



**UNIVERSITÀ DI PISA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE**

Corso di laurea specialistica in medicina veterinaria

Tesi di laurea:

Valutazione microscopica della vitalità di blastocisti di cavallo dopo 6 o  
24 ore di refrigerazione a 5°C in differenti media

**RELATORE:**

Prof. Francesco Camillo

**CORRELATORE:**

Dott. Duccio Panzani

**CANDIDATO**

Lorenzo Bianchini

**ANNO ACCADEMICO 2013/2014**

*Alla mia famiglia, a Cinzia  
e a Carlotta.*

## ***Indice***

Riassunto/Abstract.....Pag 5

### **PARTE GENERALE**

Introduzione.....Pag 6

CAPITOLO 1: DALLA FECONDAZIONE AL RECUPERO DEGLI EMBRIONI.....Pag 7

Fisiologia dell'embrione equino dal concepimento alla discesa in utero

Morfologia embrionale.....Pag 9

Ricerca e recupero degli embrioni.....Pag 10

Valutazione morfologica.....Pag 17

CAPITOLO 2: METODI DI CONSERVAZIONE DEGLI EMBRIONI.....Pag 20

Introduzione alle tecniche di trasporto degli embrioni.....Pag 20

Congelamento degli embrioni.....Pag 22

Vitrificazione degli embrioni.....Pag 25

Problemi della crioconservazione.....Pag 28

Refrigerazione degli embrioni.....Pag 30

Packaging degli embrioni.....Pag 39

Effetti avversi della refrigerazione degli embrioni.....Pag 40

Principali colorazioni per la valutazione della vitalità degli embrioni Pag 41

### **PARTE SPERIMENTALE**

CAPITOLO 3: LAVORO SPERIMENTALE.....Pag 43

Scopo del lavoro.....Pag 43

Materiali e metodi.....Pag 45

Recupero degli embrioni.....Pag 47

Valutazione e misurazione degli embrioni dopo il recupero.....	Pag 51
Preparazione degli embrioni prima della refrigerazione.....	Pag 51
Colorante DAPI.....	Pag 54
Colorazione degli embrioni.....	Pag 54
Risultati.....	Pag 56
Discussioni e Conclusioni.....	Pag 59
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>Pag 62</b>

## Riassunto

Parole chiave: cavallo, embrione, refrigerazione, DAPI, media di refrigerazione

L'obiettivo di questo studio è stato quello di confrontare il numero di cellule morte embrionali di cavallo dopo 6 e/o 24h di refrigerazione in 3 differenti media. Sono stati recuperati embrioni al giorno 8 mediante un flushing uterino con Ringer Lattato a 37°C in un filtro Ez-Way (PETS, Canton, TX, USA) da 17 fattrici Trottatrici Italiane inseminate artificialmente con seme fresco o congelato. Sono stati valutati qualità, stadio e diametro degli embrioni prima di assegnarli random a uno di questi trattamenti: EmCare Holding Solution (ICPbio Reproduction, USA) 24h (EHS24;n=6) usando il protocollo standard (controllo); EmCare Flushing Solution (ICPbio Reproduction, USA) 6h (EFS6; n=6) e 24h (EFS24; n=4); Ringer Lattato 6h (RL6; n=7). Nei gruppi EFS e RL6 gli embrioni recuperati nel filtro sono stati sciacquati con 1 L di EFS o RL, per rimpiazzare il medium recuperato dall'utero.

I filtri riempiti di fluido sono stati poi posti in un Equitainer® e, dopo il raffreddamento per il tempo dovuto, sono stati messi in incubazione con il colorante DAPI e sono state contate le cellule morte usando un microscopio Leica DM LB con illuminazione UV.

Il numero totale di cellule è stato stimato usando la correlazione:

$n = 0,0106d^2 + 2,0542d - 375,28$  (n= numero di cellule, d=diametro embrionale in  $\mu$ ) (Moussa et al, 2004)

L'effetto del trattamento e il diametro di gruppo (<300, 300-1000, >1000 $\mu$ ) sulle percentuali di cellule morte/cellule totali stimate nell'embrione, sono stati valutati con il metodo statistico ANOVA (GLM). Tutti gli embrioni recuperati sono blastocisti di qualità eccellente o buona. Nelle cellule morte non sono state osservate differenze in proporzione tra diametro e trattamento. Il mantenimento per 24h in EFS o per 6h in RL di embrioni al giorno 8 di buona qualità non ha provocato un aumento della proporzione di cellule morte confrontate con la refrigerazione in EHS per 24h.

Se gli studi in vivo confermeranno l'assenza di danni embrionali maggiori, questi protocolli potranno semplificare la refrigerazione e il trasporto degli embrioni equini prima del trasferimento.

## Abstract

Key words: horse, embryo, cooling, DAPI, cooling media.

The aim of this study was to compare the number of embryo dead cells after 6 and/or 24 h of cooled preservation in three different media. Day 8 embryos were collected by uterine flushing with Ringer Lactate at 37°C in an Ez-Way Filter (PETS, Canton, TX, USA) from 17 Standardbred mares artificially inseminated with fresh or frozen semen. Embryo quality, stage and diameter were evaluated before embryos were randomly allocated to one of these treatments: Emcare Holding Solution (ICPbio Reproduction, USA), 24 h (EHS24; n = 6), using the standard protocol (control); Emcare Flushing Solution (ICPbio Reproduction, USA), 6 h (EFS6; n = 6) and 24 h (EFS24; n = 4); Ringer Lactate, 6 h (RL6; n = 7). In EFS's and RL6 groups, the recovered embryos were kept in the filter and rinsed with 1 l of EFS or RL, which replaced the medium flushed from the uterus. Fluid filled filters were then placed in the Equitainer® and after cooling for the due time, the embryos were incubated with the cells stain DAPI and the dead cells were counted using epifluorescence UV-illumination on a Leica DM LB microscope. Embryo's total cell number was estimated using the correlation:

$n = 0.0106d^2 + 2.0542d - 375.28$  (n = cells number, d = embryo diameter in  $\mu$ m) (Moussa et al., 2004;160). The effects of treatment and diameter group (<300, 300-1000, >1000 $\mu$ ) on the percentages of dead cells/estimated total embryo cells were evaluated by ANOVA (GLM). All the recovered embryos were excellent or good quality blastocysts.

No differences in proportion of dead cells were observed between diameter and treatment. Holding for 24 h or in RL for 6 h, 8 days old, good quality equine embryos in EFS didn't increase the proportion of dead cells compared to cooling in EHS for 24 h. If in vivo studies will confirm the absence of major embryo damage, these protocols will simplify equine embryo cooling and shipping, before transfer.

## ***Introduzione***

La refrigerazione degli embrioni equini è un elemento importante dell'industria mondiale della riproduzione equina. Nell'arco degli anni questa tecnica ha avuto diverse evoluzioni, tali da permettere percentuali di gravidanza delle cavalle riceventi via via maggiori.

I primi studi risalgono al 1982 da parte di Imel e colleghi, furono ottenuti bassi tassi di gravidanza incubando embrioni per un massimo di 6 ore in Dulbecco's Phosphate Buffering Solution + 20% di Siero fetale bovino (FCS).

Uno studio che comparava DPBS e Ham F-10 è stato condotto da Douglas e il suo gruppo nel 1982.

Sempre nello stesso anno è stato testato il medium Ham F-10 comparato al DPBS+10% FCS (Squires et al, 1982), e uno studio simile anche nell'anno 1984 da parte di Slade.

Nei primi anni 2000 sono stati testati dei prodotti studiati appositamente quali: ViGro Holding Solution e gli Emcare.

Uno studio è stato condotto nel 2003 da Moussa e colleghi, con il confronto tra Ham F-10 (fino a quel momento usato estensivamente), Emcare e ViGro.

Nell'anno 2004 Moussa ha approntato un protocollo ricorrendo all'uso di EmCare Complete Holding solution, e utilizzando il DAPI per la valutazione della vitalità embrionale.

Grazie all'evoluzione di queste tecniche è stato possibile sviluppare il nostro protocollo.

# Capitolo 1: DALLA FECONDAZIONE AL RECUPERO DEGLI EMBRIONI

## *Fisiologia dell'embrione equino dal concepimento alla discesa in utero*

Nella specie equina la deposizione del seme avviene all'interno dell'utero, gli estrogeni agevolano il movimento del materiale seminale inducendo delle modificazioni del muco e provocando la formazione di canali che facilitano la progressione degli spermatozoi. Questi ultimi, all'interno del tratto genitale femminile subiscono delle modificazioni che sono un prerequisito per la successiva fecondazione, questo processo è detto capacitazione. Uno degli effetti più importanti è la rimozione di glicoproteine dalla superficie della membrana cellulare spermatica, poiché queste interferiscono con la reazione acrosomiale. Vi è il rilascio di enzimi idrolitici dalla testa dell'acrosoma, consentendo la penetrazione dello spermatozoo fra le cellule della granulosa, la zona pellucida e il contatto con la membrana plasmatica dell'oocita. Poiché nel tratto genitale femminile, gli spermatozoi devono subire tutte queste modificazioni prima della fertilizzazione, la deposizione del materiale seminale deve avvenire prima dell'ovulazione. Nella cavalla sottoposta a inseminazione artificiale con seme congelato, a causa della ridotta sopravvivenza degli spermatozoi, si deposita il seme in tempi molto vicini all'ovulazione. Nella specie equina l'oocita completa la prima divisione meiotica dopo la fertilizzazione. Avvenuta la fecondazione, l'embrione continua il suo sviluppo all'interno dell'ovidutto, fino allo stadio di morula o di giovane blastocisti, prima di passare all'utero. Questo periodo dà all'utero il tempo di portare a termine la risposta infiammatoria che causa la rimozione degli spermatozoi e permette che le ghiandole dell'endometrio inizino a secernere nutrienti, sotto lo stimolo del progesterone prodotto dal corpo luteo; questi nutrienti sono essenziali per lo sviluppo dell'embrione durante la fase di preimpianto. Unica nella specie equina è la capacità di discriminare un oocita fertilizzato da uno non fertilizzato, gli oociti non fertilizzati dei cicli precedenti rimangono dentro l'ovidutto, mentre l'oocita fertilizzato passa nell'utero.

L'effettore di questo particolare comportamento è la PGE2 (Weber et al, 1995). In una serie di esperimenti è stato dimostrato che non solo l'embrione secerne PGE2 e PGF2 $\alpha$  dal 4-5° giorno dopo ovulazione (Weber et al, 1991; Freeman et al, 1992), ma anche che la somministrazione nell'ovidutto di PGE2 il giorno 4, induce una entrata prematura dell'embrione in utero (Weber et al, 1991). Da queste scoperte, oggi è assodato che gli embrioni sono prima bloccati nella regione ampullare dell'ovidutto da contrazioni toniche del muscolo liscio circolare dell'istmo. Una volta che un embrione in sviluppo ha raggiunto lo stadio di morula è in grado di secernere PGE2 in quantità sufficienti da far rilassare lo "sfintere" dell'istmo e quindi di passare rapidamente verso l'utero. Dato che gli oociti non fertilizzati non sono in grado di secernere le prostaglandine non raggiungono quasi mai l'utero (tranne rari casi nei quali seguono l'embrione). Per l'esperimento descritto in precedenza è possibile applicare, per via laparoscopica, un gel a base di PGE negli ovidutti per anticipare il passaggio dell'embrione, ad esempio per una successiva criopreservazione oppure nei casi di fattrici subfertili, nelle quali gli oociti non fertilizzati accumulati impediscano il passaggio dell'embrione (Allen et al, 2006). Per la cavalla i cambiamenti della sintesi e del rilascio della prostaglandina sono cruciali per lo stabilirsi della gravidanza, è dimostrato che l'embrione è in grado di produrre sostanze che modificano la capacità di sintesi della PGF da parte dell'utero. Uno dei sistemi con cui l'endometrio è informato della presenza di un embrione è la sintesi di estrogeni da parte dell'embrione stesso. Nella cavalla, riveste particolare importanza anche il passaggio e il movimento dell'embrione nel tratto genitale; infatti esso si sposta continuamente nei due corni uterini, prima di impiantarsi definitivamente il 16° giorno. L'impianto si realizza attraverso una "invasione" dei villi, le prime indicazioni di quest'ultimo iniziano circa 25-30 giorni dopo la fecondazione e si pensa che debbano trascorrere altri 7-10 giorni prima che si produca una significativa quantità di principi nutrizionali da sito d'impianto.



### *Morfologia Embrionale dal giorno 0 al 7*

Sei ore dopo l'ovulazione, gli oociti sono ancora rivestiti dalle cellule del cumulo e quindi non è possibile determinarne l'effettiva fertilizzazione. Comunque di un totale di 18 oociti o embrioni, recuperati da 12 a 92 ore post ovulazione, 16 sono stati fertilizzati in una quasi sincronia (Bezard et al, 1989). I pronuclei materni e paterni sono visibili dopo 12 ore dall'ovulazione (Bezard et al, 1989) e migrano in apposizione entro le seguenti 7 ore (Grondal et al, 1993).

Le seguenti caratteristiche dello sviluppo dell'embrione equino sono vitali per lo stabilirsi della gravidanza, e spiegano in parte la difficoltà di una fertilizzazione in vitro: le membrane di rivestimento depositate all'esterno della zona pellucida; il meccanismo mediante il quale la massa cellulare interna inizia la segregazione ed il già citato meccanismo del discernimento degli oociti fecondati rispetto a quelli non. Da citare anche la marcata asimmetria nella distribuzione degli organelli cellulari nell'oocita, prima e dopo l'ovulazione, come anche nello zigote alle prime fasi (Betteridge, 2007). L'interesse è notevole, poiché la polarità può essere influenzata dalla comunicazione tra cellule follicolari e oocita tramite processi transzonali che possono essere distrutti da procedure come la maturazione in vitro delle cellule uovo, dando origine così ai ben noti problemi di sviluppo in vitro.

La segregazione delle cellule interne dal trofoblasto alla formazione della blastocisti è molto meno rapida e distinta nel cavallo rispetto ai ruminanti. Negli equidi la massa cellulare interna è molto più dispersa e occupa una maggior parte dello spazio cellulare a palizzata del trofoblasto. Da questo fatto, nel cavallo, è più difficile distinguere la morula dalla blastocisti giovane rispetto alle altre specie domestiche (Betteridge, 2007).

Quando, a circa 6 giorni post ovulazione, l'embrione passa nell'utero, possiede ancora la zona pellucida non espansa, solitamente con un diametro totale di circa 180 $\mu$ m, e si presenta in transizione tra morula e blastocisti (Battut et al, 2001).

La cavità della blastocisti inizia ad ingrandirsi, diventando meglio definita, la massa interna cellulare diventa più nitida e appare rugosa con cellule dell'endoderma; in seguito queste ultime prima formano "colonie" separate e distribuite nel trofoblasto interno, poi, con la crescita, si fondono a formare un foglietto unico (Enders, 1993). Sulla superficie esterna, la capsula è portata internamente tra il trofoblasto e lo strato interno della zona pellucida (Betteridge,

2007), quest'ultima poi degenera nel primo giorno di discesa in utero (Figura 1).

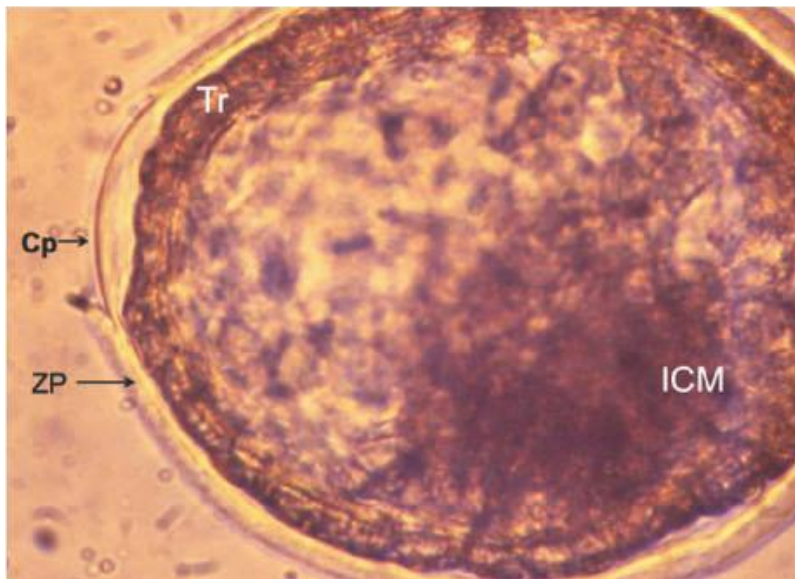


Figura 1 Distacco della zona pellucida, con formazione della capsula circondante il trofoblasto. (Betteridge 2007)

### *Ricerca e recupero degli embrioni*

Uno dei primi studi sul recupero di embrioni equini per via non chirurgica è quello eseguito da Oguri e Tsutsumi nel 1972. In passato il trasferimento di embrioni nella specie bovina era stato studiato e tentato con successo da Mutter e colleghi nel 1964, Sugie (1965), Rowson et al (1969); mentre nella specie suina da Polge e Day nel 1968. In questo esperimento l'obiettivo è stato il tentativo di recupero di embrioni dal lume uterino di fattrici usando l'apparato di Rowson e Dowling (1949), e secondariamente esaminare la possibilità di un embryo transfer.

Lo studio è stato condotto su un totale di 18 fattrici di razza Hokkaido di un'età di 2-13 anni, usate nei due anni precedenti per la stagione riproduttiva. Ogni giorno è stata eseguita una palpazione per determinare lo stato delle ovaie e dell'utero.

Per testare se gli embrioni, trasferiti per via transcervicale, siano espulsi dal lume uterino, sono stati depositati nella parte centrale del corno uterino, usando uno speciale iniettore, degli oociti di coniglio + 0,3mL di una mistura di siero di coniglio, Ringer e 1000UI di penicillina. Da 2 a 10 oociti sono stati depositati, 3 o 4 giorni post ovulazione, in 11 fattrici dopo la monta; e 6 giorni post ovulazione in 5

cavalle non servite dallo stallone. Gli oociti sono stati recuperati mediante flushing 5, 24, 48 ore rispettivamente dopo 3, 4, 6 giorno dalla deposizione in utero.

I flushing sono stati attuati usando un apparato a 3 vie modificato di Rowson & Dowling (1949), creato per la specie bovina come illustrato in Figura 2.

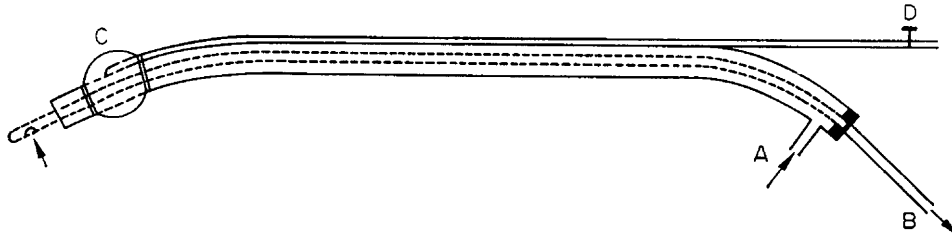


Figura 2. Tubo esterno di materiale acrilico, interno di resina vinilica. La punta del tubo esterno è connessa con un tubo fine di polietilene da un palloncino di lattice. Il tubo interno è libero di muoversi in ogni direzione dentro quello esterno. A: tubo di infusione (esterno). B:tubo di recupero (interno). C: pallone di lattice. D: sistema per intercettare l'aria.

Questo strumento è stato inserito attraverso la cervice nel lume uterino, e guidato dal retto con una mano. Il pallone di lattice, una volta in posizione, è stato gonfiato con aria per il bloccaggio. Il fluido del flushing è stato infuso attraverso il tubo esterno, e poi recuperato con quello interno. L'utero è stato lavato in condizioni asettiche, usando circa 1500mL di soluzione salina sterile. I vari liquidi dal flushing sono stati recuperati e separatamente stoccati in tubi appositi da 100mL e tenuti a 30°C per 20 minuti. Circa 3mL del fluido surnatante di ogni tubo è stato rimosso e gli oociti (ed embrioni) sono stati osservati con un microscopio.

Sono stati effettuati 80 tentativi di recupero di embrioni equini con le tecniche prima descritte a 5, 6, 7, 8, 9, 10 giorno post ovulazione. Mediante un microscopio graduato sono state osservate le dimensioni di 25 embrioni equini recuperati da 5 a 8 giorni post ovulazione, e quelle di 30 oociti non fertilizzati recuperati con puntura dell'ovaio di fattrici all'autopsia.

Sono stati ottenuti 11 embrioni da 5 a 7 giorni post ovulazione.

La percentuale di volume medio di medium recuperato in un totale di 85 flushing uterini è stata del 97,3%.

Il tasso di recupero degli oociti di coniglio a 5, 24 e 48 ore post trasferimento è risultato diminuire col tempo, circa il 50% degli oociti sono rimasti nell'utero equino per più di 48 ore. Questi esperimenti hanno mostrato che tecniche non chirurgiche possono essere utilizzate per la deposizione e il recupero di embrioni equini.

Gli embrioni di cavallo recuperati ai giorni 6, 7, 8, 9 e 10 post ovulazione sono stati recuperati allo stadio di blastocisti; tuttavia non sono stati recuperati embrioni in 9 diversi flushing al 5 giorno post ovulazione, alcuni sono stati trovati in cavalle che avevano ricevuto oociti di coniglio 48 ore e 24 ore prima del flushing. Ad esempio, quando gli oociti di coniglio sono stati trasferiti 3 giorni post ovulazione, e i flushing approntati 48 ore dopo il trasferimento, il tasso di recupero di embrioni equini è stato del 100%. Quando, invece, la deposizione di oociti di coniglio è stata fatta nel 4° giorno post ovulazione, e il flushing a 24 ore, il tasso di recupero è stato del 25%.

Un altro studio di Oguri e Tsutsumi del 1974 riporta un altro recupero di embrioni con risultati interessanti.

Sono state usate come fattrici e ricevente 18 fattrici di razza Hokkaido, una mezzo-Hokkaido e 6 mezzosangue, di età tra 2 e 19 anni. Tutte le cavalle sono state provate con lo stallone ogni mattina fino all'evidenza dell'estro, e palpate per via rettale. A giorni alterni sono state condotte alla monta naturale fino all'ovulazione. Per la sedazione è stata utilizzata propionilpromazina 1% (Combelen®, Bayer) a 1mL/100kg 30-40 minuti prima del flushing.

Gli embrioni sono stati prelevati dalle donatrici da 144 a 168 ore post ovulazione, usando l'apparato e le metodiche descritte nello studio precedente (Oguri e Tsutsumi, 1972). Sono stati recuperati 15 embrioni, dei quali 10 sono stati posti in un medium composto da Ringer lattato con 1000UI di penicillina/mL e mantenuti a 30°C per 29 fino a 70 minuti. I rimanenti 5 embrioni sono stati lasciati nel medium di flushing fino al trasferimento.

Dall'utero di 20 donatrici sono stati recuperati 18 embrioni 6 giorni dopo l'ovulazione, con un tempo medio di flushing di 18 minuti; il diametro medio degli embrioni includendo la zona pellucida è stato di 185µm.

Nel 1978, dal gruppo di Zavy e colleghi è stata riportata una tecnica per la raccolta di fluido dall'utero di cavalle, che può essere sfruttata anche nel flushing per gli embrioni.

Sono state utilizzate 18 fattrici normalmente cicliche, di razza Quarter Horse e Purosangue Inglese. Il recupero è stato effettuato nei giorni 4, 8, 12, 14, 16, 18 e 20 post ovulazione. Ogni giorno il comportamento estrale è stato verificato

presentando le cavalle allo stallone. L'ovulazione è stata controllata giornalmente con palpazione transrettale. In totale, durante l'esperimento sono stati portati a termine 42 flushings. Le cavalle sono state assegnate al giorno della raccolta in ordine ascendente, fino all'ovulazione. Molte fattrici sono state coinvolte in più di un flushing in successivi cicli estrali, ma per almeno un ciclo sono state fatte riposare (dal punto di vista riproduttivo).

Tutte le cavalle sono state poste in un travaglio metallico, è stata bendata la coda ed è stato effettuato un lavaggio del perineo con un disinfettante (Novalsan® Fort Dodge), non è stato necessario fare uso di tranquillanti.

Il catetere utilizzato (Figura 3) è basato su una modifica all'apparato ideato da Fahning e colleghi nel 1966 per il bovino. Consiste in un catetere di Foley (da 8-10mm) con una cuffia gonfiabile sulla punta, all'interno è stato posto un secondo catetere di materiale metallico da 16 gauge dotato nella sua sommità di una punta Silastic di circa 13 cm, con una serie di fori laterali, per favorire la raccolta del liquido e ridurre traumi. Questo strumento è stato sottoposto a sterilizzazione prima dell'uso.

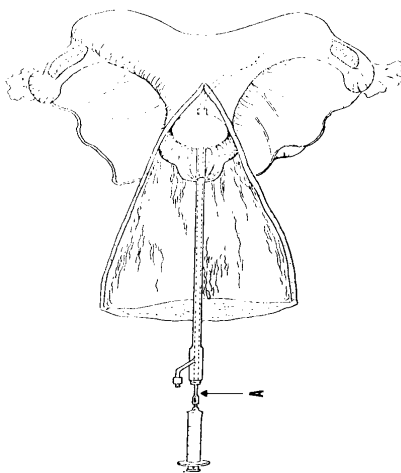


Figura 3: Rappresentazione schematica dello strumento in posizione nell'utero.

E' stato inserito per via transcervicale nell'utero, una volta in posizione la cuffia è stata gonfiata con 60cc di aria e posta subito dopo l'ostio cervicale interno, così da attuare un blocco a livello di quest'ultimo. Sono stati infusi attraverso il catetere interno 80mL di soluzione NaCl 0,33M all'interno del lume uterino. Poi è stato eseguito un massaggio dell'utero per via transrettale per 5 minuti, per favorire un mescolamento del medium. Dopo, il fluido è stato lentamente recuperato, le

aliquote sono state poste in fiale sterili e messe in bagno ghiacciato. Terminato anche l'ultimo flushing, nell'utero di ogni fattrice è stato posto come antibatterico 50mL di infuso di nitrofurazone, poi il catetere è stato rimosso e le cavalle riportate nel loro paddock.

Il volume medio di liquido recuperato è stato di 85mL e non è apparso condizionato significativamente dal ciclo estrale. Non sono state osservate infezioni uterine in nessuna delle fattrici prese in esame; non sono stati nemmeno riscontrati effetti negativi sulla fertilità, dal momento che molte cavalle sono state fatte accoppiare in cicli successivi e sono risultate gravide.

Una tecnica diversa è stata proposta da Imel e colleghi nel 1981; è stato raccolto il liquido refluo dall'utero in cilindri graduati, è stato poi tenuto a temperatura di 37°-38°C e lasciato riposare per circa 30 minuti. E' stato poi sifonato in un altro contenitore fino a lasciare nel primo solo 50-100 mL nei quali verrà ricercato l'embrione; successivamente il liquido recuperato dai lavaggi.

Nel 1989 da Patricia Sertich è stato riportato uno studio della durata di 4 anni, coinvolgente 18 donatrici, nel quale è citato un ulteriore metodo di recupero embrioni. Il giorno 7 post ovulazione, la donatrice è stata posta in un travaglio e con la seguente tecnica asettica è stato effettuato il lavaggio dell'utero.

E' stato eseguito con un catetere di Foley modificato, inserito nel corpo uterino e bloccato sulla cervice con la cuffia insufflata con 30mL di aria. Come medium è stata utilizzata una soluzione salina tamponata con fosfati (a 37°C), composta da acqua distillata e ionizzata + siero bovino fetale 1% + 60UI di penicillina e 60ug di diidrostreptomina/mL. Ogni lavaggio è stato portato a compimento con 1L di medium in utero per gravità, e recuperandolo, sempre per gravità, in un cilindro graduato da 1L. La mano dell'operatore è rimasta in vagina durante le operazioni e l'utero non è stato massaggiato per via rettale. Ogni lavaggio è stato eseguito per 3 volte. Quando la maggior parte del fluido non è stata recuperata, è stata somministrata per via endovenosa ossitocina nel dosaggio di 20UI, favorendo il recupero del fluido entro 1-5 minuti. Dopo il terzo lavaggio, sono state somministrate PGF2a per via intramuscolare al dosaggio di 0.022mg/kg.

Il cilindro graduato contenente il medium di lavaggio è stato mantenuto a 23°C per 20-30 minuti per permettere la decantazione dell'embrione. La parte superiore del

medium è stata aspirata attraverso un filtro per embrioni, lasciando 50mL di fluido nel cilindro, che è stato poi posto in una piastra Petri. Il cilindro è stato sciacquato con altri 50mL di medium che è stato posto nuovamente nella piastra. Il fluido è stato osservato con un microscopio da dissezione per la ricerca dell'embrione.

Dopo la localizzazione è stato lavato per mezzo di 3 bagni consecutivi in piastre Petri contenenti il medium precedente microfiltrato con aggiunta di 20% siero fetale bovino inattivato.

Su 17 fattrici, in 4 anni sono stati eseguiti 111 flushings uterini, dei quali 45 hanno avuto successo (35 con embrione singolo e 10 con embrioni gemelli). Vi sono stati 7 casi di oociti non fertilizzati. Il 44% degli embrioni è stato recuperato al primo lavaggio, 27% al secondo e 20% al terzo.

Di interesse è anche un studio di Vanderwall presentato nel 2000, nel quale è stato analizzato tutto il processo di recupero embrioni.

E' stato riportato che gli embrioni possono essere recuperati tra il giorno 6 e il 9, ma il tempo ottimale è 7 o 8. L'indicazione principale per recuperi anticipati al giorno 6 è la criopreservazione.

La raccolta è stata attuata con un lavaggio uterino transcervicale. Dopo aver posizionato la fattrice in travaglio, il perineo della stessa è lavato con un detergente, sciacquato accuratamente e asciugato con attenzione. L'operatore, munito di guanto sterile, inserisce nella vagina un catetere plastico sterile di 80 cm e con diametro di 8mm, munito di pallone gonfiabile all'estremità (Figura 4), che viene gonfiato superata la cervice per bloccare l'eventuale fuoriuscita di liquido.

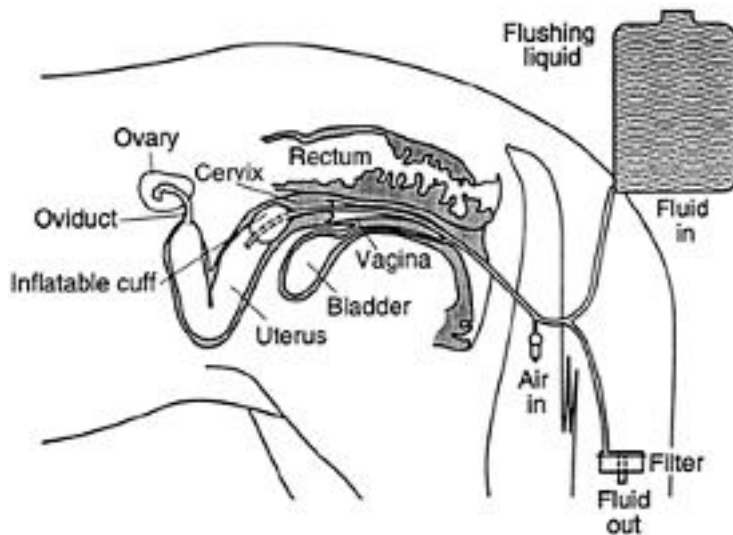


Figura 4: Disegno schematico della procedura da Aguilar e Woods 1997.

Una volta posto il catetere, l'utero è stato lavato 3 o 4 volte con il medium di Dulbecco (DPBS) riscaldato (30-35°C)+1% siero bovino fetale+100UI/mL penicillina+100µg/mL. L'utero è stato riempito con 1 o 2 litri di medium per ogni flushing, poi il liquido è stato recuperato attraverso il catetere e un filtro per embrioni; sotto quest'ultimo è stato posto un contenitore graduato per monitorare la quantità di fluido recuperato. Dopo il primo flush l'utero è stato massaggiato per via rettale durante quelli seguenti, per favorire il recupero. E' necessario recuperare almeno il 90% del liquido, che deve presentarsi scevro da sangue o flocculi (segno di endometrite attiva).

Al completamento del lavaggio, il filtro è stato svuotato in un piatto sterile per ricerca al microscopio a circa 15x di ingrandimento. Gli embrioni di 8 giorni sono sempre visibili con attenzione anche a occhio nudo. Una volta che è identificato un embrione, è sottoposto ad un minimo di 3 lavaggi sequenziali in gocce di DPBS+10% di siero bovino fetale sterilizzato, dopo il lavaggio è posto in una piastra Petri con lo stesso medium, per poi essere trasferito.

Ancora un altro metodo di recupero embrioni è stato riportato da Wilsher e Allen nel 2004. Lo sviluppo delle ovaie in estro è stato monitorato giornalmente o a giorni alterni con ecografia (Simpson et al., 1982). All'evidenza del raggiungimento di 35mm del follicolo dominante, la fattrice è stata fatta accoppiare naturalmente o inseminata una sola volta; in coincidenza è stato somministrato per via endovenosa 3000UI di hCG o CEG (Crude Equine Gonadotrophin extract). Sono



state eseguite ecografie giornalmente fino all'evidenza dell'ovulazione.

Il giorno 7 post ovulazione la cavalla è stata alloggiata in un travaglio in una stanza riscaldata a 30-32°C. Dopo un lavaggio del perineo, è stata utilizzata una sonda da flushing, passando attraverso la vagina e attraverso l'ostio cervicale, usando come guida il dito dell'operatore. Una volta posta oltre l'ostio cervicale interno, è stata insufflata e bloccata in situ, così da sigillare il passaggio. L'utero è stato infuso con 1-2 litri di medium a base di DPBS+0,5% di siero fetale bovino+0.025% di kanamicina, e riempito per gravità finché la fattrice non ha dato segni di fastidio. Dall'operatore, per via rettale, sono stati eseguiti dei massaggi e dei ballottamenti dell'utero per favorire la circolazione del liquido nella totalità del lume; il medium è stato poi recuperato, sempre per gravità, passando attraverso un filtro per embrioni (Em-Con Filter). L'intera procedura è stata poi ripetuta una seconda volta, dopo la quale la cuffia gonfiabile è stata svuotata e il catetere rimosso dalla cavalla. L'embrione è stato poi cercato in una piastra Petri, mediante un microscopio da dissezione.

### *Valutazione Morfologica*

Il primo lavoro su questo argomento è stato quello di McKinnon e Squires del 1988.

E' stata elaborata una scala, divisa in 5 stadi:

Stadio 1	Morula: un embrione di colore scuro, con cellule impacchettate in modo ovoidale. Presenza o meno di spazio perivitellino incluso nella zona pellucida (circa 16 µm).
Stadio 2	Giovane blastocisti: un embrione incluso in una zona pellucida spessa, con due distinte popolazioni di cellule. Cellule esterne non colorate (trofoblastiche) formanti una cavità piena di liquido (blastocele primitivo) con una massa cellulare interna più scura nel centro.
Stadio 3	Blastocisti: un embrione con la cavità del blastocele ben sviluppata, una massa cellulare interna scura ed in posizione eccentrica, cellule trofoblastiche sottili e non colorate,

	capsula acellulare (1 $\mu$ m) sulla superficie interna della zona pellucida più sottile (<16 $\mu$ m).
Stadio 4	Blastocisti in espansione: un embrione con una grande cavità blastocistica, una massa cellulare interna a forma di disco schiacciata contro lo strato trofoblastico esterno ma ben differenziata, una capsula più spessa ed una zona pellucida sempre più sottile (3 $\mu$ m).
Stadio 5	Blastocisti schiusa: un embrione nello stadio di blastocisti espansa con la zona pellucida completamente persa e capsula esposta.

Un altro metodo di valutazione morfologica è stato elaborato da Roels e colleghi nel 2014.

Sono stati recuperati o spediti (tempo di trasporto 4-24h) al centro ET, embrioni di cavallo di giorni 7-8 per due stagioni riproduttive consecutive.

Dopo il lavaggio con holding medium, sono stati fotografati con un protocollo standard; le fotografie, combinate con le informazioni sulla ricevente, spedizione, trasporto e stato di gravidanza a 14 fino 50 giorni, sono state conservate per la valutazione in data successiva.

Tutti gli embrioni sono stati valutati morfologicamente, usando criteri predefiniti e senza conoscere in anticipo l'esito di gravidanza. I criteri includevano lo stadio di sviluppo, forma, grado di disidratazione della blastocisti e presenza e/o integrità della zona pellucida. Se presente la capsula, è stato stimato il grado di deiscenza tra la stessa e la blastocisti. Sono state registrate anche le seguenti caratteristiche: colore e omogeneità, numero di frastagliature sulla superficie, quantità di detriti adesi alla superficie esterna dell'embrione, presenza di blastomeri estrusi o irregolari.

Sono stati trasferiti 1047 embrioni dei quali 505 recuperati nella clinica, e 542 refrigerati e trasportati. A 14 giorni 853 fattrici sono risultate gravide (82%), a 50 giorni 729 (70%). Dalle analisi dei dati è risultato che lo stadio di sviluppo non ha avuto influenza sul tasso di gravidanza a 14 giorni, ma ha avuto un impatto importante su quello a 50 giorni, stesso risultato anche per la presenza ed integrità della zona pellucida. I detriti rimasti adesi all'embrione e la regolarità della superficie esterna non hanno avuto influenza sull'esito di gravidanza.

Comunque, forma dell'embrione, aderenza della capsula, riduzione della blastocisti (all'interno della capsula persa), colore e presenza di blastomeri estrusi hanno rivestito importanza sia nel controllo di gravidanza a 14 che a 50 giorni. Un'anormalità morfologica chiamata "tela di ragno", riscontrata per il 93% solo in embrioni trasportati e/o refrigerati, consistente in linee irregolari nella blastocisti stessa, ha avuto effetti significativi sul controllo di gravidanza a 14 giorni.

Dallo studio è emerso che nessuna delle caratteristiche, presa individualmente, ha favorito effetti fatali dopo il trasferimento, tuttavia è stato riconosciuto che, su questo numero di embrioni, non si è in grado di identificare caratteristiche che possano escludere alcuni embrioni dall'essere trasferiti.

## Capitolo 2: METODI DI CONSERVAZIONE DEGLI EMBRIONI

### *Introduzione alla tecnologia di trasporto per embrioni*

L'abilità di trasportare embrioni ha avuto un ampio impatto sull'industria dell'embryo transfer equino.

Questa tecnica, non permessa dallo stud book per il Purosangue Inglese, è da molti anni utilizzata con successo nella specie equina. Con questa tecnica è possibile produrre un embrione in un luogo, e poi trasportarlo, così da risultare meno costoso rispetto alla movimentazione di una cavalla.

In uno studio di Carnevale del 2000 sono stati analizzati i fattori influenzanti i tassi di gravidanza e la morte embrionale precoce in un programma di ET.

Sono state utilizzate 18 cavalle riceventi di vari pesi ed età, sane da punto di vista generale e riproduttivo. Per la sincronizzazione con le donatrici sono stati utilizzati impianti con GnRH oppure hCG. Il giorno 5 sono state valutate con ecografia e palpazione per questi parametri: tono uterino, tono cervicale, morfologia del CL, edema uterino, cisti, fluidi o aria in utero. Sono state valutate "accettabili" con CL ben definito e buoni toni uterini e cervicali. "Marginalmente accettabili", invece, se presenti CL ecograficamente poco definiti, e toni uterini e/o cervicali leggeri. Fattrici con patologie uterine, CL assenti e/o edemi persistenti sono state considerate "inaccettabili".

Le donatrici sono state inseminate nella struttura, oppure trasportate per il recupero, o ancora inseminate e sottoposte a flushing in varie strutture degli USA.

Dal gruppo di Carnevale gli embrioni sono stati recuperati 7-8 giorni post ovulazione con lavaggio transcervicale mediante 4L di DPBS+1%FCS. Gli embrioni sono stati poi lavati e tenuti in DPBS+10% per circa un'ora e valutati (McKinnon, 1988).

Gli embrioni, invece, trasportati da un'altra struttura sono stati posti in un tubo da coltura contenente Ham F-10+10%FCS+1% penicillina e gassato, in Equitainer, con

tempo di trasporto variabile tra 6-32h.

Gli embrioni sono stati trasferiti in 558 casi per via chirurgica (laparotomia del fianco in stazione) e in 78 per via non chirurgica (Squires, 1995).

La maggior parte delle riceventi è stata esaminata per la gravidanza nei giorni 12, 14, 16, 25, 35 e 50. Le fattrici non gravide al giorno 12 sono state ricontrollate ai giorni 14 e 16.

I tassi di gravidanza per i 2 anni dello studio sono stati del 65,7% ai 12 giorni (419/638) e 55,5% a 50 giorni (354/638).

Il trasporto e la refrigerazione degli embrioni non hanno avuto influenza nei tassi di gravidanza. Al giorno 12 i tassi sono risultati simili, mentre al giorno 50 è stato riportato che gli embrioni trasferiti con diametro 100-299  $\mu\text{m}$  hanno mostrato tassi di gravidanza più bassi che quelli da 600-999  $\mu\text{m}$  e 1000-1999  $\mu\text{m}$ .

Nel 2003 da Squires e colleghi è stata presentata una review sulla refrigerazione dell'embrione equino.

E' stato dimostrato che la vitalità embrionale è mantenuta per 24h in Ham F-10 gassato con 5% Ossigeno, 5% di Anidride Carbonica e 90% di azoto (Carnevale et al, 2000); è stato anche riportato che non vi sono particolari differenze tra i tassi di gravidanza di embrioni refrigerati, trasportati e freschi (Carney et al, 1991).

Gli embrioni sono trasportati in un dispositivo di raffreddamento passivo (Equitainer®) a 5°C sia con corriere che per via aerea. L'intervallo tra il recupero e il trasferimento di embrioni conservati è di 12-30h generalmente. Tuttavia se un embrione non è recuperato da una donatrice con flushing programmato, l'Ham F-10 gassato non è riutilizzabile; per questo motivo sono stati compiuti altri studi per indentificare un medium senza questi inconvenienti.

Da Fleury e colleghi nel 2002 sono stati incubati embrioni in Ham F-10 con buffer Hepes+4% BSA a 15-18°C per periodi variabili prima del trasferimento. Gli embrioni mantenuti per meno di 1h sono stati usati come controlli. I prodotti del concepimento sono stati posti per 1-18h a 15-18°C con un semplice dispositivo di raffreddamento, sono stati poi divisi in gruppi:

- Gruppo 1 <1h
- Gruppo 2 1-4h
- Gruppo 3 4-8h
- Gruppo 4 8-12h

- Gruppo 5 12-18h

Ogni gruppo è stato suddiviso in 2 categorie: embrioni di misura <1000 o >1000 $\mu$ . Non vi sono state differenze di tasso di gravidanza tra i vari gruppi. Gli autori arrivarono alla conclusione che era possibile conservare embrioni in Ham F-10 fino a 18h senza avere effetti negativi sui tassi di gravidanza.

Da McCue e colleghi nel 2000 sono stati comparati i tassi di gravidanza per embrioni refrigerati 24h in Ham F-10 o EmCare<sup>®</sup>. Non vi sono state differenze.

Anche Moussa nel 2002 eseguì una comparazione tra media disponibili in commercio (Ham, EmCare<sup>®</sup> e ViGro<sup>®</sup>), non trovando, con l'ausilio della colorazione DAPI, differenze tra i vari media impiegati per embrioni refrigerati in Equitainer per 24h. In uno studio successivo (Moussa et al, 2004), sempre degli stessi autori, sono stati valutati i tassi di gravidanza, concludendo che sia Emcare che ViGro potevano essere delle alternative valide al medium Ham per la refrigerazione 24h di embrioni equini.

### *Congelamento degli embrioni*

La criopreservazione degli embrioni permette una raccolta degli stessi e il trasferimento senza limiti di tempo e spazio; ma non solo, anche il management delle riceventi è semplificato perché non è necessario avere 2 o più cavalle sincronizzate con la donatrice per ogni flushing.

In molte specie di mammiferi il commercio internazionale di embrioni è simile a quello del seme congelato, soprattutto nel caso dei bovini. Nell'anno 2006 più di 420000 embrioni di bovidi sono stati trasferiti nel mondo, 95000 in Europa dei quali il 57% erano congelati (Thibier, 2006; Merton, 2007).

Le prime nascite da embrioni di mammifero congelati, sono state riportate da Whittingham et al nel 1972 nel topo, in seguito nella specie bovina nel 1973 da Wilmut e Rowson. Nel cavallo la prima gravidanza da embrione congelato è stata ottenuta nel 1981, ma vi fu un aborto pretermine (Griffin et al, 1981); la prima nascita fu riportata dal gruppo di Yamamoto il 31 Maggio 1982.

Nel 1993, da parte di Poitras e colleghi sono stati descritti due metodi di

congelamento. Sono stati scelti solo embrioni di qualità eccellente o buona, secondo la scala elaborata da McKinnon e Squires nel 1988, e sono stati inseriti random in uno dei due metodi di congelamento. Nel primo gruppo (82 embrioni), ogni prodotto è stato sottoposto a equilibratura a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) in due step: 0,7M (5%) e 1,4M (10%) di glicerolo in PBS (soluzione salina tamponata con fosfati) con 4g/L BSA (siero di albumina bovina) per 10 e 20 minuti rispettivamente. Nel secondo gruppo (51 embrioni) ogni embrione è stato posto in una piastra di agar (0,5x0,5-1mm) utilizzando la tecnica di Willadsen; in seguito è stato aggiunto il crioprotettore come descritto in precedenza. L'embrione è stato posto in una goccia, separato da due bolle d'aria in una paillette da 0,25mL riempita con PBS+BSA. Quest'ultima è stata sigillata con polvere di alcool polivinilico e tenuta orizzontalmente (in bagno d'alcool) nella camera di un freezer programmabile.

Le paillettes sono state congelate a  $-7^{\circ}\text{C}$  con un cooling rate di  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , e tenute a questa temperatura per 15 minuti. Successivamente con un cooling rate di  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  sono state portate a  $-30^{\circ}\text{C}$  e poi a  $-33^{\circ}\text{C}$  e tenute alle rispettive temperature per 30 minuti prima di essere immerse in azoto liquido (LN2).

Gli embrioni sono stati tenuti in LN2 per sette mesi 24H/24H.

Ogni scongelamento ha incluso un gruppo di 8 fino a 12 embrioni, scongelati appunto in un bagno a  $37^{\circ}\text{C}$  per 10 secondi. I prodotti sono stati posti dalle paillettes in una soluzione 1,4M di glicerolo+4g/L di BSA a  $37^{\circ}\text{C}$ . Gli embrioni inclusi sono stati rimossi dall'agar con due aghi ipodermici fissati a siringhe da 1mL. Il crioprotettore di entrambi i gruppi è stato poi rimosso e tutti gli embrioni sono stati trasferiti individualmente in 5 bagni di PBS contenenti diverse concentrazioni di glicerolo: 1,165M; 0,938M; 0,7M; 0,462M; 0,224M; e infine in PBS con 4g/L di BSA; ogni step ha avuto 10 minuti di tempo di equilibratura.

Sempre nel 1993 dal gruppo di Bruyas è stato citato un metodo di congelamento ancora diverso. Sedici embrioni sono stati equilibrati a  $22^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti sequenzialmente in una soluzione di glicerolo bi-distillato alla concentrazione di 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10%; poi sono stati posti in paillettes da congelamento da 0,25mL. Queste sono state poi congelate, da temperatura ambiente, a  $-7^{\circ}\text{C}$  con cooling rate di  $-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  in un freezer a bagno d'alcool. Sono state tenute in queste condizioni per 5 minuti, poi portate a  $-30^{\circ}\text{C}$  con rate di  $-0,3^{\circ}\text{C}$ , e infine immerse in

azoto liquido.

Dopo 3-5 giorni, le paillettes sono state scongelate in acqua a 37°C, gli embrioni sono stati recuperati e posti in glicerolo fresco al 10% per 5 minuti a 22°C. Il crioprotettore è stato poi diluito spostando il prodotto in 6 bagni successivi di glicerolo in concentrazione decrescente: 8,3%; 6,7%; 5,0%; 3,3%; 1,6% e 0%. Un embrione è stato perso durante la procedura di congelamento.

Sono stati riportati da Hochi, in una review del 1998, alcuni metodi e crioprotettori alternativi a quelli riportati finora.

E' stato citato che l'1,2-propanediolo usato come CP, permette lo sviluppo di blastocisti scongelate, ma il trasferimento dell'embrione in fattrici riceventi non ha avuto successo (Meira et al,1993).

Il DMSO (dimetilsolfossido) non avrebbe un adeguato effetto protettivo sulle blastocisti equine (Yamamoto et al,1982).

E' stato visto che il glicole etilenico (EG) ha una permeabilità negli embrioni maggiore del glicerolo (Hochi et al, 1994), per questo sono stati testati i tassi di gravidanza con blastocisti criopreservate con EG. I tassi di gravidanza sono stati del 25% con EG e del 38% con glicerolo (Hochi et al,1996); sono state viste frequentemente rotture delle coperture della blastocisti nella fase di scongelamento. Al contrario, quando al medium di 1,8M di EG è stata aggiunta una piccola quantità di saccarosio (0,1M), tutti gli embrioni post scongelamento mostravano capsule intatte e uno sviluppo in vitro.

Alcuni embrioni congelati sono stati trasferiti direttamente in utero di cavalle riceventi dopo diluizione dei crioprotettori nella paillette con soluzione fisiologica, i tassi di gravidanza (64%) sono stati simili a quelli di embrioni freschi (70%).

Nel 2005 da parte da Tharasanit e colleghi è stato descritto un metodo di congelamento per embrioni messo a punto dalla facoltà di Medicina Veterinaria di Utrecht, in Olanda.

Sono state seguite in parte le metodiche enunciate da Czolonkowska e colleghi nel 1985. L'embrione, precedentemente equilibrato, è stato caricato in una paillette di polivinilcloruro da 0,25mL, immerso in una goccia di glicerolo al 10% e protetto dai due lati mediante due bolle d'aria a fare da cuscino. La paillette è stata sigillata con una sigillatrice per paillette da seme, e posta verticalmente in un freezer



programmabile. Il raffreddamento iniziale è stato di 1°C/min da T ambiente fino a -6°C, a questa temperatura è stata fatta stazionare per 6 minuti. Il raffreddamento è stato poi continuato con un rate di 0,3°C/min fino a -33°C, tenute a questa temperatura per 10 minuti, e poi immerse in azoto liquido.

Tutti gli embrioni sono rimasti in LN2 per almeno una settimana, prima dello scongelamento.

Le paillettes sono state scongelate prima all'aria per 10s e poi immerse in acqua a 35°C per 1 minuto.

Dopo, l'embrione è stato versato in una soluzione PBS+10% di glicerolo+0,25M di saccarosio. Il crioprotettore (CP) è stato poi allontanato con lavaggi consecutivi per 10 minuti ciascuno in PBS+saccarosio 0,25M+concentrazioni decrescenti di glicerolo (7,5; 5; 2,5; e 0%).

In un lavoro riepilogativo del 2012, Tom Stout ha riportato le due diverse tecniche di congelamento: la vitrificazione e lo slow freezing.

Della prima ne parleremo in un paragrafo successivo.

Lo slow freezing consiste nell'esposizione graduale (a step) dell'embrione ad un agente crioprotettivo (CPA), prima del raffreddamento controllato a diversi stadi. L'agente più comune per congelare gli embrioni equini è il glicerolo (10%; 1,36M), con il quale l'embrione è equilibrato mediante un'incubazione in 2 a 4 soluzioni con concentrazioni crescenti.

Sono stati testati anche altri CPA, come il DMSO, 1,2 propanediolo, glicole etilenico (1,5M; Bruyas et al,1995) o metanolo (2,5M; Bass et al, 2004), perché i primi studi suggerivano che l'esposizione al glicerolo fosse responsabile per la maggior parte del danno sofferto dagli embrioni a livello dell'ultrastruttura cellulare e all'attività metabolica. Questi CPA alternativi hanno un basso peso molecolare che dovrebbe facilitarne l'accesso nelle cellule embrionali (Bruyas et al 1995; Bruyas, 2011).

Comunque, mentre alcuni CPA appaiono relativamente non tossici per gli embrioni, come il glicole etilenico o il metanolo, la loro capacità crioprotettiva è spesso scarsa, e sicuramente non superiore al glicerolo; in realtà infatti, solo gli embrioni trattati con glicole hanno riportato dei buoni tassi di gravidanza post scongelamento (7/11; Hochi et al. 1996). Durante lo slow freezing, l'embrione è esposto a due minacce: la formazione di cristalli e la disidratazione. Mentre il raffreddamento procede, si forma ghiaccio extracellulare lasciando i soluti

indietro, così da aumentare l'osmolarità dei rimanenti liquidi extracellulari. Per bilanciare le concentrazioni intra ed extracellulari, l'acqua (che non è ancora congelata) esce dalle cellule, causando disidratazione.

Stabilire il cooling rate ottimale è ugualmente importante, poiché se troppo rapido vi è la formazione di letale ghiaccio intracellulare, se invece troppo lento vi sarà disidratazione eccessiva.

Queste nozioni spiegano l'esigenza di un congelatore programmabile e anche la necessità di effettuare un seeding a  $-6$   $-7^{\circ}\text{C}$ , in modo da coordinare la formazione di ghiaccio in maniera controllata e di evitare il "supercooling", che distruggerebbe le cellule.

Secondo molti studi riportati da McKinnon et al. nel 2011, risulta che da 878 embrioni di cavallo congelati trasferiti, vi sono state solo 244 (28%) di gravidanze, con solo 22 puledri nati, dovute ad aborti spontanei, aborti indotti o parti pretermine. La media di gravidanze è bassa, ed è stato notato che i successi sono stati perlopiù ottenuti con embrioni di dimensioni minori (diametri  $< 200$ - $300 \mu\text{m}$ ).

Da parte di Lascombes e Pashen nel 2001, è stata riportata una delle migliori percentuali di gravidanza (24/43, 56%) dopo congelamento e trasferimento di embrioni, ma solo con questi ultimi di piccole dimensioni e raccolti in tempi molto brevi post ovulazione.

### *Vitrificazione degli embrioni*

Nel 2006 è stato riportato da Elaine M. Carnevale un metodo per la vitrificazione.

E' stato utilizzato un medium base composto da un PBS modificato, senza calcio e magnesio ma con l'aggiunta di piruvato di sodio (0,3mmol), glucosio (3,3mmol) e 20% di siero fetale bovino. Sono richieste 3 Soluzioni di Vitrificazione (VS) glicerolo e glicole etilenico come crioprotettori CP.

Prima della criopreservazione, gli embrioni sono stati recuperati, lavati e posti in un medium di conservazione a T ambiente per meno di 15 minuti.

Durante il processo di vitrificazione sono stati sequenzialmente esposti a 3 VS: VS1 (Gly 1,4M); VS2 (Gly 1,4M+ EG (3,6M) e VS3 (Gly 3,4M)+ EG (4,6M). E' anche

necessaria una soluzione diluente (DS) a base di galattosio 0,5M al caricamento delle paillettes.

I media sono posti in piastre Petri a T 22-24°C per permettere la movimentazione organizzata degli embrioni attraverso le varie soluzioni; poiché, a processo iniziato, l'embrione dev'essere mosso con precisi intervalli nei media sequenziali, un errore può danneggiare irrimediabilmente un prodotto.

Per iniziare, l'embrione è stato rimosso dal medium di conservazione e posto in VS1 per 5 minuti, le movimentazioni devono essere effettuate in piccoli volumi di soluzione. E' stato poi posto in VS2 per altri 5 minuti, e in VS3 per solo 1 minuto (questa soluzione è tossica). L'embrione è stato poi inglobato in una goccia di VS3 da 30µL per riempire più facilmente la paillette.

La paillette stessa, da 25µL è caricata in questo modo: 90µL DS, 5µL aria, embrione in 30µL di VS3, 5µL aria e 90µL di DS. Poi è stata immersa per 1 minuto in azoto liquido, in apposito contenitore, usando una pinza lunga.

Per lo scongelamento, la paillette è stata tenuta all'aria per 10 secondi, senza toccare la parte centrale, poi è stata immersa in acqua a 20-22°C per 10 secondi. La paillette è stata scossa, in modo simile ad un termometro, per favorire la circolazione dei liquidi all'interno e prevenire danni all'embrione, ed è stata lasciata in posizione orizzontale per 4-5 minuti.

Gli embrioni sono stati trasferiti in riceventi entro 6-8 minuti dallo scongelamento; i tassi di gravidanza sono risultati simili a quelli con embrioni congelati (slow freezing) in riceventi 5-6 giorni post ovulazione (Hudson et al, 2006).

Nel 2012, questa tecnica è stata riportata anche da Stout. Consiste in un congelamento ultraveloce che induce un'istantanea transizione dei fluidi sia extra che intracellulare dallo stato liquido al solido, una fase simile al vetro senza formazione di ghiaccio. Questa particolare forma della materia è possibile solo con alte concentrazioni di CP (circa 5-6 volte quelle impiegate nello slow freezing), e mediante una riduzione di temperatura a velocità molto alte, usualmente con immersione in azoto liquido (Liebermann et al, 2002).

Ponendo le paillettes standard da 0,25µL direttamente in azoto, si genera un cooling rate di 2500°C/min; tuttavia è possibile innalzare questo valore fino 20000°C/min, riducendo il volume di medium che circonda l'embrione stirando la paillette per diminuire il diametro interno (Open Pulled Straw; Vatja et al 1998;

Oberstein et al 2001; Moussa et al, 2005), oppure con l'utilizzo di uno strumento Cryoloop (Oberstein et al, 2001); il cooling rate molto accelerato assicura un passaggio rapido attraverso le aree critiche per i danni da congelamento, e riduce le concentrazioni di CPA richieste.

Questa tecnica richiede molti meno investimenti rispetto allo slow freezing, tuttavia il problema principale sono le alte concentrazioni di crioprotettori, che sono tossici per l'embrione. Per questo motivo è necessario attenersi scrupolosamente alle indicazioni sulle tempistiche d'immersione dell'embrione nei vari CP; è difficile più di quel che sembra, perché un'alta concentrazione di CPA rende la soluzione molto densa e l'embrione affonda molto lentamente (Bruyas 2011); per questo motivo è necessaria una buona conoscenza nel manipolare gli embrioni in soluzioni così dense.

#### *Problemi della criopreservazione di embrioni di cavallo*

In una comparazione con gli embrioni di altre specie di mammiferi, alcune peculiarità di quelli equini possono spiegare la difficoltà nella criopreservazione. La blastocisti è di dimensioni molto maggiori e composta di un maggior numero di cellule rispetto a quella di altre specie. Queste dimensioni potrebbero essere la causa dell'alta sensibilità alla criopreservazione e potrebbero spiegare il motivo per cui si hanno maggiori successi con embrioni di dimensioni più contenute.

Mentre le blastocisti dei ruminanti sono mediamente composte da circa 100 cellule, quelle equine a 6.5 giorni invece da una media di 400-500 (Bruyas et al, 1993; Moussa et al, 2005).

Il grande numero di cellule nella blastocisti equina è parzialmente dovuto alla durata molto breve del ciclo cellulare delle cellule embrionali, di 6 ore al giorno 7, mentre nella maggior parte delle specie è tra le 14 e le 24 ore (Moussa et al, 2005; Colchet et al, 2000). L'intensa attività mitotica può aumentare la sensibilità dell'embrione ai crioprotettori, e perciò causare gli effetti negativi del processo di congelamento sul citoscheletro (Dobrinsky, 2002; Tharasanit et al, 2005).

Le cellule di blastocisti equina ai primi stadi contengono molte vescicole e una grande quantità di lipidi immagazzinata in gocce di diverse dimensioni (Bruyas et al, 1993; Flood et al, 1992).

Mohr e Thompson nel 1981 hanno spiegato che le specie aventi allo stadio di

embrioni una grande quantità di vescicole sono particolarmente difficili da criopreservare. La difficoltà di raffreddamento e di crioconservazione degli embrioni della specie suina si sospetta sia dovuta proprio all'alto contenuto lipidico (Dobrinsky, 2002).

La capsula è un'altra peculiarità degli embrioni equini. Alcuni studi hanno suggerito che quest'ultima può impedire l'entrata del crioprotettore nell'embrione, risultando in un insulto osmotico e/o insufficiente crioprotezione, dovuta appunto alla insufficiente concentrazione di CP nell'embrione (Bruyas et al, 2000; LeGrand et al, 1999). In solo 4 studi è stato provato il fatto che alcuni embrioni congelati non hanno capsula, sia perché sono stati prodotti in vitro (Galli et al, 2002; Matsukawa et al, 2003), oppure perché basati su osservazioni microscopiche di sezioni seriali di blastocisti ai primi stadi dove non è stata trovata traccia di capsula (Bruyas et al, 2000). In questi studi appena citati, la maggior parte degli embrioni è sopravvissuta non mostrando alcun danno cellulare come quelli freschi (<5% di cellule morte). L'ipotesi è che vi sia una correlazione tra lo spessore della capsula e la congelabilità degli embrioni. Questo potrebbe spiegare perché vi è un'apparente sensibilità variabile alla criopreservazione tra embrioni e perché solo quelli di piccole dimensioni sopravvivono al congelamento o alla vitrificazione. I prodotti del concepimento, raccolti con flushing subito dopo il loro arrivo nell'utero, non hanno ancora la capsula, oppure essa è molto sottile o incompleta; questi sono congelati con successo con l'ausilio del glicerolo, in modo simile a quelli bovini (Bruyas et al, 2000). Quando la capsula è di maggior spessore la penetrazione del crioprotettore può essere più lenta e ridotta, questo aggrava l'insulto osmotico causato dalla disidratazione delle cellule e diminuisce la protezione delle cellule durante il congelamento o la vitrificazione. Vi sono ulteriori studi nei quali sono state misurate variazioni del diametro embrionale, prima, durante e dopo l'aggiunta del crioprotettore che sembrano confermare questa ipotesi (Hochi et al, 1994; Duchamp et al, 2006; Pfaff et al, 1993; Hochi e Ogasawara, 1994).

## *La refrigerazione degli embrioni*

Una diminuzione della temperatura ambientale durante lo stoccaggio provoca un rallentamento del metabolismo embrionale (Clark et al,1987); di conseguenza gli embrioni equini non avanzano con lo sviluppo o di diametro se conservati a 5°C (Carnevale et al, 1987). Questa inibizione del metabolismo durante il congelamento è reversibile, difatti l'aumento di diametro riprende quando la temperatura aumenta a 37°C (Clark et al,1987). Clinicamente, la refrigerazione consente di conservare in vitro per breve periodo (<24 ore) un embrione, per poi trasportarlo nel luogo dove avverrà il trasferimento in una ricevente.

I primi tentativi di conservazione di embrioni equini a breve termine (entro 24 ore) nel medium tradizionale Dulbecco PBS, non hanno avuto molto successo. In uno studio di Imel e colleghi del 1981 sono stati messi a coltura 15 embrioni in DPBS+20% di siero di manzo a 37°C per 24 ore, e altri 14 embrioni nello stesso medium per circa 3 ore. Il tasso di gravidanza con trasferimento non chirurgico in fattrici riceventi è stato di 6.6% (1/15) e 21,3 (3/14) rispettivamente. E' stato eseguito uno studio successivo, nel quale gli embrioni sono stati conservati nello stesso medium, ma trasferiti per via chirurgica della linea alba. Il tasso di gravidanza di questi embrioni, mantenuti a 37°C per 24 ore, è stato del 20% (3/15) contro il 47,1% (8/17) per embrioni trasferiti entro le 3 ore dopo il recupero (Squires et al, 1982).

E' stato riportato da Douglas, nel 1982, che il mantenimento di embrioni di cavallo a temperatura ambiente da 6 a 24 ore in DPBS, con antibiotici (100UI di penicillina e 100 µg streptomina/mL) e 20% di siero fetale bovino, mostra tassi di gravidanza a 24 giorni inferiori (3/7; 42%) di quelli di embrioni trasferiti entro 3 ore dal recupero. Come conseguenza di questi studi pionieristici, gli embrioni erano generalmente trasferiti entro 3 ore dal recupero (Squires et al, 1985).

Una serie di esperimenti è stata condotta nei primi anni 80 dalla Colorado State University, per identificare un medium alternativo al DPBS per la conservazione degli embrioni equini. E' stato scoperto che il medium Ham F-10+20% di siero bovino fetale (FCS) ha permesso un 85% di aumento di diametro di embrioni equini messi in coltura in vitro per 24 ore (Imel et al, 1981). Successivamente, nel 1982, è stato riportato da Squires e colleghi un tasso di gravidanza a 50 giorni del

45,5% (5/11) per embrioni trasferiti chirurgicamente dopo coltura per <3 ore in Ham F-10+20% di siero bovino, e del 44,4% (4/9) in DPBS+20% siero bovino.

Dal gruppo di Slade, nel 1984, è stata fatta una comparazione tra la conservazione di embrioni equini bisezionati in DPBS+10%FCS con aria e tra Ham F-10+10% FCS in 5% CO<sub>2</sub> a 37°C per 24 ore. E' stato riportato che il medium Ham è superiore al DPBS nel mantenere la qualità dell'embrione e nel promuovere la crescita e lo sviluppo embrionale.

Il problema maggiore del medium Ham F-10 nella pratica clinica è il sistema tampone. Questo fluido contiene un tampone a base di bicarbonato che è dipendente dalla CO<sub>2</sub> per la stabilizzazione del pH. Inoltre, dopo la preparazione, il pH è mantenuto stabile solo per circa 72 ore.

E' stato riportato da Moussa e colleghi nel 2003 uno studio nel quale sono comparati in vitro ed in vivo il medium F-10 di Ham, Emcare e ViGro holding solution per la refrigerazione degli embrioni.

Sono state usate fattrici pony Welsh dai 3 ai 14 anni come donatrici, sane dal punto di vista generale e riproduttivo, sincronizzate con un analogo delle prostaglandine (Dinoprost 500µg, Dinolytic, Upjohn Laboratory, Puurs-Belgium). Al raggiungimento di 33mm di follicolo sono state somministrate 20mg di gonadotropine equine (CEG) per indurre l'ovulazione. Dopo 24 le donatrici sono state inseminate con 600x10<sup>6</sup> spermatozoi; gli embrioni sono stati recuperati 7 giorni post ovulazione.

Sono state poi selezionate 20 fattrici riceventi con meno di 10 anni, il cui tratto riproduttivo è stato esaminato con palpazione transrettale ed ecografia per il monitoraggio della crescita follicolare e il giorno dell'ovulazione, tono uterino, tono cervicale, CL, edema uterino, cisti, fluido, aria nel lume uterino. E' stata indotta l'ovulazione con 20mg di CEG al raggiungimento di follicolo di 33mm.

Le riceventi sono state usate al giorno 6 (n=19) o giorno 7 (n=1). Le fattrici sono state classificate come "accettabili" se al giorno 6 o 7 è evidenziata la presenza di un CL ben definito e un tono uterino e cervicale eccellente.

Nell'esperimento 1 sono state comparate le vitalità in vitro di embrioni equini di 7 giorni dopo 0, 6 e 24 ore di refrigerazione in tre media differenti: Ham f-10 gassato per 5 minuti con 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> con aggiunta di 10% FCS (Fetal Calf Serum) e 1% penicillina/streptomicina, EHS e VHP (AB Technology, Pullman, WA).

In aggiunta è stata esaminata la relazione tra taglia dell'embrione e qualità dopo 24h di refrigerazione.

Sono stati recuperati 50 embrioni equini al giorno 7 post ovulazione con un flushing uterino transcervicale usando 3x0,5 L di EmCare embryo flushing solution (ICP, Auckland, NZ). Tutti gli embrioni sono stati lavati 10 volte in EmCare embryo flushing solution poi misurati e valutati per la morfologia (McKinnon e Squires, 1988).

Sono stati poi assegnati random a 5 gruppi di trattamenti (n=10/gruppo). Nel gruppo 0 di controllo sono stati valutati immediatamente dopo il recupero e il lavaggio. Gli embrioni del gruppo E-6h sono stati valutati dopo 6 ore di conservazione a 5°C in EHS. Quelli conservati per 24h a 5°C sono stati mantenuti in Ham F-10 (Gruppo H-24h), EHS (E-24h) o VHP (V-24h).

Per la conservazione sono stati posti in una provetta da 5mL riempita con il medium appropriato, a sua volta posta in una provetta da centrifuga da 50mL riempita con medium da flushing e alloggiata in un Equitainer. Dopo il trattamento, gli embrioni di controllo e quelli conservati sono stati lavati 3 volte in EHS poi sono stati posti sempre in EHS contenente 1µg/mL 4',6-diamidin-2-fenilindolo (DAPI, Sigma, St. Louis, MO), incubati per 15 minuti a temperatura ambiente e di nuovo lavati 3 volte in EHS (Huhtinen et al, 1995).

La colorazione è stata osservata con un microscopio a fluorescenza inversa (Olympus, IMT-2) e sono state determinate le cellule morte per embrione.

Nell'esperimento 2 sono stati comparati i tassi di gravidanza dopo il trasferimento per gli embrioni conservati per 24h in Ham F-10 o EHS.

Sono stati recuperati 45 embrioni equini al giorno 7 e sono stati trattati come descritto nell'esperimento 1. Per ogni giorno di recupero embrioni, sono stati eseguiti flushings su 3-6 donatrici e gli embrioni sono stati assegnati a uno dei due gruppi di trattamenti in maniera alternata. Gli embrioni sequenziali (uno per ogni gruppo) sono stati trasferiti come una coppia in una ricevente. Sono stati posti in 5mL di Ham F-10 (Gruppo 1; n=20) o in 5mL di EHS (Gruppo 2; n=20). Un embrione per ogni gruppo è stato posto nella sua provetta da 5mL, e posti insieme nella provetta da centrifuga da 50mL riempita con medium del flushing e conservata in Equitainer per 24h.

Venti paia di embrioni sono state trasferite per via laparotomica del fianco (Squires e Sidel, 1995). La tecnica comprendeva la deposizione simultanea



nell'utero dei due embrioni.

Nella valutazione in vitro (esperimento 1) è stato riportato che il diametro medio degli embrioni non differiva significativamente tra i 5 gruppi e tutti gli embrioni sono stati valutati di grado eccellente o buono. Il numero medio di cellule morte nel gruppo 0h e E-6h è risultato simile, significativamente minore invece, rispetto a quello di embrioni conservati per 24h. La media di cellule morte per embrione è stata simile nei gruppi H-24h, E-24h e V-24h. Per compensare la differenza in dimensione, il rapporto tra il numero di cellule morte e il totale di cellule per embrione è stato stimato calcolando la superficie esterna e correlando il numero di cellule morte ad un'unità di superficie (numero di cellule morte/mm<sup>2</sup>). Con questa stima, sono state rilevate sostanziali differenze tra i gruppi 0h, E-6h e i 3 gruppi 24h, ma non sono state trovate differenze tra H-24h, E-24h e V-24h.

Per stimare l'effetto delle dimensioni sulla vitalità dopo 24h di conservazione, gli embrioni appartenenti a questo gruppo sono stati raggruppati e la correlazione tra cellule morte/mm<sup>2</sup> e dimensione è apparsa negativa. Quando è stato analizzato il 25% degli embrioni con il maggior numero di cellule morte/mm<sup>2</sup> la dimensione di questi è stata uguale o inferiore a 400µm. Quando sono stati comparati embrioni con diametro <400µm (n=19) e >400µm, il numero medio di cellule morte/mm<sup>2</sup> per embrioni <400µm di diametro è stata più alta di quella di embrioni >400µm.

La dimensione media degli embrioni e la qualità degli embrioni per l'esperimento 2 non sono state differenti. Quindici su 20 fattrici (75%) sono diventate gravide dopo il trasferimento; 2/15 (13%) con gravidanza gemellare, mentre 13/15 (87%) singola. Su 17 embrioni sopravvissuti, 9 (53%) sono stati conservati in Ham F-10 e 8 (47%) in Emcare. Non sono stati osservati tassi di sopravvivenza diversi.

Da parte di Moussa e colleghi nel 2004 è stato condotto un altro studio per valutare la vitalità e la frammentazione del DNA in differenti media a 5°C.

Sono state utilizzate come donatrici 43 fattrici Pony tra i 3 e i 14 anni, sane dal punto di vista riproduttivo e generale. L'ovulazione è stata indotta all'evidenza ecografica di un follicolo di 33mm, con la somministrazione di 20mg CEG per via IV. Dopo l'iniezione di CEG le fattrici sono state inseminate con seme fresco con una concentrazione di spermatozoi 600x10<sup>6</sup> e gli embrioni recuperati al giorno 7 post ovulazione.

Sono stati recuperati 50 embrioni con un lavaggio transcervicale usando 3x0,5L di

Emcare Complete Flush Solution, il tasso di recupero è stato dell'84%. Gli embrioni sono stati lavati 10 volte in ECFS a 37°C, e poi misurati usando un microscopio e valutati come descritto da McKinnon e Squires nel 1988.

Gli embrioni sono stati assegnati random in 5 gruppi di trattamento (n=9-10 per gruppo). Quelli nel gruppo 0h (controllo) sono stati valutati immediatamente dopo il recupero e lavaggio. Gli embrioni nel gruppo E-6h sono stati valutati dopo 6h di conservazione a 5°C in EHS. Gli embrioni conservati 24h a 5°C sono stati mantenuti sia in Ham F-10 (gassato come nel precedente studio riportato), EHS (E-24h) o in ViGro Holding Plus (V-24h). Gli embrioni conservati sono stati posti in una provetta 5mL riempita con il medium appropriato e poi messi in una provetta da 50mL riempita con il medium da flushing, tutto poi è stato inserito in un Equitainer.

Dopo i rispettivi trattamenti, sia gli embrioni di controllo che quelli conservati sono stati lavati 3 volte in EHS e poi incubati in EHS contenente 1µg/mL di DAPI e tenuti per 15 minuti a temperatura ambiente, poi lavati nuovamente 3 volte in EHS. Il numero di cellule morte (DAPI positive) per embrione è stato determinato mediante un microscopio a fluorescenza invertita (Olympus, IMT-2). Dopo il conteggio, gli embrioni sono stati fissati in una soluzione PBS contenente 3% di paraformaldeide a temperatura ambiente per 1h e lavati 3 volte in PBS. Sono tenuti a 4°C in PBS contenente 0,05% NaN<sub>3</sub> + 1mM di fluoruro di fenilmetilsulfonide (PMSF).

Ogni embrione è stato colorato individualmente per tutta la durata dell'esperimento. La marcatura TUNEL è stata basata sulla procedura descritta da Brison e Schultz nel 1997. Gli embrioni fissati sono stati lavati 3 volte in PBS arricchito con 1mg/mL di alcool polivinilico. Gli embrioni sono stati permeabilizzati mediante incubazione in 0,1% Triton X-100 citrato sodico per 10 minuti su ghiaccio, e poi lavati due volte in PBS/PVA. Ogni embrione è stato incubato in 20µL di una miscela di TUNEL fluoresceina coniugato dUTP e TdT sotto olio minerale per 1h a 37°C in ambiente oscuro. I controlli positivi sono stati incubati in DNasi e lavati in PBS/PVA prima della colorazione TUNEL. I controlli negativi sono stati incubati in fluoresceina-dUTP in assenza di TdT. Dopo la colorazione TUNEL, gli embrioni sono stati lavati due volte in PBS e poi direttamente posti in vetrino con coprioggetto.

Gli embrioni marcati con TUNEL sono stati analizzati con un microscopio ad

epifluorescenza (Olympus BH2) con un filtro per emissioni a passo lungo che permette la visualizzazione di cellule marcate con TUNEL e con DAPI. Il numero di cellule colorate con TUNEL o DAPI, o TUNEL+DAPI sono state contate. Gli embrioni fissati sono stati poi ricolorati con DAPI per marcare tutti i nuclei; poi al microscopio sono state contate tutte le cellule DAPI colorate. Il numero di cellule colorate con tutti i vari metodi e il numero totale sono state determinate con una griglia apposita montata nell'oculare. La percentuale di cellule colorate è stata calcolata dividendo il numero di cellule colorate per il numero totale x 100.

L'analisi della varianza è stata usata per comparare i diametri, il chi quadro per comparare i gradi morfologici tra i vari gruppi di trattamenti. Le differenze tra la percentuale di cellule morte e quelle apoptotiche sono state analizzate con il Mann-Whitney U test, usando il software StatXact 5.

Sono stati identificati i seguenti pattern di colorazione: TUNEL+/DAPI+= cellule morte o in apoptosi avanzata, TUNEL+/DAPI- = cellule vive o in apoptosi iniziale, TUNEL-/DAPI+= cellule morte o necrotiche, TUNEL-/DAPI-= cellule vive o non apoptotiche.

La percentuale media di cellule marcate con DAPI è stata simile sia nel gruppo 0h che nel E-6h ed è stata molto alta per ognuno dei 3 gruppi conservati per 24h. Non sono state osservate differenze sostanziali tra i gruppi H-24h e V-24h. Le cellule colorate solo col DAPI (TUNEL-/ DAPI+: morte o necrotiche) non sono state trovate in embrioni freschi, hanno mostrato un aumento da 0h a 6h, e di nuovo da 6 a 24h.

La percentuale di cellule colorate con TUNEL è stata simile nei gruppi 0h ed E-6h e molto più alta in 24h. Non sono state scoperte sostanziali differenze tra i tre media di conservazione. La percentuale di cellule colorate solo con TUNEL (TUNEL+/ DAPI-) non ha differito tra embrioni freschi e conservati per 6h e 24h, invece, la percentuale di cellule morte (DAPI+) è risultata aumentata con il tempo di incubazione, suggerendo che la conservazione refrigerata non ha aumentato l'incidenza di cellule in apoptosi precoce.

Non è stata trovata differenza tra la percentuale di cellule colorate con DAPI e quella di cellule marcata con TUNNEL.

Il diametro medio di embrioni non ha mostrato differenze nei 5 gruppi e tutti gli embrioni sono stati valutati morfologicamente col grado di eccellente o buono.

Analizzando la correlazione tra dimensione e percentuale di cellule DAPI marcate

dopo 6h (n=10) e 24h (n=30) di refrigerazione, è stata osservata una correlazione tra il diametro degli embrioni e la percentuale media di cellule morte, indicando che il diametro è negativamente correlato con la percentuale di cellule necrotiche; gli embrioni più piccoli presentano una percentuale di cellule morte maggiore rispetto a quelli di dimensioni più grandi.

Dal trend generale è stato notato che il diametro è correlato negativamente con il grado di apoptosi. Quando gli embrioni sono arbitrariamente divisi in piccoli (<400µm) e grandi (>400µm), quelli con diametro minore mostrano una percentuale maggiore di cellule apoptotiche (TUNEL+/ DAPI-), suggerendo che l'incidenza di apoptosi diminuisce con l'età dell'embrione, oppure che gli embrioni più piccoli di una stessa età siano meno vitali e siano coinvolti in un più intenso meccanismo di fisiologica eliminazione.

Dal gruppo di Moussa e colleghi nel 2004 è stata studiata la correlazione tra il numero di cellule e il diametro di embrioni equini recuperati i giorni 6.5, 7 e 8.

Sono state usate come donatrici 60 fattrici di razza Welsh, tra i 3 e il 14 anni, tutte le cavalle erano sane dal punto di vista riproduttivo. L'ovulazione è stata indotta all'evidenza ecografica di un follicolo di 33mm, con la somministrazione di 15mg CEG per via IV. 24h dopo l'iniezione di CEG le fattrici sono state inseminate con seme fresco con una concentrazione di spermatozoi  $600 \times 10^6$ , l'ovulazione è avvenuta dopo 24 ore. Gli embrioni sono stati recuperati 192h (36h+6,5x24h), 204h (36h+7x24h) e 228h (36h+8x24h) dopo la somministrazione di CEG, quindi al giorno 6.5, 7, 8. Sono stati recuperati mediante un lavaggio uterino transcervicale con 3 x 0,5L di EmCare Complete Flush Solution a 37°C, è stato poi eseguito un lavaggio per 10 volte con Emcare Holding Solution sempre a 37°C. Gli embrioni sono stati assegnati a 3 gruppi d'età differente (D6,5:n=12 D7:n=98 e D8:n=14), sono stati poi valutati morfologicamente col metodo di McKinnon e Squires del 1988 e il diametro di ogni embrione, includendo la zona pellucida è stato misurato con un microscopio.

Sono stati poi fissati in una soluzione PBS+4% paraformaldeide a temperatura ambiente per 1h e lavati 3 volte in PBS. Il numero totale di cellule è stato valutato contando i nuclei DAPI marcati. Gli embrioni fissati sono stati colorati con DAPI 1µg/mL per marcare tutti i nuclei; questi ultimi sono stati contati usando una griglia apposita montata su un microscopio a fluorescenza invertita.

Differenze significative riguardo ai diametri ed il numero di cellule tra i gruppi di età sono state rilevate mediante il test Kruskal Wallis usando il software StatXact 5. Le analisi comparative tra gruppi sono state fatte usando l'U-test; le correlazioni tra il numero totale di cellule, il diametro degli embrioni e lo stadio di sviluppo sono state calcolate con il test di Spearman.

I diametri degli embrioni sono variati tra i 160-260 $\mu$ m, 160-840 $\mu$ m e 380-1640 $\mu$ m rispettivamente per embrioni al giorno 6,5 7 e 8. Il diametro medio (SEM) di embrioni al giorno 6,5 e 7 non ha avuto differenze significative, ma è risultato più piccolo rispetto a quelli al giorno 8. Un embrione (1640  $\mu$ m-20322 cellule) è stato considerato un errore e rimosso dall'analisi.

Il numero totale di cellule è variato tra 226-726, 265-7652 e 2251-20322 per embrioni rispettivamente di 6,5 7 e 8 giorni. Il numero medio di cellule per embrioni del giorno 6,5 (394 $\pm$ 12) è stato significativamente più basso degli altri. Il numero medio di cellule per quelli di 7 giorni è stato più basso (2365 $\pm$ 170) di quelli di 8 (7984 $\pm$ 390).

Durante questo studio, sono stati recuperati 4 paia di embrioni gemelli al giorno 7(n=2) e 8(n=2). I gemelli al giorno 7 derivavano da una doppia ovulazione sincrona unilaterale mentre quelli del giorno 8 da una doppia ovulazione sincrona bilaterale. Solo un paio di gemelli unilaterali erano esattamente identici in diametro e comparabili per numero di cellule (15% di differenza); le altre 3 paia erano molto differenti in diametro (63%, 23% e 33%) e in numero di cellule (87%, 27% e 70%), nonostante la sincronia delle ovulazioni.

Il diametro medio e il numero di cellule non hanno avuto differenze significative tra gli stadi di morula, blastocisti giovane e blastocisti per quanto riguarda gli embrioni al giorno 6,5. Nel gruppo del giorno 7, non ci sono state differenze nel diametro della morula, blastocisti giovane e blastocisti ma è risultato più basso rispetto al diametro della blastocisti espansa. Il numero di cellule della morula e della giovane blastocisti è stato significativamente più basso di quello rilevato nella blastocisti adulta ed espansa, sempre negli embrioni di giorno 7.

C'è stata una differenza importante nel numero di cellule tra blastocisti adulta ed espansa (1142 $\pm$ 82 cellule contro 3424 $\pm$ 211, embrioni di 7 giorni). Il diametro e il numero di cellule della morula e della blastocisti giovane non ha differito tra embrioni del giorno 6,5 e 7. Il diametro medio della blastocisti nei giorni 6,5 e 7 non ha mostrato differenze significative mentre il numero di cellule delle

blastocisti di 7 giorni è stato maggiore rispetto a quello di quelle di 6,5.

Il diametro medio delle blastocisti espanse del giorno 7 non ha differito con quelle del giorno 8 ma il loro numero di cellule è stato più alto di quelle del giorno 7 (8461±416 contro 3424±211).

I coefficienti di correlazione (valori r) tra il numero totale di cellule e il diametro sono stati significativi in ogni gruppo d'età:

- giorno 6,5: 0,965
- giorno 7: 0,977
- giorno 8:0,982

Il totale delle blastocisti normali ed espanse (n=112) ha indicato che il coefficiente di correlazione tra il numero delle cellule e il diametro dell'embrione è degno di nota (r=0,976); un'altra correlazione significativa (r=0,682) è stata osservata tra il numero delle cellule e il diametro in tutte le morulae e giovani blastocisti (n=12) dei giorno 6.5 e 7.

In conclusione è stato dimostrato che il numero di cellule nell'embrione equino è correlato strettamente con il diametro embrionale della blastocisti normale ed espansa, con questa formula per calcolare il numero (n) di cellule basato sul diametro embrionale (d) espresso in micron:  **$n=0,0106d^2+2,0542d-375,28$** .

E' stata riportata da Carnevale, nel 2009 una review sulla refrigerazione.

La ricerca usata come base per il trasporto commerciale di embrioni è stata presentata nel 1987 (Carnevale et al,1987); gli embrioni sono stati conservati in un medium di coltura per tessuti (Ham's F-10+10% siero fetale bovino) gassato con 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, e 90% di N<sub>2</sub>. A 14 giorni, i tassi di gravidanza sono risultati simili agli embrioni di controllo, trasferiti subito dopo il recupero. A 35 giorni i tassi sono risultati più alti nei controlli rispetto agli embrioni conservati (80% contro 55% rispettivamente). E' stato quindi concluso che questa tecnica di conservazione era accettabile per il trasporto degli embrioni. Questo sistema è stato poi modificato, per sostenere un regime di commercializzazione, ed i tassi di gravidanza a 12, 35 e 50 giorni non sono risultati differenti per embrioni refrigerati e spediti nei confronti di quelli trasferiti direttamente nella stessa località del recupero (Carney et al,1991). Comunque le perdite di gravidanza sono state più alte quando gli embrioni erano trasportati per più di 12 ore (Carney et al, 1991).

## *Packaging degli embrioni*

L'embrione è identificato, lavato e posto in un holding medium dentro un contenitore sicuro. Il medium di conservazione deve mantenere un pH costante e sostenere la vitalità dell'embrione, normalmente sono aggiunti una fonte proteica e antibiotici. Oltre ai già citati Ham F-10, sono disponibili per stabilizzare il pH i tamponi zwitterionici, sono stati riportati similari tassi di gravidanza per embrioni conservati in F-10 gassato e in medium per embrioni EmCare Holding Solution di questo tipo (McCue et al, 2000; Moussa et al, 2003). I due media sono stati comparati in vitro con un altro medium (ViGro Holding Plus), non sono state notate differenze (Moussa et al, 2004).

Per l'embryo transfer sono stati usati i sistemi studiati per il trasporto di seme refrigerato devono garantire la tenuta di un'appropriata temperatura per tutta la durata del viaggio

Uno dei più comuni è l'Equitainer (Hamilton Research, Inc. South Hamilton, MA), in uno studio precedente (Carnevale et al 1987) il medium contenuto nell'Equitainer ha subito una diminuzione di temperatura di 0,3°C/min, fino a 5°C in 5 ore; la temperatura è stata mantenuta a 5-10°C tra 5 e 24 ore.

Dopo il recupero, l'embrione è lavato con 3-6 gocce di medium per rimuovere i detriti. Il medium dovrebbe essere ad una temperatura tra i 22°C e 37°C per il lavaggio, la conservazione e il packaging.

Materiali richiesti per il confezionamento: 5-6mL di holding medium, 50mL di medium per flushing, provetta sterile da 5mL con tappo a vite, provetta sterile da centrifuga da 50mL, Parafilm, Equitainer.

La tecnica riportata da Carnevale è la seguente:

- Riempire la provetta da 5mL con circa 4,5mL di holding medium riscaldato
- Trasferire l'embrione dopo il lavaggio nella provetta
- Aggiungere medium fino a riempire tutti i 5mL, chiudere il tappo e sigillare con Parafilm
- Riempire la provetta da 50mL con medium da flushing recuperato
- Porre la provetta da 5mL contenente l'embrione in quella da 50mL, chiuderla attentamente e sigillare anch'essa con Parafilm
- Caricare la provetta da 50mL nell'Equitainer

### *Effetti avversi della refrigerazione di embrioni equini*

Da Carnevale e colleghi nel 1987 è stato notato che l'evidenza ecografica della vescica embrionale nell'utero, dopo trasferimento di embrione refrigerato, è spesso ritardata e la dimensione della vescicola è spesso minore. E' stato suggerito che lo stoccaggio refrigerato possa risultare in un rallentamento della crescita. E' stato proposto che refrigerare gli embrioni equini possa danneggiare la massa cellulare interna più che le cellule trofoblastiche, causando un'aumentata incidenza di sviluppo di trofoblasto con embrione propriamente detto (Carnevale et al, 1987); questo non è stato osservato in uno studio più ampio, eseguito successivamente nello stesso luogo (Carney et al, 1991).

Esistono report contrastanti sulla refrigerazione dell'embrione e sulla perdita della gravidanza. Da Cook e colleghi nel 1989, è stata riportata una percentuale di perdita tra il giorno 15 e il 50 dell' 11,5% per gli embrioni freschi, e dell'8,2% per quelli trasportati. Dal gruppo di Carney e colleghi nel 1991, è stato riportato che i tassi di gravidanza iniziali (giorno 12), con trasferimento chirurgico, erano simili per embrioni freschi e refrigerati, e che soprattutto il tasso di perdita embrionale non cambiava tra i due gruppi. Comunque, per fattrici riceventi embrioni refrigerati, la perdita embrionale tra il giorno 12 e 35 è stata maggiore nei casi di embrioni refrigerati per più di 12 ore (25%), comparata con quella di quelli sempre refrigerati ma per meno di 12 ore (10%).

In uno studio più recente, tuttavia, l'incidenza di perdita embrionale non è stata differente tra embrioni trasferiti immediatamente dopo il flushing e trasportati in condizioni refrigerate (Carnevale et al, 2000).

E' stato notato da molti studiosi che l'embrione equino di maggiori dimensioni tollera il raffreddamento meglio di quello di minor dimensione (Carney et al, 2000; Moussa et al, 2003; Moussa et al, 2004). Negli embrioni più piccoli il raffreddamento è associato ad una maggior percentuale di cellule morte (Carnevale et al, 1987). E' stato riportato da Carney e colleghi nel 1991, che il trasferimento di embrioni più piccoli ha dato meno gravidanze di quello con embrioni più grandi. Il trasferimento di 22 embrioni refrigerati, con diametro <250µm ha mostrato un tasso di gravidanza del 59%, mentre quello di 105 embrioni >250µm uno dell'80%.



In uno studio di Moussa e colleghi del 2004 è stato osservato che embrioni di diametro  $>400\mu\text{m}$ , dopo 24 ore di refrigerazione, hanno una vitalità maggiore di quelli  $<400\mu\text{m}$ , basata sul numero medio di cellule morte/ $\text{mm}^2$  per ogni categoria di taglia dell'embrione.

### *Principali colorazioni per embrioni*

Nel 2001 è stato riportato da Thouas e colleghi uno studio nel quale gli embrioni bovini erano colorati con una metodica alternativa a quelle riportate finora.

Le blastocisti (espansive, in espansione, giovani o parzialmente schiuse) sono state prima incubate in  $500\mu\text{L}$  di Soluzione 1 (Medium Hepes+ 1% di Triton X-100 e  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  di Ioduro di propidio) per 30 secondi o fino a che il trofoectoderma non mostrava un cambiamento di colore verso il rosso. Le blastocisti sono state poi spostate nella Soluzione 2 (100% di etanolo+ $25\mu\text{g}$  di bisbenzimidide) e conservate a  $4^\circ\text{C}$  per tutta la notte. Le blastocisti marcate sono state poi trasferite nel glicerolo e visualizzate al microscopio. Lo ioduro di propidio è impermeabile alle membrane, e è quindi utilizzato generalmente per colorare le cellule morte.

Nel 2005 da parte di Tharasanit e colleghi, è stata utilizzata un'altra tecnica per la colorazione cellulare. Embrioni equini sono stati permeabilizzati mediante un'immersione in Triton X-100 allo 0,1% in PBS, per visualizzare il citoscheletro e poi colorati per 1h a temperatura ambiente con una soluzione di Alexa Fluor 488-phalloidin  $15\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS. Dopo un lavaggio in PBS, gli embrioni sono stati colorati negativamente in DAPI  $0,1\mu\text{g}/\text{mL}$  per contare i nuclei cellulari.

Per la localizzazione della membrana plasmatica cellulare, un numero di embrioni è stato marcato per 1,5h con una soluzione a  $5\mu\text{g}/\text{mL}$  di agglutinina di germe di grano. Sono stati poi posti al buio in un vetrino in attesa di valutazione microscopica.

Nel 2007 dal gruppo di Hinrichs e colleghi è stato descritto un ulteriore metodo di colorazione differenziale degli embrioni.

Le blastocisti sono state incubate a temperatura ambiente per 40s in  $500\mu\text{L}$  di PBS

contenente 100µg/mL PI e 1% Triton X-100. Sono state poi sciacquate con etanolo puro, e poste sempre in etanolo+30-40µg/mL di Hoechst 33342 per tutta la notte a 4°C. Il giorno successivo sono state osservate con un microscopio a fluorescenza; i nuclei marcati con PI apparivano rossi, mentre quelli con bisbenzimidide blu.

## Capitolo 3: PARTE SPERIMENTALE

### *Scopo del lavoro*

L'Embryo Transfer è una tecnologia riproduttiva che ha avuto notevole diffusione negli ultimi anni, poiché permette notevoli vantaggi nell'industria dell'equitazione, fatti salvi casi particolari, come il PSI, nel cui Stud Book è vietata l'iscrizione a cavalli prodotti con qualsivoglia tecnologia di riproduzione.

E' possibile ottenere più prodotti l'anno per una singola fattrice di valore (vietato nella razza Trottatore Italiano), oppure permettere la riproduzione di cavalle importanti ma troppo anziane o con patologie a carico dell'apparato riproduttivo. Un altro aspetto fondamentale è che, con il trasporto di embrioni, si ha una notevole semplificazione commerciale, dal momento che, ovviamente, spostare un embrione è molto più economico che spostare una cavalla.

Dati questi nuovi impulsi tecnici e commerciali, ad oggi, molti colleghi utilizzano questa tecnica sempre più di frequente, eseguendo flushings uterini per la ricerca di embrioni.

Successivamente al lavaggio uterino (procedura relativamente poco complessa), la tecnica di manipolazione degli embrioni non è semplice, dal momento che richiede, oltre ad aver a disposizione numerose cavalle riceventi, manualità specialistica, attrezzatura e laboratorio non alla portata di tutti i colleghi. Fino ad oggi il trasporto degli embrioni era subordinato all'uso di media particolari (Carney et al, 1991), con specifiche procedure come lavaggi sequenziali e misurazioni al microscopio (Carnevale et al, 2000).

Nel 2011 da Panzani e colleghi è stata studiata una tecnica semplificata per la refrigerazione breve (6-8h) di embrioni equini. In questo studio, il filtro contenente l'embrione è stato riempito con EFS in modo da sostituire il liquido di lavaggio (Ringer Lattato) e posto direttamente in Equitainer per 6-8h. Gli embrioni sono stati poi trasferiti in riceventi a 5-8 giorni post ovulazione. I tassi di gravidanza sono risultati analoghi a quelli in letteratura sia per embrioni freschi (Squires et al, 2004; Panzani et al, 2009) che refrigerati 24h in media più complessi come Ham, EmCare e ViGro (Moussa et al, 2003).

In letteratura non vi sono studi sulla vitalità embrionale dopo semplice mantenimento di embrioni nel filtro con Ringer Lattato (lo stesso medium utilizzato per il lavaggio uterino). In questo modo un collega potrebbe mandare al centro di referenza per la riproduzione direttamente il filtro usato per il flushing senza aver nemmeno controllato la presenza dell'embrione, riducendo così a 0 i potenziali pericoli e i problemi.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di comparare il numero di cellule morte embrionali dopo 6 e/o 24h di refrigerazione in 3 differenti media: EmCare Holding Solution® (ICPbio Reproduction, USA); Emcare Flushing Solution® (ICPbio Reproduction, USA); Ringer Lattato.

Il Ringer Lattato è utilizzato comunemente come medium di lavaggio, il nostro protocollo è stato studiato per verificare se, mantenendo l'embrione nel filtro del flushing e inserendolo direttamente con un Equitainer, la vitalità degli embrioni possa subire o no una diminuzione.

## ***Materiali e metodi***

Lo studio è stato eseguito presso l'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università di Pisa (San Piero a Grado, Pisa 43° 41' 30"), su 16 cavalle di razza Trottatore Italiano. Le fattrici facevano parte del gruppo di riceventi selezionate e non utilizzate come riceventi di embrioni per la stagione di monta dell'anno 2011. L'età era compresa tra gli 8 e i 15 anni ed il peso corporeo tra 402 e 560 Kg con una media di 481,3±49,9 Kg; all'inizio dello studio le cavalle si presentavano sane dal punto di vista generale e riproduttivo.

Le fattrici sono state mantenute in paddock ed alimentate con fieno ad libitum e mangime fioccato, somministrato in razioni stabilite sulla base di peso corporee mensili e secondo i fabbisogni stabiliti dal National Research Council (1989).



Figura 5 Cavalle in paddock, Dipartimento di Scienze Veterinarie.

### *Monitoraggio del ciclo estrale e inseminazione artificiale*

Lo stadio del ciclo riproduttivo è stato monitorato mediante palpazione (Figura 6) ed ecografia transrettale (ecografo Toshiba Just Vision 200 con sonda semiconvex a frequenza variabile 5-7Mhz, modello PVF-738F)(Figura 7), a cadenza bisettimanale durante il diestro e quotidiana durante l'estro.



Figura 6 Esame apparato riproduttivo: palpazione rettale.



Figura 7 Esame ecografico dell'apparato riproduttivo.

Le cavalle, impiegate come donatrici di embrioni, sono state inseminate con seme fresco o congelato all'evidenza di un follicolo ovarico con diametro  $>35\text{mm}$ .

In 9 cavalle è stato somministrato GnRH sintetico (buserelin acetato) al dosaggio  $1\text{mg/mL}$  (Suprefact<sup>®</sup> 5,5mL/capo via SC Sanofi-Aventis S.p.A Milano), per favorire l'ovulazione entro 48h dalla somministrazione.

Per le inseminazioni è stato utilizzato il seme di due stalloni di provata fertilità prelevato con una vagina artificiale modello Colorado<sup>®</sup> (CSU Model AV, ARS), sia fresco che congelato.

Sono state eseguite 26 inseminazioni con seme fresco, e 28 con seme congelato.

Il materiale seminale fresco è stato valutato (volume, colore, motilità, concentrazione) e diluito volumetricamente in proporzione 1:3 con l'extender INRA96<sup>®</sup> (IMV Technologies, Francia).

Per quanto riguarda il congelato, l'eiaculato è stato diluito con un extender a base di latte ad una concentrazione di  $6 \times 10^6$  spermatozoi/mL e centrifugato per 10-15 min a 350-700g. Successivamente è stato eliminato il surnatante in modo da lasciare non più di 0-5% di plasma seminale (Amann e Pickett, 1987); lo sperma è di nuovo risospeso alla concentrazione desiderata ( $100-200 \times 10^6$  spermatozoi/mL) in un extender per congelamento, basato sia su tuorlo d'uovo oppure su latte, con aggiunta di crioprotettori. Il seme è stato poi caricato in paillette da seme da 0,5mL, congelate per immersione in vapori di azoto liquido fino alla temperatura finale di  $-140^\circ\text{C}$  (Watson et al, 2000). Le paillettes sono state poi conservate in azoto liquido a  $-196^\circ\text{C}$ .

### *Recupero degli embrioni*

Tutte le cavalle inseminate sono state sottoposte a flushing uterino 8 giorni dopo l'ovulazione per il recupero degli embrioni.

Le cavalle sono state contenute in un travaglio, la coda è stata introdotta in un guanto da esplorazione rettale, fissata con nastro adesivo e legata lateralmente, il retto è stato svuotato dalle eventuali scibale presenti e il perineo è stato sottoposto a tre lavaggi con un sapone antisettico a base di iodio, sciacquato con acqua e asciugato con attenzione (Figura 8).



Figura 8 Lavaggio del perineo con sapone antisettico.

Per il recupero degli embrioni è stato impiegato un dispositivo a tre vie comprendente una sonda specifica dal diametro 36 Fr (IVON, IMV, Francia), ed un filtro da recupero embrionale (EZ WAY FILTER, SPI™ Canton, TX) (Figura 9). Il medium impiegato per il flushing è stato Ringer Lattato nella misura di 1-2 litri per lavaggio per un totale di 5 lavaggi consecutivi.



Figura 9 Strumenti per embryo transfer.

L'operatore, una volta calzato un guanto sterile e lubrificato le dita con gel sterile, ha introdotto la sonda cuffiata in vagina e poi nel canale cervicale fino a raggiungere il lume uterino. Una volta che il catetere ha raggiunto il corpo dell'utero, la cuffia della sonda è stata gonfiata con 80cc di aria tramite una siringa sprovvista di ago. L'utero è stato sottoposto a più lavaggi mantenendo rispettivamente chiusa la via del filtro al momento dell'introduzione del medium in utero e chiusa la via collegata alla sacca di medium al momento del recupero del liquido uterino attraverso il filtro.





Figura 10 Flushing di una cavalla per recupero embrioni.

Durante il recupero del liquido di lavaggio, l'operatore ha massaggiato l'utero per via rettale al fine di favorire il completo deflusso dello stesso (Figura 10).

A questo punto, è stata sgonfiata la cuffia della sonda, quest'ultima è stata estratta dalla vagina e la coda è stata sfasciata.

Tutte le donatrici sono state trattate con 3mg dell'analogo delle  $PGF_{2\alpha}$  alfaprostol (1,5mL/capo/im, Gabbrostim®, CEVA VETEM, Milano).

Gli embrioni recuperati sono stati 23 su 45 flushings eseguiti (percentuale di successo 51,11%), dei quali 14 provenienti da cavalle inseminate con seme fresco (percentuale di recupero: 53,84%) e 9 con seme congelato (percentuale di recupero 32,14%).



Figura 11 Scorcio del laboratorio Regionale autorizzato per la manipolazione degli embrioni equini (Università di Pisa, Dipartimento di Scienze Veterinarie).

Subito dopo il flushing uterino, la piastra con griglia contenente il filtro è stata osservata sotto uno stereomicroscopio (Leica® S6E) a 40x per la ricerca degli embrioni (Figura 11 e 12).

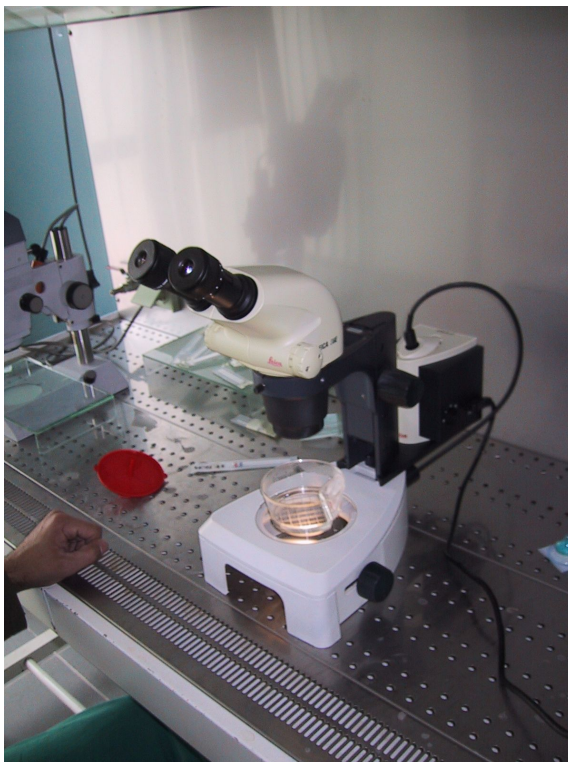


Figura 12 Leica S6E. Microscopio stereoscopico usato per ricercare gli embrioni nel filtro.

### *Valutazione e misurazione degli embrioni dopo il recupero*

Gli embrioni recuperati (n=23) sono stati misurati mediante oculare micrometrico (vedi Figura) e valutati per la morfologia (McKinnon e Squires, 1988), risultando di qualità eccellente o buona; sono stati poi spostati in pozzetti contenenti medium Emcare Holding Solution® a 37°C e sottoposti a 3 lavaggi consecutivi, tutte le operazioni sono state svolte sotto cappa a flusso laminare. Sono stati infine fotografati con una fotocamera e sono stati valutati il diametro e lo stadio di sviluppo (Figura 13). Sono stati arruolati nello studio embrioni con dimensioni <2000μ.

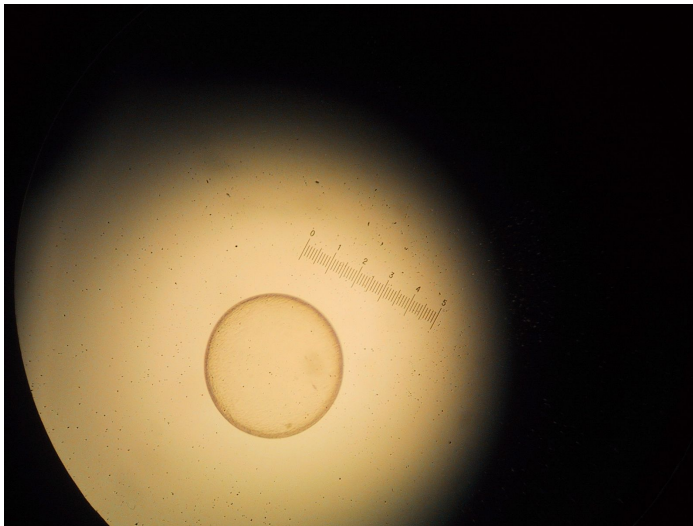


Figura 13 Embrione di cavallo con scala micrometrica per dimensioni.

### *Preparazione degli embrioni prima della refrigerazione*

I diversi media utilizzati in questo esperimento sono stati:

- EmCare Holding Solution® (ICPBio Reproduction, USA)
- EmCare Flushing Solution® (ICPBio Reproduction, USA)
- Ringer Lattato

Gli embrioni sono stati divisi in questi gruppi:

- EHS per 24h con protocollo standard (gruppo di controllo composto da 6 embrioni)
- EFS per 6h (6 embrioni)
- EFS per 24h (4 embrioni)

- RL per 6h (7 embrioni)

Nei gruppi EFS e RL gli embrioni recuperati sono stati lavati con 1L di EFS o RL per rimpiazzare il medium recuperato dall'utero.

Gli embrioni sono stati assegnati random a uno dei gruppi appena enunciati, ognuno è stato tenuto direttamente nel filtro di recupero e posto nell'Equitainer® (Hamilton Research, Inc. South Hamilton, MA) in questo modo (Figura 14 e 15):

- Filtro con medium di lavaggio ed embrione (sigillato con Parafilm) e rivestito con 3 giri di carta assorbente

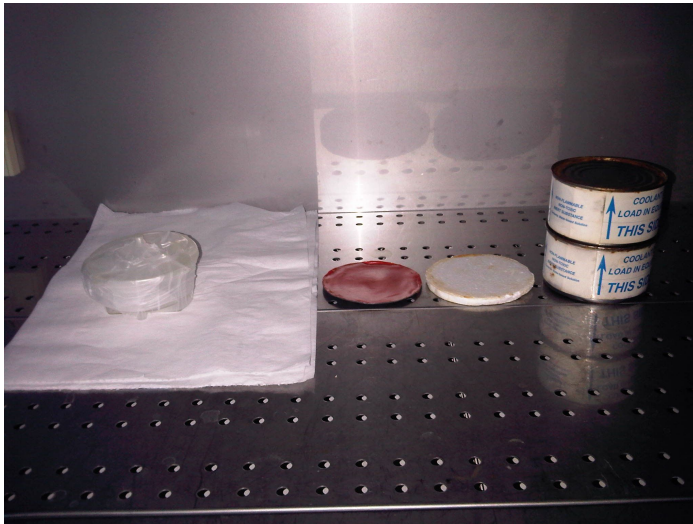


Figura 14 Carta assorbente, filtro rivestito di Parafilm, spessore di polistirolo e tavolette refrigeranti.

- Spessore di polistirolo di circa 8mm
- Tavolette refrigeranti dell'Equitainer®
- Sonda del termometro e tappo.

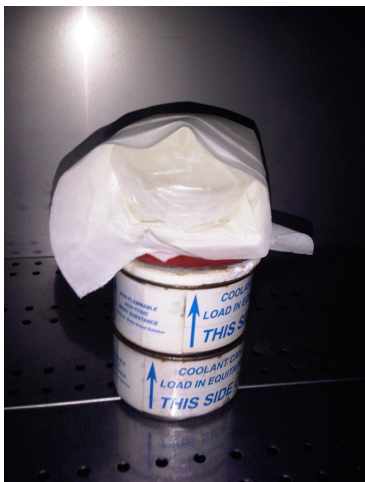


Figura 15 Disposizione e preparazione del filtro da porre nell'Equitainer.

La temperatura è stata presa alla chiusura del contenitore e alla sua riapertura 6 o 24h dopo (Figura 16 e 17).



Figura 16 Equitainer® con filtro posizionato all'interno e sonda per temperatura.



Figura 17 Equitainer chiuso con filtro e sonda per termometro all'interno.

### *Preparazione del colorante DAPI*

Il DAPI o 4',6-diamidin-2-fenilindolo è un colorante organico fluorescente che lega fortemente regioni del DNA ricche in sequenze A-T. Il legame di questo colorante al dsDNA produce una fluorescenza, apparentemente derivante dalla disposizione delle molecole d'acqua sia dal DAPI che da una eccitazione di livello inferiore; comunque si lega anche all'RNA, ma in sequenze A-U. Il complesso DAPI/RNA mostra una maggiore emissione d'onda e fluorescenza rispetto a DAPI/dsDNA (500nm e 460nm).

Questa sostanza è un comune colorante nucleare per usi in tecniche di fluorescenza multicolore, dando un caratteristico colore blu, marcando le cellule morte (Figura 18). Quando usato correttamente, il DAPI marca selettivamente i nuclei, con colorazione quasi nulla del citoplasma.

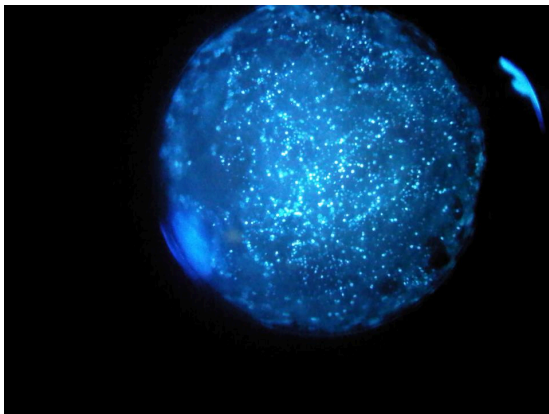


Figura 18 Embrione colorato con DAPI, alta percentuale di cellule morte.

Nel presente studio è stato utilizzato DAPI dilactato (DAPI Nucleic Acid Stain D3571 Molecular Probes®, Thermo Fisher Scientific, USA), con dosaggio 5mg/mL. Per la preparazione del colorante è stato disciolto il contenuto di una fiala (10mg) in 2mL di acqua deionizzata; lo stoccaggio del preparato è stato disposto al buio e ad una temperatura di 2-6°C.

### *Colorazione degli embrioni*

Trascorso il tempo prestabilito, è stata annotata la temperatura finale e l'Equitainer è stato riaperto.

Il filtro contenente l'embrione è stato rovesciato per metà in una piastra Petri quadrata, è stato poi agitato dolcemente ed è stato poi versato il liquido rimanente. L'embrione è stato poi cercato con il microscopio già citato in precedenza, nel caso in cui non era trovato, si aspirava un po' di medium dalla piastra e, con una siringa sprovvista di caucciù, si lavava la provetta.

Individuato l'embrione è stato lavato 3 volte in EmCare a temperatura ambiente, ed è stato immerso in 1-1,15 mL di soluzione DAPI ricostituita (dosaggio 1µg/mL) e incubato al buio per 5 minuti.

Trascorso il tempo necessario, l'embrione è stato lavato nuovamente in EHS 5 volte, ed è stato caricato (insieme ad una goccia di EHS) in un vetrino portaoggetti provvisto di incavo e coperto con un coprioggetto. Subito dopo, l'embrione è stato osservato con un microscopio a epifluorescenza Leica® DMLB a 100 e 200x con illuminazione UV e sono state contate le cellule colorate per due volte da due operatori diversi ed è stata poi eseguita una media tra le due misurazioni.

Il numero di cellule totali è stato stimato usando la correlazione:

$$n = 0,0106d^2 + 2,0542d - 375,28$$

(n=numero di cellule, d=diametro embrionale in µ) (Moussa et al, 2004).

Gli effetti dei trattamenti con diversi media e i diametri degli embrioni dei vari gruppi sulle percentuali di cellule morte/cellule totali stimate sono stati valutati con ANOVA (GLM).

## ***Risultati***

La seguente tabella riporta i gruppi di trattamento con i diversi animali, gli stadi di recupero degli embrioni, le dimensioni espresse in micron, le temperature iniziali e finali, e il numero di cellule marcate con DAPI.

EB: blastocisti espansa.

Data	Cavalla	Stadio embrione	Medium utilizzato	Tempo	Dimensioni	T° Iniziale	T° Finale	DAPI
26 Aug	Cavalla 1	Blastocisti	RL+EHS	24h	1290 $\mu$	26,5°C	12,0°C	>200
27 Aug	Cavalla 2	Blastocisti	RL+EHS	24h	464,8 $\mu$	25,5°C	17,0°C	23
2 Sept	Cavalla 3	Blastocisti	RL+EHS	24h	258 $\mu$	27,0°C	N/R	3
4 Sept	Cavalla 4	Blastocisti	RL+EHS	24h	774 $\mu$	28,0°C	11,9°C	4
12 Sept	Cavalla 5	Blastocisti	RL+EHS	24h	258 $\mu$	N/R	N/R	4
15 Sept	Cavalla 3	Blastocisti	RL+EFS	6h	516 $\mu$	N/R	N/R	4
15 Sept	Cavalla 3	Blastocisti	RL+EFS	6h	516 $\mu$	N/R	N/R	4
21 Sept	Cavalla 7	Blastocisti	RL+EFS	6h	1548 $\mu$	23,0°C	10,8°C	1
2 Oct	Cavalla 8	Blastocisti	RL+EFS	6h	232,2 $\mu$	N/R	N/R	3
19 Oct	Cavalla 8	Blastocisti	RL+EFS	24h	1083,6 $\mu$	24,8°C	11,2°C	131
23 Oct	Cavalla 11	Blastocisti	RL+EFS	24h	232,2 $\mu$	19,6°C	10,4°C	1
24 Oct	Cavalla 12	Blastocisti	RL+EFS	24h	1032 $\mu$	N/R	N/R	40
24 Oct	Cavalla 13	Blastocisti	RL+EFS	24h	1186,8 $\mu$	N/R	N/R	43
27 Oct	Cavalla 9	EB	RL+EFS	6h	129 $\mu$	23,0°C	16,8°C	15
3 Nov	Cavalla 15	Blastocisti	RL+RL	6h	1290 $\mu$	20,5°C	16,8°C	95



3 Nov	Cavalla 16	Blastocisti	RL+RL	6h	1161 $\mu$	20,5°C	16,8°C	0
4 Nov	Cavalla 3	Blastocisti	RL+RL	6h	1032 $\mu$	20,3°C	14,8°C	1
6 Nov	Cavalla 17	Blastocisti	RL+RL	6h	1419 $\mu$	22,7°C	19,8°C	8
7 Nov	Cavalla 1	Blastocisti	RL+RL	6h	464,4 $\mu$	21,9°C	16,4°C	26
8 Nov	Cavalla 11	Blastocisti	RL+RL	6h	825,6 $\mu$	22,2°C	13,8°C	33
17 Nov	Cavalla 10	EB	RL+EFS	6h	670,8 $\mu$	20,1°C	14,9°C	1
17 Nov	Cavalla 5	Blastocisti	RL+EFS	6h	1702,8 $\mu$	20,1°C	14,9°C	2
18 Nov	Cavalla 3	Blastocisti	RL+RL	6h	825,6 $\mu$	19,5°C	12,1°C	0

Utilizzando la formula espressa in precedenza è stata elaborata una ulteriore tabella che riporta i dati sui diametri, cellule totali, cellule morte e rapporto cellule morte/totale stimato.

Gruppo di trattamento	Diametro ( $\mu$ )	Cellule totali (n)	Cellule morte (n)	Cellule morte (%)
EHS24	608,9 $\pm$ 435,4	6412,9 $\pm$ 8029,0	56,8 $\pm$ 108,3	0,58 $\pm$ 0,46
EFS6	842,8 $\pm$ 614,4	12219,6 $\pm$ 14366,8	2,2 $\pm$ 1,2	0,11 $\pm$ 0,17
EFS24	877,2 $\pm$ 433,3	11075,4 $\pm$ 7063,8	53,8 $\pm$ 54,9	0,41 $\pm$ 0,34
RL6	1002,5 $\pm$ 507,6	13297,9 $\pm$ 7290,5	23,3 $\pm$ 34,3	0,26 $\pm$ 0,35

Non sono state osservate differenze proporzionalmente significative tra il diametro embrionale ed il trattamento con diversi media.

Il mantenimento di embrioni di buona qualità al giorno 8 per 24h in EmCare Flushing Solution o per 6h in Ringer Lattato, confrontato con la refrigerazione in EmCare Holding Solution per 24h, non ha provocato un aumento della proporzione di cellule morte.

## ***Discussioni e conclusioni***

Nella specie equina la preservazione degli embrioni con l'ausilio delle basse temperature è di grande diffusione. La refrigerazione è la tecnica più efficace (Carnevale et al 1987; Sertich et al, 1988; Carney et al,1991; Moussa et al, 2003); permette di trasportare l'embrione equino in strutture specializzate mantenendone la vitalità, solitamente per un arco di tempo dalle 6 alle 24h, quando non si hanno a disposizione cavalle riceventi. I primi studi sul trasferimento degli embrioni, mantenendo la vitalità degli stessi per 6-24 ore, sono iniziati tempo fa: Oguri e Tsutsumi (1974), Allen e Rowson (1975) e Douglas (1980) sono stati gli studiosi che per primi hanno fatto ricerca in questo campo (Rubio, 2001).

Negli ultimi anni l'embryo transfer nel cavallo ha avuto notevole diffusione, ma continua a risentire negativamente della difficoltà tecnica di conservare l'embrione equino (Moussa et al, 2002). Quest'ultimo, infatti, è molto sensibile allo shock da congelamento specialmente al superamento del diametro di 300µm, dimensioni che sono raggiunte, generalmente, 7 giorni dopo l'ovulazione (Squires e Seidel, 1996). La soluzione, rappresentata dalla ricerca dell'embrione al giorno 6, quando le sue dimensioni sono <300 , non è facilmente praticabile, in quanto al giorno 6 la percentuale di recupero è ridotta, specialmente nelle cavalle anziane o in quelle inseminate dopo l'ovulazione (generalmente con seme congelato).

Questo limite tecnico, riduce fortemente le possibilità applicative dell'ET alla riproduzione equina; la conservazione degli embrioni ed il loro trasferimento in un tempo successivo, infatti, offrirebbe numerosi vantaggi, tra i quali: la riduzione dei rischi sanitari sugli animali; la possibilità di gestire le donatrici nello stesso luogo dove risiedono, senza doverle trasportare al centro dove sono mantenute le riceventi; la riduzione del costo dell' Embryo transfer; la riduzione del numero di riceventi da mantenere; la possibilità di effettuare un commercio internazionale degli embrioni con incremento del ritmo del miglioramento genetico.

Alcuni di questi vantaggi, specialmente quello di non dover trasportare le donatrici, possono essere perseguiti con la semplice refrigerazione dell'embrione.

Gli embrioni equini, siano essi destinati ad essere trasferiti direttamente o dopo refrigerazione, vengono comunque recuperati 7-8 giorni dopo l'ovulazione della

donatrice (Fleury e Alverenga, 1999). Inseminando le cavalle con seme fresco, sono stati riportati tassi di recupero degli embrioni di 8 giorni pari al 74,4% (Squires e Seidel, 1995), 58% (Fleury e Alverenga, 1999), 62% (Eldrige-Panuska et al., 2005); i tassi di recupero al 7° giorno dopo l'ovulazione sono risultati molto simili (65%, Riera e Stout, 2009). Nella maggior parte dei casi, l'embrione di 8 giorni è visualizzabile ad occhio nudo.

La percentuale di recupero ottenuta in questa tesi, 51%, si colloca nella media di quanto riportato in letteratura.

Sono stati descritti protocolli per la refrigerazione e il trasporto dell'embrione equino: la blastocisti, una volta recuperata, viene posta in un liquido di coltura più o meno complesso, quali Ham's F10, Vigro Holding Plus o EmCare Holding Solution, refrigerata in Equitainer e spedita per il trasferimento in un centro di raccolta delle riceventi (Moussa et al., 2003). Il ricorso a questi protocolli trova difficoltà ad entrare nella pratica quotidiana perché implica la disponibilità di un microscopio stereoscopico e una certa dimestichezza con la ricerca e manipolazione degli embrioni.

Nello studio di Moussa e colleghi, nel 2004 sono stati valutati embrioni equini con DAPI conservati a 5°C in EHS 6h, EHS 24h, Ham F-10 24h, ViGro 24h e un controllo 0h valutato subito dopo la raccolta. E' stato osservato che il numero di cellule morte non ha mostrato differenze sostanziali tra gruppi 24h in diversi media. I risultati coincidono con il nostro studio in riferimento all'EHS.

Da parte di Panzani e colleghi, nel 2011 è stato eseguito uno studio per la valutazione di una tecnica semplificata di refrigerazione breve (6-8h) dell'embrione equino. Dopo il recupero, il prodotto del concepimento è stato mantenuto nel filtro della sonda da lavaggio uterino, ed è stato sostituito il liquido di lavaggio con EFS. Il filtro è stato poi sigillato e posto in Equitainer per 6-8h. Dopo trasferimento di embrioni, la percentuale di gravidanza, degli embrioni refrigerati, a 14 giorni e 25 giorni (72,7%), è stata sovrapponibile ad embrioni freschi usati come controllo; entrambe le percentuali sono state analoghe anche a quanto riportato in letteratura (Panzani et al, 2009).

L'obiettivo del presente studio è stato quello di comparare il numero di cellule morte embrionali dopo 6 e/o 24h di refrigerazione in 3 differenti media: EmCare Holding Solution® (ICPbio Reproduction, USA); Emcare Flushing Solution® (ICPbio Reproduction, USA); Ringer Lattato.

Nella nostra ricerca è stato dimostrato in vitro che lo stoccaggio di embrioni di cavallo, al giorno 8 e di buona qualità, per 24h in EFS o per 6h in RL, non ha provocato un aumento della proporzione di cellule morte confrontate con la refrigerazione in EHS per 24h; quindi viene ventilata la possibilità di mantenere l'embrione direttamente nello stesso medium di lavaggio per 6h (Ringer Lattato), usandolo per il trasporto, semplificando ancora la procedura per colleghi che non abbiano a disposizione gli strumenti, o le cavalle riceventi, per approntare un Embryo Transfer.

Nel nostro studio in vitro non si sono mostrati importanti danni cellulari, sarebbe un interessante spunto di ricerca ottenerne la conferma in vivo. Questo permetterebbe ai colleghi di spedire l'embrione in centri di riferimento direttamente dentro al medesimo filtro usato per il flushing, insieme al Ringer Lattato usato come medium. In questo modo si semplificherebbero notevolmente tutte le procedure di trattamento degli embrioni prima di un loro trasporto. Nel nostro studio con il DAPI, sono state valutate le cellule morte, sarebbe anche interessante studiare l'embrione refrigerato con l'ausilio di altre colorazioni, ad esempio per visualizzare il citoplasma (agglutinina di germe di grano), il citoscheletro (come il colorante Alexa Fluor 488-phalloidin) oppure i nuclei (Hoechst). Questo potrebbe dare informazioni ancor più dettagliate sulla vitalità embrionale dopo refrigerazione nelle condizioni sperimentate.

## BIBLIOGRAFIA

Aguilar J, Woods GL. Embryo transfer in horses: indications, technique, and expected outcomes. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1997; 208-213.

Allen WR, Stewart F, Trounson AO, Tischner M, Bielanski W. Viability of horse embryos after storage and long- distance transport in the rabbit. *J Reprod Fertil* 1976;47: 387–90.

Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN. Laparoscopic application of PGE2 to re-establish oviducal patency and fertility in infertile mares: a preliminary study. *Equine Vet J* 2006; 38:454–9.

Amann RP e Pickett BW. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. 1987 *Journal of Equine Veterinary Science*, 7:145-173.

Bass LD, Denniston DJ, Maclellan LJ, McCue PM, Seidel GE Jr, Squires EL,: Methanol as a cryoprptectant for equine embryos. *Theriogenology* 2004 62 1153-1159.

Battut I, Grandchamp des Raux A, Nicaise JL, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF. When do equine embryos enter the uterine cavity? An attempt to answer. In: Katila T, Wade JF (eds) *Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 3. Newmarket: R&W Publications, 2001; pp. 66–8.

Betteridge KJ. Comparative aspects of equine embryonic development. *Anim Reprod Sci* 2000;60–61:691– 702.

Betteridge KJ. Equine embryology: an inventory of unanswered questions. *Theriogenology* 2007;68 Suppl 1: S9–21.

Bezard J, Magistrini M, Duchamp G, Palmer E. Chronology of equine fertilization and embryonic development in vivo and in vitro. *Equine Vet J Suppl* 1989;8:105–10.

Bielanski A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology* 2007;68:1–22.

Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 1997;56:1088-96.

Bruyas J-F, Bezard J, Lagneaux D, Palmer E. Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after cryopreservation: differential effects on ICM and trophoblast cells. *J Reprod Fertil* 1993;99:15–23.

Bruyas J-F, Sanson J-P, Battut I, Fieni F, Tainturier D. Effect of sucrose in diluting glycerol or ethylene glycol after thawing of frozen day 6.25 horse embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;56:549–60.

Bruyas J.F, Marchand P, Fieni F., Taintourier D. The inability of DMSO to effectively cryoprotect day 6,5 horse embryos. *Theriogenology* 43,387 1993.

Bruyas JF, Battut I, Pol JM, Botrel C, Fieni F, Tainturier D,: Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after treatment with four cryoprotectants: differential effects on inner cell mass and trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 1995 Monograph Series 1, 329-339.

Carnevale EM, Eldridge-Panuska WD, Caracciolo di Brienza V. How to collect and vitrify equine embryo for direct transfer? In: Proceedings of the 50th Annual Con- vention of the American Association of Equine Practitioners, Denver. International Veterinary Information Service, 2004.

Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology* 2000;54:965–79.

Carnevale EM, Squires EL, McKinnon AO: Comparison of Ham's F10 with CO<sub>2</sub> or HEPES buffer for storage of equine embryos at 5°C for 24 H. *J Anim Sci* 65:1775-1781, 1987.

Carnevale EM. Vitrification of equine embryos. *Vet Clin N Am Equine* 2006;22:831–41.

Carney NJ, Squires EL, Cook VM, et al: Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology* 36:23-32, 1991.

Chaves MG, Gonzalez EP, de Abreu Rosas C, Agüero A. Cryopreservation of equine embryos by two vitrification methods. *Theriogenology* 1997;47:388.

Clark KE, Squires EL, McKinnon AO, Seidel GE Jr. Viability of stored equine embryos. *J Anim Sci* 1987;65:534–42.

Colchen S, Battut I, Fieni F, Tainturier D, Siliart S, Bruyas J-F. Quantitative histological analysis of equine at exactly 156 and 168h after ovulation. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;56:527–37.

Cook VM, Squires EL, McKinnon AO, Bailey J, Long PL. Pregnancy rates of cooled transported equine embryos. *Equine Vet J* 1989;8(Suppl):80–1.

Czlonkowska M, Boyle MS & Allen WR Deep freezing of horse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 1985 75 485–490.

Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 2002;57:285–302.

Douglas RH. Some aspects of equine embryo transfer. *J Reprod Fertil* 1982;32(Suppl):405–8.

Duchamp G, Allard A, Grizelj J, Plotto A, Bruneau B, Mermillod P, Meriaux JC, Bruyas J-F, Vidament M. Effect of conditions of incorporation and concentration of cryoprotectants on equine embryo viability after freezing. *Anim Reprod Sci* 2006;94:374–7.

Eldridge-Panuska WD, Caracciolo di Brienza V, Seidel GE Jr, et al. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology* 2005;63:1308–19.

Enders AC, Schlafke S, Lantz KC, Liu KM. Endoderm cells of the equine yolk sac from Day 7 until formation of the definitive yolk sac placenta. *Equine Vet J Suppl* 1993;15:3–9.

- Fahning, M. L., R. H. Schtdtz and E. F. Graham. 1966. A technique for the collection of uterine fluids from the live cow. *Vet. Res.* 79:230.
- Fleury JJ, Fleury PDC, Landim-Alvarenga FC. Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes buffer at a temperature of 15±18 8CDpreliminary results. *Theriogenology* 2002.
- Flood PF, Betteridge KJ, Diocee MS. Transmission electron microscopy of horse embryos, 3–16 days after ovulation. *J Reprod Fertil Suppl* 1992;32:319–27.
- Freeman DA, Woods GL, Vanderwall DK, Weber JA. Embryo-initiated oviductal transport in mares. *J Reprod Fert- til* 1992;75:535–8.
- Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G, Duchamp G, Daels P, Lazzari G. Frozen-thawed embryos produced by Ovum Pick Up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology* 2002;58:705–8.
- Griffin JL, Castleberry RS, Schneider HS. Influence of day collection on recovery rate in mature cycling mares. *Theriogenology* 1981;15:106 (abstract).
- Grøndahl C, Grøndahl Nielsen C, Eriksen T, Greve T, Hyttel P. In vivo fertilization and initial embryogenesis in the mare. *Equine Vet J Suppl* 1993;15:79–83.
- K. Hinrichs, Y.H. Choi, B.E. Walckenaer, D.D. Varner, D.L. Hartman. In vitro-produced equine embryos: Production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. *Theriogenology* 68 (2007) 521–529
- Hochi S, Fujimoto T, Braun J, Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994a;42:483–8.
- Hochi S, Maruyama K, Oguri N. Direct transfer of equine blastocyst frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. *Theriogenology* 1993 46, 1217-1224.
- Hochi S, Ogasawara M, Braun J, Oguri N: Influence of relative embryonic volumes during glycerol equilibration on the survival of frozen thawed equine



blastocysts. *J.Reprod. Dev.* 1994.

Hochi S. Current status of IVM/IVF/IVC Technology and Embryo preservation in the equine species. *J.Mamm.Ova Res.* 1998 vol 15.

Hudson J, McCue PM, Carnevale EM, et al. The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. *J Equine Vet Sci* 2006;26:51–4.

Hudson J., Hudson B., Bailey J., Williams S., Seagle C., Meredith T. : Vitrification of Equine Embryos: Effect of polyvinyl alcohol (PVA) in vitrification of equine embryos. 2008.

Huhtinen M, Bredbacka P, Kotilainen T. Nonsurgical transfer of 4',6-diamidin-2-fenilindole stained equine demi-embryos treated with cytocholasin B and nocodazole. *Biol. Reprod. Monograph Ser. 1* 1995: 325-8

Imel KJ, Squires EL, Elsdon RP, Shideler RK. Collection and transfer of equine embryos. *J Am Vet Med Assoc* 1981;179: 987–91.

J-F. Bruyas , J. Bezard, D. Lagneaux and E. Palmer. Quantitative analysis of morphological modifications of day 6,5 horse embryos after cryopreservation: differential effects on inner cell mass and trophoblast cells *Journal of reproduction and fertility* 1993. 99 15-23.

Lascombes FA, Pashen RL. Results from embryo freezing and postovulation breeding in commercial embryo transfer programme. In: Katila T, Wade J (eds) Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 3. R & W Publications, 2001; pp. 95–6.

Legrand E, Bencharif D, Battut I, Taintureir D, Bruyas J-F. The effect of glycerol 1M on frozen horse embryos; localization of damaged cells. In: Proceedings of the 15th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, Lyon, 1999; pp. 182–3 (abstract).

- Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker M J,: Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.* 2002
- Matsukawa K, Takahashi S, Adachi N, Akagi S, Hanada A. Effect of activation treatment for equine oocytes after ICSI and subsequent embryo's freezability. *Theriogenology* 2003;59:454 (abstract).
- McCue PM, Scoggin CF, Meira C, Squires EL. Pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 hours in Ham's F-10 vs Emcare<sup>TM</sup> embryo holding solution. *Proceedings Society for Theriogenology* 2000:147 (abst).
- McKinnon AO, Squires EL. Morphologic assessment of the equine embryo. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:401-6.
- McKinnon et al. 2011, Equine Reproduction pagg 2888-9
- Meira C, Alvarenga M.A, Papa F.O: Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediolo as cryoprotectans. *Equine Vet J. Suppl.* 1993.
- Merton S. Overall bovine embryo transfer activity in Europe. In: Proceedings of the 23rd Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Alghero, 7-8 September, 2007; pp. 71-72.
- Michael T. Zavy, Fuller W. Bazer and Dan C. Sharp A Non-Surgical Technique for the Collection of Uterine Fluid from the Mare *J ANIM SCI* 1978, 47:672-676.
- Mohr LR, Trounson AO. Comparative ultrastructure of hatched human, mouse and bovine blastocysts. *J Reprod Fertil* 1981;66:499-504.
- Moussa M, Bersinger I, Doligez P, Guignot F, Duchamp G, Vidament M, Mermillod P, Bruyas J-F,: In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 2005 64, 1619-1632.
- Moussa M, Duchamp G, Mahla R, Bruyas J-F, Daels PF. Effect of embryo age on the viability of equine embryos after cooled storage using two transport systems. *Journal of Equine Veterinary Science* Volume 26, Issue 11 , Pages 529-534, November 2006.
- Moussa M, Duchamp G, Mahla R, Bruyas J-F, Daels PF. In vitro and in vivo comparison of Ham's F-10, Emcare holding solution and ViGro Holding Plus

for the cooled storage of equine embryos. *Theriogenology* 2003;59:1615–25.

Moussa M, Perreau C, Baril G, Duchamp G, Vidament M, Daels P, Bruyas J-F, Mermillod P. Comparison of cell proliferation index in equine and caprine embryos using a modified BrdU incorporation assay. *Theriogenology* 2005;64:1823–32.

Moussa M, Tremoleda JL, Duchamp G, Bruyas J-F, Colenbrander B, Bevers MM, Daels PF. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5° C. *Theriogenology* 2004;61:921–32.

Moussa M, Duchamp G, Bruyas J-F, Daels PF. Correlation between the number of cells and the diameter of equine embryos recovered on day 6,5 7 and 8. 20th Annual Meeting A.E.T.E. - Lyon, 2004

Mutter, L. R., Graden, A. P. & Olds, D. (1964) Successful non-surgical bovine embryo transfer. *A. I. Digest* 12, 3. *Anim. Breed. Abstr.* 33, 219.

Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE, Seidel GE Jr, Carnevale EM, Squires EL,,: Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology* 2001 55 607-613.

Oguri e Tsutsumi. Non surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *J.Reprod.Fert* 1972 31, 187-195.

Oguri e Tsutsumi. Non-surgical egg transfer in mares. *J.Reprod.Fert* 1974 41, 313-320.

Panzani D., Crisci A., Rota A., Camillo F. Effect of day of transfer and treatment administration on the recipient on pregnancy rates after equine embryo transfer. 2009 *Veterinary research communications*.

Panzani D., Restepo A. E, Rota A., Camillo F. Protocollo semplificato di refrigerazione per 6-8 ore di embrioni equini. *Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians*, Montesilvano, Italy 2011.

Pfaff R, Seidel GE, Squires EL, Jasko DJ. Permeability of equine blastocysts to ethylene glycol and glycerol. *Theriogenology* 1993;39:284 (abstract).

Pierre Poitras. Patrick Guay, Denis Vaillancourt, Nedjma Zidane and Michel

- Bigras-Poulin. In vitro Viability of Cryopreserved Equine Embryos Following Different Freezing Protocols. *Can J Vet Res* 1994; 58: 235-241
- Polge e Day, Pregnancy following non-surgical egg transfer in pigs. *Vet. Rec.* 82, 712.
- Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987;24:387– 402.
- K. Roels, I. Lemahieu, S. Piepers, H. Vandaele, A. Van Soom, P.F. Daels. Effect of morphologic characteristics of embryos on pregnancy outcome after transfer. 2014 *Journal of Equine Veterinary Science* 34 180.
- Rowson, L, Moor, R. M. & Lawson, R. A. S. Fertility following egg transfer in the cow; effect of methods, medium and synchronization of oestrus. *J. Reprod. Fert.*1969 18, 517.
- Rowson, L. E. A. & Dowling, D. F. An apparatus for the extraction of fertilized eggs from the living cow. 1949 *Vet. Rec.* 61, 191.
- Rowson, L. E. A. & Moor, R. M. Non-surgical transfer of cow eggs. *J. Reprod. Fert*1966. 11, 311.
- Scott, A. M. A single acid gel for the separation of albumins and transferrins in horses. *Anim. Blood Groups & Biochem. Genet.* 1970 1, 253.
- Sertich PL. Transcervical embryo transfer in performance mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1989 Oct 1; 195(7) 940-944.
- Simpson, D.J., Greenwood, R.E.S., Ricketts, S.W., Rosedale, P.D., Sanderson, M. and Allen, W.R. (1982) Use of ultrasound echography for early diagnosis of single and twin pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 32, 431-439.
- Slade NP, Williams TJ, Squires EL, Seidel GE Jr. Production of identical twin pregnancies by microsurgical bisection of equine embryos. In: 10<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1984;11:241.
- Squires EL, Seidel GE Jr. Collection and Transfer of Equine Embryos. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin* No. 08. Fort Collins, CO:

Colorado State University, 1995.

Squires EL, Imel KJ, Iuliano MF, Shideler RK. Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer program. *J Reprod Fertil* 1982;32(Suppl):409–14.

Squires EL, McCue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 1999; 51:91-104. – PubMed.

Squires EL, Carnevale E.M, McCue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 59 (2003).

Sugie, T. Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *J. Reprod. Fert.* 1965 10, 197

Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TAE. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. *Reproduction* 2005;129:789–98.

G.A.Thouas, N.A.Korfiatis, A.J.French, G.M.Jones, A.O.Trounson. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* 2001 / 149 Vol 3. No 1. 25–29.

Thibier M. New records in the number of both in vivo- derived and in vitro- produced bovine embryos around the world in 2006. *IETS Newsletter* 2007;25:15–20.

Tom A.E. Stout. Cryopreservation of equine embryos: current state-of-the-art. *Reprod Domest Anim.* 2012 Jun;47 Suppl 3:84-9

Vanderwall D.K. Current equine embryo transfer techniques. *Recent Advances in Equine Theriogenology* 2000. *Ivis.org*

Vatja G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H: Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 1998 51 53-58.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. 2000 *Animal Reproduction Science*, 60-61: 481-492.

Watanabe, Y. & Noda, H. Preparation of equine blood typing reagents. *Jap. J. zootech. Sci.* 1970 41, 649.

Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. *Biol Reprod* 1991;45:544–6.

Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos *Biol Reprod* 1991;45:540–3.

Weber JA, Woods GL, Lichtenwalner AB. Relaxatory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. *Biol Reprod Mono* 1995;1:125–30.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to –196° C and –269° C. *Science* 1972;178:411–14.

Willadsen SM. Micromanipulation of embryos of the large domestic species. In: Adams CE, ed. *Mammalian Egg Transfer*. BocaRaton, Florida: CRC PressInc.,1982:185-210.

Wilmot I, Rowson LEA. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973;92:686–90.

Wilsher S. e Allen W.R. An improved method for nonsurgical embryo transfer in the mare. *Equine Vet. Educ.* 2004 16. (39-44).

Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 1982;32:399–403.