerario (Jacobs, 1992; Volarcik et al., 1998); questa differenza riscontrabile tra linea germinale maschile e femminile è legata principalmente al fenomeno dell'invecchiamento degli ovociti: nelle femmine tutti gli ovociti iniziano la meiosi durante lo sviluppo fetale, ma dopo che i cromosomi omologhi hanno formato le sinapsi e iniziato il processo di ricombinazione, l'ovocita entra in un periodo di arresto meiotico; la meiosi sarà completata anni dopo, appena prima che lo stesso ovocita venga ovulato. Dopo l'ovulazione l'ovocita va incontro ad un nuovo arresto nel corso della metafase della seconda divisione, che verrà completata solo se l'ovocita viene fecondato. Il lungo tempo che intercorre tra l'inizio e la fine della meiosi sembra essere responsabile della più elevata incidenza di aneuploidie negli ovociti rispetto agli spermatozoi. Tuttavia è stata riportata un'ampia variabilità tra studi effettuati in laboratori diversi, con percentuali di ovociti aneuploidi variabili tra il 3% e il 46.6% (Pacchierotti et al., 2007). Analogamente a quanto riscontrato negli spermatozoi, anche negli ovociti esiste una ampia variabilità intracromosomiale, con alcuni cromosomi che sembrano andare incontro ad eventi di non disgiunzione nel corso della meiosi con una frequenza molto maggiore rispetto ad altri, ed in modo particolare il cromosoma 21 (Pacchierotti et al., 2007).

Nell'uomo le possibilità di studio e sperimentazione sugli ovociti sono notevolmente ridotte, a causa di fattori etici e di reperibilità del materiale biologico; gli animali domestici possono rappresentare un modello grazie alla grande quantità di materiale reperibile presso i mattatoi. Questo materiale, destinato altrimenti ad essere perso, può costituire un'ottima sorgente per l'acquisizione di dati che possono poi essere trasferiti nel campo della ricerca biomedica, ad esempio per individuare quei mutageni ambientali, o derivanti dalle attività antropiche, che sono in grado di esplicare un effetto aneugenico nelle cellule germinali e negli embrioni.

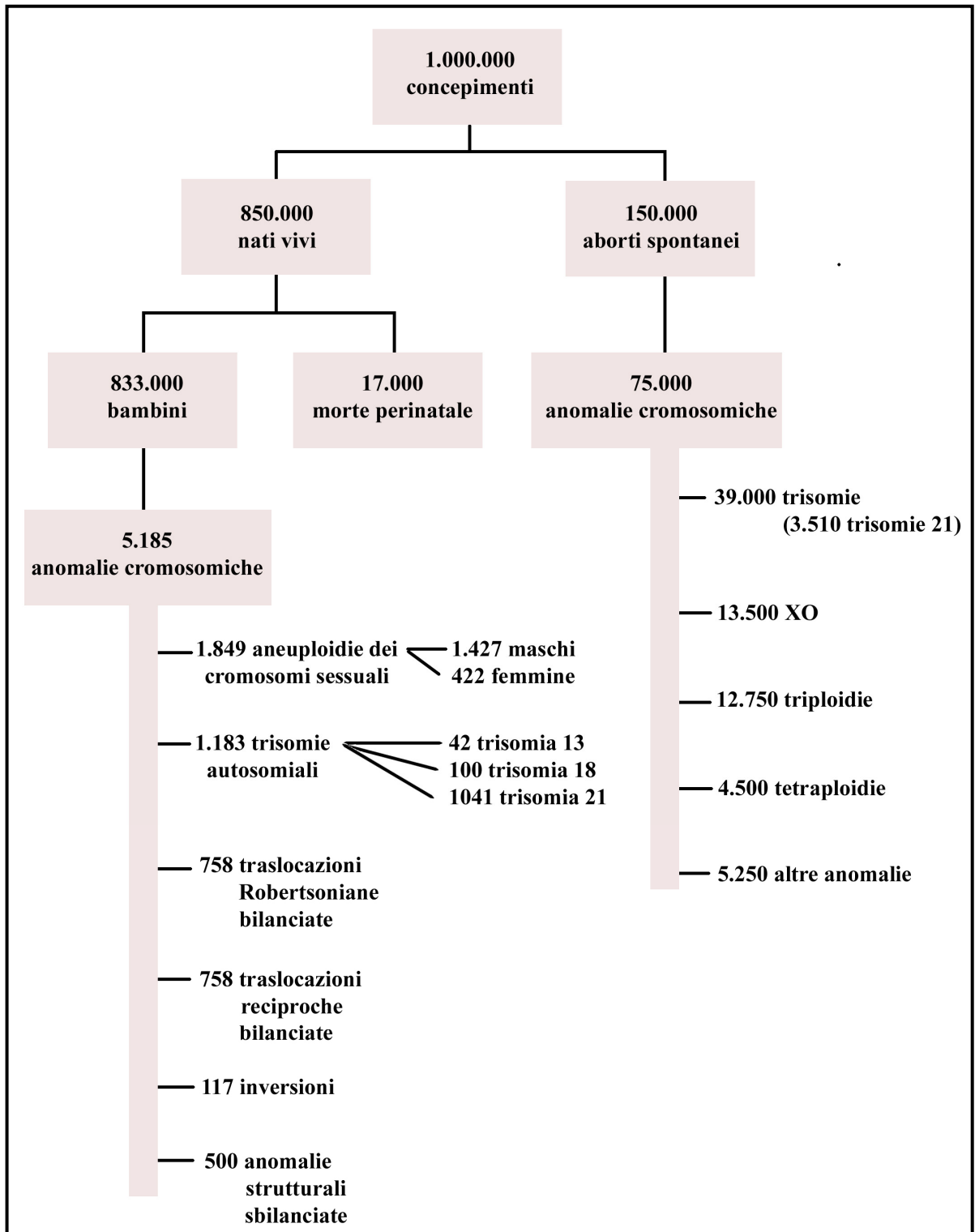


Figura 2 – Incidenza di anomalie cromosomiche nell'uomo (modificata da Sankaranarayanan, 1979)

1.3 Le anomalie cromosomiche negli animali domestici

1.3.1 Anomalie cromosomiche negli animali adulti

A differenza dell'uomo negli animali domestici esiste una certa difficoltà nel calcolare con esattezza l'incidenza di anomalie cromosomiche in quanto gli animali malformati, sterili, ipofertili vengono sistematicamente eliminati dall'allevamento e raramente viene richiesta una diagnosi citogenetica.

I dati sulla frequenza di anomalie cromosomiche negli animali adulti derivano principalmente dalle attività di *screening* che vengono effettuate da diversi laboratori, in modo particolare sui riproduttori maschi bovini e suini, o da analisi citogenetiche che hanno la finalità di indagare le cause di ipofertilità o di infertilità di specifici soggetti; da tempo infatti è stata messa in luce la relazione esistente tra anomalie cromosomiche (sia numeriche che strutturali) e diminuzione della fertilità negli animali portatori (per una review si veda Ducos et al., 2008). Si tratta quindi soprattutto di anomalie bilanciate, che non inficiano la vitalità dell'individuo e che hanno effetti fenotipici trascurabili (ad eccezione della sfera riproduttiva) o di anomalie che interessano i cromosomi sessuali e quindi, come precedentemente detto, più tollerate.

Nel bovino questa attività di screening è legata in modo particolare alla eradicazione della traslocazione Robertsoniana 1;29. L'incidenza di tale tipo di anomalia risulta essere compresa, a seconda della razza, tra lo 0 e il 60% (Ducos et al., 2008; Iannuzzi et al., 2008).

Oltre la traslocazione 1;29 sono riportate in letteratura numerose altre fusioni centriche che coinvolgono cromosomi diversi, ma in genere interessano un numero limitato di individui; fa eccezione la traslocazione 26;29 nella razza grigio alpina che ha una frequenza, in questa razza, del 7.8% (De Giovanni et al., 1979; Di Meo et al., 2000).

In uno studio su larga scala condotto in Ungheria tra il 1975 e il 1992 (Kovacs e Csukly, 1980; Kovacs, 1989, 1994; Kovacs et al., 1992) è stato studiato l'impatto della traslocazione Robertsoniana 1;29 direttamente in una grande azienda statale su un gruppo di 300 vacche

figlie di un toro portatore della traslocazione. L'indice di inseminabilità (numero di inseminazioni/gravidanza) del gruppo t+ (portatore della traslocazione) era del 28.43% più alto rispetto al gruppo t- (con cariotipo normale); analogamente la fertilità (% di gravidanze dopo la prima inseminazione) era del 32.41% più bassa nel gruppo t+ rispetto a quello t-. Anche il periodo interparto era maggiore nel gruppo t+, così come l'età al primo e ai successivi parti. Tra i due gruppi non sono state invece riscontrate differenze nel numero di aborti e di nati morti e poiché anche l'intervallo tra due inseminazioni era uguale, si deve dedurre che la mortalità embrionale nel gruppo t+ avveniva molto precocemente, nella prima metà del ciclo estrale, a causa della produzione di zigoti geneticamente sbilanciati, con conseguente ritorno in calore dell'animale al ciclo successivo, come evidenziato dal più alto numero di inseminazioni per gravidanza necessarie nel gruppo t+. La perdita totale di embrioni nella prima fase di sviluppo è stata calcolata essere del 22.7% più alta nel gruppo t+ rispetto a quello t-.

A differenza del bovino, in cui il principale tipo di anomalia che si riscontra tra gli animali adulti è la traslocazione di tipo Robertsoniano, nel suino quella maggiormente rappresentata è la traslocazione reciproca, come dimostrato dai risultati ottenuti dallo screening citogenetico effettuato da diversi laboratori europei (Ducos et al., 2008), mentre casi di traslocazione Robertsoniana sono raramente osservati. La prevalenza di riarrangiamenti strutturali bilanciati in verri prima dell'entrata in riproduzione è stata stimata essere dello 0.47%, il che equivale a dire che 1 animale su 200, in soggetti con fenotipo normale e fertilità non ancora stimata, è portatore di anomalia cromosomica. Questa percentuale aumenta notevolmente quando si analizzano solo animali con riduzione della fertilità già accertata.

Per quanto riguarda le anomalie numeriche autosomiche, queste sono raramente osservate negli animali adulti, poiché sono generalmente letali e non consentono lo sviluppo dell'embrione e del feto. Molto più frequenti sono le anomalie numeriche dei cromosomi sessuali; in particolare, il chimerismo XX/XY sia nei maschi che nelle femmine è quello

maggiormente rappresentato ma sono stati descritti anche casi di chimerismo XY/XXY, XY/XYY, XXX/XY da parte di diversi autori, così come casi di trisomia XXX, XXY e XYY (per una review si veda Ducos et al., 2008).

La sindrome XXY (equivalente alla sindrome di Klinefelter nell'uomo) è stata descritta diverse volte nel bovino (Scott e Gregory, 1965; Logue et al., 1979; Dunn et al., 1980; Abdel Malak et al., 1984; Sysa e Slota, 1984; Previtali e Galli, 1996; Krumrych, 2003) ed assume particolare rilevanza poichè è sempre associata ad ipogonadismo e conseguente sterilità dovuta ad azoospermia. Nel 1999, Molteni et al. hanno studiato gli effetti della trisomia XXY in 2 soggetti di razza chianina, riscontrando ipogonadismo, fenotipo femminile, assenza di epitelio germinativo nei testicoli, azoospermia e ridotta concentrazione ematica di testosterone.

Minori effetti fenotipici sono determinati dalla trisomia XXX, che sembra avere effetti limitati sullo sviluppo degli organi genitali, mentre determina alterazioni del processo riproduttivo. I sintomi vanno dalla mancanza di calori (Norberg et al., 1976), alla manifestazione continua di estro (Moreno-Millan et al., 1987), alla infertilità (Buoën et al., 1981; Pinheiro et al., 1987; Prakash et al., 1995), fino a soggetti che mostrano funzioni sessuali normali (Rieck et al., 1970).

I casi di trisomia XYY sono spesso descritti in individui con mosaicismo, mentre più rari sono i casi di trisomia 'pura' XYY. Gli individui affetti presentano una ridotta circonferenza scrotale oltre a ipoplasia testicolare; la concentrazione ematica di testosterone è circa 2 volte maggiore rispetto alla media dei soggetti con cariotipo normale XY (Krumrych et al., 2003).

Anche in questo caso quindi le funzioni riproduttive vengono ad essere compromesse.

Le aneuploidie degli autosomi descritte in animali adulti riguardano, in genere, cromosomi piccoli, che contengono un numero ridotto di geni e la cui presenza soprannumeraria è compatibile con la vita, anche se gli effetti fenotipici che determinano sono sempre evidenti.

La loro frequenza è stata stimata essere, in animali adulti, di circa lo 0.17%(Halnan, 1976) .

Per quanto riguarda la specie bovina, nel 1967 Hoffmann ha riportato il primo caso di aneuploidia autosomica in un vitello con criptorchidismo; nel 1968 Herzog e Hohn hanno riscontrato aneuploidia autosomica in un soggetto con malformazione della mascella inferiore. Mori et al. (1969) hanno dettagliatamente descritto un caso di aneuploidia autosomiale in un vitello neonato che presentava gravi alterazioni del fenotipo: forte ritardo della crescita, colonna vertebrale arcuata, mascella inferiore più corta del normale, disposizione irregolare dei denti incisivi, criptorchidismo. In tutti i casi sopra descritti non è stato possibile individuare il cromosoma presente in triplice copia, in quanto le tecniche di bandeggio cromosomico non erano state ancora perfezionate; in tutti i casi, però, si trattava di un autosoma piccolo, probabilmente, come suggerito dagli autori, il n.17 o il n. 18. Diversi casi di trisomia 23 associati a nanismo sono stati descritti in Romania, ma il cromosoma soprannumerario anche in questo caso non è stato identificato con precisione tramite tecniche di bandeggio (Gluhovschi e Bistriceanu, 1972); Herzog et al. nel 1977 hanno descritto la sindrome da trisomia 18 nel bovino, anche se l'identificazione era ancora incerta, per cui alcuni autori parlano di trisomia 17, altri di trisomia 18; questa sindrome è sempre associata con brachignatia inferiore (mandibola inferiore più corta del normale), criptorchidismo e idrocefalo. In alcuni soggetti poi venivano riscontrati altre alterazioni del fenotipo quali nanismo, curvatura della spina dorsale, ipoplasia dei reni e artrogriposi del carpo. In seguito al perfezionamento delle tecniche di bandeggio e con la successiva standardizzazione del cariotipo nella specie bovina, vengono riportati i primi casi di aneuploidia autosomale con identificazione del cromosoma implicato. Nel 1985 Mayr et al. riportano un caso di trisomia 22 in una femmina; fenotipicamente l'animale presentava ernia ombelicale, fistola dell'uraco, leggera brachignatia inferiore e sviluppo corporeo inferiore alla media. Altri casi di trisomia 22 sono stati descritti da Agerholm e Christensen nel 1993 e da Christensen e Juul nel 1999. Brachignatia è stata associata anche a trisomia del cromosoma 24 (Makinen et al., 1987); altri sintomi associati a questa trisomia erano difetti del cuore, dell'uraco e ridotta velocità di

crecita. In un gruppo di 18 femmine sterili Murakami et al. (1989) hanno evidenziato un caso di trisomia 20. La stessa trisomia è stata descritta nel 1995 da Lioi et al.; oltre a brachignatia inferiore il soggetto presentava deformazione alle gambe anteriori e posteriori, cecità e assenza di genitali esterni.

Altri casi di trisomia riportati in letteratura riguardano i cromosomi 16 (Kovacs et al., 1990), 19 (Kulikova et al., 1991), 12 (Herzog 1991), 26 in forma di mosaicismo (Ducos et al., 2000) e 28 (Iannuzzi et al., 2001). Quest'ultimo caso riguarda lo stesso soggetto precedentemente classificato come portatore di trisomia 22 da Christensen e Juul nel 1999. Utilizzando la FISH con sonde locus specifiche è stato appurato che il cromosoma soprannumerario era il realtà il n. 28. Il soggetto presentava crescita ridotta, brachignatia superiore, ipersalivazione, strabismo, clitoride di dimensioni superiori alla media e presenza di capezzoli soprannumerari (Iannuzzi et al., 2001).

Dai casi esposti risulta evidente che:

- a) le anomalie strutturali bilanciate (principalmente traslocazioni reciproche nel suino e Robertsoniane nel bovino) sono generalmente tollerate, ma determinano riduzione della fertilità, per cui è importante effettuare degli screening citogenetici sulla popolazione, ed in modo particolare sui maschi in riproduzione, per evitare che tali anomalie vengano diffuse nella popolazione a mezzo dell'inseminazione strumentale;
- b) le anomalie numeriche dei cromosomi sessuali sono compatibili con la vita, ma determinano fenotipi variabili a livello di apparato riproduttore e quasi sempre si osserva una riduzione della fertilità;
- c) le anomalie numeriche degli autosomi quasi sempre non sono compatibili con la vita e determinano morte embrionale precoce; negli animali adulti sono stati riportati casi di trisomie, ma sempre per autosomi piccoli, con un numero ridotto di geni e sempre accompagnate a gravi alterazioni del fenotipo;

1.3.2 Anomalie cromosomiche negli embrioni

I primi studi sull'assetto citogenetico degli embrioni negli animali domestici risalgono alla fine degli anni '60; da quegli anni in poi furono sviluppate le tecniche per la preparazione diretta dei cromosomi a partire da embrioni allo stadio di pre-impianto nel topo (Tarkowski, 1966), suino (McFeely, 1967; McGaughey e Polge, 1971), bovino (McFeely e Rajakoski, 1968; King et al., 1979; Hare et al., 1980) e pecora (Long, 1977; Long e Williams, 1978). La principale limitazione di questo tipo di analisi era il basso numero delle piastre metafasiche ottenibili per l'analisi; dagli embrioni, che a seconda dello stadio di analisi hanno un numero cellulare variabile tra 2 e 150 circa (King, 2008) si ottenevano solo una o due piastre utilizzabili per lo studio dell'assetto cromosomico. In ogni caso, nel corso degli anni, sono stati accumulati numerosi dati in diverse specie.

Nel 1980 Long e Williams hanno riscontrato, su 89 embrioni di pecora prodotti 'in vivo' e recuperati 3 giorni dopo l'accoppiamento, 1 embrione mixoploide $2n/1n$ (1.12%) e 4 embrioni trisomici $2n+1$ (4,7%). Gli stessi autori nel 1982 hanno studiato l'assetto citogenetico in embrioni di suino di 10 giorni, analizzando separatamente le cellule del trofoblasto e dell'embrioblasto (Inner cell mass-ICM) e riscontrando una incidenza di mixoploidia rispettivamente del 47.4% e 5.1%, rispettivamente, dimostrando in tal modo che le cellule poliploidi negli embrioni si localizzano principalmente nel trofoblasto, il quale non darà origine al feto ma agli annessi embrionali. Uno studio simile è stato realizzato nel bovino (Iwasaki et al., 1990); in questo caso l'incidenza di embrioni con anomalie cromosomiche nella ICM era del 18.2% per quelli coltivati in vitro e del 22.2% per quelli ottenuti in vivo; gli stessi autori successivamente (Iwasaki et al., 1992) hanno analizzato 192 embrioni di bovino prodotti in vitro allo stadio di 2-32 cellule e 104 allo stadio di blastocisti riscontrando anomalie nel 12.1% dei casi allo stadio di 2 cellule, 10.0-36.4% a 4-16 cellule, 7.1% a 17-32 cellule e 44.2% a blastocisti. Le anomalie che interessavano l'ICM sono state riscontrate nel 18.6% dei casi.

Nel 1996 Kawarsky et al. hanno studiato le anomalie cromosomiche in embrioni bovini di 2 e 5 giorni prodotti in vitro utilizzando il seme di 2 animali normali e di 1 animale portatore di traslocazione Robertsoniana 1;29. I risultati indicano un'incidenza di aneuploidia (presenza di 1 cromosoma in più o in meno) in circa il 9% negli embrioni ottenuti dal seme di animali normali e del 23% in quelli ottenuti dal seme del toro con traslocazione; l'incidenza di variazioni nella ploidia (embrioni aploidi, poliploidi e mixoploidi) era del 24% in embrioni ottenuti dal seme di animali normali e del 21% in embrioni ottenuti dal seme del toro con traslocazione.

In un altro studio condotto utilizzando metodi convenzionali Ocana-Quero et al. (1999) riportano, in embrioni prodotti in vitro, il 18% di anomalie cromosomiche così raggruppate: 8% aploidia, 2% aneuploidia, 8% poliploidia.

Nella capra gli embrioni prodotti in vitro hanno un'incidenza molto elevata di anomalie cromosomiche stimata intorno al 60%, attribuibile alle difficoltà tecniche nella metodica di IVP in questa specie (Villamediana et al., 2001). Nel 40% degli embrioni suini prodotti in vitro, il 40% sono state riscontrate anomalie cromosomiche, principalmente rappresentate da poliploidia e mixoploidia; inoltre è stato visto che gli embrioni citogeneticamente anormali presentavano un numero inferiore di cellule rispetto a quelli con corredo cromosomico normale $2n$ (McCauley et al., 2003). Sia nel bovino (Kawarsky et al., 1996) che nel suino (McCauley et al., 2003), il tasso di sviluppo embrionale è influenzato dall'assetto cromosomico e risulta essere inferiore per gli embrioni aploidi e poliploidi, intermedio per quelli aneuploidi e maggiore in embrioni con assetto cromosomico normale diploide o mixoploide.

Tutti questi studi, nonostante la limitazione del numero di cellule per embrione analizzate, hanno messo in luce che l'anomalia più frequente negli embrioni è la mixoploidia $2n/4n$, anche se sono stati osservati casi di mixoploidia $2n/3n$ e $2n/n$ (King, 2008). L'introduzione della ibridazione fluorescente in situ (FISH) ha reso possibile, successivamente, l'analisi di

tutte le cellule (sia in metafase che in interfase) che compongono il singolo embrione. Sono quindi stati accumulati dati sull'incidenza di embrioni anormali nelle varie specie, in relazione anche al metodo di produzione (in vivo, in vitro o clonazione). La tabella 1 sintetizza i risultati finora ottenuti (King, 2008).

Specie	Metodo di produzione ^a			Referenza
	FA/N	IVF	SCNT	
Pecora	19.6	65.3	56.2	Alexander et al., 2006; Coppola et al., 2007
Bovino	25.0	72.2	76.8	Viuff et al., 1999; Booth et al., 2003
Bovino	-	25.7	42.8	Bureau et al., 2003
Cavallo	18.2	40.0	-	Rambags et al., 2005
Suino	11.4	-	-	Zudova et al., 2003

^a FA/N= fecondazione artificiale o accoppiamento naturale; IVF= fertilizzazione in vitro; SCNT= trasferimento nucleare di cellule somatiche (clonazione)

Tabella 1 – Percentuale di embrioni con anomalie cromosomiche in base al metodo di produzione.

In embrioni prodotti in vivo, la percentuale di anomalie cromosomiche varia tra l'11% nel suino (Zudova et al., 2003) al 25 % nel bovino (Viuff et al., 1999); in embrioni fecondati in vitro questa percentuale aumenta e varia dal 40% nel cavallo (Rambags et al., 2005) al 72% nel bovino (Viuff et al., 1999), fino a raggiungere, per questa specie, quasi il 77% negli embrioni ottenuti tramite clonazione (Booth et al., 2003) La maggioranza degli embrioni anormali è risultata essere mixoploide, e quindi contenente una % di cellule con corredo cromosomico normale 2n e una % con corredo sbilanciato (n, 3n o 4n). Non è chiaro il destino di questi embrioni mixoploidi; da un lato si pensa (Magli et al., 2000) che esista un livello soglia di cellule anormali tollerate, al di sopra del quale gli embrioni vengono eliminati. Questo giustificherebbe, in base ai dati riportati in tabella 1, le basse percentuali di gravidanze ottenute impiantando embrioni prodotti tramite IVF e clonazione, per i quali l'incidenza di anomalie cromosomiche è maggiore. Altri autori suggeriscono che le cellule poliploidi embrionali vengono progressivamente eliminate dall'embrione in sviluppo o vengono relegate nel trofoblasto ed eventualmente, come conseguenza, nella placenta. A favore di questa tesi è

stato visto che l'incidenza di cellule apoptotiche aumenta in concomitanza con lo sviluppo dell'embrione in modo particolare in quelli prodotti tramite IVF e clonazione (Gjorret et al., 2005). Per quanto riguarda l'incidenza di embrioni aneuploidi (corredo genetico $2n-1$ o $2n+1$) non sono disponibili numerosi studi; nel bovino i valori riportati variano tra il 2% (Ocana-Quero et al., 1999) e il 9% (Kawarsky et al., 1996); nel suino Zudova et al. (2003) hanno stimato un valore più elevato, pari al 16.2%. Il fatto che negli animali adulti si osservi un'incidenza di aneuploidie dello 0.17% (Halnan, 1976) indica chiaramente che questi embrioni non hanno la possibilità di svilupparsi e che vengono eliminati nelle prime fasi di impianto e gravidanza. Anche negli animali domestici, quindi, come nell'uomo, le aneuploidie sono tra le cause principali di morte embrionale e fetale. Esiste inoltre una notevole differenza nel tasso di anomalie cromosomiche tra embrioni prodotti in vitro e in vivo; tale differenza è attribuibile alle condizioni di coltura o a influenze epigenetiche che alterano il normale processo di sviluppo embrionale.

1.3.3 Anomalie cromosomiche negli spermatozoi

L'organizzazione della cromatina nel nucleo dello spermatozoo è complessa ed è abbastanza differente da quella che si riscontra nelle cellule somatiche. Innanzitutto, a causa dell'inattivazione del genoma spermatico, il grado di metilazione è notevolmente superiore; inoltre gli istoni, le proteine che legano il DNA, sono sostituiti dalle protammine (Meistrich et al., 1976; Warrant e Kim, 1978; Balhorn, 1982), piccolissime proteine altamente basiche con pesi molecolari che variano da 4.000 a 6.000 KDa. Questa sostituzione è un fattore importante in quanto permette una maggiore condensazione della cromatina nella testa dello spermatozoo, il che riduce l'energia richiesta per spingere le cellule spermatiche attraverso un mezzo acquoso. Le protammine dei mammiferi sono infatti ricche di residui di arginina e cisteina, che, formando tra di loro ponti disolfuro (S-S) (Balhorn et al., 1991), permettono una maggiore condensazione del DNA, che è stimato essere circa 6 volte più compattato rispetto alle cellule somatiche (Wyrobek et al., 1976). L'elevato grado di condensazione dei cromosomi ha costituito il limite principale per l'analisi citogenetica delle cellule spermatiche; il primo metodo per la visualizzazione dei cromosomi all'interno del nucleo spermatico è stato messo a punto nell'uomo da Rudak et al. (1978) e consisteva nella fecondazione interspecifica in vitro di ovociti di hamster con spermatozoi umani. Il citoplasma di ovociti maturi di hamster si è rivelato essere in grado di decondensare la cromatina spermatica fortemente compattata degli spermatozoi. A causa della differenza di specie il processo di fecondazione si arresta e non avviene la fusione dei 2 pronuclei, consentendo in tal modo di indagare il contenuto cromosomico di singoli spermatozoi. La stessa metodologia è stata successivamente applicata per analizzare i nuclei spermatici negli animali domestici quali bovino (Tateno et al., 1986; Tateno e Mikamo, 1987; Creighton e Houghton, 1986; Tateno et al., 1994; Ramesha e Goswami, 1995), suino (Creighton e Houghton, 1987; Bird e Houghton, 1990; Benkhalifa et al., 1992), pecora (Tateno et al., 1990) e bufalo (Ramesha e Goswami, 1994). La maggior parte di questi studi mirava alla

identificazione dei cromosomi sessuali, per determinare le percentuali di spermatozoi portatori del cromosoma X o Y o per studiare la segregazione durante la meiosi in animali portatori di traslocazione. La principale limitazione di questo metodo era l'estrema laboriosità, che consentiva l'analisi di un numero molto limitato di cellule spermatiche, nell'ordine delle decine o poche centinaia. In un solo studio (Ramesha e Goswami, 1995) viene riportata l'incidenza di spermatozoi aneuploidi nel bovino, risultata pari al 14.28%. L'introduzione della tecnica FISH ha reso lo studio del contenuto cromosomico degli spermatozoi molto più veloce, consentendo, con un'unica reazione di ibridazione, l'analisi di migliaia di cellule, ed eliminando la necessità della coltura di cellule ovocitarie per la fecondazione interspecifica. Nel 1991 Schwerin et al. hanno aperto la strada mettendo a punto un protocollo per la visualizzazione del cromosoma Y in spermatozoi bovini utilizzando il metodo della timidina triziata. Mentre nell'uomo la disponibilità di sonde cromosoma-specifiche commerciali ha dato la possibilità di investigare l'incidenza di aneuploidie per i diversi cromosomi in soggetti normali, ipofertili o infertili, in relazione anche a stili di vita e esposizione a sostanze chimiche e inquinanti, negli animali domestici la mancanza di sonde specifiche ha limitato di molto le possibilità di investigazione. La maggior parte dei lavori presenti in letteratura hanno un approccio di tipo metodologico, mentre pochi riportano i dati sull'incidenza di aneuploidie (Hassanane et al., 1999; Rubes et al., 1999; Di Bernardino et al., 2004) e solo limitatamente a pochi cromosomi: X e Y nel bovino, pecora, capra e bufalo, 1-10 e Y nel suino.

Spermatozoi di bovino, suino e bufalo sono stati oggetto di indagine FISH per individuare la presenza del cromosoma Y (Kobayashi et al., 1999; Kawarasaki et al., 1995; Habermann et al., 2005) o per discriminare tra spermatozoi con cromosoma X e Y (Rens et al., 2001; Piumi et al., 2001; Revay et al., 2002; Parrilla et al., 2003; Revay et al., 2003).

Nel 1999 Rubes et al. hanno utilizzato la tecnica FISH per studiare l'incidenza di aneuploidie per i cromosomi 1, 10 e Y in spermatozoi di suino che è risultata essere dello 0.075 %, 0.067

%, e 0.094 %, rispettivamente. L'incidenza totale di aneuploidie (disomie e nullisomie) per tutti i cromosomi dedotta dai dati ottenuti è quindi del 3%, mentre la frequenza di spermatozoi diploidi in questa specie è dello 0.177%. Hassanane et al. (1999) utilizzando un metodo FISH bicolore con sonde specifiche per i cromosomi sessuali riportano i valori dell'incidenza di aneuploidie dei cromosomi sessuali nel bovino: spermatozoi disomici XX, YY e XY hanno una frequenza dello 0.07%, 0.03% e 0.03%. L'incidenza di spermatozoi diploidi è risultata dello 0.05%. Nel 2004 Di Berardino et al. hanno dimostrato che le sonde bovine Xcen (centromerica) e Y ottenute mediante microdissezione cromosomica e DOP-PCR potevano essere utilizzate per indagare l'assetto cromosomico, relativamente ai cromosomi sessuali, anche nella pecora, capra e bufalo. Inoltre riportano interessanti differenze tra queste specie per quanto concerne la frequenza di spermatozoi disomici XX, XY e YY e di spermatozoi diploidi. La frequenza totale di spermatozoi anormali (disomici+diploidi), stimata su un campione di 3 soggetti e analizzando 1000 spermatozoi per animale, è risultata maggiore nella capra di razza Sarda (0.393%), seguita dal bufalo tipo river di razza Mediterranea Italiana (0.224%), dal bovino di razza Frisona Italiana (0.096%) e dalla pecora di razza Laticauda (0.033%). L'anno successivo Di Berardino et al. hanno determinato con maggiore precisione la frequenza di aneuploidie dei cromosomi sessuali in 5 bufali tipo river di razza Mediterranea Italiana, estendo l'analisi a 10.000 spermatozoi per animale. La frequenza media di spermatozoi disomici XX, XY e YY era dello 0.20%, 0.05% e 0.02%, rispettivamente. L'incidenza media di spermatozoi diploidi era dello 0.21%.

Bonnet-Garnier et al. (2006) riportano nel bovino un'incidenza di spermatozoi disomici per i cromosomi 1 e 29 dello 0.05% e 0.06%, rispettivamente; tuttavia questi dati si riferiscono ad un solo animale utilizzato come controllo in uno studio che mirava ad indagare la segregazione meiotica in animali portatori della traslocazione rob (1;29). Anche altri autori hanno utilizzato la metodica FISH per studiare la segregazione dei cromosomi in spermatozoi

di suini e bovini portatori di traslocazioni (Pinton et al., 2004a; 2004b; 2005; 2007; 2008; Bonnet-Garnier et al., 2004; Massip et al., 2008).

Come si evince dall'analisi letteratura c'è una generale mancanza di dati rispetto all'incidenza di aneuploidie negli spermatozoi degli animali domestici, nonostante diversi studi, nell'uomo, hanno dimostrato, in soggetti infertili ma cromosomicamente normali, un aumento del tasso di aneuploidie spermatiche, dovuto principalmente ad iperaploidia dei cromosomi sessuali e a diploidia; inoltre l'incidenza di tali aneuploidie è inversamente proporzionale alla concentrazione spermatica dell'eiaculato e alla motilità totale degli spermatozoi in pazienti affetti da oligoastenozoospermia (Egozcue et al., 2000a; 2000b; Vegetti et al., 2000). Nel bovino i dati disponibili si riferiscono tutti a soggetti di razza Frisona: 5 animali (10.000 sp./animale) nel lavoro di Hassanane et al. del 1999, 3 animali (1.000 sp./animale) in quello di Di Bernardino et al. del 2004.

1.3.4 Anomalie cromosomiche negli ovociti

La maggior parte dei lavori sull'assetto citogenetico degli ovociti negli animali domestici sono stati realizzati utilizzando metodi convenzionali. Questo ha consentito di definire con precisione l'incidenza di ovociti diploidi nelle diverse specie, mentre per quanto riguarda però l'incidenza di ovociti aneuploidi sono molto pochi i lavori che riportano tale dato, e, ad eccezione di quelli che utilizzano la metodica FISH, non viene identificato il cromosoma sopranumerario, rendendo di fatto impossibile indagare circa l'esistenza di differenze intercromosomiali nel tasso di non-disgiunzione.

Il primo lavoro sull'analisi citogenetica di ovociti negli animali domestici è del 1967 ad opera di Baker e Franchi che hanno studiato la struttura dei cromosomi in ovociti primordiali di bovino. Nel 1971, McGaughey e Polge hanno invece analizzato per la prima volta l'assetto cromosomico in ovociti di suino maturati in vitro, riscontrando un'incidenza di aneuploidia del 3.4% e di diploidia del 12.2%. Successivamente, nel 1974, Jagiello et al. hanno analizzato

il numero di chiasmate per cromosoma e il comportamento alla segragazione in ovociti di pecora e bovino coltivati in vitro; il numero medio di crossingover per bivalente è risultato essere di 1.30 e di 1.19 rispettivamente per la pecora e il bovino. Nel 1977 McGaughey ha investigato gli effetti sulla maturazione nucleare di ovociti suini della supplementazione di progesterone ed estradiolo, scoprendo che questi aumentavano la percentuale di ovociti normali se utilizzati simultaneamente mentre inducevano aumenti di diploidia e aneuploidia se usati singolarmente. Nel 1983 Mikhaïlenko et al. hanno analizzato l'assetto citogenetico in ovociti di bovino in relazione alla loro morfologia e alla capacità di maturazione in vitro, indicando l'esistenza di una relazione tra morfologia dell'ovocita e capacità di sviluppo in vitro. Moor e Crosby (1985) hanno dimostrato gli effetti negativi delle basse temperature sulla maturazione nucleare di ovociti di pecora e sul seguente sviluppo embrionale post-impianto in vivo. L'esposizione a basse temperature durante la maturazione causa una riduzione dello sviluppo a blastocisti dal 44% fino al 6% quando l'esposizione avviene tra le 12 e le 15 ore dall'inizio della maturazione ovocitaria.

Suss et al. (1988) hanno analizzato la sequenza temporale della segragazione cromosomica in ovociti di bovino maturati in vitro, trovando che il 75% degli ovociti raggiunge la metafase II dopo 20 ore di coltura e dimostrando che la supplementazione di FSH (ormone follicolo stimolante) causa un ritardo nella condensazione cromosomica di circa 3 ore. Nello stesso anno King et al. hanno analizzato citogeneticamente ovociti di bovino partenogenetici attivati in vitro; circa il 75% degli ovociti attivati sono risultati essere aploidi. Nel 1989 Fuhrer et al. hanno analizzato la configurazione cromatinica di ovociti bovini in base al diametro del follicolo di provenienza, osservando un aumento nella percentuale di ovociti normali quando il diametro follicolare è compreso tra i 3 e gli 8 mm. Nel cavallo (King et al., 1990) l'incidenza di ovociti disomici e diploidi è risultata essere rispettivamente del 5.5% e 2.7%. Su un totale di 836 ovociti bovini analizzati Yadav et al. (1991) riportano una percentuale di maturazione del 72% e un'incidenza di ovociti aneuploidi e diploidi del 5.8% e 10.7%. Nel

suino la frequenza di non disgiunzione varia tra l' 11.9% e il 21.6% in scrofette rispettivamente al primo e al terzo estro (Koenig e Stormashak, 1993). La maggiore incidenza di ovociti aneuploidi spiegherebbe, in parte, il maggiore tasso di mortalità embrionale in scrofette inseminate al primo estro, rispetto a quelle inseminate negli estri successivi al primo.

Nel 1995 Ectors et al. hanno studiato l'assetto citogenetico di ovociti bovini maturati in vitro e classificati in base al diametro del follicolo di provenienza; la percentuale di ovociti anormali è risultata essere di circa il 3% e non sono state riscontrate differenze legate al diametro follicolare. Nel 1996 Sosnowski et al. hanno investigato lo stadio meiotico di ovociti di bovino maturati in vitro, riportando una efficienza di maturazione del 74.1% ed un'incidenza di ovociti diploidi del 12.4%. Nello stesso anno Lechniak et al. riportano, sempre nel bovino, l'esistenza di differenze interindividuali nella percentuale di ovociti diploidi. Yadav et al. (1997) hanno determinato i tempi ottimali di maturazione in vitro di ovociti di capra, pecora e bufalo, che sono risultati essere rispettivamente di 32, 30 e 24 ore.

Sempre nel 1997 Sosnowski et al. hanno studiato la progressione meiotica in ovociti di cavallo maturati in vitro. Le percentuali maggiori (75%) di maturazione si ottenevano dopo 36 ore, mentre a 24 ore raggiungeva la maturazione solo il 42% degli ovociti. La frequenza di aneuploidia in ovociti di bovino maturati in vitro riportata da Lechniak e Switonski (1998) è del 7.1%. Nello stesso anno Lechniak et al. riportano i risultati dell'analisi citogenetica di ovociti bovini partenogenetici; il 37.5% mostra anomalie cromosomiche e in particolare aploidia (25%), triploidia (4.2%) e tetraploidia (8.3%). Nel 1999 Ocana-Quero et al. hanno analizzato l'influenza del diametro follicolare, del terreno di maturazione, della temperatura e del tempo di incubazione sull'incidenza di ovociti diploidi nel bovino. La più alta incidenza di diploidia era legata alla più alta concentrazione di siero estrale contenuta nel terreno di maturazione, alla più bassa temperatura di coltura e al prolungamento del tempo di incubazione (48h). Inoltre è stato visto che la crioconservazione degli ovociti a basse temperatura comporta alterazioni nell'arrangiamento dei cromosomi sul fuso mitotico. Dopo

lo scongelamento, meno del 31% degli ovociti mostra un arrangiamento cromosomico normale, rispetto al 90% degli ovociti non sottoposti a nessun trattamento (Saunders e Parks, 1999).

Nel 2001 Vozdova et al. hanno sviluppato un metodo FISH per studiare l'incidenza di aneuploidia di specifici cromosomi in ovociti suini maturati in vitro; utilizzando sonde specifiche per il cromosoma 1 e 10 hanno trovato una frequenza di disomia per questi 2 cromosomi del 3%, il che porta a stimare un'incidenza totale di ovociti disomici per questa specie del 27%. La frequenza di ovociti diploidi è risultata invece del 27.7%; questo significa che più della metà degli ovociti suini prodotti in vitro è geneticamente sbilanciata. Utilizzando metodi convenzionali Lechniak et al. (2002) hanno studiato, nel bovino, la relazione esistente tra diametro dell'ovocita e ploidia, trovando che gli ovociti aploidi hanno un diametro maggiore rispetto a quelli diploidi. Nel suino, invece, non sembra esistere una relazione che leghi il diametro dell'ovocita con la sua ploidia (Lechniak et al., 2005). Sosnowski et al. (2003) hanno messo in relazione l'incidenza di anomalie cromosomiche in ovociti di suino con il tempo di incubazione; la maggior parte di ovociti diploidi e aneuploidi si riscontra dopo 40h di incubazione, mentre il tempo ottimale di coltura è risultato essere di 36h. Questi autori riportano una frequenza di aneuploidia e di diploidia del 4.9% e 12.8%. Nel 2005 Roth e Hansen hanno dimostrato gli effetti negativi dell'esposizione di ovociti bovini in maturazione alle alte temperature. In seguito all'esposizione a 41°C per le prime 12 ore di incubazione, la maggior parte degli ovociti presentava arresto della meiosi o disorganizzazione dei cromosomi lungo il fuso meiotico. Nel 2005 Pinton et al. hanno utilizzato la metodica FISH per studiare la segregazione meiotica in 2 scrofe portatrici di due diverse traslocazioni reciproche, riportando una frequenza di ovociti bilanciati del 67.6% e del 59.4%. Allo stesso modo Bonnet-Garnier et al. (2008) hanno calcolato, in bovine portatrici di traslocazione Robertsoniana 1;29 una frequenza di gameti bilanciati del 74.1% e di quelli sbilanciati del 4.06%, mentre gli ovociti diploidi erano pari al 21.8%. Lechniak et al. (2007) hanno utilizzato

la tecnica FISH con sonde specifiche per i cromosomi 1 e 10 per studiare le differenze nel tasso di anomalie cromosomiche in ovociti ottenuti da scrofe adulte o prepuberi; mentre la frequenza di diploidia è risultata simile (intorno al 25%) la frequenza di ovociti aneuploidi, per i 2 cromosomi analizzati, differiva in maniera significativa, essendo del 10.8% nelle scrofe prepuberi e dell'1.3% in quelle adulte. Questi dati indicano ancora una volta l'alta percentuale di ovociti anormali; estendendo i valori ottenuti da questi autori per i cromosomi 1 e 10 a tutti gli autosomi si evince che quasi il 57% degli ovociti di suino prodotti in vitro è aneuploide.

Nel bovino mancano completamente dati sull'incidenza di aneuploidia negli ovociti per singoli cromosomi. Dai dati sopra riportati la percentuale di ovociti aneuploidi è di circa il 6-7% (Yadav et al., 1991; Lechniak e Switonski, 1998), mentre quella di ovociti diploidi è del 10-12% (Yadav et al., 1991; Sosnowski et al., 1996).

1.4 Meccanismi di formazione delle anomalie cromosomiche

1.4.1 Meccanismi di formazione delle anomalie strutturali

Lo scambio di materiale genetico tra cromatidi fratelli e cromosomi omologhi è un prerequisito per il normale svolgersi del processo meiotico. Se questo scambio avviene tra regioni cromosomiche non omologhe si potranno formare dei riarrangiamenti strutturali. Questo scambio non omologo può avvenire tra cromatidi fratelli (intracromosomiale), tra cromosomi omologhi (intercromosomiale) o tra due cromosomi differenti. Sono state formulate diverse ipotesi per spiegare la genesi dei riarrangiamenti strutturali, come ad esempio l'ipotesi rottura-riunione (Wolff, 1961; Evans, 1962) e l'ipotesi dello scambio (Revell, 1963). L'utilizzo di tecniche di citogenetica molecolare ha consentito di chiarire diversi aspetti del meccanismo di formazione delle anomalie strutturali dovute a rotture cromosomiche, per la formazione delle quali sono necessari almeno tre passaggi.

- 1) Una rottura cromosomiale da inizio al processo; questa può originare spontaneamente o a causa dell'azione di sostanze mutagene;
- 2) Se la sequenza nella quale ha avuto origine la rottura contiene delle sequenze ripetute all'interno del genoma, queste potranno interagire con sequenze presenti su cromosomi diversi o in un'altra regione dello stesso cromosoma;
- 3) L'appaiamento tra sequenze omologhe appartenenti a locus diversi potrà risultare nella formazione di un riarrangiamento strutturale, la cui natura dipenderà dal modo in cui la rottura viene riunita, dalla localizzazione, grandezza e orientamento delle regioni omologhe di appaiamento e dal numero di eventi di crossing-over che avverranno.

L'appaiamento tra sequenze omologhe presenti in alleli diversi può essere quindi alla base della formazione di anomalie strutturali durante la fase di crossing over (NAHR - ricombinazione omologa non allelica). Duplicazioni e delezioni potranno verificarsi a seguito di eventi di NAHR tra cromosomi omologhi o cromatidi fratelli. Se l'evento di NAHR avviene tra sequenze presenti sullo stesso cromatidio si formeranno delezioni o inversioni. Le traslocazioni invece possono originarsi da eventi di NAHR tra differenti cromosomi (Gersen and Keagle, 2005).

1.4.2 Meccanismi di formazione delle anomalie numeriche

Il processo meiotico è estremamente conservato tra gli organismi eucarioti; attraverso la meiosi vengono generati 2 gameti aploidi mediante un processo specializzato di divisione cellulare che consiste in un ciclo di replicazione del DNA seguito da due divisioni cellulari. La prima divisione, o meiosi I (MI) implica la segregazione dei 2 cromosomi omologhi, mentre durante la meiosi II (MII) la segregazione riguarda i 2 cromatidi fratelli e può quindi essere considerata analoga ad una divisione mitotica. Nel corso della profase I i cromosomi

omologhi si appaiano, formando le sinapsi, e vanno incontro al processo di ricombinazione. Affinchè nel corso della prima divisione avvenga la segregazione dei cromosomi omologhi piuttosto che dei cromatidi fratelli, sono necessari particolari accorgimenti:

- a) il mantenimento delle connessioni fisiche tra i due cromosomi omologhi fino all'anafase I, che viene realizzato dai siti di ricombinazione o chiasmata;
- b) la formazione di una qualche costrizione sui centromeri dei cromatidi fratelli, per garantire che questi migreranno verso lo stesso polo, invece che verso poli opposti;

Gli errori della segregazione cromosomica possono avvenire sia nella prima che nella seconda divisione meiotica, ma si è visto che questi avvengono principalmente durante la prima divisione (Hassold e Hunt, 2001). Questi errori vengono comunemente indicati con il termine di non-disgiunzione, ma sono possibili diversi meccanismi di segregazione errata. Come illustrato nella figura 3, un fallimento nello scioglimento della chiasmata tra i cromosomi omologhi nel corso della anafase I porterà ad una non-disgiunzione 'pura', in quanto entrambi gli omologhi migreranno verso lo stesso polo. Uno scioglimento prematuro della chiasmata, o il fallimento nella sua formazione, farà in modo che gli omologhi segregheranno in maniera indipendente nel corso della anafase I, venendo a mancare quelle connessioni fisiche necessarie affinché il processo si svolga senza errori. Se entrambi migreranno allo stesso polo, si parlerà di non-disgiunzione 'achiasmatica' (Hassold e Hunt, 2001). Oltre che gli omologhi, gli errori della MI possono interessare anche i cromatidi fratelli. Una separazione prematura dei cromatidi fratelli (PSSC-premature separation of sister chromatid) nel corso della prima divisione potrà, eventualmente, comportare la migrazione di un intero cromosoma e di un singolo cromatidio allo stesso polo, mentre verso il polo opposto migrerà solo uno dei due cromatidi separati precocemente. Quindi in seguito a PSSC potrà o meno generarsi una aneuploidia nelle cellule figlie a seconda del comportamento dei due cromatidi liberi nel corso della anafase I. Gli errori della MII, invece, sono tipicamente attribuiti al fallimento della

separazione dei due cromatidi fratelli (Figura 3). Gli effetti dei differenti eventi di non-disgiunzione sulla formazione dei gameti sono rappresentati in figura 4.

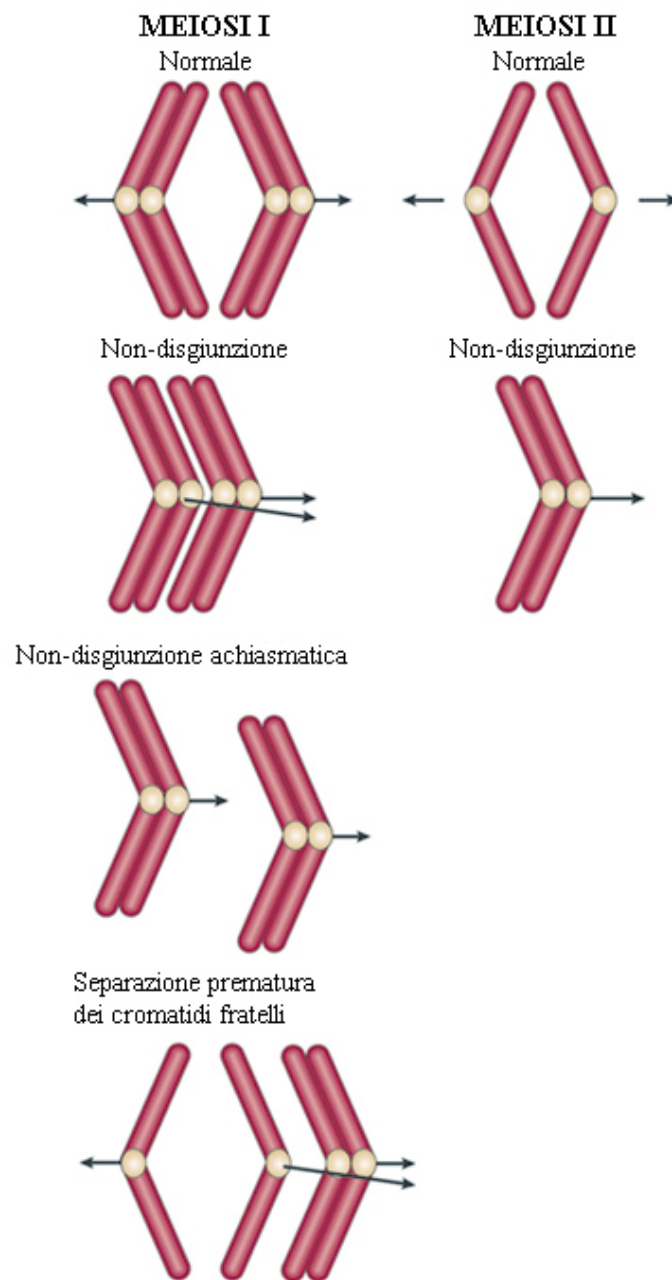


Figura 3 – Meccanismi di segregazione normali e anormali nel corso della meiosi I e meiosi II

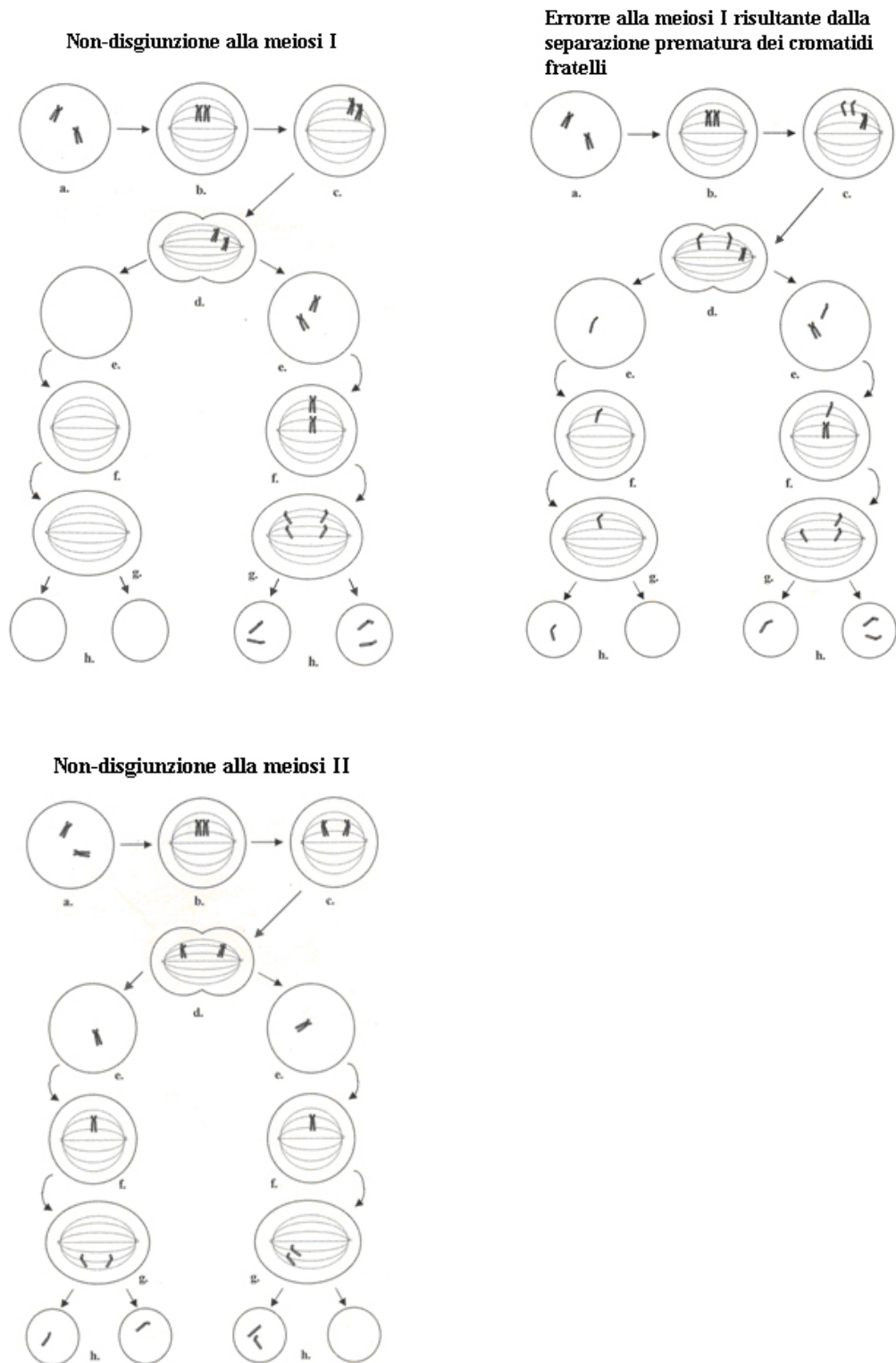


Figura 4 – Gameti risultanti da eventi di non-disgiunzione in meiosi I, dalla separazione prematura dei cromatidi fratelli e da non-disgiunzione in meiosi II (da Gersen and Keagle, 2005)

Nell'uomo sono stati realizzati numerosi studi per indagare l'origine (materna o paterna) e la fase in cui si generano (MI o MII) delle principali trisomie. È stata quindi messa in luce l'esistenza di una notevole variazione tra i diversi cromosomi; gli errori paterni sono la causa di circa il 50% dei casi di trisomia XXY e di trisomia 2, ma solo del 5-10% dei casi per le trisomie che interessano gli altri cromosomi. Allo stesso modo la percentuale di trisomie dovute a errori in MI o in MII varia a seconda del cromosoma preso in considerazione. Tra le trisomie di origine materna, ad esempio, quasi tutti i casi sono dovuti ad errori in MI, mentre le trisomie dei cromosomi sessuali sono associate, in un terzo dei casi, con errori in MII, che riguardano anche più della metà dei casi di trisomia 18 (Bugge et al., 1998; Hassold et al., 1995). Al di là di queste differenze, comunque, gli errori predominanti sono quelli che avvengono nel corso della MI materna. Come detto la ricombinazione tra i cromosomi omologhi gioca un ruolo importante nel corso della meiosi perchè garantisce il mantenimento di una connessione fisica tra gli stessi. Disturbi nel corso del processo di ricombinazione (riduzione o assenza di scambi) sono associati ad eventi di non-disgiunzione. Non solo il numero, ma anche il punto di ricombinazione sembra giocare un ruolo importante nel garantire la corretta segregazione. In studi meiotici utilizzando cromosomi artificiali di lievito (YAC) è stato visto che cromosomi con un solo scambio terminale (Ross et al., 1996) o pericentromerico (Sears et al., 1995) sono più propensi ad andare incontro ad eventi di non-disgiunzione. Allo stesso modo, nell'uomo è stata riportata una assenza o riduzione di ricombinazione nella genesi di diverse trisomie; ad esempio circa il 40% dei casi di trisomia 21 di origine materna sono dovuti ad assenza di formazione della chiasmata (Lamb et al., 1997). Sono stati inoltre riportati casi di trisomia 21 di origine materna in fase MII in cui si assisteva ad un aumento della frequenza di ricombinazione per questo cromosoma nella regione pericentromerica (Lamb et al., 1996). Poichè il processo di ricombinazione (che avviene in MI) influenza il comportamento dei cromosomi in MII, diversi autori si sono interrogati sulla reale esistenza di eventi di non-disgiunzione in MII, o se questi sono

semplicemente il risultato di alterazioni che iniziano in MI ma i cui effetti si rendono manifesti nella MII. Anche in questo caso si è visto che i diversi cromosomi non si comportano allo stesso modo: mentre questo modello sembra vero per il cromosoma 21, nel caso del cromosoma 18 e dei cromosomi sessuali non si osservano alterazioni (nel numero e nella posizione) degli eventi di ricombinazione nei casi di trisomia attribuiti a errori in MII (Hassold e Hunt, 2001).

1.5 Cause principali nella genesi delle anomalie cromosomiche

Le anomalie cromosomiche possono originarsi spontaneamente oppure come conseguenza dell'esposizione di un individuo ad agenti ambientali in grado di indurle. Nel primo caso potranno essere dovute, per esempio, ad errori casuali durante la divisione cellulare (King et al., 2006) o a causa della espressione dei siti fragili (nel caso delle anomalie strutturali), che sono regioni genomiche particolarmente soggette a rotture (Dekaban, 1965). Tra i principali fattori ambientali in grado di provocare variazioni nel numero o nella struttura dei cromosomi ricordiamo le radiazioni, i mutageni chimici e i mutageni biologici.

Uno dei fattori predisponenti nella genesi delle aneuploidie è poi rappresentato dall'età materna; due ipotesi cercano di spiegare questo fenomeno. La prima parte dal presupposto che l'ovocita ha la stessa età della femmina che lo ha prodotto e prevede semplicemente che gli ovociti più vecchi vadano più facilmente incontro ad errori nel corso della risoluzione della chiasmata e quindi più facilmente avverranno eventi di non-disgiunzione (Henderson and Edwards, 1968; Cheng et al., 1995). La seconda ipotesi è detta del "pool limitato di ovociti"; in base a tale ipotesi ad ogni ciclo mestruale (estrale negli animali) saranno presenti numerosi follicoli a diversi stadi di sviluppo. Solo quelli ad uno stadio ottimale completeranno la MI ed eventualmente raggiungeranno l'ovulazione; con il passare del tempo, il numero di follicoli allo stadio di sviluppo ottimale si riduce progressivamente, per cui raggiungeranno la maturazione anche ovociti che si trovano in follicoli ad uno stadio di maturazione sub-

ottimale, il che avrà come conseguenza un aumento dei fenomeni di non-disgiunzione (Kline et al., 2000).

Tra i fattori ambientali in grado di causare anomalie cromosomiche le radiazioni ionizzanti vengono classificate tra gli agenti clastogeni (in grado di indurre variazioni nella struttura dei cromosomi); le radiazioni infatti sono causa di rotture del DNA, sia a singola che a doppia elica, di rotture cromatidiche e cromosomiche. In caso di errori nel corso del processo di riparazione si genereranno delle anomalie, principalmente di tipo strutturale. Diversi studi effettuati su organismi provenienti da zone radiocontaminate (Cherobyl, Tomsk-7, Goiania ecc.) hanno confermato la relazione diretta tra l'esposizione a radiazioni e insorgenza di anomalie cromosomiche (Slozina et al., 1997; Lazutka, 1996; Hinton et al., 2007; Slovinska et al., 2004; Ryabokon and Goncharova, 2006).

Sempre più frequentemente gli uomini e gli animali sono esposti a sostanze chimiche mutagene presenti nell'ambiente di vita o nei cibi che ne costituiscono la dieta. Le emissioni delle industrie, i gas di scarico di automobili e tir, insetticidi, pesticidi e additivi utilizzati per la produzione alimentare, rappresentano dei fattori di rischio per la salute umana e animale, poiché sono in grado di indurre la formazione di anomalie cromosomiche, sia a livello di cellule somatiche che a livello di cellule germinali. Diversi studi hanno utilizzato gli animali domestici per monitorare gli effetti dell'inquinamento ambientale; utilizzando test genotossicologici (SCE, test delle rotture, test dei micronuclei) è stata messa in luce la relazione esistente tra ambiente di allevamento (in zone periindustriali o agricole) e danno genetico (Hsieh, 1982; Ahmed et al., 1998; Rubes et al., 1992; Sivikova e Dianovsky, 1995). Altri autori hanno utilizzato gli stessi test per determinare le alterazioni genetiche derivanti dall'esposizione degli animali a specifici inquinanti. Tra questi i pesticidi rappresentano una classe di sostanze a cui gli animali sono particolarmente esposti attraverso l'alimentazione. Lioi et al. (1998) hanno studiato nel bovino gli effetti genotossici di 3 pesticidi (Glifosate, Vinclozolina e DPX-E9636); tutti i composti hanno causato aumenti significativi

nell'incidenza di rotture cromosomiche e SCE. Sutiakova et al. (2004; 2006) hanno studiato gli effetti della esposizione di pecore alla clorina e ad un fungicida; in entrambi i casi hanno riscontrato nei soggetti esposti un aumento nel tasso di aberrazioni cromosomiche e di micronuclei. Nel caso delle diossine, Perucatti et al. (2006) hanno riscontrato, in pecore allevate in zone contaminate, un significativo aumento delle rotture cromosomiche e del numero di SCE, ad indicare la capacità di questa classe di composti di causare danni a livello genetico. Kadmiri et al. (2006) hanno evidenziato in linfociti provenienti da animali esposti a reflui industriali, un aumento nella frequenza dei micronuclei. Diversi autori hanno poi indagato gli effetti delle micotossine sugli animali domestici, essendo questi fortemente esposti a tali sostanze tramite l'alimentazione; sia la fumosina (De Lorenzi et al., 2005) che la fusaproliferina causano aumenti nella frequenza di micronuclei e di SCE, ed hanno quindi un effetto genotossico negli animali esposti. La micotossina zearalenone è in grado di alterare il processo di maturazione meiotica in ovociti di bovino maturati in vitro (Minervini et al., 2001).

Per quanto riguarda le sostanze mutagene che sono in grado di provocare l'insorgenza di aneuploidie nelle cellule germinali, la maggior parte delle informazioni ci arriva da studi realizzati su topi e cavie, in modo particolare per gli ovociti. Più numerosi sono gli studi che indagano, nell'uomo, la relazione tra esposizione a particolari sostanze e incidenza di aneuploidie degli spermatozoi. La diazepamina e la griseofulvina sono in grado di indurre un aumento di spermatozoi disomici e diploidi, la carbendazima e il tiabendazolo di spermatozoi diploidi, la colchicina e il triclorfon di spermatozoi disomici (Adler et al., 2002). Anche l'etoposide, il merbarone, la bleomicina e la cisplatina provocano aumenti nella frequenza di spermatozoi aneuploidi (Martin et al., 1997; Attia et al., 2002). Aumenti nel tasso di spermatozoi anormali sono stati osservati nell'uomo in seguito all'esposizione nell'ambiente lavorativo di acrilonitrile (Xu et al., 2003), benzene (Li et al., 2001) e pesticidi (Xia et al., 2004). Aumenti di cellule anormali sono stati osservati anche in seguito a particolari stili di

vita, quali consumo di alcol, di caffeina e fumo (Robbins et al., 1997). Per quanto riguarda gli ovociti, aumenti nel tasso di aneuploidia sono stati descritti in cavie a seguito dell'esposizione a colchicina, blastina solfato, nocodazolo, griseofulvina, benomile, podofillotossina, carbendazima, tiabendazolo, diazepamina, tricolorfon, taxol, ciclofosfamide, etoposide, (per una review si veda Pacchierotti et al., 2007). Un esempio degli effetti dell'esposizione anche a basse dosi a queste sostanze aneugeniche è quello del Bisfenolo A (BPA); il BPA è una delle sostanze chimiche con i maggiori volumi di produzione ed è uno dei principali componenti del policarbonato plastico, un additivo utilizzato per la fabbricazione di altri tipi di plastica, tra cui alcuni tipi utilizzati per il confezionamento di cibi e bevande. È stato dimostrato che il BPA viene ceduto dai contenitori ai cibi e alle bevande e questa è considerata la maggiore fonte di esposizione per l'uomo. Inoltre il BPA è stato trovato nell'acqua, nell'aria e nel terreno. Screening effettuati a livello di popolazione hanno riscontrato un livello medio di BPA nel sangue che varia tra i 2 e i 4 ng/ml. In seguito a studi effettuati su ovociti di femmine esposte al BPA è stato dimostrato che questo è causa un di errori nel corso della sinapsi e del crossing-over, con conseguente aumento di errori nel corso della segregazione cromosomica e dell'incidenza di aneuploidie a livello ovocitario. Queste aneuploidie saranno responsabili di aborti embrionali e fetali e della nascita di individui malformati (Hunt e Hassold, 2007). Come si evince dai dati sopra esposti, sono numerose le sostanze che causano aumenti nell'incidenza di cellule germinali aneuploidi; alcune di queste sostanze sono utilizzate a fini medici, principalmente come agenti chemioterapici o antielmintici, mentre per altre l'esposizione avviene attraverso l'ambiente e l'alimentazione (pesticidi, fungicidi, micotossine, benzene e altri inquinanti).

Gli animali domestici sono sempre più frequentemente esposti a tali sostanze ed in modo particolare a quelle utilizzate per la difesa delle colture; tali sostanze possono avere effetti che si ripercuotono direttamente sulla loro salute, e indirettamente anche su quella umana, poiché attraverso i prodotti di origine animale entrano nella catena alimentare. Dal punto di vista

strettamente zootecnico aumenti nella frequenza di aneuploidie delle cellule germinali possono essere causa di riduzione della fertilità, in quanto in grado di provocare aborti embrionali precoci, con conseguente ritorno in calore dell'animale per le specie monoovulatricci e riduzione nel numero dei nati per quelle polioovulatricci, causando in tal modo perdite economiche per l'allevatore. Per tali ragioni diventa indispensabile approfondire la conoscenza degli effetti di tale esposizione sia negli animali che nell'uomo, in modo da valutare correttamente il loro impatto sulla salute. Inoltre i dati raccolti sugli animali domestici possono essere trasferiti nel campo della ricerca biomedica, come modello da cui derivare informazioni utili nella ricerca applicata alla salute umana. Gli animali domestici, in modo particolare quelli che si alimentano al pascolo, possono inoltre essere usati come veri e propri 'bioindicatori'; monitorando un gruppo di animali nel tempo tramite opportuni test citogenetici è possibile verificare se sono intervenuti cambiamenti nell'ambiente in cui questi animali sono allevati e gli effetti sulla salute di tali cambiamenti.

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

I recenti progressi nel campo della citogenetica molecolare hanno fornito nuove metodologie per analizzare il contenuto cromosomico di spermatozoi ed ovociti. La maggior parte dei lavori presenti in letteratura riguarda cellule germinali di topo o umane, grazie alla disponibilità di sonde molecolari cromosoma-specifiche commerciali da utilizzare per l'ibridazione fluorescente in situ (FISH), mentre negli animali domestici esiste una generale mancanza di dati circa l'incidenza di anomalie nelle loro cellule germinali, principalmente a causa della mancanza di sonde commerciali.

Gli obiettivi del presente lavoro di ricerca sono pertanto stati:

1. Produrre sonde molecolari specifiche per i cromosomi X, Y e 5 di bovino mediante microdissezione cromosomica e DOP-PCR;
2. Sviluppare una metodica FISH per analizzare l'assetto cromosomico di spermatozoi ed ovociti nella specie bovina;
3. Definire l'incidenza di base di aneuploidia e diploidia nelle cellule germinali maschili e femminili in due razze bovine italiane da latte, la Frisona Italiana e la Bruna Italiana, al fine di investigare le differenze esistenti per questa specie a livello individuale, di razza e di genere.

3. MATERIALI E METODI

La metodologia utilizzata ha previsto i seguenti steps:

- a) Preparazione delle sonde painting cromosoma-specifiche
 - colture cellulari
 - allestimento dei vetrini e bandeggio cromosomico
 - microdissezione cromosomica
 - DOP-PCR
- b) Maturazione in vitro di ovociti di bovino
- c) Decondensazione dei nuclei spermatici
- d) Ibridazione fluorescente in situ su piastre metafasiche mitotiche, su spermatozoi decondensati e ovociti
- e) Analisi microscopica e raccolta dei dati
- f) Analisi statistica

3.1 Soggetti esaminati

I campioni di seme di animali di razza Frisona Italiana e di Bruna Italiana per l'analisi delle aneuploidie spermatiche sono stati forniti da 2 diversi centri genetici specializzati. Sono stati analizzati 10 animali per ognuna delle due razze e 5.000 spermatozoi per animale, per un totale di oltre 100.000 cellule spermatiche. L'età media degli animali al momento del prelievo era di 15 mesi per entrambe le razze. Il seme è stato fornito in palette che sono state stoccate a -196°C in azoto liquido fino al loro utilizzo.

L'analisi delle cellule germinali femminili è stata realizzata su animali destinati alla macellazione; l'età media degli animali era di 24 mesi. In totale sono stati analizzati 39 animali, 23 di razza Frisona e 16 di razza Bruna.

3.2 Preparazione delle sonde painting cromosoma specifiche

Colture cellulari

Per l'ottenimento delle piastre metafasiche da utilizzare per la microdissezione cromosomica sono state allestite delle colture cellulari di linfociti a partire da sangue bovino periferico. Il sangue è stato prelevato il più sterilmente possibile da bovini maschi e raccolto in vacutainer contenenti sodio eparina. I campioni sono stati trasportati al laboratorio mantenendoli ad una temperatura di +4°C. Si è quindi proceduto alla preparazione dei terreni in flasche sterili monouso; la composizione dei terreni era la seguente:

- 8 ml di RPMI 1640 (Dutch Modification) (Sigma);
- 1 ml di siero fetale bovino (Lonza);
- 100 µl di L-Glutamina (Cambrex), concentrazione finale (CF) 0.3 mg/ml;
- 150 µl di Concanavalina A (Sigma), CF 15 µg/ml;
- 40 µl di soluzione Penicillina/Streptomicina (Gibco)
- 50 U.I. (unità internazionali) di Eparina (Marvecs Pharma)

Al terreno così preparato è stato aggiunto 1ml di sangue intero. Le flasche sono state poste in incubatore termostatico a 37.5°C per 72 ore. Per bloccare la divisione mitotica in metafase, 40' prima dello scadere delle 72 ore è stato aggiunto Colcemid (Gibco) ad una concentrazione di 0.04 µg/ml. Trascorso questo tempo il contenuto delle flasche è stato trasferito in provette da 15 ml e centrifugato a 1500 rpm per 10'. Dopo aver aspirato il surnatante si è proceduto ad effettuare il trattamento ipotonico risospesendo le cellule dapprima in 2 ml e successivamente in 12 ml di soluzione KCl 0.075 M per 20' a 37.5°C. Al termine del trattamento ipotonico in ogni flasca è stato aggiunto 1 ml di Fissativo di Carnoy (3:1 metanolo:acido acetico) freddo e si è proceduto ad una nuova centrifugazione con le stesse modalità. Dopo aver aspirato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 2 ml di fissativo freddo e si è proceduto alla fissazione delle cellule risospesendole energicamente con una pipetta

pasteur. Dopo aver portato il fissativo ad un volume di 10 ml i tubi sono stati posti a 4°C per 20', dopo di che sono stati effettuati 3 lavaggi delle sospensioni cellulari operati attraverso l'aggiunta ripetuta di fissativo ghiacciato, seguita da centrifugazione e aspirazione. Dopo l'ultima centrifugazione le cellule sono state risospese in 1-2 ml di fissativo ghiacciato per ottenere la giusta concentrazione cellulare.

Allestimento dei vetrini e bandeggio GTG

4-5 gocce della sospensione cellulare così ottenuta sono state versate sia su vetrini portaoggetto che su vetrini coprioggetto 24X60 mm precedentemente lavati in etanolo, asciugati all'aria e mantenuti immersi in acqua distillata fredda. I vetrini sono stati analizzati al microscopio ottico in contrasto di fase per determinare la qualità dei preparati e il grado di concentrazione cellulare. Si è quindi proceduto all'allestimento di tutti i vetrini coprioggetto che, una volta asciutti, sono stati conservati in etanolo a -20°C fino al loro utilizzo.

Per consentire l'identificazione dei cromosomi durante la microdissezione, i preparati mitotici sono stati bandeggiati con la tecnica GTG. Brevemente, 2-3 vetrini portaoggetto conservati in etanolo sono stati asciugati all'aria e immersi in una soluzione 0.05% di tripsina (MP Biomedicals) in PBS per un tempo variabile tra 30 e 90 secondi; dopo lavaggio in PBS i vetrini sono stati colorati per 5' con una soluzione di Giemsa (Becker), 3% in acqua distillata, lavati con acqua distillata e asciugati all'aria. I vetrini portaoggetto sono quindi stati montati su appositi telaietti di plexiglass e osservati al microscopio in luce diretta; una volta determinato il tempo ottimale di trattamento con tripsina si è proceduto ad allestire gli altri vetrini con le stesse modalità.

Microdissezione cromosomica

Per la microdissezione cromosomica è stato utilizzato un microscopio rovesciato Leica DMIRB equipaggiato con tavolino rotante e micromanipolatore elettronico eppendorf. Al

microscopio è stata collegata una telecamera a colori JVC TK1280E le cui immagini vengono proiettate su di un monitor a colori; una stampante video Sony multiscan UP 930 consente di catturare le immagini e stamparle su carta termica. Il micromanipolatore Eppendorf 5171 è dotato di joystick per guidare l'ago lungo i tre assi x,y e z. Il piatto per l'inserzione del sostegno dell'ago può subire una inclinazione fino a 90°. I microaghi per la microdissezione sono stati ottenuti da capillari pieni in vetro borosilicato di 1 mm di diametro (KF Technology) utilizzando un puller a doppio stadio Narishige PC 10. Questo puller consente, attraverso variazioni della temperatura di una resistenza, di modulare il diametro delle punte a seconda degli usi, a partire da un diametro minimo di 0.5 µm.

Si descrive brevemente la metodica di microdissezione: il vetrino coprioggetto fissato al telaio di plexiglass viene montato sul tavolino rotante del microscopio con la faccia recante i cromosomi rivolta verso l'alto. Individuata una piastra metafisica utilizzando l'obiettivo 20X, si identifica il cromosoma di interesse con l'obiettivo 100X (Figura 5a) e lo si posiziona perpendicolarmente all'ago; per prelevare l'intero cromosoma si depone una goccia di acqua prima di avvicinare il microago al cromosoma e sollevarlo; se invece occorre microdissettare una specifica regione cromosomica, si effettua il taglio (Figura 5b) e solo successivamente si aggiunge l'acqua per sollevare il frammento isolato (Figura 5c). Una volta che il cromosoma o il frammento ha aderito alla punta dell'ago, questa viene rotta in un tubo da PCR contenente un apposito buffer di raccolta.

Utilizzando tale tecnica sono state prelevate e deposte in 3 tubi separati:

- 10 copie del cromosoma Y bovino;
- 10 copie della regione pericentromerica del cromosoma X bovino;
- 10 copie del cromosoma 5 bovino.

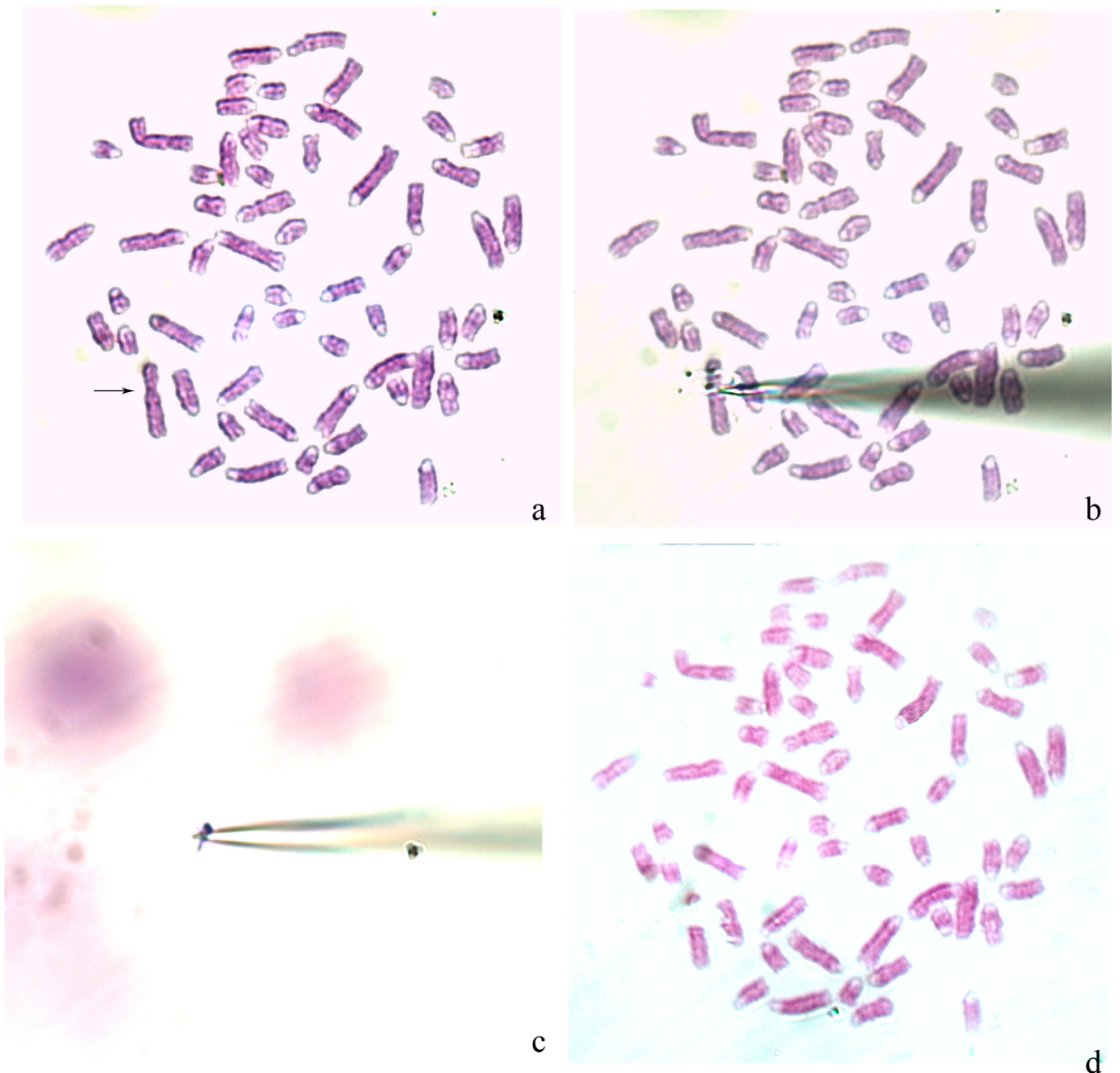


Figura 5 – Fasi della microdissezione cromosomica della regione pericentromerica del cromosoma X bovino: identificazione del cromosoma (a), taglio del frammento di interesse (b), sollevamento e raccolta del frammento (c), la stessa piastra priva della porzione microdissettata (d).

DOP-PCR (Degenerate oligonucleotide primer- polymerase chain reaction)

Una volta terminata la raccolta dei cromosomi si è proceduto alla loro amplificazione mediante DOP-PCR. Questa è una speciale applicazione della PCR che consente l'amplificazione di tutte le sequenze di DNA contenute nel mix di reazione. Questa capacità è

dovuta al particolare primer utilizzato che contiene al suo interno un box centrale di 6 nucleotidi degenerati ed è fiancheggiato da specifiche sequenze di 6 nucleotidi all'estremità 3' e di 10 nucleotidi all'estremità 5'; La sequenza del primer è la seguente 5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3'(Telenius et al., 1992). La procedura di amplificazione si è differenziata per i 2 cromosomi sessuali e per il cromosoma 5.

Amplificazione dei cromosomi Y e Xcen

La raccolta di questi due cromosomi è avvenuta in 20 µl di soluzione 2.5 mM di MgCl₂ in Buffer Taq (Applied Biosystem). Terminata la raccolta si è proceduto al seguente pretrattamento termico:

15 cicli: 30°C 1'
 50°C 1'

Al termine del pretrattamento sono stati aggiunti 30 µl del seguente mix di reazione: Taq buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.1 mM each (Promega), Primer 120 pmol, Taq 0.5U (AmpliTaq – Applied Biosystem); i campioni sono quindi stati sottoposti al seguente trattamento termico in apparecchio termociclizzatore BioRad iCycler:

 93°C 3'

8 cicli 94°C 1'
 30°C 1'
 45°C 1'
 72°C 3'

28 cicli 94°C 1'
 56°C 1'
 72°C 3'

 72°C 10'

Al termine della procedura di amplificazione i campioni sono stati congelati a -20°C fino alla reazione di marcatura.

Amplificazione del cromosoma 5

Per la produzione della sonda per il cromosoma 5 è stata adottata una procedura leggermente diversa, utilizzando, nei primi otto cicli, un enzima differente, la Sequenase (GE Healthcare). La raccolta delle copie di questo cromosoma è stata effettuata in 3.4 µl di soluzione T7 buffer (GE Healthcare). Al termine della raccolta è stato effettuato un trattamento con topoisomerasi. Dopo aver aggiunto il seguente mix: dNTP (0.2 mM), primer 10 pmol, Topoisomerasi 1U (Sigma), i campioni sono stati incubati a 37°C per 30'. La topoisomerasi è stata inattivata riscaldando i campioni a 95°C per 10'. A questo punto i campioni sono stati sottoposti al seguente protocollo di amplificazione:

8 cicli	94°C	1'
	30°C	2'
	37°C	2'

Ad ogni ciclo, durante la fase di annealing a 30°C sono stati aggiunti 0.2 µ di Sequenase (GE Healthcare) diluita 1:8 con buffer T7. Al termine degli 8 cicli è stato aggiunto il mix di reazione contenente Taq buffer 1X, MgCl₂ 3.5 mM, dNTPs 0.2 mM each (Promega), Primer 50 pmol, Taq 2.5U (Applied Biosystem); il protocollo di amplificazione è stato il seguente:

40 cicli	94 °C	1'
	56 °C	1'
	72 °C	2.5'
	72 °C	7'

Al termine della procedura di amplificazione i campioni sono stati congelati a -20°C fino alla reazione di marcatura.

Marcatura delle sonde Xcen, Y e 5

Le sonde sono state marcate utilizzando alternativamente dUTP-16-biotina (Roche) e dUTP-11-digoxigenina (Roche) mediante una seconda reazione di DOP-PCR in cui sono stati utilizzati come stampo 2 µl di prodotto della prima reazione.

La sonda Xcen è stata marcata con dUTP-11-digoxigenina, per poter essere utilizzata simultaneamente con le sonde Y (negli spermatozoi) e 5 (negli ovociti) entrambe marcate con dUTP-16-biotina. Il mix di reazione contenente Buffer Taq 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dAGC 0.2 mM each, dTTP 0.1mM, Primer 0.1 mM, Taq 2U, dUTP-16-biotina (o dUTP-11-digoxigenina) 0.1 mM, DNA di prima amplificazione 2 µl, è stato sottoposto al seguente protocollo di amplificazione:

	93°C	3'
30 cicli	94°C	1'
	56°C	1'
	72°C	2'
	72°C	5'

Le sonde così marcate sono state conservate in congelatore a -20°C fino al loro utilizzo per la FISH.

3.3 Maturazione in vitro di ovociti di bovino

Le ovaie sono state raccolte presso mattatoi della zona subito dopo la macellazione e trasportate in laboratorio in soluzione 0.9% NaCl mantenuta ad una temperatura di 37°C. Le ovaie sono state lavate 2 volte in PBS e i complessi ovocita-cumulo ooforo (COCs) sono stati aspirati per punzione tramite ago 18 G1/2 dai follicoli ovarici con un diametro compreso tra i 2 e gli 8 mm. Gli ovociti sono stati recuperati individualmente per ogni animale e raccolti in capsule petri contenenti PBS + 10% Foetal Calf Serum + Sodio Piruvato (Sigma) 0.2 mM e gentamicina (Sigma) 25 µg/ml. I COCs sono stati selezionati mediante l'utilizzo di uno stereomicroscopio e solo gli ovociti con citoplasma uniforme e finemente granulato e circondati da più strati di cellule del cumulo non espanse sono stati raccolti e trasferiti, separatamente per ogni animale, in una piastra multiwell da 12 pozzetti per i lavaggi. Questi sono stati effettuati per 3 volte in terreno TCM 199 supplementato con 10% FCS, 0.2 mM

Sodio Piruvato, 25 µg/ml gentamicina. Il terreno per il quarto e ultimo lavaggio e per la preparazione delle gocce di maturazione è stato preparato come sopra, ma con in più l'aggiunta dei seguenti ormoni: 5 µg/ml LH (Sigma), 2.5 µg/ml FSH (Sigma), 1µg/ml Estradiolo (Sigma). Gocce di 50 µl di tale terreno sono state poste in capsule petri, coperte con olio minerale e incubate per almeno 2 ore a 39°C in atmosfera al 5% di CO₂ e 100% di umidità per la equilibratura dei componenti. Gli ovociti selezionati sono stati trasferiti a gruppi di 10, separatamente per ogni animale, nelle gocce di maturazione e incubati per 24h a 39°C in atmosfera al 5% di CO₂ e 100% di umidità.

Al termine delle 24h si è proceduto al trattamento degli ovociti per l'analisi cromosomica, che ha previsto:

- lavaggio dei COCs in PBS per due volte;
- trasferimento degli ovociti in una soluzione 1mg/ml di ialuronidasi (Sigma) e incubazione a 39°C per 5-10 minuti;
- distacco delle cellule della granulosa;
- lavaggio in PBS;
- trattamento ipotonico per 4' in una soluzione 0.8% NaCitrato e 4' in KCl 0.075M;
- trasferimento degli ovociti in una soluzione di prefix 50% KCl 0.075M e 50% di fissativo 2:1 metanolo: acido acetico;
- fissazione overnight a 4°C;
- trasferimento di un singolo ovocita sul vetrino portaoggetto;
- fissazione con fissativo 1:1 metanolo:acido acetico deposto goccia a goccia dall'alto fino alla rottura della zona pellucida e alla fuoriuscita del materiale cromosomico;
- delimitazione dell'area contenente l'ovocita mediante matita a punta di diamante.

I vetrini sono quindi stati osservati al microscopio ottico con obiettivo 20X e classificati in base allo stadio meiotico come:

- *rottura della vescicola germinale (GVBD)*: la cromatina della vescicola germinale si rompe in vari gruppi di cromatina connessi gli uni agli altri;
- *metafase I*: i cromosomi omologhi sono associati formando i bivalenti;
- *metafase II*: i cromosomi sono formati dai due cromatidi fratelli uniti per il centromero e il numero cromosomico è aploide; è visibile il 1° globulo polare nel quale i cromosomi hanno un grado di condensazione variabile;
- *metafase II non ridotta*: i cromosomi sono formati dai due cromatidi fratelli uniti per il centromero e il numero cromosomico è diploide; il 1° globulo polare è assente.

Per la presente ricerca sono stati selezionati gli ovociti che si trovavano allo stadio di metafase II con globulo polare visibile e identificabile senza ambiguità e quelli allo stadio di metafase II non ridotta, in quanto anche in questo caso erano implicati eventi di non-disgiunzione che riguardavano l'intero assetto cromosomico. Gli ovociti allo stadio di metafase II aploide, ma in cui il globulo polare era andato disperso durante la procedura di fissazione o quelli in cui non era chiaramente identificabili sono stati esclusi dall'analisi. Questo ha permesso di evitare distorsioni dei dati dovuti ad artefatti che si possono verificare durante la procedura di ibridazione fluorescente in situ, in quanto la disomia dell'ovocita è stata sempre confermata dalla nullisomia del globulo polare, e viceversa.

I vetrini selezionati per l'analisi sono stati conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

3.4 Decondensazione dei nuclei spermatici

Per la decondensazione del nucleo degli spermatozoi è stato utilizzato il metodo descritto da Han et al. (1992), leggermente modificato e adattato alla specie in esame. Le paiette di seme sono state tolte dall'azoto liquido e scongelate a 37°C per 1'. Il loro contenuto è stato recuperato in provette da 1.5 ml. Gli spermatozoi sono stati lavati per 3 volte in 1 ml di una soluzione di PBS (pH 7.4) contenente 6 mM EDTA (Sigma) mediante centrifugazione a 1500 rpm per 5', aspirazione del surnatante e aggiunta di nuova soluzione. Al termine dei

lavaggi agli spermatozoi è stato aggiunto 1ml di soluzione decondensante (5mM Diitiotreitolo in PBS)(Sigma); sono stati testati diversi tempi e diverse temperature e la combinazione ottimale è risultata essere di 20' a temperatura ambiente. Allo scadere dei 20' gli spermatozoi sono stati lavati 2 volte con PBS e fissati con fissativo 3:1 metanolo:acido acetico. Una goccia di sospensione è stata deposta su un vetrino portaoggetto precedentemente lavato in etanolo; la concentrazione di cellule spermatiche è stata aggiustata dopo aver osservato i vetrini al microscopio ottico in contrasto di fase e si è quindi proceduto con la preparazione dei restanti vetrini che sono poi stati conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

3.5 Ibridazione fluorescente in situ su piastre metafasiche mitotiche, spermatozoi decondensati e meiosi ovocitarie

Le sonde ottenute mediante microdissezione cromosomica e DOP-PCR sono state testate singolarmente e in combinazione per la loro specificità e intensità di segnale su piastre metafasiche ottenute da linfociti di bovino. Una volta verificato che le sonde ibridavano sui cromosomi di interesse e che il segnale era visibile in modo chiaro sia sui cromosomi che nei nuclei in interfase presenti sul vetrino, si è proceduto all'utilizzo delle stesse anche sui preparati spermatici e ovocitari.

La procedura di ibridazione fluorescente in situ ha previsto i seguenti steps:

Precipitazione delle sonde

Le sonde marcate sono state precipitate mediante centrifugazione in etanolo a 13.000 rpm per 30' a 4°C; le seguenti combinazione di sonde sono state precipitate simultaneamente nello stesso tubo:

- Xcen (marcata con dUTP-11-digoxigenina) e Y (marcata con dUTP-16-biotina) per l'analisi degli spermatozoi;

- Xcen (marcata con dUTP-11-digoxigenina) e 5 (marcata con dUTP-16-biotina) per l'analisi degli ovociti.

Prima della precipitazione, in ogni tubo contenente le sonde sono stati aggiunti i DNA competitor utilizzati per bloccare le sequenze ripetute: 10 µg di salmon sperm DNA (Sigma) e 10 µg di Calf thymus DNA (Sigma).

Al termine della centrifugazione è stato eliminato l'etanolo, e il pellet è stato risospeso in 15 µl di soluzione di denaturazione (50% formammide in SSC2X + 10% dextran solfato)(entrambi Sigma). I tubi sono stati posti a 37°C per 1h per consentire lo scioglimento completo del pellet.

Denaturazione delle sonde

Le sonde sono state denaturate a 72°C per 10'; la denaturazione è stata bloccata immergendo i tubi in ghiaccio per 3'. Le sonde sono quindi state poste a 37°C per 1.5h per consentire la preibridazione delle sequenze ripetute con i competitor DNA.

Pretrattamento e denaturazione dei vetrini

I vetrini sono stati sottoposti, prima dell'ibridazione, ad un pretrattamento per eliminare i residui di nucleoplasma immergendoli per 10' in una soluzione 0.01% di Pepsina (Sigma) in 10mM HCl mantenuta a 37°C. Successivamente i vetrini sono stati lavati 2 volte in acqua distillata, asciugati all'aria e deidratati mediante passaggi (2' ognuno) in serie ascendente di etanolo 70% - 80% - 96%.

Trascorso il tempo di preibridazione delle sonde si è proceduto con la denaturazione dei vetrini immergendoli in una soluzione di formammide al 70% in SSC2X a 72°C. Il tempo di denaturazione è stato diverso a seconda del materiale biologico:

- 2' per i cromosomi metafasici
- 3' per le piastre meiotiche ovocitarie

- 5' per i nuclei spermatici

La denaturazione è stata bloccata immergendo i vetrini in etanolo ghiacciato 70 – 80 – 96% per 2' ognuno.

Ibridazione in situ

Sui vetrini asciutti sono state aggiunte le sonde denaturate, sulle quali è stato applicato un coprioggetto. I vetrini sono stati avvolti in ritagli di pellicola trasparente e posti overnight in camera umida a 37°C per l'ibridazione tra le sonde e il materiale genetico fissato sui vetrini.

Lavaggi dei vetrini e rilevamento con anticorpo

Il giorno seguente è stata rimossa la pellicola che ricopriva i vetrini e si è proceduto ad effettuare i lavaggi per rimuovere la sonda in eccesso e quella legata in modo aspecifico. I lavaggi sono stati:

- 30' SSC2X a temperatura ambiente in agitazione;
- 3X 4' Washing solution (50% formammide in SSC2X) a 42°C;
- 3X 4' SSC2X a 42°C
- PBST (PBS+ 0.1% Tween 20 (Serva)) 5' a temperatura ambiente

Per la visualizzazione delle sonde al microscopio in fluorescenza delle sonde marcate con biotina (Y e 5) è stata utilizzata streptavidina coniugata con il fluorocromo Alexa 488 (Invitrogen) che emette fluorescenza verde; per le sonde marcate invece con digoxigenina (Xcen) è stato utilizzato un anticorpo Anti-digoxigenina di pecora coniugato con rodamina (Roche) che emette fluorescenza rossa. Entrambe sono state diluite ad una concentrazione di 1 mg/ml in PBS e, al momento dell'uso, diluite ulteriormente 1:500 in PBT (PBST+ 1 mg/ml BSA (Sigma)). Su ogni vetrino, dopo l'ultimo lavaggio in PBST, sono stati applicati 70 µl della soluzione contenente i 2 anticorpi ed è stato applicato il coprioggetto. I vetrini sono stati

incubati per 1h a 37°C in camera umida. Al termine del trattamento con anticorpo i vetrini sono stati lavati 3 volte in PBST a temperatura ambiente in agitazione. I vetrini sono stati montati con una soluzione 0.24µg/ml di DAPI (Sigma) in Antifade (VectorLab) e conservati al buio.

3.6 Osservazione al microscopio e raccolta dei dati

I preparati sono stati osservati utilizzando un obiettivo ad immersione 100X montato su un microscopio con lampada UV Leica DM RA equipaggiato con filtri specifici per il DAPI, FITC, e Cy3 (rispettivamente per l'osservazione della fluorescenza blu, verde e rossa), con un filtro tripla banda per l'osservazione contemporanea dei 3 fluorocromi e con le ottiche per il contrasto di fase. Il microscopio era inoltre dotato di una camera digitale Leica DC 300F ed era collegato ad un personal computer sul quale era installato il software Leica CW 4000 FISH per l'acquisizione delle immagini.

Spermatozoi

Per ogni toro (10 per razza) analizzato sono stati contati circa 5000 spermatozoi, 50.000 per razza e 100.000 in totale. Le cellule sovrapposte o quelle colorate in maniera non uniforme sono state escluse dal conteggio. Per ogni nucleo spermatico è stato registrato il tipo (X o Y) e il numero dei cromosomi sessuali presenti. Sono stati considerati normali gli spermatozoi con un unico cromosoma sessuale (un segnale rosso o verde). Per il conteggio delle anomalie sono stati seguiti i criteri di Robbins et. al (1995): i due segnali dovevano essere comparabili in grandezza e intensità, separati da una distanza pari almeno alla grandezza del segnale stesso ed essere simili ai segnali presenti nelle cellule dello stesso campo microscopico. I nuclei con più di un cromosoma sessuale sono stati classificati in base al tipo di segnale (XX, YY o XY) e come disomici o diploidi; quest'ultima distinzione è stata realizzata comparando la grandezza della cellula contenente il doppio segnale con quella delle

cellule presenti nello stesso campo microscopico; se questa era visibilmente maggiore rispetto a tutte le cellule presenti lo spermatozoo è stato considerato diploide (Joseph et al., 1984). Nei casi in cui si sospettava la sovrapposizione di due spermatozoi o la presenza di una cellula somatica è stato utilizzato il contrasto di fase che consentiva di visualizzare la coda dello spermatozoo. Sono inoltre stati conteggiati gli spermatozoi privi di segnale per verificare l'efficienza di ibridazione.

Ovociti

Per evitare errori nel calcolo dell'incidenza di anomalie cromosomiche sono stati analizzati solo gli ovociti in cui, oltre la metafase II, era chiaramente visibile il 1° globulo polare con i segnali fluorescenti. Questo ha consentito di evitare che i dati potessero essere sovra/sottostimati a causa delle manipolazioni che il materiale subisce nel corso della fissazione. Inoltre sono stati conteggiati gli ovociti diploidi. Gli ovociti sono stati classificati secondo il seguente schema:

Segnali piastra metafasica meiotica	Segnali 1° globulo polare	Classificazione
RV	RV	Aploide
RRV	V	Disomico X
RVV	R	Disomico 5
V	VRR	Nullisomico X
R	RVV	Nullisomico 5
RRV	RV	Separazione prematura centromero cromosoma X*
RVV	RV	Separazione prematura centromero cromosoma 5*
RRVV	Assente	Diploide

R= rosso (cromosoma X); V= verde (cromosoma 5); *segnali di uguale intensità e separati da una distanza pari almeno alla grandezza del segnale stesso.

3.7 Analisi statistica

La distribuzione di frequenza delle anomalie cromosomiche nelle cellule spermatiche è stata testata per la normalità, per verificare quali fossero i test statistici più appropriati da utilizzare. Poiché la distribuzione osservata si discostava in maniera significativa da quella

normale (test di Shapiro, di Anderson-Darling e di Kolmogorov-Smirnov), si è deciso di utilizzare i test non parametrici, che sono indipendenti dal tipo di distribuzione. La proporzione di spermatozoi portatori del cromosoma X e Y in rapporto alla frequenza attesa di 1:1 è stata analizzata mediante il test del chi-quadro applicando la correzione di Yates; le differenze interindividuali nell'incidenza dei diversi tipi di anomalie sono state testate mediante test del chi-quadro, ipotizzando una distribuzione uniforme di ogni singola anomalia tra i vari animali analizzati. Le differenze nell'incidenza dei diversi tipi di anomalie (disomia-diploidia, XX-YY-XY, errori in meiosi I-errori in meiosi II), e le differenze tra le 2 razze sono state analizzate mediante i test di Kruskal-Wallis e di Mann Whitney. Per determinare l'esistenza di associazioni tra le diverse anomalie è stato utilizzato il coefficiente di correlazione di Spearman. Le differenze interrazziali e intercromosomiche nell'incidenza di anomalie negli ovociti sono state analizzate mediante test del chi-quadro.

4. RISULTATI

4.1 Produzione delle sonde e ottimizzazione del metodo FISH

Le sonde cromosoma-specifiche preparate mediante microdissezione cromosomica e DOP-PCR sono state inizialmente testate su piastre metafasiche e nuclei di linfociti bovini per verificare la loro specificità e intensità; sonde che producono segnali aspecifici o di debole intensità non possono essere utilizzate per l'ibridazione, in modo particolare nei nuclei spermatici, perché renderebbero difficoltosa la distinzione tra cellule normali e anormali.

La figura 6 mostra il segnale FISH delle sonde Xcen (a), Y (b) e 5 (c) su metafasi di maschio bovino e la localizzazione del segnale FISH prodotto dalle sonde Xcen, Y e 5 sugli ideogrammi standard dei rispettivi cromosomi di bovino (ISCNDB, 2000) mediante bandeggio DAPI (d). Tutte le sonde prodotte si sono dimostrate specifiche per il cromosoma di interesse, come mostrato dall'assenza di segnale fluorescente sugli altri cromosomi. L'efficienza di ibridazione è stata superiore al 99% sui cromosomi metafasici e superiore al 95% nei nuclei in interfase; le sonde si sono quindi dimostrate idonee allo scopo per il quale sono state preparate, permettendo di identificare in maniera univoca e non ambigua i 3 cromosomi. Il segnale della sonda Xcen copriva approssimativamente metà del braccio corto, corrispondente alle regioni Xp11-14, con un segnale rosso più intenso osservabile sopra il centromero. Probabilmente in questa regione sono presenti più sequenze ripetute di DNA che risultano in una maggiore luminescenza. Le sonde per i cromosomi Y e 5 coprivano interamente i rispettivi cromosomi; il segnale della sonda Y è risultato più intenso sul braccio lungo, eterocromatico, meno su quello corto. Il segnale della sonda per il cromosoma 5 copriva interamente il cromosoma, anche se presentava delle zone di maggiore luminescenza, dovute probabilmente alla presenza di sequenze ripetute, nelle regioni 5q12-14, 5q21-23, 5q26-31, 5q34-35.

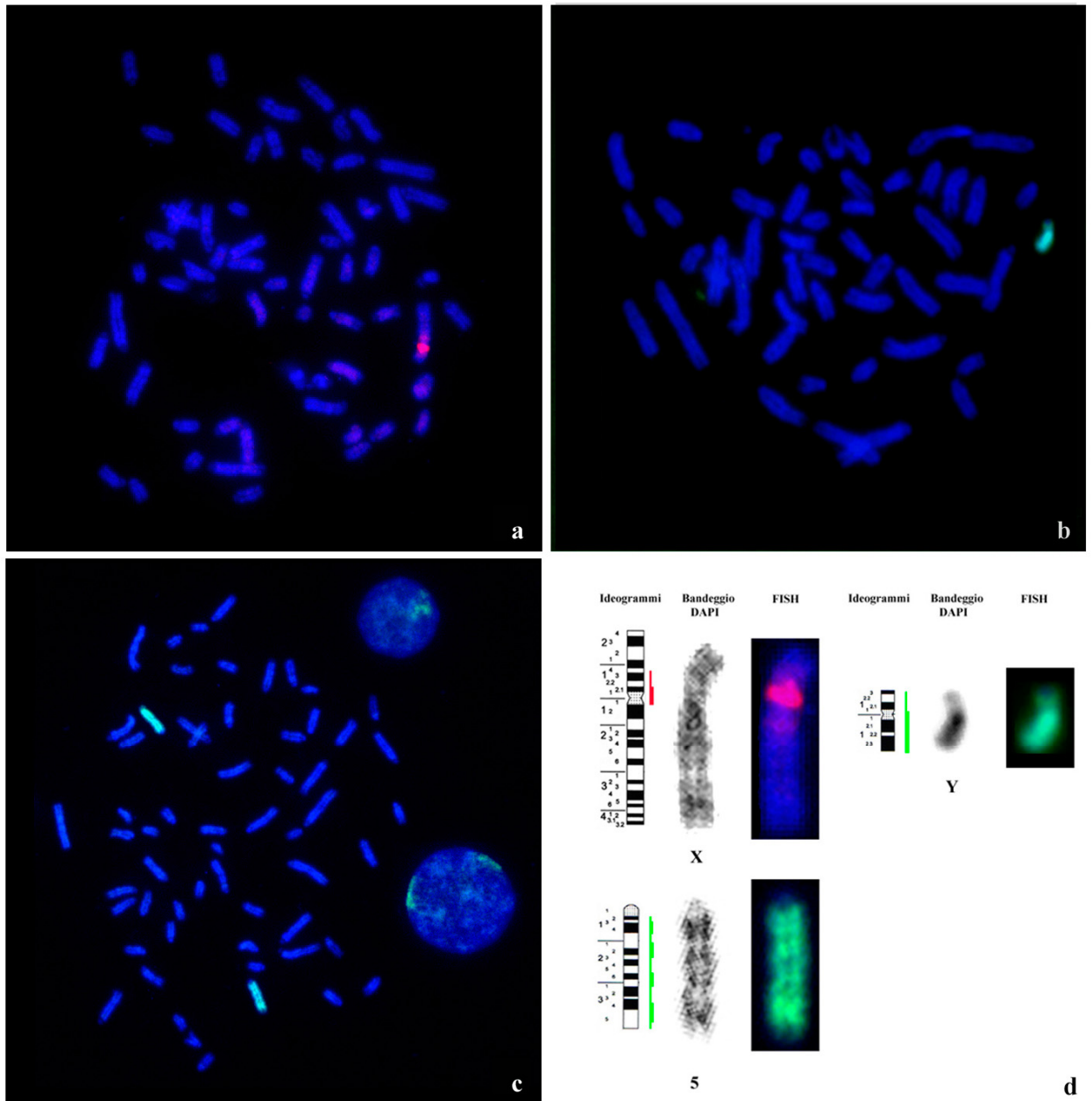


Figura 6 – Piastre metafasiche di maschio bovino mostranti il segnale delle sonde Xcen (a), Y (b) e 5 (c) e localizzazione del segnale FISH sugli ideogrammi standard di bovino (d).

4.2 Anomalie cromosomiche negli spermatozoi

Le tabelle 2 e 3 riportano i risultati dell'analisi degli spermatozoi con le sonde Xcen e Y rispettivamente per la razza Frisona e Bruna. La tabella 4 riporta una sintesi delle principali statistiche descrittive per ogni tipo di anomalia nelle due razze. L'efficienza di ibridazione (spermatozoi con segnale/spermatozoi totali) è stata elevata; mediamente il 98.84% delle cellule esaminate mostrava il segnale FISH per uno dei due cromosomi sessuali. Solo un animale, 'Fecondo' della razza Frisona, ha mostrato una efficienza di ibridazione più bassa, del 92.34%. Sono stati analizzati approssimativamente 5000 spermatozoi per animale (range 4794-6002) per un totale di più di 100.000 spermatozoi esaminati. Ogni cellula è stata classificata, in base ai segnali presenti al suo interno, in una delle seguenti categorie: normale X (un segnale rosso), normale Y (un segnale verde), disomico XX (doppio segnale rosso e diametro normale), disomico YY (doppio segnale verde e diametro normale), disomico XY (doppio segnale, uno rosso e uno verde e diametro normale), diploide XX (doppio segnale rosso e diametro doppio), diploide YY (doppio segnale verde e diametro doppio), diploide XY (doppio segnale uno rosso e uno verde e diametro doppio). La figura 7 mostra i diversi tipi di anomalie riscontrate. È stata analizzata, mediante test del chi-quadro la frequenza di spermatozoi X e Y sul totale degli spermatozoi esaminati rispetto al rapporto atteso di 1:1. Complessivamente si è avuto uno scostamento statisticamente significativo da quello atteso in favore del cromosoma Y ($\chi^2 > 3.84$; $df=1$; $\alpha=0.05$; $p < 0.05$). In totale, infatti, il 51.146% degli spermatozoi portava il cromosoma Y e il 47.250% quello X. Tale deviazione è stata particolarmente significativa in alcuni animali (ad esempio nel toro 'Adatto' della razza Frisona la percentuale è stata di 54.230% e 44.846% rispettivamente per Y e X); in quattro animali la frequenza di spermatozoi X e Y non si è discostata in modo significativo dal rapporto di 1:1: 'Sempre' della razza Frisona, 'Excalibur', 'Pastello' e 'Rax' della razza Bruna.

Animale	X (%)	Y (%)	Disomici			Diploidi			Sperm. con segnale (%)	Sperm. senza segnale (%)	Totale
			XX (%)	YY (%)	XY (%)	XX (%)	YY (%)	XY (%)			
Soul	2819 (46.968)	3154 (52.549)	1 (0.017)	5 (0.083)	1 (0.017)	1 (0.017)	0 (0.000)	0 (0.000)	5981 (99.650)	21 (0.350)	6002
Tempel	2411 (47.081)	2623 (51.220)	4 (0.078)	5 (0.098)	2 (0.039)	1 (0.020)	0 (0.000)	0 (0.000)	5046 (98.535)	75 (1.465)	5121
Sorgo	2643 (51.300)	2487 (48.273)	5 (0.097)	2 (0.039)	2 (0.039)	1 (0.019)	0 (0.000)	1 (0.019)	5141 (99.786)	11 (0.214)	5152
Sempre	2509 (49.380)	2564 (50.463)	2 (0.039)	0 (0.000)	1 (0.020)	0 (0.000)	0 (0.000)	0 (0.000)	5076 (99.902)	5 (0.098)	5081
Fecondo	2420 (44.658)	2574 (47.500)	2 (0.037)	1 (0.018)	2 (0.037)	1 (0.018)	0 (0.000)	4 (0.074)	5004 (92.342)	415 (7.658)	5419
Sesto	2257 (47.080)	2468 (51.481)	0 (0.000)	2 (0.042)	1 (0.021)	1 (0.021)	1 (0.021)	1 (0.021)	4731 (98.686)	63 (1.314)	4794
Slam	2510 (47.225)	2761 (51.947)	2 (0.038)	0 (0.000)	1 (0.019)	0 (0.000)	1 (0.019)	2 (0.038)	5277 (99.285)	38 (0.715)	5315
Adatto	2380 (44.846)	2878 (54.230)	4 (0.075)	2 (0.038)	2 (0.038)	0 (0.000)	1 (0.019)	2 (0.038)	5269 (99.284)	38 (0.716)	5307
Slancio	2472 (46.094)	2854 (53.216)	3 (0.056)	1 (0.019)	2 (0.037)	1 (0.019)	0 (0.000)	2 (0.037)	5335 (99.478)	28 (0.522)	5363
Veliero	2372 (47.138)	2645 (52.564)	0 (0.000)	1 (0.020)	2 (0.040)	2 (0.040)	0 (0.000)	3 (0.060)	5025 (99.861)	7 (0.139)	5032
<i>Totale</i>	<i>24793 (47.148)</i>	<i>27008 (51.360)</i>	<i>23 (0.044)</i>	<i>19 (0.036)</i>	<i>16 (0.030)</i>	<i>8 (0.015)</i>	<i>3 (0.006)</i>	<i>15 (0.029)</i>	<i>51885 (98.667)</i>	<i>701 (1.333)</i>	<i>52586</i>

Tabella 2 – Risultati dell’analisi citogenetica in spermatozoi di soggetti di razza Frisone Italiana.

Animale	X (%)	Y (%)	Disomici			Diploidi			Sperm. con segnale (%)	Sperm. senza segnale (%)	Totale
			XX (%)	YY (%)	XY (%)	XX (%)	YY (%)	XY (%)			
Excalibur	2548 (49.824)	2505 (48.983)	2 (0.039)	4 (0.078)	0 (0.000)	1 (0.020)	0 (0.000)	1 (0.020)	5061 (98.964)	53 (1.036)	5114
Pupo	2474 (47.559)	2669 (51.307)	0 (0.000)	3 (0.058)	0 (0.000)	1 (0.019)	0 (0.000)	2 (0.038)	5149 (98.981)	53 (1.019)	5202
Partner	2444 (47.383)	2632 (51.028)	0 (0.000)	6 (0.116)	2 (0.039)	0 (0.000)	0 (0.000)	0 (0.000)	5084 (98.565)	74 (1.435)	5158
Pastello	2635 (49.905)	2589 (49.034)	2 (0.038)	1 (0.019)	0 (0.000)	2 (0.038)	0 (0.000)	3 (0.057)	5232 (99.091)	48 (0.909)	5280
Rax	2505 (48.802)	2576 (50.185)	2 (0.039)	1 (0.019)	0 (0.000)	2 (0.039)	0 (0.000)	2 (0.039)	5088 (99.123)	45 (0.877)	5133
Evolution	2374 (45.866)	2714 (52.434)	1 (0.019)	2 (0.039)	0 (0.000)	0 (0.000)	0 (0.000)	2 (0.039)	5093 (98.396)	83 (1.604)	5176
Etmark	2246 (44.643)	2715 (53.965)	3 (0.060)	1 (0.020)	0 (0.000)	0 (0.000)	0 (0.000)	6 (0.119)	4971 (98.807)	60 (1.193)	5031
Proxy	2327 (46.318)	2664 (53.025)	1 (0.020)	3 (0.060)	1 (0.020)	0 (0.000)	1 (0.020)	1 (0.020)	4998 (99.482)	26 (0.518)	5024
Roy	2345 (45.209)	2796 (53.904)	0 (0.000)	1 (0.019)	0 (0.000)	1 (0.019)	1 (0.019)	1 (0.019)	5145 (99.190)	42 (0.810)	5187
Publio	2415 (47.945)	2287 (45.404)	0 (0.000)	1 (0.020)	3 (0.060)	2 (0.040)	0 (0.000)	3 (0.060)	5014 (99.543)	23 (0.457)	5037
<i>Totale</i>	<i>24313 (47.355)</i>	<i>26147 (50.927)</i>	<i>11 (0.021)</i>	<i>23 (0.045)</i>	<i>6 (0.012)</i>	<i>9 (0.018)</i>	<i>2 (0.004)</i>	<i>21 (0.041)</i>	<i>50835 (99.013)</i>	<i>507 (0.987)</i>	<i>51342</i>

Tabella 3 – Risultati dell’analisi citogenetica in spermatozoi di soggetti di razza Bruna Italiana.

Statistica	<i>Frisona</i>								
	Disomie				Diploidie				Tot
	XX	YY	XY	Tot	XX	YY	XY	Tot	
Minimo	0.000	0.000	0.017	0.057	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059
Massimo	0.097	0.098	0.040	0.215	0.040	0.021	0.074	0.100	0.235
Media	0.044	0.036	0.031	0.110	0.015	0.006	0.029	0.050	0.160
Ds	0.031	0.031	0.009	0.055	0.012	0.009	0.024	0.032	0.053

Statistica	<i>Bruna</i>								
	Disomie				Diploidie				Tot
	XX	YY	XY	Tot	XX	YY	XY	Tot	
Minimo	0.000	0.019	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.076
Massimo	0.060	0.116	0.060	0.155	0.040	0.020	0.119	0.119	0.199
Media	0.022	0.045	0.012	0.078	0.018	0.004	0.041	0.063	0.141
Ds	0.021	0.031	0.020	0.038	0.016	0.008	0.031	0.036	0.037

Tabella 4 – Principali statistiche descrittive per i diversi tipi di disomie e diploidie nelle due razze oggetto di studio.

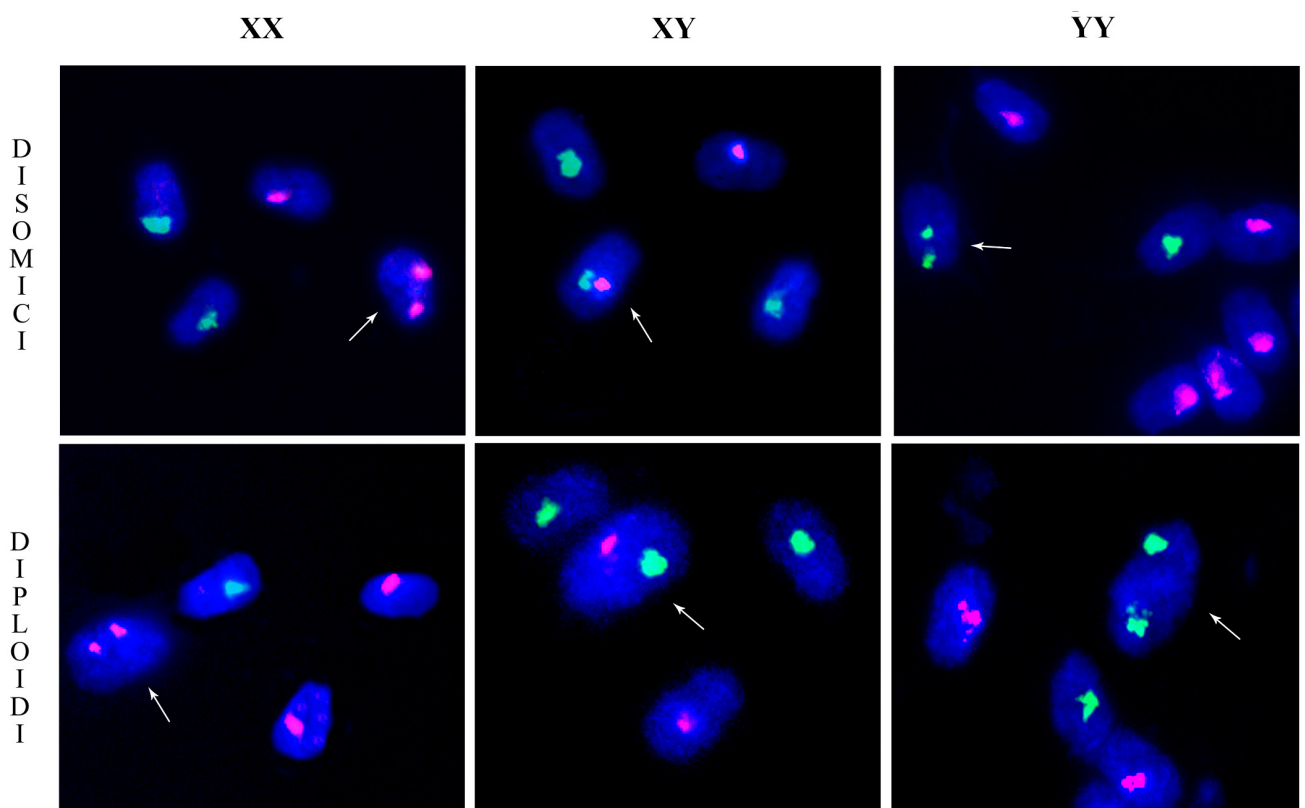


Figura 7 – Spermatozoi anormali (indicati dalle frecce) mostranti i segnali delle sonde Xcen (rosso) e Y (verde); i diploidi sono stati discriminati dai disomici in base alla loro superiore grandezza rispetto agli spermatozoi aploidi presenti nello stesso campo microscopico.

L'anomalia riscontrata con la maggiore frequenza è stata la disomia YY nella Bruna, con un'incidenza dello 0.045% (range 0.019-0.116), seguita dalla disomia XX nella frisona, 0.044%, (range 0-0.097). L'anomalia riscontrata più raramente è stata la diploidia YY sia nella Frisona che nella Bruna, con un'incidenza rispettivamente dello 0.006% (range 0-0.021) e dello 0.004% (range 0-0.020) nelle due razze.

Variazioni interindividuali

L'esistenza di differenze nell'incidenza delle diverse categorie di disomia e diploidia è stata testata mediante l'utilizzo del test del chi-quadro, assumendo una distribuzione casuale delle stesse tra i vari animali. Complessivamente non sono emerse differenze significative, ad eccezione della disomia XY nella razza Bruna ($\chi^2 > 16.91$; $df=9$; $\alpha=0.05$; $p < 0.05$); su 10 animali, 7 non presentavano nessuna cellula disomica XY e 3 avevano rispettivamente una frequenza dello 0.020%, 0.039% e 0.060%.

Variazioni intrarazziali

Sono state analizzate, all'interno di ogni razza, le differenze tra le frequenze di disomia XX, YY e XY e diploidia XX, YY e XY mediante il test di Kruskal-Wallis e utilizzando la procedura di Dunn per le comparazioni multiple a coppie. Nel caso della Frisona non sono emerse differenze significative tra i diversi tipi di disomie ($K < 5.9$; $df=2$; $\alpha=0.05$; $p > 0.05$), mentre sono emerse differenze statisticamente significative tra i diversi tipi di diploidie ($K > 5.9$; $df=2$; $\alpha=0.05$; $p < 0.05$); il confronto a coppie ha evidenziato che sono state significativamente più numerose le diploidie XY (0.029%, range 0-0.074%), rispetto alle diploidie YY (0.006%, range 0-0.021%). Nella razza Bruna, invece, sono emerse differenze significative sia nel caso delle disomie ($K > 5.9$; $df=2$; $\alpha=0.05$; $p < 0.05$) che delle diploidie ($K > 5.9$; $df=2$; $\alpha=0.05$; $p < 0.01$). La frequenza di spermatozoi disomici YY (0.045%, range 0.019-0.116) è stata infatti significativamente superiore a quella di spermatozoi disomici XY

(0.012%, range 0-0.060%). Analogamente a quanto riscontrato nella Frisona, le diploidie XY (0.041%, range 0-0.119%) erano significativamente più numerose delle diploidie YY (0.004%, range 0-0.020%).

È stata poi verificata l'esistenza di differenze tra le due classi di anomalie analizzate, le disomie e le diploidie. Mentre nella razza Bruna queste avevano complessivamente la stessa frequenza (0.078% e 0.062%, rispettivamente per disomie e diploidie), nella razza Frisona è stato riscontrata un'incidenza maggiore di disomie (0.110%), rispetto alle diploidie (0.050%) (test di Mann-Whitney, $U=659$; $\alpha=0.05$; $p<0.01$).

Per verificare l'esistenza di differenze nell'incidenza di errori di non disgiunzione durante la meiosi I (formazione di gameti disomici/diploidi XY) e la meiosi II (formazione di gameti disomici/diploidi XX e YY), sono state analizzate le differenze tra le anomalie raggruppate in questo modo, separatamente per ogni razza. In entrambe le razze non sono state riscontrate differenze per quanto riguarda le diploidie (Frisona 0.029% e 0.021%, MI e MII rispettivamente; Bruna 0.041% e 0.021%, MI e MII), mentre le differenze sono state molto significative nel caso delle disomie. Nella razza Frisona, gli errori di non disgiunzione in meiosi I avevano una frequenza dello 0.030% e in meiosi II dello 0.080% (test di Mann-Whitney, $U=13$; $\alpha=0.05$; $p<0.01$). Nella razza Bruna le frequenze sono state dello 0.012% in meiosi I e dello 0.066% in meiosi II (test di Mann-Whitney, $U=9.5$; $\alpha=0.05$; $p<0.01$). Accorpendo i dati delle disomie e delle diploide emerge che, complessivamente, nella Bruna, sono più frequenti ($p<0.05$) gli errori in meiosi II (0.088%) di quelli in meiosi I (0.053%) (test di Mann-Whitney, $U=19$; $\alpha=0.05$; $p<0.05$). Nella Frisona si nota la stessa tendenza e la probabilità del test si colloca quasi sulla soglia di rifiuto (test di Mann-Whitney, $U=25$; $\alpha=0.05$; $p=0.06$). L'analisi di possibili associazioni tra le diverse anomalie effettuata mediante il coefficiente di correlazione di Spearman non ha evidenziato l'esistenza di relazioni significative tra i diversi tipi di anomalie.

Variazioni interrazziali

Sono state confrontate le medie delle diverse anomalie tra le due razze oggetto di studio. La frequenza totale (disomie+diploidie) di anomalie cromosomiche è stata dello 0.160% (range 0.059-0.235%) nella Frisona e dello 0.140% (range 0.076-0.199%) nella Bruna; questa differenza non è risultata statisticamente significativa (test di Mann-Whitney, $U=63$; $\alpha=0.05$; $p=0.35$).

La frequenza complessiva di disomie è stata dello 0.110% (range 0.057-0.215%) nella razza Frisona e dello 0.078% (range 0.019-0.155%) nella Bruna; la differenza non è risultata statisticamente significativa (test di Mann-Whitney, $U=69.5$; $\alpha=0.05$; $p=0.15$).; tuttavia, in questo caso, il test di Mann-Whitney evidenzia una tendenza verso una maggiore incidenza di disomie nella razza Frisona, con $p=0.15$. Probabilmente aumentando il numero di soggetti tale differenza assumerebbe valori significativi. La frequenza di cellule diploidi è stata dello 0.049% (range 0-0.100%) e dello 0.062% (range 0-0.119) rispettivamente nella razza Frisona e Bruna. Anche in questo caso la differenza non è stata significativa (test di Mann-Whitney, $U=39$; $\alpha=0.05$; $p=0.42$).

Il confronto a coppie tra i diversi tipi di anomalia nelle due razze ha evidenziato differenze statisticamente significative in due casi: la disomia XX, con una frequenza dello 0.044% nella Frisona e dello 0.022% nella Bruna, e la disomia XY, che aveva una frequenza dello 0.031% nella Frisona e dello 0.012% nella Bruna.

4.3 IVM e anomalie cromosomiche negli ovociti

La tabella 5 riporta i risultati individuali dell'analisi citogenetica suddivisi per razza. L'analisi è stata condotta su un totale di 257 ovociti, 143 dalla razza Frisona e 114 dalla Bruna. In totale, 37 sono risultati diploidi (14.4%), 16 nella Frisona (11.2%) e 21 nella Bruna (18.4%). Questa differenza non è risultata statisticamente significativa ad un livello di probabilità del 5% ($\chi^2 < 3.84$; $df=1$; $\alpha=0.05$; $p > 0.05$); il p-value ottenuto dal test chi-quadro è

però stato uguale a 0.10 ed è molto probabile che aumentando il numero delle osservazioni questa differenza risulti significativa. Circa la metà (51%) degli animali analizzati ha prodotto ovociti diploidi con una leggera differenza tra le razze; il 43% di Frisone aveva 1 o più ovociti diploidi contro il 62% di Brune. L'animale con la maggiore incidenza di diploidia è stato un soggetto di razza Bruna: su 10 ovociti totali, 8 (80%) erano diploidi.

L'incidenza di aneuploidie (disomie e nullisomie) è stata calcolata sui risultati dell'analisi di 179 ovociti, 100 per la Frisona e 79 per la Bruna. I restanti 41 ovociti in fase MII non sono stati inclusi nel calcolo in quanto il 1° globulo polare non era chiaramente identificabile. La media di ovociti analizzabili (MII+GP chiaramente identificabile) per animale è stata superiore a 4 sia nella Frisona che nella Bruna; gli animali con 4 o più ovociti sono stati analizzati singolarmente, quelli con meno di 4 sono stati raggruppati per razza e inclusi nel calcolo come gruppo. Su un totale di 179 ovociti, 4 sono risultati aneuploidi (2.2%); di questi due erano disomici per il cromosoma 5 e 2 erano nullisomici, uno per il cromosoma 5 e uno per il cromosoma X. In totale il cromosoma 5 ha mostrato una frequenza di aneuploidia superiore (1.7%) rispetto al cromosoma X (0.5%). Questa differenza non è risultata statisticamente significativa al test del chi-quadro. L'incidenza totale di aneuploidia è stata leggermente superiore nella razza Bruna rispetto alla Frisona, 2.5% e 2% rispettivamente. Gli ovociti aneuploidi provenivano da 4 animali diversi e in tutti i casi, eccetto uno, gli animali che avevano prodotto ovociti aneuploidi avevano prodotto anche ovociti diploidi. In 3 ovociti (1.6%) è stata osservata una separazione prematura del centromero. Queste cellule non sono state incluse nel calcolo delle aneuploidie in quanto questo fenomeno non necessariamente darà origine a gameti geneticamente sbilanciati a seguito della seconda divisione meiotica. La figura 8 riporta i diversi assetti cromosomici riscontrati nel corso dello studio.

Animale	Età (mesi)	Numero di ovociti					PCS
		MII totali	Diploidi	MII+GP analizzati	Aneuploidi		
					Nullisomici	Disomici	
<i>Frisona Italiana</i>							
1	25	5	-	4	-	-	-
2	21	6	2	4	-	-	-
3	20	6	1	4	-	-	-
4	19	9	1	6	-	-	1 ⁵
5	15	18	2	15	-	-	1 ⁵
6	17	6	-	4	-	-	-
7	17	7	-	6	-	-	-
8	14	10	3	4	-	-	-
9	19	7	1	5	-	1 ⁵	-
10	13	10	2	6	-	-	-
11	19	7	-	6	-	-	-
12	23	11	-	10	1 ^x	-	-
13	14	12	-	7	-	-	-
Gruppo ^a	27 (media)	29	4	19	-	-	-
Totale		143	16	100	1	1	2
<i>Bruna Italiana</i>							
14	15	8	-	5	-	-	-
15	72	5	1	5	-	-	-
16	84	6	-	5	-	-	-
17	23	14	1	12	1 ⁵	-	1 ^x
18	19	10	2	6	-	-	-
19	14	14	1	11	-	-	-
20	14	6	-	6	-	-	-
21	17	6	-	6	-	-	-
22	14	17	3	10	-	1 ⁵	-
Gruppo ^b	20 (media)	28	13	13	-	-	-
Totale		114	21	79	1	1	1
<i>Totale per le due razze</i>							
		257	37	179	2	2	3

^a Gruppo di 10 animali con <4 ovociti analizzabili

^b Gruppo di 7 animali con <4 ovociti analizzabili

Tabella 5 – Risultati dell'analisi citogenetica nei singoli animali analizzati.

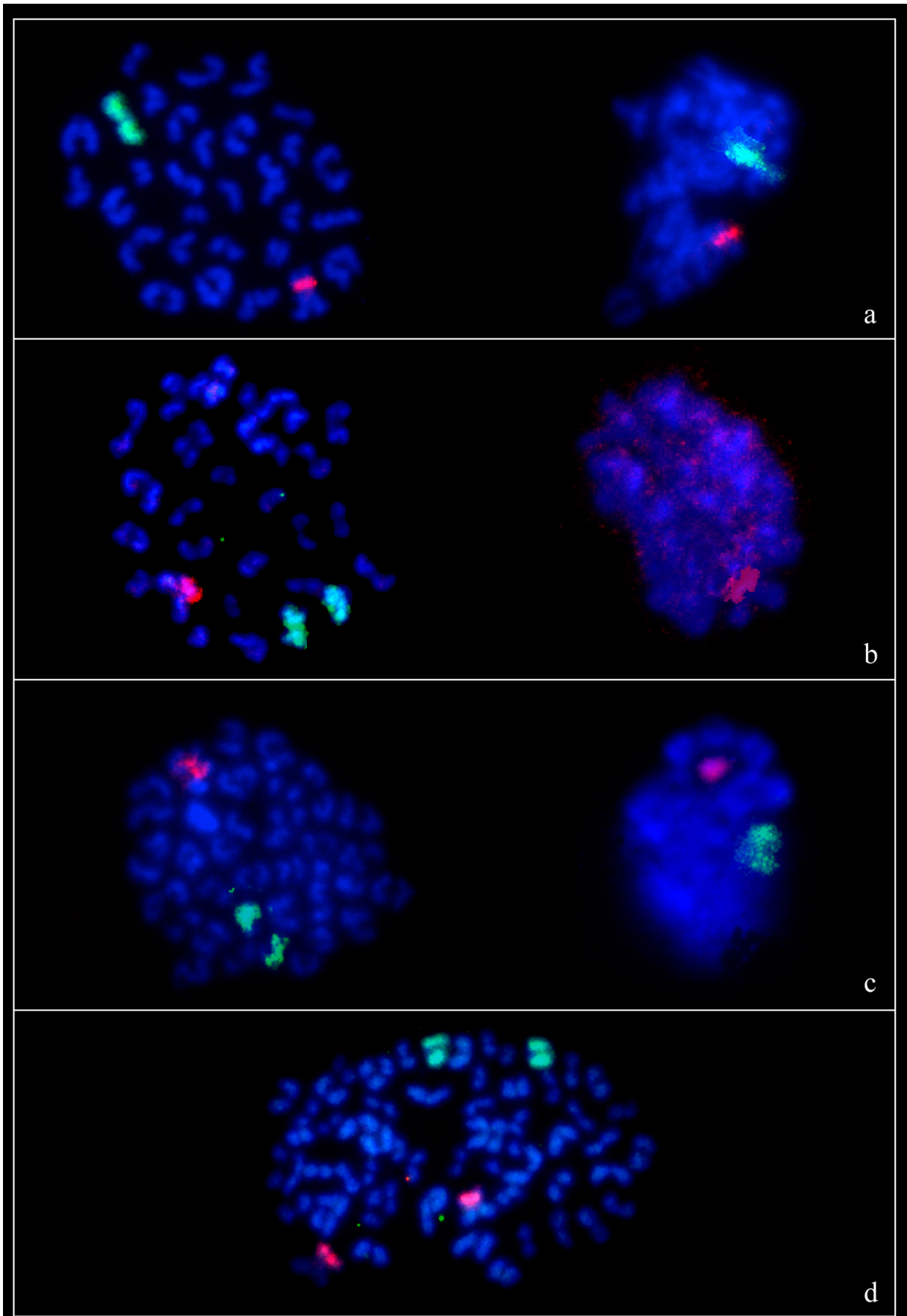


Figura 8 – Piastre meiotiche e corrispondenti globuli polari di ovociti bovini mostranti i segnali delle sonde Xcen (rosso) e 5 (verde): aploide normale (a), disomico per il cromosoma 5 (b), con separazione prematura del centromero (c), diploide (d).

5. DISCUSSIONE

Il presente studio apporta nuovi dati sull'incidenza di anomalie cromosomiche nelle cellule germinali di bovino; per la prima volta sono stati comparati i dati relativi a due razze, distintamente per i generi maschile e femminile. Questo aspetto è stato ampiamente approfondito nell'uomo, per il quale sono presenti numerosi studi tesi ad individuare tutti quei fattori in grado di alterare la normale frequenza di anomalie in spermatozoi ed ovociti, nonché ad accertare la relazione esistente tra fertilità e incidenza di aneuploidie nelle cellule germinali. Negli animali domestici, invece, principalmente a causa della mancanza di sonde cromosoma-specifiche, i dati riguardanti questo aspetto sono molto scarsi. Per tale motivo, nel presente lavoro, sono state prodotte sonde per i cromosomi X, Y e 5 tramite microdissezione cromosomica abbinata alla DOP-PCR. Queste sonde hanno mostrato un'elevata efficienza di ibridazione, superiore al 98% sia negli spermatozoi che negli ovociti. Nello studio delle aneuploidie spermatiche il limite considerato soddisfacente, utilizzando due sonde simultaneamente, è del 95% (Han et al., 1992; 1993). Questo significa che le sonde, prodotte nel corso dello studio, si sono rivelate idonee agli scopi prefissati e che il processo di decondensazione spermatica e la metodica di ibridazione sviluppata per spermatozoi e ovociti hanno funzionato in maniera appropriata.

Gli spermatozoi sono stati analizzati utilizzando le sonde per i cromosomi sessuali X e Y. Dato che il cromosoma X di bovino è tra quelli di dimensioni maggiori, una sonda di tipo painting per l'intero cromosoma avrebbe generato un segnale troppo grande all'interno del nucleo spermatico, creando difficoltà nel conteggiare in maniera non ambigua il reale numero di copie presenti. Per questo motivo si è proceduto a microdissettare ed amplificare solo la regione pericentromerica del cromosoma X, in modo da ottenere un segnale di dimensioni ridotte. A seguito di ciò, il segnale verde per il cromosoma Y aveva una dimensione maggiore rispetto a quello rosso della sonda Xcen. Questa situazione potrebbe aver provocato la

deviazione incontrata, rispetto al rapporto atteso di 1:1, di spermatozoi con cromosoma Y rispetto a quelli con il cromosoma X. È possibile che alcune cellule classificate come prive di segnale avessero in realtà un segnale per il cromosoma Xcen troppo debole per essere identificato a causa di una scarsa decondensazione del DNA in quei nuclei. Al contrario il segnale Y, più grande, emetteva sufficiente fluorescenza anche in caso di decondensazione insufficiente. Una analoga situazione viene riportata nel bovino da altri autori (Hassanane et al., 1999); anche in questo caso lo scostamento dal rapporto 1:1 viene attribuito alla differente grandezza, e quindi intensità, delle due sonde utilizzate.

L'analisi delle differenze interindividuali nell'incidenza dei diversi tipi di anomalie non ha evidenziato grosse differenze tra gli animali oggetto di studio, ad eccezione della disomia XY nella razza Bruna. In uno studio condotto su 10 uomini con spermiogramma normale, Rubes et al. (2005) hanno riscontrato la più alta variabilità individuale proprio per la disomia XY; poiché questo tipo di disomia origina da errori nel corso della MI, è possibile che esistano delle differenze a livello genetico (ad es. nei geni che regolano i checkpoint meiotici) che spiegherebbero tale variabilità interindividuale. Nel complesso è stata comunque evidenziata, nella specie bovina, una ampia uniformità tra i vari animali. Poiché tutti i campioni di seme analizzati provenivano da tori in prova di progenie presso centri genetici è possibile presupporre una certa qualità riproduttiva dei maschi analizzati che spiegherebbe la bassa variabilità riscontrata.

La distribuzione delle anomalie dei cromosomi sessuali all'interno delle due razze (variazioni intrarazziali) ha evidenziato diverse differenze significative. Nella razza Frisona è stata riscontrata una frequenza maggiore di disomie (0.010%) rispetto alle diploidie (0.050), ma mentre le prime erano ugualmente rappresentate dalle 3 tipologie (XX, YY e XY), nelle seconde le diploidie XY erano quelle con la frequenza maggiore. Nella razza Bruna la frequenza di disomie e diploidie è risultata statisticamente simile (0.078% e 0.062%, rispettivamente). In questo caso, però, le disomie non erano distribuite in maniera omogenea;

gli spermatozoi disomici YY avevano un'incidenza (0.045%) maggiore rispetto a quelli XX e XY. Anche in questa razza le diploidie maggiormente rappresentate sono state quelle XY, con differenze significative rispetto alle altre due.

Per cercare di spiegare queste differenze, le anomalie sono state raggruppate in base alla loro origine (meiosi I o meiosi II). Le disomie sono risultate più frequentemente dovute ad errori che si verificano nel corso della MII, sia nella Frisona che nella Bruna, mentre le diploidie originano in percentuali simili da errori in MI e in MII in entrambe le razze, il che può essere spiegato proprio dall'alta incidenza di spermatozoi diploidi XY rispetto ai diploidi XX e YY quando questi vengono considerati singolarmente. In altre parole, gli errori di non disgiunzione cromatidica (MII) interessano più frequentemente singoli cromosomi, mentre gli errori di non disgiunzione cromosomica (MI) possono interessare in eguale misura singoli cromosomi o interi assetti cromosomici.

Il confronto dei dati ottenuti nelle due razze non ha evidenziato sostanziali differenze; l'incidenza totale di anomalie cromosomiche è stato dello 0.160% nella Frisona e dello 0.140% nella Bruna; alla costituzione di questo valore finale, nella Frisona hanno contribuito maggiormente le disomie (0.110%) rispetto alle diploidie (0.050%), mentre nella Bruna il contributo è stato sostanzialmente simile (0.078% di disomia e 0.062% di diploidia).

A partire da questi dati, e assumendo che non ci siano differenze significative nell'incidenza di aneuploidie per i diversi cromosomi, è possibile calcolare l'incidenza totale di anomalie spermatiche per questa specie, applicando il metodo della stima conservativa (aneuploidie totali=2X iperaploidia); le cellule ipoaploidi non possono infatti essere conteggiate, in quanto indistinguibili da quelle prive di segnale a causa di errori nel corso del processo di ibridazione. Per la razza Frisona il valore di aneuploidia totale è stato del 6.6% (0.110% x 30 cromosomi = 3.3%; 2 x 3.3 = 6.6%) e per la razza Bruna del 4.68% (0.078 x 30 cromosomi = 2.34%; 2 x 2.34 = 4.68%). Tuttavia diversi autori hanno riportato, nell'uomo e nel topo, l'esistenza di differenze significative nell'incidenza di aneuploidie spermatiche tra i vari

cromosomi (Bischoff et al., 1994; Chevret et al., 1995; Martin et al., 1995; Templado et al., 2005). Sarà quindi necessario estendere il presente studio analizzando altri cromosomi, in modo da determinare con maggiore precisione la frequenza totale di spermatozoi portatori di anomalie cromosomiche nelle varie razze bovine.

La tabella 6 riporta una comparazione dei dati ottenuti nel presente lavoro con quelli disponibili in letteratura per il bovino, pecora, capra, suino e uomo.

	Bufalo river	Pecora	Capra	Suino	Uomo	Frisona svedese	Frisona italiana	Bruna italiana
Numero di individui	3	3	3	17	Review	5	10	10
Sonde utilizzate	X, Y	X, Y	X, Y	Y	Review	X, Y	X, Y	X, Y
% disomia dei cromosomi sessuali	0,160 ^a	0 ^a	0,164 ^a	0,094 ^b	0,260	0,125 ^b	0,110 ^c	0,078 ^c
% diploidia	0,064 ^a	0,033 ^a	0,229 ^a	0,177 ^b	0,190	0,045 ^b	0,050 ^c	0,062 ^c
Referenza	(Di Berardino et al., 2004)	(Di Berardino et al., 2004)	(Di Berardino et al., 2004)	(Rubes et al., 1999)	(Templado et al., 2005)	(Hassanane et al., 1999)	(presente lavoro)	(presente lavoro)

^a 1000 spermatozoi per individuo

^b 10000 spermatozoi per individuo

^c 5000 spermatozoi per individuo

Tabella 6 – Comparazione dei dati sulle anomalie cromosomiche spermatiche in diverse specie di animali domestici e nell'uomo.

I valori di anomalie totali trovati nel presente studio (0.160% e 0.140% per la razza Frisona Italiana e Bruna Italiana, rispettivamente) sono simili a quelli riportati da Hassanane et al. (1999) per la Frisona svedese (0.170%). Analogamente, sono simili i valori riscontrati nella Frisona italiana di disomia e diploidia (0.110% e 0.050%) a quelli riportati per la Frisona svedese (0.125% e 0.045%), a conferma dell'estrema uniformità genetica di questa razza. Da queste due razze si differenzia leggermente la Bruna italiana, che ha mostrato una frequenza di disomia e diploidia rispettivamente dello 0.078% e 0.062%. Il fatto che le due razze di frisona, analizzate in due diversi studi, mostrino valori molto simili tra di loro, e differenti da quelli trovati per la Bruna, sembra confermare l'esistenza di differenze interrazziali, anche se

sarà necessario analizzare un numero maggiore di razze e di individui, al fine di chiarire quanta della variabilità osservata è legata al tipo genetico. Il bufalo river, specie filogeneticamente vicina al bovino, ha un'incidenza di spermatozoi diploidi sostanzialmente simile a questo (0.064%), mentre l'incidenza di disomia è maggiore (0.160%). Per il suino sono disponibili solo i dati sulla frequenza di disomia per il cromosoma Y, 1 e 10, mentre non si conosce la frequenza di disomia per il cromosoma X; l'incidenza totale di aneuploidie per i cromosomi sessuali è quindi sicuramente maggiore rispetto al valore di 0.094% riportato in tabella. La capra e l'uomo mostrano valori più elevati tanto di disomie, quanto di diploidie, mentre la pecora sembra essere la specie con la minore frequenza di aneuploidie spermatiche, anche se questo dato andrebbe confermato tramite l'analisi di un maggiore numero di cellule. Dai dati esposti risulta evidente che esistono delle differenze interspecifiche nell'incidenza di anomalie cromosomiche spermatiche; queste differenze potrebbero in parte essere spiegate dalla differente intensità di selezione artificiale a cui le diverse specie sono state sottoposte nel corso del tempo. La selezione in favore degli animali più fertili potrebbe avere abbassato, nel corso delle generazioni, la frequenza di spermatozoi geneticamente sbilanciati, con un effetto tanto più marcato, quanto più tale selezione è stata intensa, come nel caso dei bovini. Per verificare questa ipotesi sarebbe interessante comparare le specie domestiche e selvatiche di una stessa famiglia; queste ultime, non essendo state sottoposte a selezione da parte dell'uomo, consentirebbero di conoscere l'influenza della selezione artificiale sul tasso di aneuploidie spermatiche.

Gli ovociti sono stati analizzati utilizzando sonde specifiche per i cromosomi Xcen e 5. La frequenza totale di ovociti diploidi è stata del 14.4%; i dati riportati in letteratura, ottenuti utilizzando metodi convenzionali, indicano una frequenza normale, per gli ovociti maturati in vitro, del 10-12% di diploidia (Yadav et al. 1991; Sosnowski et al., 1996). L'incidenza di diploidia non è stata simile tra le due razze oggetto di studio; la Bruna italiana

ha avuto una frequenza maggiore rispetto alla Frisone italiana (18.4% e 11.2%, rispettivamente). I test statistici indicano che questa differenza è quasi al limite della significatività ($p=0.10$); sarà quindi necessario aumentare il numero delle osservazioni per confermare l'esistenza di differenze interraziali nell'incidenza di ovociti diploidi. La frequenza di ovociti aneuploidi (disomici + nullisomici) è stata calcolata seguendo degli stretti criteri di osservazione; inoltre, solo gli ovociti in cui l'aneuploidia veniva confermata da una situazione complementare nel globulo polare sono stati considerati anormali. La disomia degli ovociti è stata sempre confermata dalla nullisomia del globulo e viceversa. In totale, 4 su 179 (2.2%) ovociti sono risultati aneuploidi; la nullisomia e la disomia hanno avuto esattamente la stessa frequenza (1.1%) e non sono state evidenziate differenze significative tra le due razze. Il cromosoma 5 ha avuto un'incidenza di aneuploidia superiore rispetto al cromosoma X (1.7% e 0.5%). Analogamente a quanto dimostrato nell'uomo (Pacchierotti et al., 2007), quindi, i diversi cromosomi sembrano avere diversi tassi di non-disgiunzione.

Assumendo come frequenza media di aneuploidia cromosomiale il valore riscontrato per i due cromosomi analizzati nel presente studio (1.1%), si può estrapolare che circa il 30% degli ovociti prodotti in vitro è aneuploide. Questo valore risulta più elevato di quello riscontrato da altri autori (6-7%) utilizzando metodi convenzionali (Yadav et al., 1991; Sosnowski et al., 1996). Tuttavia, la determinazione dell'esatto numero cromosomico in meiosi di ovociti utilizzando metodi convenzionali risulta abbastanza difficoltosa, a causa della qualità non sempre ottimale dei preparati; con questi metodi, inoltre, non è possibile confermare il risultato attraverso l'analisi del rispettivo globulo polare. Il metodo FISH sviluppato nel presente lavoro permette l'analisi simultanea di solamente due cromosomi, ma è estremamente accurato. Il valore da noi riscontrato è comparabile con quelli ottenuti in altre specie animali utilizzando la metodica FISH. Nel suino l'incidenza di aneuploidia è stata stimata, con metodo FISH, intorno al 27% (Vozdova et al., 2001), mentre i metodi convenzionali indicavano valori del 4-5% (McGaughey e Polge, 1971; Sosnowski et al.,

2003). Nell'uomo alcuni studi riportano frequenze di ovociti aneuploidi molto elevate, fino al 46.6% (Pacchierotti et al., 2007). Esiste una certa difformità di dati tra i vari laboratori, ma sembra che i metodi convenzionali tendano a sottostimare la reale incidenza di ovociti aneuploidi.

Dai risultati del presente lavoro emerge chiaramente che la percentuale di anomalie cromosomiche nelle cellule germinali è profondamente diversa tra i generi maschile e femminile; mentre gli spermatozoi anormali rappresentano il 5-6% del totale, gli ovociti con anomalie cromosomiche (aneuploidie o disomie) sono circa il 40%. Tuttavia gli ovociti analizzati nel presente studio sono stati maturati in vitro, il che potrebbe giustificare, in parte, una percentuale così alta di anomalie. Anche le condizioni di maturazione possono essere causa di aumenti nel tasso di aneuploidie ovocitarie, come evidenziato nel topo da A'arabi et al. nel 1997, i quali riportano risultati differenti utilizzando 4 differenti terreni di coltura per la maturazione. La frequenza più bassa è stata riscontrata utilizzando il medium TCM-199; poiché nel presente lavoro è stato utilizzato lo stesso medium, è possibile ipotizzare che l'influenza delle condizioni di maturazione in vitro sia stata minimizzata. Al di là del tipo di terreno utilizzato, comunque, la stessa maturazione in vitro può essere causa di maggiori frequenze di non-disgiunzione cromosomica rispetto alla situazione in vivo. Questo è stato chiaramente dimostrato per gli embrioni di diverse specie animali: nel bovino la percentuale di embrioni anormali in vivo e in vitro è rispettivamente del 25% e del 72.2% (Viuff et al., 1999). Analoga situazione si riscontra nella pecora (19.6% e 65.3%, rispettivamente in vivo e in vitro) (Coppola et al., 2007), e nel cavallo (18.2% e 40.0%, rispettivamente in vivo e in vitro) (Rambags et al., 2005). Nonostante i progressi effettuati nel campo delle biotecniche riproduttive, esiste un effetto deleterio piuttosto marcato durante la produzione di embrioni in vitro a partire da ovociti immaturi. La produzione in vitro di embrioni è un processo che richiede tre steps: maturazione dell'ovocita, fertilizzazione e cultura in vitro. Solo il 30-40%

di questi ovociti raggiunge lo stadio di blastocisti (Lonergan, 2007) e può quindi essere trasferito o congelato per usi futuri. Il restante 60-70% si arresta negli stadi precedenti. L'alto tasso di anomalie cromosomiche che si riscontra a seguito della maturazione in vitro negli ovociti potrebbe spiegare, in parte, la bassa efficienza del sistema di produzione. L'integrazione dei presenti dati con quelli ottenuti su ovociti prodotti in vivo e recuperati dopo la maturazione, consentirà di chiarire i reali effetti determinati dall'ambiente di coltura in vitro sull'incidenza di anomalie cromosomiche negli ovociti.

È possibile che gli ovociti aneuploidi, una volta fecondati, vadano incontro ad arresto dello sviluppo molto precocemente. Recenti studi, utilizzando la tecnologia dei microarray, hanno analizzato, nel bovino, i cambiamenti dell'espressione genica embrionale che avvengono dalla fase di ovocita immaturo fino allo stadio di blastocisti (Misirlioglu et al., 2006). Nelle prime fasi di sviluppo, l'embrione dipende interamente dai trascritti materni che vengono accumulati nel corso della gametogenesi. L'attivazione del genoma embrionale (EGA) avviene solo intorno allo stadio di 8-16 cellule; tuttavia, una attivazione minore del genoma inizia già allo stadio di 1 cellula e interessa specifici geni. Ad esempio sul cromosoma 5, oggetto del presente studio, sono stati identificati alcuni geni importanti la cui trascrizione dal genoma embrionale inizia molto precocemente; si tratta di geni che intervengono sia nei processi metabolici, MGST1 (Microsomal glutathione s-transferase 1), LDHB (Lactate dehydrogenase B), sia nel trasporto di elettroni, COX6B (Cytochrome c oxidase subunit VIb) e TXN2 (thioredoxin 2), sia nella traduzione del segnale, COPZ1 (Coatomer protein complex subunit 1) e SLC25A3 (Solute carrier family 25) e nella regolazione della trascrizione, BTG1 (B cell translocation gene 1, anti proliferative). La presenza sotto- o soprannumeraria di questi geni in caso di aneuploidia potrebbe comportare una loro sotto- o sovraespressione, con conseguente alterazione del metabolismo cellulare e arresto dello sviluppo zigotico nelle primissime fasi, giustificando la bassa percentuale di sviluppo a blastocisti nei sistemi in vitro.

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il metodo FISH sviluppato nel presente lavoro si è rivelato idoneo allo studio delle anomalie cromosomiche di spermatozoi ed ovociti nella specie bovina. Per la prima volta sono stati comparati i dati relativi a due razze, distintamente per i generi maschile e femminile. Le possibili applicazioni di questo metodo riguardano:

- il miglioramento delle condizioni di coltura in vitro, al fine di aumentare la percentuale di blastocisti trasferibili; ciò è particolarmente importante sia nella pratica zootecnica, da un punto di vista economico, sia, ad esempio, nelle razze a limitata diffusione, per le quali si ricorre alla produzione embrionale in vitro come metodo di conservazione;
- l'identificazione e rimozione degli agenti aneugenici presenti nell'ambiente di allevamento e nell'alimentazione che possono causare una riduzione della fertilità, con conseguenti perdite economiche;
- il monitoraggio ambientale, realizzato seguendo nel tempo l'evolversi di tale tipo di anomalie in gruppi di animali, in relazione ai cambiamenti che intervengono nell'ambiente circostante;
- la realizzazione di studi di mutagenesi in vitro al fine di ottenere informazioni da trasferire nel campo della ricerca biomedica umana.

7. BIBLIOGRAFIA

- A'arabi SY, Roussel JD, Chandler JE (1997). Chromosomal analysis of mammalian oocytes matured in vitro with various culture systems. *Theriogenology* 48:1173-83.
- Abdel Malak G, Crihiu EP, Thibier M (1984). Hormonal patterns and histological findings in a 61, XXY young postpuberal bull. *Zuchthig.* 19:155-163.
- Adler I, Schmid TE, Baumgartner A (2002). Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-fish assay: a review of the present data base. *Mutation research* 504:173-82.
- Agerholm JS e Christensen K (1993). Trisomy 22 in a calf. *Zentralblatt für veterinärmedizin. reihe a* 40:576-81.
- Ahmed S, Mahrous K, El-Sobhy H (1998). Cytogenetic study of buffalo under pollution of environmental conditions. *Mutation research* 419:21-26.
- Alexander B, Coppola G, Di Berardino D, Rho GJ, St John E, Betts DH, King WA (2006). The effect of 6-dimethylaminopurine (6-dmap) and cycloheximide (chx) on the development and chromosomal complement of sheep parthenogenetic and nuclear transfer embryos. *Molecular reproduction and development* 73:20-30.
- Angell RR, Templeton AA, Aitken RJ (1986). Chromosome studies in human in vitro fertilization. *Hum Genet* 72:333-339.
- Attia SM, Schmid TE, Badary OA, Hamada FM, Adler I (2002). Molecular cytogenetic analysis in mouse sperm of chemically induced aneuploidy: studies with topoisomerase ii inhibitors. *Mutation research* 520:1-13.
- Baker TG e Franchi LL (1967). The fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. *Journal of reproduction and fertility* 14:511-3.
- Balhorn R (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *Journal of cell biology* 93:298-305.
- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Watkins B (1991). Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry* 30:175-181.
- Basrur PK, Kanagawa H, Podliachouk L (1970). Further studies on the cell populations of an intersex horse. *Canadian Journal of comparative medicine* 34:294-298.
- Benkhalifa M, Bonneau M, Popescu P, Boscher J, Boucher D, Malet P (1992). A method for cytogenetic analysis of boar spermatozoa using hamster oocytes. *Annales de genetique* 35:61-64.
- Bird J e Houghton J (1990). Cytogenetics of porcine sperm chromosomes following ivf of zona-free hamster oocytes. *Archives of andrology* 25:45-57.
- Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt KJ, Shaffer LG (1994). Estimates of aneuploidy using

multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenetics and cell genetics* 66:237-43.

- Bonnet-garnier A, Pinton A, Berland H, Hayes H, Eggen A, Ducos A, Darre R (2004). Sperm nuclei analysis of several 1/29 robertsonian translocation carriers using fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic and genome research* 106:P22
- Bonnet-garnier A, Pinton A, Berland H, Khireddine B, Eggen A, Yerle M, Darre R, Ducos A (2006). Sperm nuclei analysis of 1/29 robertsonian translocation carrier bulls using fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic and genome research* 112:241-247.
- Bonnet-garnier A, Lacaze S, Beckers JF, Berland HM, Pinton A, Yerle M, Ducos A (2008). Meiotic segregation analysis in cows carrying the t(1;29) robertsonian translocation. *Cytogenetic and genome research* 120:91-6.
- Booth PJ, Viuff D, Tan S, Holm P, Greve T, Callesen H (2003). Numerical chromosome errors in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. *Biology of reproduction* 68:922-8.
- Bugge M, Collins A, Petersen MB, Fisher J, Brandt C, Hertz JM, Tranebjaerg L, De Lozier-blanchet C, Nicolaidis P, Brøndum-nielsen K, Morton N, Mikkelsen M (1998). Non-disjunction of chromosome 18. *Human molecular genetics* 7:661-9.
- Buoen LC, Seguin BE, Weber AF, Shoffner RN. (1981). X-trisomy karyotype and associated infertility in a Holstein heifer. *J Am Vet Med Assoc.* 179(8):808-11.
- Bureau WS, Bordignon V, Léveillé C, Smith LC, King WA (2003). Assessment of chromosomal abnormalities in bovine nuclear transfer embryos and in their donor cells. *Cloning and stem cells* 5:123-32.
- Cheng E, Chen Y, Gartler S. (1995). A cytological evaluation of the production line hypothesis in human oogenesis using chromosome painting. *Am J hum Genet* 57:A51.
- Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, Pelletier R, Cozzi J, Sèle B (1995). Meiotic segregation of the x and y chromosomes and chromosome 1 analyzed by three-color fish in human interphase spermatozoa. *Cytogenetics and cell genetics* 71:126-30.
- Christensen K e Juul L (1999). A case of trisomy 22 in a live hereford calf. *Acta veterinaria scandinavica* 40:85-8.
- Coppola G, Alexander B, Di Berardino D, St John E, Basrur PK, King WA (2007). Use of cross-species in-situ hybridization (zoo-fish) to assess chromosome abnormalities in day-6 in-vivo- or in-vitro-produced sheep embryos. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 15:399-408.
- Creighton P e Houghton J (1986). The analysis of the chromosomes of bovine sperm. *Heredity* 57:135-135.
- Creighton P e Houghton J (1987). Visualization of pig sperm chromosomes by invitro penetration of zona-free hamster ova. *Journal of reproduction and fertility* 80:619-622.

- Cribru EP, Di Berardino D, Di Meo GP, Eggen A, Gallagher DS, Gustavsson I, Hayes H, Iannuzzi L, Popescu CP, Rubes J, Schmutz S, Stranzinger G, Vaiman A, Womack J (2001). International system for chromosome nomenclature of domestic bovids (iscn db 2000). *Cytogenetics and cell genetics* 92:283-99.
- De Giovanni A, Succi G, Molteni L, Castiglioni M (1979). A new autosomal translocation in 'Alpine grey cattle'. *Ann Genet Sel Anim* 11:115-120.
- De Lorenzi L, De Giovanni AM, Malagutti L, Molteni L, Sciaraffa F, Tamburini A, Zannotti M (2005). Genotoxic activity of the Fumosis B1 mycotoxin in cultures of bovine lymphocytes. *Italian Journal of Animal Science* 4:395-402.
- Dekaban A (1965). Persisting clone of cells with an abnormal chromosome in a woman previously irradiated. *Journal of nuclear medicine: official publication, society of nuclear medicine* 6:740-6.
- Di Berardino D, Nicodemo D, Pauciullo A, Cosenza G, Ramunno L, Rubes J (2005). Aneuploidy and genome organization in sperm nuclei of river buffalo and cattle detected by fluorescence in situ hybridization (fish) and chromosome microdissection. *Italian journal of animal science* 4:40-42.
- Di Berardino D, Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Coppola G, Coppola G, Enne G, Rubes J (2004). Sexing river buffalo (*bubalus bubalis* L.), sheep (*ovis aries* L.), goat (*capra hircus* L.), and cattle spermatozoa by double color fish using bovine (*bos taurus* L.) x- and y-painting probes. *Molecular reproduction and development* 67:108-15.
- Di Meo GP, Molteni L, Perucatti A, De Giovanni A, Incarnato D, Succi G, Schibler L, Cribru EP, Iannuzzi L (2000). Chromosomal characterization of three centric fusion translocations in cattle using G-, R- and C-banding and FISH technique. *Caryologia* 53: 213-218.
- Di Meo GP, Perucatti A, Chaves R, Adegas F, De Lorenzi L, Molteni L, De Giovanni A, Incarnato D, Guedes-Pinto H, Eggen A, Iannuzzi L (2006). Cattle rob (1;29) originating from complex chromosome rearrangements as revealed by both banding and FISH-mapping techniques. *Chromosome Research* 14:649-655.
- Ducos A, Séguéla A, Pinton A, Berland H, Brun-baronnat C, Darré A, Manesse M, Darré R (2000). Trisomy 26 mosaicism in a sterile holstein-friesian heifer. *The veterinary record* 146:163-4.
- Ducos A, Revay T, Kovacs A, Hidas A, Pinton A, Bonnet-Garnier A, Molteni L, Slota E, Switonski M, Arruga MV, van Haeringen WA, Nicolae I, Chaves R, Guedes-Pinto H, Andersson M, Iannuzzi L (2008). Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenetic and Genome research* 120(1-2):26-41.
- Dunn HO, Lein DH, Mc Entee K (1980). Testicular hypoplasia in a Hereford bull with 61,XXY karyotype: the bovine counterpart of human Klinefelter's syndrome. *Cornell Vet* 70:137-146.
- Ectors FJ, Koulischer L, Jamar M, Herens C, Verloes A, Remy B, Beckers JF (1995).

Cytogenetic study of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 44:445-50.

- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J (2000). Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human reproduction update*. 6:93-105.
- Egozcue S, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Egozcue J (2000). Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *Journal of assisted reproduction and genetics* 17:307-9.
- Evans HJ (1962). Chromosome aberrations induced by ionizing radiations. 13:221-321.
- Führer F, Mayr B, Schellander K, Kalat M, Schleger W (1989). Maturation competence and chromatin behaviour in growing and fully grown cattle oocytes. *Zentralblatt für veterinärmedizin. reihe a* 36:285-91.
- Gersen SL e Keagle MB (eds) (2005). The principles of clinical cytogenetics, 2nd edn. Humana Press, 2005.
- Gjorret JO, Wengle J, Maddox-hyttel P, King WA (2005). Chronological appearance of apoptosis in bovine embryos reconstructed by somatic cell nuclear transfer from quiescent granulosa cells. *Reproduction in domestic animals = zuchthygiene* 40:210-6.
- Gluhovschi N e Bistriceanu M (1972). Cercetari clinice si citogenetice in unele cazuri cu nanism la taurine. *Seria Med. Vet.* 13:429-433.
- Griffiths AJF (2004). An introduction to genetic analysis, 8th Edition. W.H.Freeman & Co Ltd.
- Habermann FA, Winter A, Olsaker I, Reichert P, Fries R (2005). Validation of sperm sexing in the cattle (bos taurus) by dual colour fluorescence in situ hybridization. *Journal of animal breeding and genetics = zeitschrift für tierzüchtung und züchtungsbiologie* 122 suppl 1:22-7.
- Halnan C (1976). A cytogenetic survey of 1101 australian cattle of 25 different breeds. *Ann genet sel anim* 8:131-139.
- Han TL, Ford JH, Webb GC, Flaherty SP, Correll A, Matthews CD (1993). Simultaneous detection of x- and y-bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. *Molecular reproduction and development* 34:308-13.
- Han TL, Webb GC, Flaherty SP, Correll A, Matthews CD, Ford JH (1992). Detection of chromosome 17- and x-bearing human spermatozoa using fluorescence in situ hybridization. *Molecular reproduction and development* 33:189-94.
- Hare W, Singh E, Betteridge K, Eaglesome M, Randall G, Mitchell D, Bilton R, Trounson A (1980). Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. *Canadian journal of genetics and cytology* 22:615-626.
- Hassanane M, Kovacs A, Laurent P, Lindblad K, Gustavsson I (1999). Simultaneous detection of x- and y-bearing bull spermatozoa by double colour fluorescence in situ

hybridization. *Molecular reproduction and development* 53:407-12.

- Hassold T, Sherman S, Hunt PA (1995). The origin of trisomy in humans. *Progress in clinical and biological research* 393:1-12.
- Hassold TJ (1998). Nondisjunction in the human male. *Current topics in developmental biology*. 37:383-406.
- Hassold T e Hunt P (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy *Nature Reviews Genetics* 2: 280-91.
- Henderson SA e Edwards RG (1968). Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* 218:22-28.
- Herzog A e Hoehn H (1968). *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 75: 604-606.
- Herzog A, Hohn H, Rieck GW (1977). Survey of recent situation of chromosome pathology in different breeds of German cattle. *Ann Genet Sel Anim.* 9:471-491.
- Herzog A e Hoehn H (1991). Two additional cases of autosomal trisomy, 61,xy,+12 and 61,xx,+12, in cattle. *Cytogenetics and cell genetics* 57:211-3.
- Hinton TG, Alexakhin R, Balonov M, Gentner N, Hendry J, Prister B, Strand P, Woodhead D (2007). Radiation-induced effects on plants and animals: findings of the United Nations Chernobyl forum. *Health physics* 93:427.
- Hoffman R (1967). *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.* 80:390-391.
- Hsieh DP (1982). Genotoxic agents in the agro-ecosystem. Chairman's comments. *Basic life sciences* 21:117-118.
- Hunt PA e Hassold TJ (2008). Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends in genetics: tig* 24:86-93.
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Leifsson PS, Eggen A, Christensen K (2001). A case of trisomy 28 in cattle revealed by both banding and fish-mapping techniques. *Hereditas* 134:147-51.
- Iannuzzi A, Di Meo GP, Caputi Jambrenghi A, Vonghia G, Iannuzzi L, Rangel-Figueiredo T (2008). Frequency and distribution of rob(1;29) in eight Portuguese cattle breeds. *Cytogenetic and Genome research* 120:147-149.
- Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H, Hanada A, Nakahara T (1989). Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from in vitro fertilization. *Gamete research* 22:83-91.
- Iwasaki S Nakahara T (1990). Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized in vitro. *Theriogenology* 34:683-90.
- Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T (1990). Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Journal of reproduction and fertility* 90:279-84.

- Iwasaki S, Hamano S, Kuwayama M, Yamashita M, Ushijima H, Nagaoka S, Nakahara T (1992). Developmental changes in the incidence of chromosome anomalies of bovine embryos fertilized in vitro. *The journal of experimental zoology* 261:79-85.
- Jacobs PA (1992). The chromosome complement of human gametes. *Oxford reviews of reproductive biology*. 14:47-72.
- Jagiello GM, Miller WA, Ducayen MB, Lin JS (1974). Chiasma frequency and disjunctive behavior of ewe and cow oocytes matured in vitro. *Biology of reproduction* 10:354-63.
- Kadmiri M, Glouib K, Verschaeve L, Hilali A (2006). Cytogenetic monitoring of domestic mammals exposed to wastewaters from the localities of Dladla and Boukallou near Settat, Morocco. *Environment international* 32:690-696.
- Kawarasaki T, Kohsaka T, Sone M, Yoshida M, Bamba K (1995). Detection of y-bearing porcine spermatozoa by in situ hybridization using digoxigenin-labeled, porcine male-specific dna probe produced by polymerase chain reaction. *Molecular reproduction and development* 40:455-9.
- Kawarsky SJ, Basrur PK, Stubbings RB, Hansen PJ, King WA (1996). Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biology of reproduction* 54:53-9.
- King WA, Linares T, Gustavsson I, Bane A (1979). A method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. *Vet Sci Commun* 3:51-56.
- King WA, Gustavsson I, Popescu CP, Linares T (1981). Gametic products transmitted by rcp (13q-;14q+) translocation heterozygous pigs and resulting embryonic loss. *Hereditas* 95:239-246.
- King WA, Xu KP, Sirard MA, Greve T, Leclerc P, Lambert RD, Jacques P (1988). Cytogenetic study of parthenogenetically activated bovine oocytes matured in vivo and in vitro. *Gamete research* 20:265-74.
- King WA, Desjardins M, Xu K, Bousquet D (1990). Chromosome analysis of horse oocytes cultured invitro. *Genetics selection evolution* 22:151-160.
- King WA, Coppola G, Alexander B, Mastromonaco G, Perrault S, Nino-soto MI, Pinton A, Joudrey EM, Betts DH (2006). The impact of chromosomal alteration on embryo development. *Theriogenology* 65:166-77.
- King WA (2008). Chromosome variation in the embryos of domestic animals. *Cytogenetic and genome research* 120:81-90.
- Kline J, Kinney A, Reuss M, Kelly A, Levin B, Ferin M, Warburton D (2003). Trisomy and the size of the oocyte pool. No connection. *Am.J. Hum. Genet.* 73:203.
- Kobayashi J, Kohsaka T, Sasada H, Umezu M, Sato E (1999). Fluorescence in situ hybridization with y chromosome-specific probe in decondensed bovine spermatozoa.

Theriogenology 52:1043-54.

- Koenig JL e Stormshak F (1993). Cytogenetic evaluation of ova from pubertal and third-estrus gilts. *Biology of reproduction* 49:1158-62.
- Kovacs A e Csukly S (1980). Effect of the 1/29 translocation upon fertility in Hungarian Simmental cattle. *Proceedings of the 4th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals*, Uppsala, Sweden, pp35-43.
- Kovacs A (1989). Application of cytogenetics to cattle breeding improvement, in Halnan CRE (ed): *Cytogenetics of animals* (CABI).
- Kovács A, Foote RH, Lein DH (1990). 1;16 tandem translocation with trisomy 16 in a brown swiss bull. *The veterinary record* 127:205.
- Kovacs A, Gustavsson I, Csukly S, Karakas P (1992). Lifetime production of Simmental cows carrying the 1;29 translocation. *Proceedings of the 10th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals*, Utrecht, The Netherlands, pp121-125.
- Kovacs A (1994). Fertility and milk production of cattle carrying the 1;29 chromosome translocation. *Hung J Anim Prod* 43:155-181.
- Krumrych W (2003). A new case of XXY trisomy in a bull. *Medycyna Weterynaryjna* 59: 506-509.
- Kulikova SG, Petukhov VL, Grafodatskiĭ AS (1991). A new case of trisomy in cattle. *Tsitol genet* 25:28-31.
- Lamb NE, Freeman SB, Savage-austin A, Pettay D, Taft L, Hersey J, Gu Y, Shen J, Saker D, May KM, Avramopoulos D, Petersen MB, Hallberg A, Mikkelsen M, Hassold TJ, Sherman SL (1996). Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis i and meiosis ii. *Nature genetics* 14:400-5.
- Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, Hallberg A, Hersey J, Karadima G, Pettay D, Saker D, Shen J, Taft L, Mikkelsen M, Petersen MB, Hassold T, Sherman SL (1997). Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Human molecular genetics* 6:1391-9.
- Lazutka JR (1996). Chromosome aberrations and rogue cells in lymphocytes of Chernobyl clean-up workers. *Mutation Research* 350:315-329.
- Lazutka JR (1996). Chromosome aberrations and rogue cells in lymphocytes of chernobyl clean-up workers. *Mutation research* 350:315-29.
- Lechniak D, Switoński M, Sosnowski M (1996). The incidence of bovine diploid oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 46:267-77.
- Lechniak D e Switoński M (1998). Aneuploidy in bovine oocytes matured in vitro. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 6:504-6.

- Lechniak D, Cieślak D, Sosnowski J (1998). Cytogenetic analysis of bovine parthenotes after spontaneous activation in vitro. *Theriogenology* 49:779-85.
- Lechniak D, Kaczmarek D, Stanisławski D, Adamowicz T (2002). The ploidy of in vitro matured bovine oocytes is related to the diameter. *Theriogenology* 57:1303-8.
- Lechniak D, Szczepankiewicz D, Kauss D, Szulc J, Szydlowski M (2005). Ivm media, oocyte diameter and donor genotype at ryr1 locus in relation to the incidence of porcine diploid oocytes after maturation in vitro. *Theriogenology* 64:202-12.
- Lechniak D, Warzych E, Pers-kameczyc E, Sosnowski J, Antosik P, Rubes J (2007). Gilts and sows produce similar rate of diploid oocytes in vitro whereas the incidence of aneuploidy differs significantly. *Theriogenology* 68:755-62.
- Li X, Zheng LK, Deng LX, Zhang Q (2001). [detection of numerical chromosome aberrations in sperm of workers exposed to benzene series by two-color fluorescence in situ hybridization]. *Yi chuan xue bao = acta genetica sinica* 28:589-94.
- Lioi M, Scarfi M, Di Berardino D (1995). An autosomal trisomy in cattle . *Genetics selection evolution* 27:473-476.
- Lioi M B, Scarfi MR, Santoro A, Barbieri R, Zeni O, Di Berardino D, Ursini MV (1998). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. *Mutation research* 403:13-20.
- Logue DN, Harvey MJA, Munro CD, Lennox B (1979). Hormonal and histological studies in a 61, XXY bull. *Vet Rec* 2: 500-503.
- Lonergan P (2007). State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Society of reproduction and fertility supplement* 64:315-25.
- Long SE (1977). Cytogenetic examination of pre-implantation blastocysts of ewes mated to rams heterozygous for the massey i (t1) translocation. *Cytogenetics and cell genetics* 18:82-9.
- Long SE Williams C (1978). Chromosomal abnormalities in ova and zygotes from normal ewes mated to normal rams. *The veterinary record* 102:153.
- Long SE Williams CV (1980). Frequency of chromosomal abnormalities in early embryos of the domestic sheep (ovis aries). *Journal of reproduction and fertility* 58:197-201.
- Long SE Williams CV (1982). A comparison of the chromosome complement of inner cell mass and trophoblast cells in day-10 pig embryos. *Journal of reproduction and fertility* 66:645-8.
- Long SE (1984). Autosomal trisomy in a calf. *The veterinary record* 115:16-7.
- Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO (2000). Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Human reproduction (oxford, england)* 15:1781-6.

- Makinen A, Sliyslo I, Alanko M (1987). Autosomal trisomy in a heifer. *Acta veterinaria Scandinavica* 28:1-8.
- Malan V, Vekemans M, Turleau C (2006). Chimera and other fertilization errors. *Clinical genetics* 70:363-373.
- Marcum JB (1974). The freemartin syndrome. *Anim Breed Abstr* 42: 227-242.
- Martin RH, Spriggs E, Ko E, Rademaker AW (1995). The relationship between paternal age, sex ratios, and aneuploidy frequencies in human sperm, as assessed by multicolor fish. *American journal of human genetics* 57:1395-9.
- Martin RH, Ernst S, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Summers N (1997). Chromosomal abnormalities in sperm from testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Human genetics* 99:214-8.
- Massip K, Berland H, Bonnet N, Calgaro A, Billoux S, Baquie V, Mary N, Bonnet-garnier A, Ducos A, Yerle M, Pinton A (2008). Study of inter- and intra-individual variation of meiotic segregation patterns in t(3;15)(q27;q13) boars. *Theriogenology* 70:655-661.
- Mayr B, Krutzler H, Auer H, Schleger W, Sasshofer K, Glawischnig E (1985). A viable calf with trisomy 22. *Cytogenetics and cell genetics* 39:77-9.
- Mccauley TC, Mazza MR, Didion BA, Mao J, Wu G, Coppola G, Coppola GF, Di Berardino D, Day BN (2003). Chromosomal abnormalities in day-6, in vitro-produced pig embryos. *Theriogenology* 60:1569-80.
- Mcfadden DE e Friedman JM (1997). Chromosome abnormalities in human beings. *Mutation research* 396:129-40.
- Mcfeely RA (1967). Chromosome abnormalities in early embryos of the pig. *Journal of reproduction and fertility* 13:579-81.
- Mcfeely RA e Rajakoski E (1968). Chromosome studies on early embryos of the cow. *Proc int congr anim reprod artif insemin* 6:905-907.
- Mcgaughey RW e Polge C (1971). Cytogenetic analysis of pig oocytes matured in vitro. *The journal of experimental zoology* 176:383-95.
- Mcgaughey RW (1977). The culture of pig oocytes in minimal medium, and the influence of progesterone and estradiol-17beta on meiotic maturation. *Endocrinology* 100:39-45.
- Meistrich M, Reid B, Barcellona W (1976). Changes in sperm nuclei during spermiogenesis and epididymal maturation. *Experimental cell research* 99:72-78.
- Meistrich ML, Brock WA, Grimes SR, Platz RD, Hnilica LS (1978). Nuclear protein transitions during spermatogenesis. *Federation proceedings* 37:2522-5.

- Mikhaïlenko AV, Pulina GA, Iazykov AA, Gazarian KG (1983). [separate groups in the oocyte population of cows, their cytogenetic analysis and capacity for in vitro maturation]. *Nauchnye doklady vyssheĭ shkoly. biologicheskie nauki* 57-62.
- Minervini F, Dell'aquila ME, Maritato F, Minoia P, Visconti A (2001). Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with bibra* 15:489-95.
- Misirlioglu M, Page GP, Sagirkaya H, Kaya A, Parrish JJ, First NL, Memili E (2006). Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 103:18905-10.
- Molteni L, De Giovanni Macchi A, Meggiolaro D, Sironi G, Enice F, Popescu P (1999). New cases of XXY constitution in cattle. *Animal Reproduction Science* 55:107-113.
- Moor RM e Crosby IM (1985). Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *Journal of reproduction and fertility* 75:467-73.
- Moreno-Millán M, Delgado Bermejo JV, Alonso Garcia F. (1987). X-trisomy in Friesian cow with continuous oestrus. *Vet Rec.* 121(8):167-8.
- Mori M, Sasaki M, Makino S, Ishikawa T, Kawata K (1969). Autosomal trisomy in a malformed newborn calf. *Proc. Japan Acad.* 45:955-959.
- Murakami R, Miyake Y, Kaneda Y (1989). Cases of xy female, single-birth freemartin and trisomy (61, xx, +20) observed in cytogenetical studies on 18 sterile heifers. *Nippon juigaku zasshi. the japanese journal of veterinary science* 51:941-5.
- Norberg HS, Refsdal AO, Garm ON, Nes N (1976). A case report of X trisomy in cattle. *Hereditas.* 82(1):69-72.
- Ocaña-quero JM, Pinedo-merlin M, Moreno-millan M (1999). Cytogenetic study of in vitro-derived bovine embryos. *Veterinary journal* 158:228-33.
- Ocaña-quero JM, Pinedo-merlín M, Moreno-millán M (1999). Influence of follicle size, medium, temperature and time on the incidence of diploid bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 51:667-72.
- Ogilvie CM (2008). Preimplantation testing for chromosome aneuploidy. *The Obstetrician & Gynaecologist.* 10:88–92.
- Pacchierotti F, Adler I, Eichenlaub-ritter U, Mailhes JB (2007). Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. *Environmental research.* 104:46-69.
- Padula AM (2005). The freemartin syndrome: an update. *Animal Reproduction Science* 87: 93-109.
- Parrilla I, Vázquez JM, Oliver-bonet M, Navarro J, Yelamos J, Roca J, Martínez EA (2003). Fluorescence in situ hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar

spermatozoa using specific dna direct probes labelled by nick translation. *Reproduction (cambridge, england)* 126:317-25.

- Perucatti A, Di Meo GP, Albarella S, Ciotola F, Incarnato D, Jambrenghi AC, Peretti V, Vonghia G, Iannuzzi L (2006). Increased frequencies of both chromosome abnormalities and SCEs in two sheep flocks exposed to high dioxin levels during pasturage. *Mutagenesis* 21:67-75.
- Pinheiro LEL, Almeida IL, Garcia JM, Basrur PK (1987). Trisomy X and 1/29 translocation in infertile heifers. *Theriogenology* 28(6):891-898.
- Pinton A, Ducos A, Yerle M (2004). Estimation of the proportion of genetically unbalanced spermatozoa in the semen of boars carrying chromosomal rearrangements using fish on sperm nuclei. *Genetics selection evolution* 36:123-137.
- Pinton A, Ducos A, Yerle M, Faraut T, Pellestor F (2004). Male and female segregation profiles in two reciprocal translocations t(12;14)(q13;q21) t(3;15)(q27;q13) in the pig species. *Fertility and sterility* 82:P387.
- Pinton A, Faraut T, Yerle M, Gruand J, Pellestor F, Ducos A (2005). Comparison of male and female meiotic segregation patterns in translocation heterozygotes: a case study in an animal model (*sus scrofa domestica* l.). *Human reproduction (oxford, england)* 20:2476-82.
- Pinton A, Letron I, Berland H, Bonnet N, Calgaro A, Bonnet A, Yerle M, Ducos A (2007). Meiotic studies in an azoospermic (y;14) translocated boar. *Chromosome research* 15:149-149.
- Pinton A, Letron I, Berland H, Bonnet N, Calgaro A, Garnier-bonnet A, Yerle M, Ducos A (2008). Meiotic studies in an azoospermic boar carrying a y;14 translocation. *Cytogenetic and genome research* 120:106-111.
- Piumi F, Vaiman D, Cribiu E P, Guérin B, Humblot P (2001) Specific cytogenetic labeling of bovine spermatozoa bearing x or y chromosomes using fluorescent in situ hybridization (fish). *Genetics, selection, evolution.: gse* 33:89-98.
- Prakash B, Balain DS, Lathwal SS, Malik RK (1995). Infertility associated with monosomy-X in a crossbred cattle heifer. *Vet Rec.* 137(17):436-7.
- Previtali C e Galli A (1996). Klinefelter's syndrome (61, XXY) in the bulls: preliminary results. *VIII Meeting Naz. Studio dell'efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico.* Bergamo, Italia, 10 Maggio.
- Rambags BPB, Krijtenburg PJ, Drie HFV, Lazzari G, Galli C, Pearson PL, Colenbrander B, Stout TAE (2005). Numerical chromosomal abnormalities in equine embryos produced in vivo and in vitro. *Molecular reproduction and development* 72:77-87.
- Ramesha K Goswami S (1994). Chromosome analysis of murrah buffalo (*bubalus-bubalis*) spermatozoa using zona-free hamster oocytes. *Theriogenology* 42:297-305.
- Ramesha K Goswami S (1995). Sperm chromosome analysis of karan-swiss and karan-

fries crossbred bulls. *Animal reproduction science* 37:291-298.

- Rens W, Yang F, Welch G, Revell S, O'Brien PC, Solanky N, Johnson LA, Ferguson Smith MA (2001). An x-y paint set and sperm fish protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. *Reproduction (cambridge, england)* 121:541-6.
- Révay T, Kovács A, Rens W, Gustavsson I (2002). Simultaneous detection of viability and sex of bovine spermatozoa. *Reproduction, fertility, and development* 14:373-6.
- Révay T, Kovács A, Presicce GA, Rens W, Gustavsson I (2003). Detection of water buffalo sex chromosomes in spermatozoa by fluorescence in situ hybridization. *Reproduction in domestic animals = zuchthygiene* 38:377-9.
- Revell SH (1963). Chromatid aberrations: The generalized theory. In "Radiation-Induced Chromosome Aberrations" (S. Wolff, ed.) pp. 41-72.
- Rieck GW, Hohn H, Herzog A (1970). X-trisomy in cattle with signs of familial disposition for meiotic disturbances. *Cytogenetics* 9:401-409.
- Robbins WA, Baulch JE, Moore D, Weier HU, Blakey D, Wyrobek AJ (1995). Three-probe fluorescence in situ hybridization to assess chromosome x, y, and 8 aneuploidy in sperm of 14 men from two healthy groups: evidence for a paternal age effect on sperm aneuploidy. *Reproduction, fertility, and development* 7:799-809.
- Robbins WA, Vine MF, Truong KY, Everson RB (1997). Use of fluorescence in situ hybridization (fish) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environmental and molecular mutagenesis* 30:175-83.
- Ross LO, Rankin S, Shuster MF, Dawson DS (1996). Effects of homology, size and exchange of the meiotic segregation of model chromosomes in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142:79-89.
- Roth Z e Hansen PJ (2005). Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction (cambridge, england)* 129:235-44.
- Rubes J, Borkovec L, Horínová Z, Urbanová J, Proroková I, Kulíková L (1992). Cytogenetic monitoring of farm animals under conditions of environmental pollution. *Mutation Research Letters* 283:199-210.
- Rubes J, Vozdová M, Kubicková S (1999). Aneuploidy in pig sperm: multicolor fluorescence in situ hybridization using probes for chromosomes 1, 10, and y. *Cytogenetics and cell genetics* 85:200-4.
- Rubes J, Vozdova M, Oracova E, Perreault SD (2005). Individual variation in the frequency of sperm aneuploidy in humans. *Cytogenetic and genome research*. 111:229-36.
- Rudak E, Jacobs P A, Yanagimachi R (1978). Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 274:911-3.

- Ruvinsky A e Spicer LJ (1999). Developmental genetics: Sex determination and differentiation, in Fries R, Ruvinsky A (eds): *The genetics of cattle*, pp456-461 (CABI Publishing).
- Ryabokon NI e Goncharova RI (2006). Transgenerational accumulation of radiation damage in small mammals chronically exposed to Chernobyl fallout. *Radiation and environmental biophysics* 45:167-177.
- Sankaranarayanan K (1979). The role of non-disjunction in aneuploidy in man. An overview. *Mutation Research* 61: 1-28.
- Saunders K M Parks J E (1999). Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. *Biology of reproduction* 61:178-87.
- Schwerin M, Blottner S, Thomsen P, Roschlau D, Brockmann G (1991). Quantification of y-chromosome bearing spermatozoa of cattle using insitu hybridization. *Molecular reproduction and development* 30:39-43.
- Scott CD e Gregory PW (1965). An XXY trisomic in an intersex of *Bos taurus*. *Genetics* 52:473-474.
- Sears DD, Hegemann JH, Shero JH, Hieter P (1995). Cis-acting determinants affecting centromere function, sister-chromatid cohesion and reciprocal recombination during meiosis in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139:1159-73.
- Shi Q e Martin RH (2000). Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenetics and cell genetics*. 90:219-26.
- Sivikova K e Dianovsky J (1995). Sister-chromatid exchanges after exposure to metal-containing emissions. *Mutation research* 327:17-22.
- Slovinská L, Elbertová A, Mišúrová E (2004). Transmission of genome damage from irradiated male rats to their progeny. *Mut.Res* 559:29-37.
- Slozina N, Neronova E, Kharchenko T, Nikiforov A (1997). Increased level of chromosomal aberrations in lymphocytes of Chernobyl liquidators 6–10 years after the accident. *Mutation Research* 379:121-125.
- Slozina N, Neronova E, Kharchenko T, Nikiforov A (1997). Increased level of chromosomal aberrations in lymphocytes of chernobyl liquidators 6-10 years after the accident. *Mutation research* 379:121-5.
- Sosnowski J, Switoński M, Lechniak D, Moliński K (1996). Cytogenetic evaluation of in vitro matured bovine oocytes collected from ovaries of individual donors. *Theriogenology* 45:865-72.
- Sosnowski J, Lechniak D, Brzozowska M, Switoński M (1997). Cytogenetic analysis of horse oocytes matured in vitro for different periods of time. *Reproduction, nutrition, development* 37:63-8.
- Sosnowski J, Waroczyk M, Switonski M (2003). Chromosome abnormalities in secondary

pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 60:571-81.

- Süss U, Wüthrich K, Stranzinger G (1988). Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biology of reproduction* 38:871-80.
- Sutiaková I, Sutiak V, Rimková S, Poráčová J (2004). Chromosome damage in peripheral lymphocytes of sheep induced by chlorine in drinking water. *International journal of environmental health research* 14:381-90.
- Sutiaková I, Kovalkovicová N, Pisl J, Novotný J, Legáth J, Kovác G, Hlincíková S, Sutiak V (2006). Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in sheep subchronically exposed to the fungicide euparen multi (tolylfluanid). *Ecotoxicology and environmental safety* 64:312-20.
- Switonski M e Stranzinger G (1998). Studies of synaptonemal complexes in farm mammals: a review. *The Journal of heredity* 89:473-480.
- Sysa PS e Slota E (1984). The XXY syndrome in cattle. 6th Eur. Colloq. Cytogenet. Domest. Anim. Pp. 120-128.
- Tarkowski A (1966). *Cytogenetics* 5:294.
- Tateno H, Mikamo K, Kamiguchi Y, Shimada M, Hamano K (1986). Chromosomal method for identifying x-bearing and y-bearing sperms in the cattle. *Development growth & differentiation* 28:67-67.
- Tateno H e Mikamo K (1987). A chromosomal method to distinguish between x-bearing and y-bearing spermatozoa of the bull in zona-free hamster ova. *Journal of reproduction and fertility* 81:119-125.
- Tateno H, Akaike M, Fukui Y, Kamiguchi Y, Mikamo K (1990). A method for chromosome analysis of ram spermatozoa using zona-free hamster oocytes. *Theriogenology* 34:845-852.
- Tateno H, Miyake Y, Mori H, Kamiguchi Y, Mikamo K (1994). Sperm chromosome study of 2 bulls heterozygous for different robertsonian translocations. *Hereditas* 120:7-11.
- Templado C, Bosch M, Benet J (2005). Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenetic and genome research* 111:199-205.
- Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A (2000). Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Human reproduction (oxford, england)* 15:351-65.
- Vigier B, Tran D, Legegai L, Bezard J, Josso N (1984). Origin of anti-Mullerian hormone in bovine free-martin fetuses. *J Repr Fert* 70:473-479.

- Villagomez DA e Pinton A (2008). Chromosomal abnormalities, meiotic behavior and fertility in domestic animals. *Cytogenetic and Genome Research* 120(1-2): 69-80.
- Villamediana P, Vidal F, Paramio M (2001). Cytogenetic analysis of caprine 2-to 4-cell embryos produced in vitro. *Zygote* 9:193-199.
- Viuff D, Rickords L, Offenbergh H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams J L, Callesen H, Thomsen P D (1999). A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biology of reproduction* 60:1273-8.
- Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul-karim FW, Hunt P (1998). The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Human reproduction* 13:154-60.
- Vozdová M, Machatková M, Kubiková S, Zudová D, Jokesová E, Rubes J (2001). Frequency of aneuploidy in pig oocytes matured in vitro and of the corresponding first polar bodies detected by fluorescent in situ hybridization. *Theriogenology* 56:771-6.
- Warrant R e Kim S (1978). Alpha-helix double helix interaction shown in structure of a protamine-transfer-rna complex and a nucleoprotamine model. *Nature* 271:130-135.
- Wolff. S (1961). Radiation genetics. In: Errera M, Ed and Forssberg, Arne Gunnar,1904-Joint E., editors. Mechanisms in Radiobiology. New York: Academic Press. p 419-475.
- Wyrobek A, Meistrich M, Furrer R, Bruce W (1976). Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophysical journal* 16:811-825.
- Xia Y, Bian Q, Xu L, Cheng S, Song L, Liu J, Wu W, Wang S, Wang X (2004). Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate. *Toxicology* 203:49-60.
- Xu D, Zhu Q, Zheng L, Wang Q, Shen H, Deng L, Ong C (2003). Exposure to acrylonitrile induced dna strand breakage and sex chromosome aneuploidy in human spermatozoa. *Mutation research* 537:93-100.
- Yadav B, King W, Xu K, Pollard J, Plante L (1991). Chromosome analysis of bovine oocytes cultured invitro. *Genetics selection evolution* 23:191-196.
- Yadav BR, Katiyar PK, Chauhan MS, Madan ML (1997). Chromosome configuration during in vitro maturation of goat, sheep and buffalo oocytes. *Theriogenology* 47:943-51.
- Zudova D, Rezacova O, Kubickova S, Rubes J (2003). Aneuploidy detection in porcine embryos using fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic and genome research* 102:179-83.