UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
SOCIETÀ ITALIANA DELLE SCIENZE VETERINARIE
C.N.R.: PROGETTO FINALIZZATO I.P.R.A.
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA
REGIONE LOMBARDIA: ASSESSORATO SANITÀ E IGIENE ED ASSESSORATO AGRICOLTURA E FORESTE

ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA SU:

EMBRYO TRANSFER OGGI:

Problemi biologici e tecnici aperti e prospettive

MILANO - 4 MAGGIO 1984

18

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA SU:

EMBRYO TRANSFER OGGI:

Problemi biologici e tecnici aperti e prospettive

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1979 - Infezioni Respiratorie del Bovino

1980 - L'oggi e il domani della Sulfamidoterapia Veterinaria

1980 - Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria

1980 - Gli antibiotici nella pratica veterinaria

1981 - La Leucosi Bovina Enzootica

1981 - La «Scuola per la ricerca Scientifica» di Brescia

1982 - Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale

1982 - Le Elmintiasi nell'allevamento intensivo del Bovino

1983 - Zoonosi ed Animali da compagnia

1983 - Le infezioni da «Escherichia coli» degli animali

1983 - Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria

1985 - 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale

1984 - Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo

1984 - 1° Simposio internazionale di medicina veterinaria sul cavallo da competizione

1985 - La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino

1986 - Immunologia comparata della malattia neoplastica

1986 - 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO

SOCIETÀ ITALIANA
DELLE SCIENZE VETERINARIE

C.N.R.:
PROGETTO FINALIZZATO I.P.R.A.

FONDAZIONE
INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

REGIONE LOMBARDIA:
ASSESSORATO SANITÀ E IGIENE
ED ASSESSORATO
AGRICOLTURA E FORESTE

SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA

Brescia - Via Bianchi, 7

ATTI DELLA TAVOLA ROTONDA SU:
EMBRYO TRANSFER OGGI:
Problemi Biologici e Tecnici
Aperti e Prospettive

MILANO: 4 MAGGIO 1984

Edito a cura della
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

© Copyright Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia - Aprile 1987

Stampa: La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia

Questa Tavola Rotonda avrebbe dovuto essere presieduta dal Prof. Giuseppe Aureli, Direttore dell'Istituto di Anatomia degli Animali Domestici con Istologia ed Embriologia e Preside della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Milano.

Egli aveva ideato ed organizzato questa riunione nell'intento di fare il punto, attraverso il confronto di esperienze diverse ed altamente qualificate a livello internazionale, sui problemi legati al trasferimento embrionale che ancora necessitano di approfondimento.

Con questa iniziativa il Prof. Aureli si prefiggeva il triplice obbiettivo di trarre dalle esperienze provenienti dalla ricerca condotta negli ultimi anni utili indicazioni per chi opera in campo pratico, di evidenziare le prospettive che si aprono nell'ambito delle emergenti biotecnologie della riproduzione ed infine di individuare e puntualizzare i temi sui quali è indispensabile indirizzare gli sforzi della futura ricerca di base.

Purtroppo Egli non ha potuto vedere raggiunto il Suo scopo.

Superare commozione e profondo rimpianto per la Sua improvvisa, prematura scomparsa è per noi un affettuoso tributo alle Sue opere ed al Suo impegno. È un dovere che ci viene imposto dai Suoi stessi insegnamenti ed al quale non vogliamo sottrarci.

INDICE

pag.

A. Lauria
La risposta dell'ovaio di bovino alla sovrastimolazione farmacologica 9

G. Siracusa
Lo sviluppo *in vivo* e in *vitro* dell'embrione preimpianto di mammifero 25

J.P. Renard
La conservazione degli embrioni di mammiferi 49

R.M. Moor
Il ruolo dell'Embryo Transfer nell'ambito delle nuove biotecnologie della riproduzione 73

C. Polge
Considerazioni conclusive 93

INTERVENTI PREORDINATI

G. Bono, A. Comin, L. Silvestrelli, V. De Pollo, R. Oberosler, A. Gusperti
Secrezione di progesterone in bovine sottoposte a trapianto embrionale 99

V. Beghelli, C. Boiti, E. Parmigiani, S. Soana, S. Zanichelli, S. Barbacini
Studio preliminare su profili ormonali e momento di ovulazione in bovine superovulate con FSH 103

E. Parmigiani, S. Soana, S. Barbacini, S. Zanichelli
Osservazioni sull'uso della PGF2α dopo estrazione embrionale in bovine superovulate 115

A. LAURIA *

LA RISPOSTA DELL'OVAIO DI BOVINO ALLA SOVRASTIMOLAZIONE FARMACOLOGICA **

Gli studi fatti in questi ultimi anni sulla biologia della riproduzione, sostenuti e incoraggiati da progetti di ricerca di ampio respiro in tutti i Paesi del mondo compreso il nostro, hanno fatto tali e tanti progressi da intaccare diverse convinzioni e da sconvolgere molte ipotesi, chiudendone alcune vecchie e aprendone molte nuove. Tali progressi hanno soprattutto fornito nuovi mezzi al medico e al veterinario, che operano nel campo della salute dell'uomo da un lato e della produzione animale dall'altro, aprendo nel contempo vie di intervento fino a pochi anni fa impensabili.

La messe di notizie raccolte ha contribuito a chiarire alcuni dei fenomeni, ancora per certi aspetti sconosciuti, che regolano alla base i processi riproduttivi.

L'embryo transfer è uno di questi mezzi.

Esso è oggi senz'altro una realtà non soltanto in campo zootecnico, dove è subito stata colta la sua grande importanza pratico applicativa legata alla possibilità di accelerare la propagazione di materiale genetico utile ai fini della produzione di derrate di origine animale; è una realtà anche nell'ambito della ginecologia umana e, ovviamente, della ricerca di base. Soprattutto alla ricerca questo metodo riproduttivo così complesso, ma anche così efficace nel fornire utili modelli sperimentali, ha aperto le porte verso più ampi orizzonti. D'altra parte l'embryo transfer è anche capace di fornire risultati che possono venire subito trasferiti in campo pratico applicativo con una «cascata» di conseguenze che, a medio e lungo termine, possono addirittura coinvolgere l'ecosistema.

* Istituto di Anatomia degli Animali Domestici con Istologia ed Embriologia dell'Università degli Studi di Milano. Via Celoria, 10 - 20133 Milano.

** Lavoro eseguito con contributo C.N.R. nell'ambito del P.F. I.P.R.A. Subprogetto n. 1 pubblicazione n. 1033.

Se da un lato il trasferimento degli embrioni, come sopra detto, è una realtà, dall'altro esso presenta ancora alcuni problemi tecnici e biologici aperti che necessitano di approfondita ricerca (Mapletoft 1982; Aureli et al. 1983).

Uno di questi problemi è rappresentato dalla possibilità di indurre nell'ovaio di una femmina normalmente monovulante e appartenente a specie con ritmi riproduttivi lenti, la maturazione contemporanea di più follicoli al fine di ottenere il maggior numero possibile di uova fecondabili e successivamente di embrioni trasferibili. È questa una premessa che appare indispensabile per l'applicazione dell'embryo transfer nell'allevamento bovino, dove la selezione genetica è condizionata dai lunghi periodi di interparto e i problemi di ordine economico svolgono un ruolo di primaria importanza. Non va dimenticato a questo proposito che l'applicazione di questo metodo non implica soltanto il costo diretto dell'intervento, ma coinvolge tutte le struttudell'azienda che si trova impegnata in un complesso programma di selezione.

Appare evidente che per ottenere una corretta e ripetibile superovulazione che da un lato salvaguardi le strutture ovariche da danni irreversibili (la donatrice è sempre un animale di pregio) e dall'altro dia risultati finali soddisfacenti in termini di numero di embrioni vitali, è necessario possedere approfondite conoscenze sui processi che regolano l'attivazione e il progredire della maturazione follicolare.

Partendo dagli studi condotti su base istologica da Rajakowski (1960), una messe di ricerche è stata svolta sulla follicologenesi anche nella specie bovina, senza peraltro che si sia ancora addivenuti ad una interpretazione univoca dei fenomeni che la regolano.

In condizioni fisiologiche, nella bovina normalmente ciclante è stata ormai da tempo accertata la presenza di molte migliaia di follicoli primari (Pineda e Bowen 1980). A periodi fissi un certo numero di questi inizia il suo accrescimento. Nell'ovaio della bovina è sempre possibile identificare macroscopicamente un elevato numero di follicoli che possono venire convenzionalmente suddivisi in piccoli ($<$2mm), medi (3-6mm) e grandi ($>$7mm). È stato dimostrato anche che i follicoli di media grandezza sono i più numerosi fra la nona e la tredicesima giornata del ciclo (Matton et al. 1981; Moor et al. 1984).

Malgrado di norma un solo follicolo vada incontro all'ovulazione, ad ogni ciclo un certo numero di follicoli si mobilizza dalla riserva

e successivamente va incontro ad atresia. Si è potuto dimostrare che esiste durante il ciclo un turnover di follicoli di grandi dimensioni che si fa più accentuato verso la diciottesima giornata (Matton et al. 1981); il follicolo più attivo, destinato ad ovulare e che generalmente origina dalla classe dei follicoli medi, cresce rapidamente dopo la regressione del corpo luteo e, con la sua secrezione estrogenica, autostimola la propria crescita, inibisce lo sviluppo e la differenziazione di altri follicoli e provoca un abbassamento dei livelli delle gonadotropine.

In particolare il tasso di FSH circolante, che è pur sufficente per stimolare la crescita follicolare nella fase luteinica, diventerebbe così incapace di sostenere gli altri follicoli di grandi dimensioni che andranno pertanto incontro ad atresia (Moor et al. 1984). Ciò sembra essere confermato dal fatto che la somministrazione di gonadotropine esogene è in grado di provocare un aumento del numero delle ovulazioni.

È altrettanto vero però che molti sono ancora i dubbi su quali siano le classi follicolari disponibili a rispondere alla stimolazione (Moor et al. 1984) e attraverso quali intimi meccanismi ciò si verifichi.

Non ci è dato infatti ancora con certezza di sapere se l'intervento superovulatorio impedisca la regressione dei follicoli già spontaneamente mobilizzati, oppure sia in grado di attivarne dei nuovi dalla riserva; probabilmente tutti e due i fenomeni sono concomitanti, come sembra emergere dai risultati di recenti ricerche.

Da tutto ciò appare evidente come disponiamo ancora di troppo poco per poter abbattere la barriera che ostacola la prevedibilità degli effetti della superovulazione e che si concretizza in una elevata variabilità dei risultati. Non va sottovalutato il fatto che tale variabilità è frequentemente legata all'individuo, il quale per altro risponde in maniera simile (negativa o positiva) a trattamenti ripetuti (Monniaux et al. 1983; nostri dati non pubblicati).

È sorprendente peraltro che, malgrado attualmente tali meccanismi siano ancora poco noti, con semplici interventi farmacologici si possa giungere a quei risultati che hanno rappresentato la molla che ha fatto scattare l'interesse del mondo della produzione animale per le nuove tecnologie riproduttive, delle quali l'embryo transfer rappresenta soltanto il primo passo.

D'altra parte la prova che il nostro intervento sia «maldestro», consiste nella sopra citata ancora elevatissima variabilità individuale

di risposta al trattamento, che rappresenta un notevole limite ai potenziali vantaggi del trasferimento embrionale (Lauria et al. 1982 a; Oliva et al. 1982; Aureli et al. 1983); Monniaux et al. 1984; Murphy et al. 1984).

Non è infatti corretto esprimere l'efficacia del metodo in termini di medie e di percentuali, dal momento che esso si prefigge di propagare e salvaguardare il patrimonio genetico di *quella* donatrice e non di altre.

Oltre a ciò c'è unanime consenso nel riconoscere che il successo della superovulazione dipende da vari fattori quali l'età, la razza, le condizioni ambientali e stagionali, lo stato fisiologico dell'animale, ecc. (Hasler et al. 1983; Monniaux 1983).

In realtà la vera causa delle profonde differenze nel risultato che otteniamo sta nel fatto che la nostra «manipolazione» degli eventi fisiologici della follicologenesi e della ovulazione, non solo disturba meccanismi delicati che, come già detto, sono a noi in gran parte sconosciuti, ma anche e soprattutto agisce su una popolazione di strutture ovariche che risulta eterogenea in quanto esse si trovano in momenti funzionali diversi.

Risultano così essenziali: a) la precisa caratterizzazione della donatrice; b) l'impiego di farmaci di cui siano ben note composizione ed attività biologica; c) la scelta ottimale dei tempi in cui operare.

I criteri di valutazione della donatrice sono ormai universalmente accettati: da tutto quanto abbiamo detto emerge chiaramente che il risultato di un intervento superovulatorio su una bovina con basso indice di fertilità, di età molto avanzata, in condizioni di salute non buone o con aborti o turbe ginecologiche nella sua precedente carriera è affidato solo al caso. L'uso di questi animali, salvo rare eccezioni, è pertanto sconsigliabile.

È anche opinione comune che il tipo di prodotto usato rappresenti un fattore molto importante, dal momento che l'azione delle gonadotropine esogene sulla mobilizzazione dei follicoli è strettamente correlata con il tempo di emivita delle componenti FSH ed LH (Lauria et al. 1982 a, b; Monniaux et al. 1983; Moor et al. 1984).

In passato la gonadotropina più comunemente usata per la superovulazione era rappresentata dal PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin). Tale prodotto, ancor oggi impiegato per il suo basso costo

e per la possibilità di effettuare il trattamento con un unica somministrazione, non è peraltro consigliabile a causa della sua lunga emivita (dovuta all'alto contenuto in ac. sialico), per l'elevata variabilità di composizione da lotto a lotto, per la difficoltà nel definire con precisione le due attività FSH e LH, ecc.

Tutto ciò si riflette in maniera negativa in termini sia di variabilità di risposta sia di salvaguardia delle strutture ovariche della donatrice, la quale può risentire per lungo tempo delle conseguenze del trattamento ritardando il ristabilirsi delle normali condizioni fisiologiche.

L'ipotesi più probante circa il meccanismo di azione del PMSG è che esso prevenga l'atresia dei follicoli di media taglia (Monniaux et al. 1984). Gli effetti negativi legati al prolungarsi dell'azione stimolatrice (secondo Schams et al. 1978, al momento dell'estro permane in circolo ancora metà della dose iniettata) portano alla formazione in settima-ottava giornata dopo l'estro di grossi follicoli secernenti estrogeni che, alterando il quadro endocrino, rendono ragione dell'elevato numero di embrioni degenerati.

A questi inconvenienti si è cercato di porre rimedio con l'uso di siero anti-PMSG che sembra aver dato risultati abbastanza soddisfacenti (Saumande et al. 1981, 1984).

Un sensibile progresso nella definizione dei metodi superovulatori è stato perseguito dagli studi che hanno identificato nell'HMG (Human Menopausal Gonadotropin-Serono) la migliore preparazione gonadotropinica attualmente disponibile in commercio. Molto purificata, a emivita breve, a contenuto noto e costante di FSH e LH (circa 1:1), essa è capace di indurre la superovulazione nella bovina in maniera efficace, relativamente poco variabile e con un indice molto basso di turbe persistenti a carico dell'ovaio (Lauria et al. 1982 b, 1983 b).

Attraverso una serie di studi si è potuto infatti dimostrare che l'HMG induce lo sviluppo di numerosi follicoli in maniera graduale talché esso è seguito da una elevata percentuale di ovulazioni, da un rapido incremento funzionale dell'attività luteinica, da una risposta più bilanciata delle secrezioni ovariche, da un rapido ristabilirsi dell'attività ciclica dell'ovaio.

Tutto ciò favorisce una diminuzione della variabilità di risposta e, di conseguenza, del rischio che il trattamento risulti inefficace. Un dato particolarmente interessante è rappresentato dal fatto che nell'HMG

l'emivita della frazione LH è di poco inferiore a quella della frazione FSH .Questo diminuirebbe gli effetti negativi della frazione LH e lascerebbe più spazio alla frazione FSH per agire. Gli svantaggi di questo prodotto, rappresentati dall'alto costo e da un numero non particolarmente elevato di embrioni prodotti, sono controbilanciati da indubbi vantaggi quali la maggiore probabilità di ottenere embrioni trasferibili e una bassa perturbazione della sfera riproduttiva della bovina donatrice, che dopo il trattamento ritorna spontaneamente in estro con pochi giorni di ritardo rispetto al ciclo normale (Lauria et al. 1982 b).

Risultati migliori in termini produttivi possono essere ottenuti utilizzando estratti ipofisari sui quali è stata condotta un'ampia serie di ricerche e di prove sperimentali. I prodotti più comunemente usati sono ottenuti dalla pecora (Foote e Onuma 1970) dal cavallo (Moore 1975; Danner et al. 1979; Danner e Oxender 1980) e dal suino (Hasler et al. 1983; Lauria et al. 1983).

Come sopra detto, questi estratti sono caratterizzati da un'emivita nettamente inferiore a quella del PMSG (5 ore per l'FSH di pecora, secondo Laster, 1972). Ne consegue, ovviamente, la necessità di effettuare somministrazioni frazionate, ripetute nel tempo, a dosaggio decrescente e distanziate di 12 ore l'una dall'altra per periodi che variano tra i 4 e i 5 giorni (Chupin e Procureur 1982, 1983; Garcia et al. 1982).

I risultati conseguiti con gonadotropine di origine pituitaria si sono dimostrati altrettanto efficaci del PMSG e certamente meno dannosi per la donatrice, talché essi rappresentano oggi il tipo di prodotto più comunemente usato.

Malgrado, secondo alcuni Autori, i migliori risultati superovulatori si siano ottenuti con estratti di origine equina o porcina contenenti FSH e LH in rapporto 5:1 (Nelson et al. 1979; Danner et al. 1979; Danner e Oxender 1980) non si è per molto tempo tenuto nel debito conto il ruolo della componente LH, sempre presente nell'estratto.

Nei prodotti attualmente in commercio e di maggiore uso è stato recentemente dimostrata la presenza di LH in quantità di molto superiore rispetto a quella dell'FSH (Monniaux et al. 1983; Lauria et al. 1984). Se a ciò si aggiunge il fatto che da un lotto all'altro, nell'ambito dello stesso prodotto, il rapporto fra le due componenti varia

sensibilmente, risulta spesso difficile effettuare una corretta valutazione dei risultati riportati dai vari Autori.

Partendo da tutti questi presupposti, una serie di studi è stata condotta negli ultimi anni al fine di mettere a punto e sperimentare un estratto ipofisario pocino che assomasse da un lato i vantaggi dell'alta purificazione, della costanza e dell'equilibrato rapporto FSH/LH tipici dell'HMG e dall'altro la maggior efficacia tipica degli estratti ipofisari.

Tale prodotto (realizzato in via sperimentale dalla Serono e denominato p-GN) si è rivelato particolarmente efficace dando risultati molto soddisfacenti con una risposta, sia in termini di ovulazioni che di embrioni vitali, nettamente superiore a quella generalmente ottenibile usando altre preparazioni gonadotropiniche (Lauria et al. 1983).

Del tutto recentemente, uno studio condotto sul tempo di emivita delle due componenti del p-GN ha rivelato che la frazione LH possiede, nella bovina, un tempo di dimezzamento particolarmente breve che appare significativamente più ridotto rispetto a quello della componente FSH della stessa preparazione (Lauria et al. dati non pubblicati).

Nella fig. 1 sono riportati in istogramma i risultati della superovulazione in una sperimentazione comparativa effettuata usando diversi tipi di gonadotropine: da questi emerge la conferma sperimentale di quanto sopra esposto.

I follicoli una volta stimolati possono avere diverso destino. Il caso ottimale è rappresentato dalla loro maturazione in quantità elevata, dalla loro deiscenza pressocché contemporanea e dalla formazione di normali corpi lutei. Un alto numero di ovociti può così raggiungere la tuba in condizioni pseudo normali, può venire fecondato e dar luogo ad altrettanti embrioni.

Ciò però in realtà non sempre succede. Quali sono i fattori di disturbo che possono intervenire ad alterare il risultato finale?

Alcuni di essi non dipendono dalla superovulazione. Prescindo qui, naturalmente, dai casi di malformazione gonadica o tubarica e da stati patologici che, essendo rilevabili clinicamente, devono comunque scoraggiare dall'assegnare ad una bovina il ruolo di donatrice.

Certamente la scelta non tempestiva del momento in cui effettuare la fecondazione o una sua cattiva esecuzione sono molto rischiosi: non sarà mai sconsigliata abbastanza la procedura di iniziare le fecon-

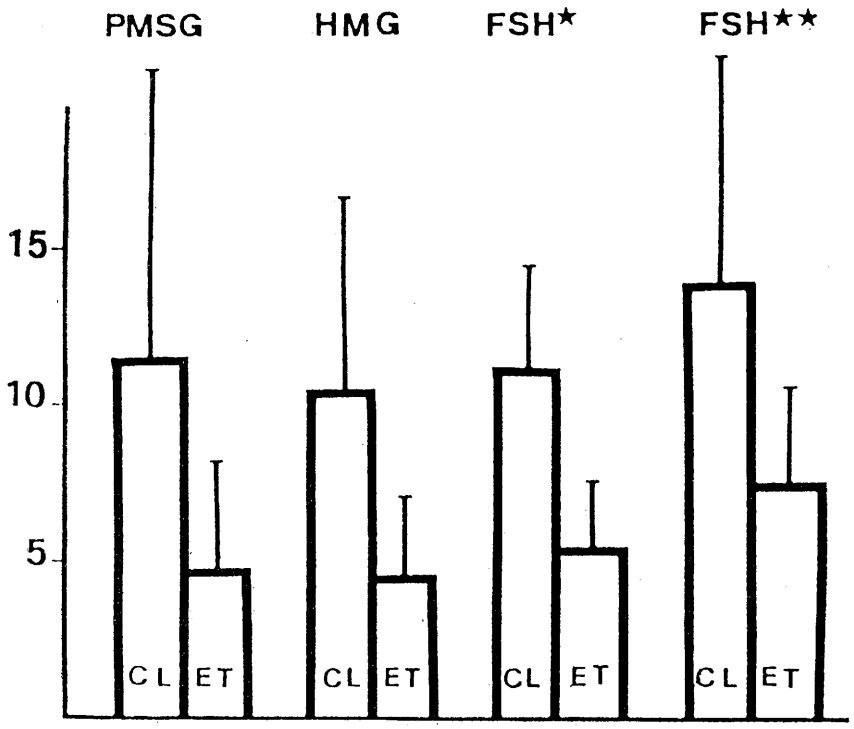


Fig. 1 - Differenze di risposta di bovine da latte alla superovulazione usando gonadotropine diverse.

CL = numero delle formazioni luteiniche accertate con palpazione transrettale (± D.S.)

ET = numero degli embrioni trasferibili ottenuti con flushing incruento (± D.S.)

PMSG = Folligon, Intervet

HMG = Pergonal, Serono

FSH* = FSH-P, Burns Biotech

FSH** = P-GN, Serono

dazioni alla cieca dopo un certo numero predeterminato di ore dal trattamento con prostaglandina. Esiste poi la possibilità che nell'ovaio sussistano fenomeni di «ipertecosi» cioè di ispessimenti anormali della superficie dell'organo che impediscono la deiscenza follicolare, o ammassi di residui luteali cicatriziali antecedenti che limitano lo spazio a uno o più follicoli in crescita. Ciò si verifica più spesso in bovine di età avanzata o vittime di patologie ovariche pregresse.

Nell'ambito della popolazione dei follicoli antrali che si formano in seguito ad una sovrastimolazione gonadotropinica, alcuni possono dar luogo a cisti follicolari o luteiniche. Non è dato di sapere se si tratta, in questi casi, di follicoli mobilizzati dalla riserva, o di follicoli già in fase maturativa e sottratti all'atresia dal sostegno dell'FSH esogeno somministrato.

In ogni caso queste formazioni immettono in circolo i loro prodotti di secrezione provocando stimolazioni anomale. Potranno venire anche negativamente influenzati i meccanismi che regolano l'attività delle vie genitali e la composizione del loro secreto che potrebbe risultare così compromissivo per gli ovociti o per gli embrioni nelle prime fasi di sviluppo. A questo proposito esistono dati sperimentali che dimostrano, tra l'altro, come alterati livelli di estrogeno provocano anomalie nello sviluppo della blastocisti precoce di pecora (Moor e Trounson 1977).

Inoltre, nostri dati non pubblicati confermano quanto già da tempo evidenziato da altri Autori che ascrivono sia a rapporti fortemente alterati dei livelli plasmatici degli ormoni steroidei (Booth et al. 1975) sia alla lunga permanenza nell'utero della donatrice (Newcomb 1982) la causa principale delle alte percentuali di embrioni disvitali che si riscontrano al momento della raccolta.

È un fatto che la presenza nell'ovaio superovulato di follicoli cistici è spesso associata a un numero elevato di morule che si arrestano nel loro sviluppo dopo le prime divisioni mitotiche e quindi vanno incontro a degenerazione precoce. In bovine superovulate con PMSG è stato infatti dimostrato come la somministrazione di siero antiPMSG, che riduce i follicoli cistici e abbassa il livello di estrogeni circolanti, migliora la percentuale di embrioni vitali (Boland et al. 1978).

Un altro fattore da non sottovalutare è rappresentato dall'azione negativa esercitata dall'eccesso di LH somministrato nel corso del trattamento.

Esistono dati sufficenti per ipotizzare che un elevato tasso di LH potrebbe indurre una precoce attivazione dell'ovocita agendo a livello nucleare e sbloccando la meiosi in tempi troppo lontani dell'ovulazione.

Sappiamo infatti che gli oociti sono bloccati nella profase della prima divisione meiotica da diversi fattori quali FSH ed estrogeni (Oxberry e Greenwald 1982), AMP ciclico (Eppig e Downs 1984), inibitori presenti nel liquido follicolare (O.M.I. oocyte maturation inhibitor) prodotti dalle cellule della granulosa (Tsafriri e Channing 1975; Tsafriri et al. 1976, 1977; Centola et al. 1981). Nella fase preovulatoria, inoltre, si ha la comparsa di recettori per l'LH nella granulosa, dalla cui azione, modulata da FSH ed estrogeni (McNatty et al. 1982; Staigmiller e England 1982) dipende la ripresa della maturazione meiotica in seguito ad un'attività contrastante esercitata sull'O.M.I. (Hillensjo et al. 1979; Moor et al. 1981).

Tutto ciò è in pieno accordo con quanto va emergendo dalla letteratura recente dove si riscontrano sempre più frequentemente prove sperimentali a sostegno del fatto che un alto livello di LH esercita un effetto negativo sul risultato finale della superovulazione (Lauria et al. 1982 a,b, 1983 a,b; Murphy et al. 1984; Chupin et al. 1984).

L'esame clinico transrettale effettuato in fase luteinica non sempre è in grado di fornire informazioni sufficenti sulla risposta ovarica al trattamento. L'esame ecografico o l'osservazione per mezzo della laparoscopia può certamente fornire maggiori informazioni, ma neppure con questi mezzi si è in grado di stabilire con certezza se le formazioni luteiniche presenti sono veri corpi lutei o follicoli luteinizzati (Monniaux et al. 1983; Aureli et al. 1983; Lauria et al. 1983 a).

Va a questo proposito tenuto conto del fatto che le strutture luteiniche che si formano possono appartenere a follicoli nei quali il processo di luteinizzazione inizia molto precocemente, talché è possibile identificarlo morfologicamente già in fase preovulatoria. Tale processo si manifesta con una precoce degenerazione dell'uovo e della granulosa accompagnato da fenomeni di luteinizzazione tecale che si instaurano in ampie aree distribuite a carta geografica sulla superficie del follicolo (fig. 2). Lo studio istoenzimologico dei territori luteinizzati dimostra come in essi sia presente una intensa attività steroidogenica (Lauria et al. 1983 a). Ciò potrebbe giustificare il fatto che alla palpazione transrettale il clinico apprezza la presenza di un certo nu-

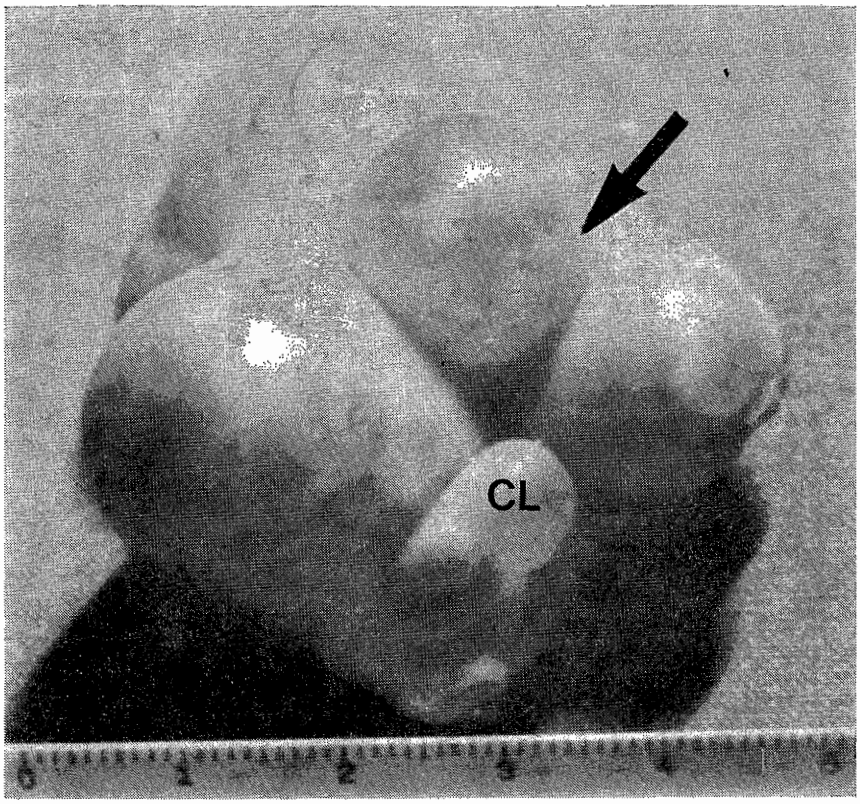


Fig. 2 - Ovaio di bovina superovulata prelevato poche ore prima della ovulazione. La freccia indica un follicolo con aree luteinizzate più chiare. C.L. = Corpo luteo del ciclo precedente.

mero di corpi lutei e poi, molto spesso, non riesce a raccogliere un numero corrispondente di embrioni, fatti salvi naturalmente i limiti tecnici imposti dal flushing uterino.

Da tutto quanto sopra emergono chiaramente una serie di indicazioni sia per il ricercatore, cui spetta il compito, peraltro non facile, di penetrare più in profondità l'istofisiologia ovarica e tubarica, sia per il clinico che affronta un intervento di superovulazione al quale spetta il compito di valutare correttamente l'insieme dei parametri che possono condizionare il successo finale dell'embryo transfer.

BIBLIOGRAFIA

1) Aureli G., Lauria A., Cremonesi F. (1983): Attualità e prospettive dell'embryo transfer. Atti Soc. Ital. Buiatria, XV, 179-196.
2) Boland M.P., Crosby T.F. Gordon I. (1978): Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. Theriogenology *10*, 175-180.
3) Booth W.D., Newcomb R., Strange H., Rowson L.E.A., Shacher H.B. (1975): Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. Vet. Rec. *97*, 366-369.
4) Cahill L.P., Dufour J. (1979): Follicular populations in the ewe under different gonadotrophin levels. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. *19*, 1475.
5) Centola G.M., Anderson L.D., Channing C.P. (1981): Oocyte maturation inhibition activity in porcine granulosa cells. Gamete Res. *4*, 451-462.
6) Chupin D., Combarnous V., Procureur R. (1984): Antagonistic effect of LH on FSH induced superovulation in cattle. Theriogenology *21*, 299.
7) Chupin D., Procureur R. (1982): Use of pituitary FSH to module superovulation in cattle: effects of injection regimen. Theriogenology *17*, 81.
8) Chupin D., Procureur R. (1983): Efficency of pituitary extracts (FSH) for induction of superovulation in cattle. Animal Reprod. Sci. *6*, 11-23.
9) Cowan B.D. (1982): The egg-embryo chamber for intrabdominal culture. Fertil. Steril. *38*, 616-620.

10) DANNER M.L., OXENDER W.D. (1980): Efficacy of an equine pituitary extract to superovulate cows. Theriogenology *13*, 94.
11) DANNER M.L., OXENDER W.D., FOGWELL R.L., DOUGAS R.H. (1979): Use of equine pituitary extracts with and without HCG to superovulate cows. Theriogenology *11*, 96.
12) EPPIG J.J., DOWNS S.M. (1984): Chemical signal that regulate mammalian oocyte maturation. Biol. Reprod. *30*, 1-11.
13) FOOTE R.M., ONUMA H. (1970): Superovulation, ovum collection, culture and transfer. A review. J. Dairy. Sci. *53*, 1681-1691.
14) GARCIA G.J., SEIDEL G.E.Jr., ELDSEN R.P. (1982): Efficacy of shortened FSH treatement for superovulating cattle. Theriogenology *17*, 90.
15) HASLER J.F., Mc CAULEY A.D., SCHEMERHORN E.C., FOOTE R.H. (1982): Superovulatory response of Holstein cows. Theriogenology *19*, 83-99.
16) HILLENSJO T., CHANNING C.P., POMERANTZ S.H., SCHWARTZ-KRIPMER A. (1979): Intrafollicular control of oocyte maturation. Biol. Reprod. *15*, 32-39.
17) IRELAND J.J., ROCHE J.F. (1983): Development of non ovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. Endocrinology *112*, 150-156.
18) IRELAND J.J., ROCHE J.F. (1982): Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotrophin receptors. Endocrinology *111*, 2077-2086.
19) LASTER B.D. (1972): Disappearance and up-take of I 125 FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. J. Reprod. Fert. *30*, 407-415.
20) LAURIA A., GENAZZANI A.R., OLIVA O., INAUDI P., CREMONESI F., AURELI G. (1982 a): Clinical and endocrinological investigation on superovulation induced in heifers by Human Menopausal Gonadotrophin. J. Reprod. Fertil. *66*, 219-225.
21) LAURIA A., OLIVA O., GENAZZANI A.R., CREMONESI F., CROTTI A., BARBETTI M. (1982 b): Improved method to induce superovulation in cattle using Human Menopausal Gonadotropin. Theriogenology *18*, 357-364.
22) LAURIA A., AURELI G., OLIVA O., CREMONESI F. GENAZZANI A.R., BARBETTI M. (1984): Superovulation of milking dairy cows using pituitary extracts containing different amount of LH. Proc. Int. Cong. of An. Reprod. A.I. Urbana Champaign *331*.
23) LAURIA A., CREMONESI F., GANDOLFI F., BORTOLUSSI M., OLIVA O., AURELI G. (1983 a): Comportamento morfofunzionale dell'ovaio di bovine sottoposte a superovulazione. Atti Soc. It. Sci. Vet. *XXXVII*, 145-147.
24) LAURIA A., OLIVA O., GENAZZANI A.R., CREMONESI F., GANDOLFI

F., BARBETTI M. (1983): Superovulation of dairy and beef cows using porcine FSH with defined LH content. Theriogenology *20*, 675-682.
25) MAPLETOFT R.J. (1982): Superovulation and recovery of ova from the bovine. Proc. Owners and Manager Workshop VII Meeting I.E. T.S. Denver, Colorado, 37.
26) MATTON P. ADELAKOUN V. (1981): Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. J. Animal Science *54*, 813-820.
27) McNATTY K.P., LUN S., FANNIN J., McDIARMID J.M., HEAT D.A. (1982): The recruitment of an ovarian follicle for ovulation. Proc. VII Asia and Oceania Congress of Endocrinology, Tokyo, 22-26.
28) MONNIAUX D., CHUPIN D., SAUMANDE E.J. (1983): Superovulatory response in cattle. Theriogenology *19*, 55-81.
29) MONNIAUX D., MARIANA J.L., GIBSON W.R. (1984): Action of PMSG on follicular population in the heifers. J. Reprod. Fertil. *70*, 243-253.
30) MOOR R.M., KRUIP Th.A.M., GREEN D. (1984): Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? Theriogenology *21*, 103-116.
31) MOOR R.M., TROUNSON A.O. (1977): Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert. *29*, 101-109.
32) MOOR R.M., OSBORN J.C., CRAN D.G., WALTERS D.E. (1981): Selective effect of gonadotrophins on cell coupling nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes. J. Embryol. Exp. Morph. *61*, 347-365.
33) MOORE N.W. (1975): The control of time of oestrus and ovulation and the induction of superovulation in cattle. Aust. J. Agric. Res *29*, 295.
34) MURPHY B.D., MAPLETOFT R.J., MANNS J., HUMPHREY W.D. (1984): Variability in gonadotrophin preparation as a factor in the superovulatory response. Theriogenology *21*, 117-125.
35) NELSON L.D., SEIDEL G.E.Jr, ELDSEN R.P., BOWEN R.A. (1979): Superovulation of cows using FSH and PGF 2α. Theriogenology *11*, 104.
36) NEWCOMB R. (1982): Egg recovery and transfer in cattle. In Mammalian Egg Transfer. C.E. Adams. ed.; CRC Press. Inc. Boca Roton, Florida, 81-118.
37) OLIVA O., CREMONESI F., CROTTI S., LAURIA A. (1982): Incidenza della razza, dell'età e del tipo di trattamento sulla superovulazione della bovina. Atti Soc. It. Sci. Vet. *XXXVI*, 310-313.
38) OXBERRY B.A., GREENWALD G.S. (1982): An autoradiographic study of the binding of I 125 labeled follicle stimulating hormone, chorionic gonadotrophin and prolactin to the hamster ovary, throughout the oestrus cycle. Biol. Reprod. *25*, 505-516.

39) PARLOW A.F. (1972): Influence of differences in the persistence of luteinizing hormone in blood on their potency in the ovarian ascorbic acid depletion bioassay. Endocrinology *91*, 1109-1112.
40) PINEDA M.H., BOWEN R.A. (1980): Embryo transfer in domestic animals. In: Veterinary Endocrinology and Reproduction, L.E. Mc Donald ed., LEA & FABIGER, Philadelphia, 467-501.
41) RAJAKOWSKI E. (1960): The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variation. Acta Endocrinolocica *34*, suppl. 52, 1-68.
42) SAUMANDE J., CHUPIN D. (1981): Production of PMSG antiserum in cattle: assay of inhibitor activity and use in superovulated heifers. Theriogenology *15*, 108.
43) SAUMANDE J., PROCUREUR R., CHUPIN D. (1984): Effect of injection of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. Theriogenology *21*, 727-731.
44) SCHAMS D., MENZER C.H., SCHALLEMBERGER E., HOFFMAN B., HAHN J., HAHN R. (1978): The use of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and endocrine response in cattle. In «Control of reproduction in the cow.» J.M. Sreenan Ed.; Martinus Nijhoff, The Hague, 122-143.
45) STAIGMILLER R.B., ENGLAND B.G. (1982): Folliculogenesis in the bovine. Theriogenology *17*, 43-52.
46) STEELMAN S.L., POHLEY F.M. (1953): Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with Human Chorionic Gonadotrophin. Endocrinology *53*, 604-616.
47) TSAFRIRI A., CHANNING C.P. (1975): An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. Endocrinology *96*, 922-927.
48) TSAFRIRI A., CHANNING C.P., POMERANTZ S.H., LINDER H.R. (1977): Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by porcine follicular fluid. J. Endocrinology *75*, 285-291.
49) TSAFRIRI A., POMERANTZ S.H., CHANNING C.P. (1976): Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial characterization of the inhibitor. Biol. Reprod. *14*, 511-516.

SUMMARY

The response of the bovine ovary to the pharmacological overstimulation.

The induction of the ovarian overstimulation is one of the open problems of embryo transfer, since the variability of individual response still represents, in practice, a limit to the wider use of such a biotechnology for bovine reproduction.

The main limit to consistent improvements of the final results of superovulation, is the scarce information still available on the basic mechanism which induces the multiple and simultaneous mobilization of follicles under the effect of the administration of exogenous gonadotropins.

Better results have been recently obtained using HMG and pituitary extracts with defined LH content. This is probably due to the short half-life of both FSH and LH components typical of these extracts and to the lack of the negative effects en excess of LH activity can induce. Using these preparations the mean number of viable embryos is increased; furthermore the risk to disturb persistently the ovarian physiology and to develop follicles unable to ovulate or undergoing a preovulatory luteinization is reduced. Also the individual variability diminishes, but it still remains high.

We can conclude that further, consistent improvement could be achieved only throughout a deeper knowledge of the mechanisms which control and regulate the histophysiology of the ovary and of the genital tract.

G. SIRACUSA *

LO SVILUPPO *IN VIVO* E *IN VITRO* DELL'EMBRIONE PREIMPIANTO DI MAMMIFERO

Intendo dividere questa rassegna in tre parti. Nella prima descriverò lo sviluppo pre-impianto dell'embrione di mammifero, considerando la cinetica di proliferazione cellulare e il progressivo differenziamento morfologico dell'embrione fino alla comparsa dei due tessuti che compongono la blastocisti. Nella seconda parte passerò ad esaminare quali sono i meccanismi molecolari che regolano lo sviluppo embrionale. Poiché gran parte di quanto sappiamo sullo sviluppo dell'embrione deriva da esperimenti in cui esso è stato coltivato *in vitro*, discuterò infine brevemente anche alcuni aspetti del processo di coltura. Mi riferirò nella esposizione principalmente all'embrione di topo, giacché la maggior parte di questi studi sono stati fatti con questa specie.

1. *Cronologia e morfologia dello sviluppo pre-impianto*

Quando si studiano gli stadi pre-impianto dello sviluppo, si rimane sorpresi dal constatare le forti somiglianze che esistono tra gli embrioni di mammiferi euterici di specie anche molto diverse. Ad esempio, le dimensioni dell'uovo variano pochissimo anche tra i mammiferi più diversi, e sono comprese tra i 70 e i 120 μm. La durata dello sviluppo preimpianto, e in particolare del periodo pre-blastocisti, è relativamente costante, malgrado possano esistere forti differenze nella durata della gestazione. Ad esempio nell'uomo la durata della gestazione è di circa 270 giorni e il periodo pre-impianto è circa 8 giorni. Nel topo la gestazione dura soltanto 20 giorni, eppure il periodo preimpianto dura 4 giorni. È anche da notare che il periodo trascorso

* Cattedra di Anatomia Umana Normale, II Università di Roma «Tor Vergata», Via O. Raimondo - 00173 Roma.

nella tuba è estremamente simile nelle varie specie. L'insieme di tutte queste analogie, e altre di cui farò cenno più avanti, lasciano presumere che il metabolismo e i meccanismi differenziativi dell'embrione preimpianto siano alquanto simili tra le varie specie di mammifero.

1.A. *La cinetica di proliferazione*

La segmentazione è molto lenta nel mammifero, rispetto a quanto succede negli ambrioni di invertebrati e di vertebrati inferiori. Ad esempio, mentre nel pesce rosso le divisioni cellulari si susseguono ad intervalli di 20 minuti, e nella rana di circa un'ora, un embrione di topo impiega circa 24 h per arrivare allo stadio di 2 blastomeri, e un embrione umano circa 34 ore.

Nella Tab. 1 sono indicate alcune delle caratteristiche della cinetica di proliferazione dell'embrione di topo. È da notare come la durata del ciclo cellulare sia piuttosto lunga per i primi due cicli, e poi si dimezzi, e come la prima divisione di segmentazione possa verificarsi dopo intervalli molto diversi dall'ovulazione in ceppi diversi (Niwa e coll., 1980). Secondo Goldbard e Warner (1982) questo fenomeno è sotto il controllo di un gene *Ped* (Preimplantation embryo development) associato al complesso H-2.

Nello zigote il periodo di duplicazione del DNA è di durata insolitamente breve (Siracusa e coll., 1975) e i due pronuclei duplicano separatamente il proprio DNA (Fig. 1). La duplicazione è asincrona tra i due pronuclei, ed è il pronucleo maschile a finire per primo. L'intervallo postsintetico G_2 è piuttosto lungo nel primo ciclo e si fa poi estremamente lungo (10-15h) nel secondo ciclo. Questo è in netto contrasto con quello che succede nei cicli successivi, ove l'intervallo G_2 si riduce a valori di 1h o meno. Non è noto il significato biologico del lunghissimo intervallo G_2 del secondo ciclo. C'è comunque da tener conto che il secondo ciclo cellulare è un periodo cruciale per il differenziamento biochimico dell'embrione, come vedremo meglio in seguito, e che l'ingresso nella seconda divisione mitotica costituisce per l'embrione di topo in coltura un ostacolo non trascurabile. Infatti soltanto gli embrioni di alcuni ceppi inbred e i loro F1 riescono a dividersi in coltura dallo stadio di zigote a quello di blastocisti (Whitten e Biggers, 1968).

TABELLA 1 - CRONOLOGIA DI SVILUPPO *IN VIVO* DELL'EMBRIONE PRE-IMPIANTO DI TOPO

1° ciclo
Durata: 15-24 h (il momento della 1ª divisione varia tra ceppi diversi)
Fase S breve (3.5 - 5.5 h)
S: asincrona tra i due pronuclei
G_2: 6-7 h
M: 1.5 h

2° ciclo
Durata: 19-24 h
G_1: assente o molto breve
S: 6-7 h
G_2: estremamente lungo (10-15 h)
M: 1.5 h

Cicli successivi
Durata: 10-12 h
G_1: assente o molto breve fino allo stadio a 16 blastomeri
S: 6-7 h
G_2: 0.5 - 1 h
M: 1.5 h

Dati riassunti da: Gamow e Prescott (1970); Barlow e coll. (1972); Luthardt e Donahue (1973 e 1975); Siracusa e coll. (1975); Sawicki e coll. (1978); Streffer e coll. (1980); Goldbard e Warner (1982).

La maggior parte dei ceppi randomly-bred si arresta allo stadio a due blastomeri; questo blocco può essere superato trasferendo gli embrioni nella tuba materna (Whittingham e Biggers, 1967), o iniettando in essi un po' di citoplasma di embrioni che non presentano questo blocco (Muggleton-Harris e coll., 1982). Anche gli embrioni di altre specie coltivati in mezzi definiti presentano una tendenza ad arrestarsi a stadi specifici della segmentazione (p. es. il criceto presenta un blocco a 2 e 4 blastomeri (Bavister e coll., 1983).

Un'altra importante caratteristica del ciclo cellulare dell'embrione di topo a 2-16 blastomeri è l'assenza (Gamow e Prescott, 1970) o la durata molto breve (Luthardt e Donahue, 1975; Sawicki e coll., 1978; Streffer e coll., 1980) della fase G_1. La presenza o meno di una fase G_1 è problema non banale, ma collegato con l'esistenza di meccanismi di regolazione del ciclo cellulare già nel periodo pre-blastocisti.

Fig. 1 - Autoradiografia di uovo fecondato di topo prelevato dalla tuba 11 ore dopo l'accoppiamento e incubato per 1 ora in ^{3}H-timidina. Entrambi i pronuclei sono marcati. Il pronucleo femminile, più piccolo, mostra una più elevata densità di grani autoradiografici. È marcato anche il secondo globulo polare. (da Siracusa e coll., 1975).

Lo sviluppo *in vitro* dell'embrione di topo è leggermente ritardato rispetto a quello *in vivo* (Streffer e coll., 1980), il che può stare a indicare che le condizioni colturali non sono ancora perfette. Negli ultimi anni si sono resi disponibili dati piuttosto accurati anche sui parametri di segmentazione dell'embrione umano in coltura (Edwards, 1981; Trounson e coll., 1982) (Tab. 2). I dati di Edwards indicano un tempo di ciclo dei blastomeri piuttosto costante, pari a circa 16 ore; quelli di Trounson indicano invece un ciclo più breve (10 ore il 2° ciclo e circa 9 il 3° ciclo).

1.B. *Il compattamento e la formazione della blastocisti*

Fino allo stadio ad otto blastomeri l'embrione di mammifero è composto di cellule approssimativamente sferiche, ben distinguibili l'una dall'altra alla microscopia ottica. Durante questo stadio cominciano però delle modificazioni nella forma e nei rapporti dei blastomeri che hanno lo scopo di consentire lo stabilirsi di complessi di giunzione tra i blastomeri stessi, e quindi la formazione della blastocisti.

Partendo dai limitati punti di contatto iniziali, i blastomeri adiacenti estendono progressivamente la loro superficie di contatto, aderendo l'uno all'altro secondo superfici piane. Gli spazi intercellulari divengono così sottili che i confini dei singoli blastomeri non sono più distinguibili al microscopio ottico, e l'embrione assume un aspetto compatto (Fig. 2). Questo fenomeno, che prende il nome di compat-

TABELLA 2 - SVILUPPO IN COLTURA DELL'EMBRIONE UMANO PRE-IMPIANTO

Stadio	Intervallo dall'inseminazione (ore)	
	a	b
2 blastomeri	33.2	35.6
4 blastomeri	49.0	45.7
8 blastomeri	64.8	54.3
16 blastomeri	80.7	68-85
Morula	96.8	96-120
Blastocisti iniziale	112.7	120-144

Dati riassunti da: a: Edwards (1981)
b: Trounson e coll. (1982)

tamento, è stato studiato nei suoi dettagli ultrastrutturali soprattutto nell'embrione di topo (Ducibella e Anderson, 1975; Ducibella e coll., 1977), ma è stato osservato anche nel ratto (Schlafke e Enders, 1967), nel coniglio (Lewis e Gregory, 1929), nella scimmia (Panigel e coll., 1975) e nell'uomo (Steptoe e coll., 1971). Nell'embrione umano il compattamento avviene ad uno stadio più tardivo (a 32 blastomeri secondo Trounson e coll., 1982).

Durante la fase del compattamento i blastomeri si polarizzano (Ducibella e coll., 1977): i microvilli si concentrano alla superficie apicale, esterna dei blastomeri; microtubuli e mitocondri si portano nel citoplasma corticale, disponendosi parallelamente alla superficie appiattita di adesione intercellulare; il nucleo si porta in posizione basale (Reeve, 1981). L'asse di polarizzazione di ciascun blastomero è diretto verso il centro dell'embrione.

Tra le superfici laterali dei blastomeri in via di apposizione si sviluppano intanto degli elementi giunzionali a disposizione maculare. Questi tendono ad essere del tipo tight in prossimità della superficie apicale (esterna) dei blastomeri, e di tipo gap in sedi più basali.

Allo stadio di morula (16-32 blastomeri) le giunzioni maculari occludenti si estendono progressivamente attorno alla superficie apicale dei blastomeri esterni, trasformandosi in vere zonule occludenti. Si stabilisce in questo modo una barriera di permeabilità tra l'ambiente materno e le cellule che si trovano nella parte centrale della morula. Questa regionalizzazione dell'embrione rappresenta un importante evento differenziativo: lo strato esterno di cellule è infatti destinato a formare il trofoblasto, mentre il gruppo di cellule interne diverrà l'embrioblasto. Tra le cellule interne della morula sono presenti esclusivamente giunzioni di tipo gap; giunzioni di questo tipo collegano pure le cellule interne alle esterne.

La comparsa delle zonule occludenti tra le cellule più esterne della morula le trasforma di fatto, da un punto di vista anatomico e funzionale, in un epitelio di rivestimento di tipo occludente, in grado di trasportare e accumulare fluidi dall'esterno verso l'interno dell'embrione. A seguito di queste attività di trasporto si forma all'interno dell'embrione la cavità blastocelica.

La natura occludente dell'epitelio trofoblastico è confermata nella blastocisti, oltre che dai reperti morfologici, anche da altre osservazioni, quali la presenza di una elevata resistenza elettrica transtrofoblastica

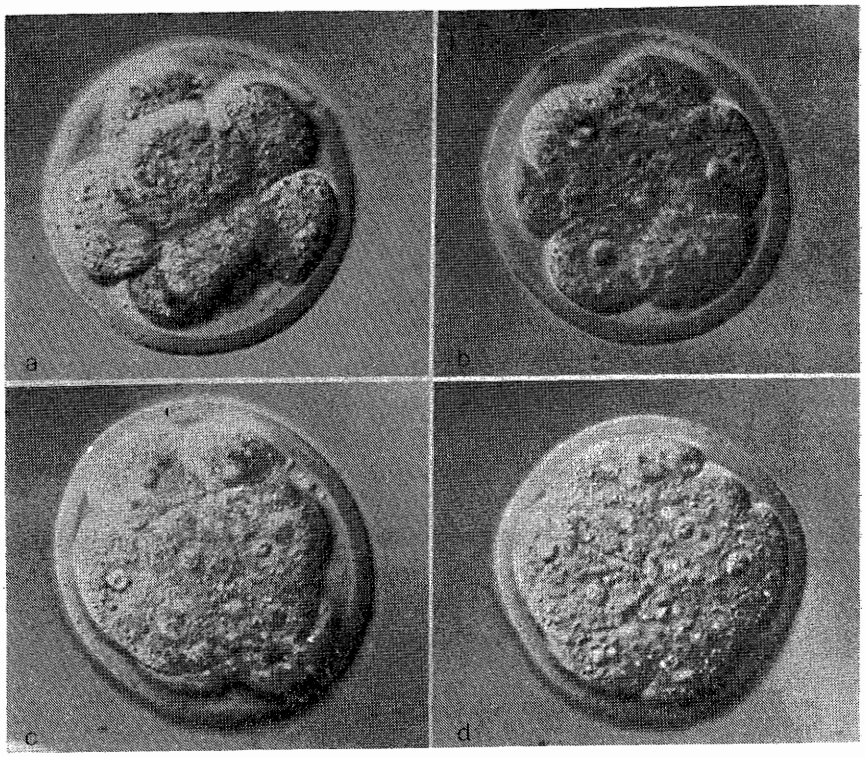


Fig. 2 - (a-d): Stadi successivi del compattamento di embrione di topo a 8 blastomeri. Si noti come come i contorni dei singoli blastomeri si facciano progressivamente meno distinti, e l'embrione acquisti un aspetto «compatto». Microscopia a contrasto interferenziale.

(Cross, 1973), e la dimostrazione che alcuni ioni (come il calcio) sono mantenuti nel liquido blatocelico a concentrazione più elevata che nel mezzo circostante (Borland e coll., 1976).

La formazione del blastocele è accompagnata dalla comparsa tra le cellule trofoblastiche di un nuovo tipo di giunzione, il desmosoma, che ha il compito presumibile di mantenere una salda coesione tra le sottili cellule trofoblastiche durante l'espansione del blastocele. La formazione dei desmosomi è accompagnata dalla comparsa nelle stesse cellule di filamenti intermedi citocheratinici; filamenti intermedi di vimentina e desmina compaiono soltanto dopo l'impianto (Jackson e coll., 1980). Le cellule del trofoblasto e quelle dell'embrioblasto continuano inoltre ad essere collegate tra loro da giunzioni gap. Grazie a questa rete di collegamenti giunzionali, che compaiono nell'embrione ad 8 blastomeri compatto e permangono per tutto il rimanente sviluppo preimpianto (Lo e Gilula, 1979), tutte le cellule embrionali sono accoppiate ionicamente a costituire una popolazione funzionalmente coordinata. Le cellule dell'embrioblasto sono inoltre collegate tra di loro e con le cellule trofoblastiche da maculae adhaerentes.

2. *Il controllo genetico dello sviluppo pre-impianto*

Lo sviluppo dell'embrione comporta l'attuazione di un programma ordinato di sintesi macromolecolari, che conduce al progressivo differenziamento dei vari tipi cellulari. Noi cercheremo ora di analizzare brevemente quali sono i meccanismi molecolari che regolano il differenziamento preimpianto dell'uovo fecondato, e portano alla formazione delle due linee cellulari presenti nella blastocisti. In molte specie a sviluppo esterno, le prime fasi dello sviluppo embrionale sono dirette non dai geni dell'embrione, ma da RNA messaggeri materni, immagazzinati nell'ovocito in forma «mascherata», inattiva, durante l'ovogenesi. Negli Echinodermi e negli Anfibi, ad esempio, i geni dell'embrione cominciano gradualmente a controllare lo sviluppo all'incirca durante la gastrulazione (Davidson e coll., 1982; Dawid e coll., 1983), e fino a questo stadio gli embrioni possono continuare a svilupparsi anche se sono stati enucleati (Brachet e coll. 1963; Smith e Ecker, 1965).

Qual è la situazione nel mammifero? L'uovo ovulato eredita dalla

madre RNA messaggero? lo usa? fino a quale stadio? a quale stadio il genoma dell'embrione diviene attivo? I dati che riporteremo riguardano essenzialmente l'embrione di topo, che è stato il più studiato da questo punto di vista. Varie rassegne sull'argomento sono apparse in tempi recenti (Siracusa, 1976; Sherman, 1979; Johnson, 1979; Magnuson e Epstein, 1981), e ad esse rinviamo per una più esauriente trattazione.

2.A. *L'eredità materna e la sintesi di nuovo RNA*

L'uovo ovulato di topo o di coniglio eredita dalla madre una notevole quantità di RNA, che è ben superiore (sia in termini assoluti che per unità di volume cellulare) a quella contenuta in una cellula somatica (Pikò e Clegg, 1982). Tale RNA è costituito di tRNA e rRNA (Young e coll., 1973; Bachvarova, 1974), nonché di mRNA (identificato sulla base del suo contenuto in poli (A), Schultz, 1975; Clegg e Pikò, 1978; Levey e coll., 1978 e della sua capacità di essere tradotto *in vitro* in un sistema cell-free, Braude e coll., 1979).

All'atto della fecondazione l'uovo di mammifero è dunque perfettamente attrezzato per sintetizzare proteine utilizzando informazioni genetiche trascritte dalla madre. D'altra parte, l'embrione di mammifero comincia molto precocemente, rispetto alla maggior parte degli altri embrioni, a sintetizzare RNA. Sintesi di RNA è stata dimostrata sia autoradiograficamente (Mintz, 1964) che biochimicamente (Clegg e Pikò, 1982) già nei pronuclei dello zigote. A questo stadio i livelli di sintesi sono tuttavia molto bassi, e il ruolo dell'RNA sintetizzato (principalmente un RNA eterodisperso privo di poli (A) e di grosso peso molecolare) è poco chiaro. Allo stadio a due blastomeri l'embrione di topo sintetizza però chiaramente tutti i tipi di RNA: possiede un organizzatore nucleolare attivo (dimostrato con le colorazioni citochimiche all'argento da Hansmann e coll., 1978) e sintetizza RNA eterogeneo, tRNA, rRNA e RNA poli (A)$^+$ (Woodland e Graham, 1969; Knowland e Graham, 1972; Levey e coll., 1978; Clegg e Pikò, 1982). La sintesi di RNA si mantiene però a livelli estremamenti bassi fino allo stadio a 4 blastomeri, si fa più intensa a partire dallo stadio a 8 blastomeri (Epstein e Daente, 1971), e aumenta bruscamente (di 7 volte) allo stadio di blastocisti (Clegg e Pikò, 1977).

Non è noto quali siano i meccanismi che regolano tali variazioni di sintesi; esse comunque non sembrano dipendere dalla disponibilità dell'enzima RNA polimerasi (Siracusa, 1973; Siracusa e Vivarelli, 1975; Warner, 1977).

La stabilità dell'RNA sintetizzato sembra variare considerevolmente in funzione dello stadio di sviluppo: la vita media dell'mRNA è di 9.5 h nella morula, e di 30-50 h nella blastocisti iniziale (Kidder e Pedersen, 1982).

Nelle fasi iniziali di sviluppo l'embrione di mammifero sembra dunque disporre sia di messaggi materni che – almeno a partire dallo stadio a 2 blastomeri – di messaggi trascritti dal proprio genoma. In che sequenza l'embrione usa queste informazioni genetiche per sintetizzare le proprie proteine?

2.B. *La sintesi di proteine nell'embrione*

Sintesi di proteine può essere facilmente dimostrata (come incorporazione di aminoacidi radioattivi) nell'embrione di mammifero a tutti gli stadi di sviluppo, e anche nell'uovo non fecondato. La velocità di sintesi cambia durante lo sviluppo, e presenta un notevole aumento (di 8 volte) tra lo stadio a 2 e a 8 blastomeri (Brinster e coll., 1976). Sostanziali variazioni della velocità di sintesi legate allo stadio di sviluppo sono state dimostrate anche per varie proteine specifiche (Chen e coll., 1980), nonché per actina, tubulina (Abreu e Brinster, 1978) e latticodeidrogenasi-1 (Mangia e coll., 1976).

Oltre a queste variazioni quantitative, si verificano durante lo sviluppo embrionale cambiamenti nei tipi di polipeptidi sintetizzati. Alcuni di questi (almeno nel coniglio) sono chiaramente dei semplici cambiamenti «cronologici», che si attuano cioè dopo un intervallo fisso dall'ovulazione sia nell'uovo non fecondato che in quello fecondato (Van Blerkom, 1979). Questi cambiamenti sono probabilmente regolati a livello post-trascrizionale (ossia sono dovuti a una modificazione degli RNA messaggeri materni), dal momento che nell'uovo non fecondato non è dimostrabile sintesi di RNA. Altri cambiamenti del partner delle proteine sintetizzate si verificano invece solo dopo fecondazione o attivazione. Anche per alcuni di questi ultimi (quelli che si verificano durante le prime 24 h di sviluppo) è stato però dimo-

strato che si tratta di cambiamenti regolati su base post-trascrizionale: infatti essi si manifestano anche in embrioni a 2 blastomeri coltivati durante le prime 24 ore di sviluppo in presenza di α-amantina, un inibitore dell'RNA polimerasi II, e quindi della sintesi del mRNA (Braude e coll., 1979), e addirittura in zigoti enucleati (Petzoldt e coll., 1980).

I dati che abbiamo fin qui esposto indicano che almeno durante le prime 24 ore dalla fecondazione l'embrione di topo utilizza programmi di sviluppo ereditati in forma post-trascrizionale. Una ulteriore, e ancora più diretta prova a sostegno di questo assunto viene dagli esperimenti di Braude e coll. (1979) e di Cascio e Wassarman (1982). I primi hanno dimostrato che tra gli mRNA dell'uovo non fecondato (identificati attraverso traduzione in un sistema *cell-free*) sono già presenti quelli che dirigeranno la sintesi di alcune nuove proteine (p. m. 35.000) destinate a comparire nell'embrione a 2 blastomeri. Più recentemente Cascio e Wassarman (1982) hanno dimostrato, con la stessa tecnica, che gli ovociti di topo contengono già, a tutti gli stadi di accrescimento, gli mRNA che codificano per quei polipeptidi.

Per quanto tempo, ossia fino a che stadio di sviluppo, l'embrione continua ad utilizzare gli mRNA ereditati dalla madre?

I dati della letteratura indicano che gran parte della cospicua eredità materna di mRNA viene eliminata allo stadio a 2 blastomeri. Durante tale stadio infatti si ha una brusca riduzione della quantità di RNA totale per embrione (Olds e coll., 1973; Pikò e Clegg, 1982), e una riduzione ancor più marcata della quantità di poli (A) (Levey e coll., 1978; Pikò e Clegg, 1982). Anche gli studi di Bachvarova e De Leon (1980) indicano che negli stadi iniziali di sviluppo si ha un'intensa degradazione dell'RNA materno poli $(A)^+$, marcato *in vivo* durante l'ovogenesi. Infine, mRNA per la globina di topo o di coniglio iniettato in uova fecondate di topo viene tradotto fino allo stadio a 2 blastomeri, e poi viene probabilmente degradato (Brinster e coll., 1980). Ciò è nettamente diverso da quello che avviene in embrioni di Xenopus iniettati nello stesso modo, in cui la sintesi di globina è ancora rilevabile nel girino, cioè molti giorni dopo l'iniezione del messaggero (Gurdon, 1974).

Abbiamo dunque visto che allo stadio a 2 blastomeri si ha nell'embrione di topo l'attivazione dei geni embrionali (rilevabile come trascrizione di tutte le classi di RNA) e la contemporanea inattivazio-

ne di gran parte dell'mRNA materno. Secondo Flach e coll. (1982) questo «passaggio di poteri» tra genoma materno e genoma embrionario avviene in un periodo piuttosto ben delimitato dello stadio a 2 blastomeri, cioè tra le 27 e le 30 ore dalla fecondazione.

Dobbiamo a questo punto chiederci in che momento diventa essenziale per l'embrione sintetizzare i propri mRNA per continuare a svilupparsi, e quando compaiono le prime proteine codificate da tali mRNA.

2.C. *Quando la nuova sintesi di RNA diventa indispensabile allo sviluppo?*

Questo problema può essere affrontato attraverso studi sull'effetto degli inibitori della trascrizione. In generale questi esperimenti hanno dimostrato che l'embrione di mammifero è assai sensibile a tali trattamenti. Ciò è in netto contrasto con quanto avviene in embrioni di Anfibi ed Echinodermi, che possono svilupparsi fino allo stadio di blastula avanzata in presenza di actinomicina D (Gross e Cousineau, 1964; Brachet e coll., 1964) o – come abbiamo già visto – addirittura dopo enucleazione. L'actinomicina D inibisce molto rapidamente (entro 12 ore circa) la segmentazione e la formazione della blastocisti in embrioni di topo (Monesi e coll., 1970 a; Molinaro e coll., 1972; Golbus e coll., 1973). Negli stadi iniziali di sviluppo tuttavia, il trattamento con actinomicina, pur inibendo completamente la trascrizione, riduce soltanto parzialmente (del 50% circa) la sintesi di proteine (Monesi e coll., 1970 b), che evidentemente è a questo stadio ancora in parte sostenuta da RNA materni.

I risultati ottenuti con l'uso di actinomicina D debbono tuttavia essere interpretati con cautela, in considerazione dei molti effetti collaterali prodotti da questo inibitore della sintesi del RNA. Più specifici sono gli effetti dell'α-amanitina, un inibitore irreversibile dell'enzima responsabile della produzione di mRNA. Ovociti di topo fecondati in presenza di α-amanitina riescono a svilupparsi fino allo stadio a 2 blastomeri, ma non oltre (Flach e coll., 1982), cosa che conferma che a questo stadio deve avvenire la trascrizione di geni indispensabili per l'ulteriore sviluppo dell'embrione, ma anche che le fasi precedenti alla prima divisione mitotica possono avvenire in assenza di attività trascri-

zionale. Uno degli eventi più iniziali dello sviluppo dell'uovo, la formazone di pronuclei, può addirittura verificarsi in uova di topo coltivate in presenza di inibitori della sintesi proteica (Siracusa e coll., 1978).

L'uso dell'α-amanitina ha anche consentito di evidenziare con chiarezza che un importante passo differenziativo dello sviluppo preimpianto (la cavitazione dell'embrione) dipende da un evento trascrizionale che si verifica nella morula circa 68 h dopo la fecondazione (Braude, 1979). Infatti embrioni di topo trasferiti in α-amanitina fino a 65 h dalla fecondazione non formano la cavità blastocelica, mentre la percentuale di blastulazione aumenta drasticamente se il trattamento viene applicato a tempi successivi alle 68 h.

Abbiamo fin qui visto che molto precocemente l'embrione comincia a trascrivere i propri geni e che questa attività trascrizionale è essenziale perché l'embrione possa svilupparsi oltre lo stadio a 2 blastomeri. La prossima domanda che dobbiamo porci è quando vengono espresse nell'embrione le informazioni contenute negli mRNA neosintetizzati?

2.D. *L'espressione dei geni dell'embrione*

Due diverse linee di esperimenti indicano che il genoma embrionale viene non solo precocemente trascritto, ma anche rapidamente espresso. Già allo stadio di 2-8 blastomeri infatti è stata evidenziata l'espressione di geni paterni sia sotto forma di difetti di sviluppo dovuti a mutazioni genetiche che come comparsa di varianti enzimatiche e antigeniche di eredità paterna.

La prima linea di evidenza sperimentale (v. rassegna di Magnuson 1983) mostra che almeno tre fattori genetici che sono letali nella forma omozigote (e precisamente i geni A^y (*agouti yellow*), t^{12} e la delezione del locus albino c^{25h}) inducono anomalie cellulari di vario tipo già in embrioni di topo di 2-4 blastomeri (Granhoml e Johnson, 1978; Hillman e coll., 1970; Lewis, 1978).

Un'ulteriore prova diretta della precoce espressione dei geni embrionali viene dalla dimostrazione della comparsa nell'embrione di 2-8 blastomeri di fenotipi proteici codificati esclusivamente dal genoma paterno. Poiché alla fecondazione gli spermatozoi non portano

mRNA all'ovocito, l'identificazione nell'embrione di prodotti genici paterni (ad esempio varianti isoenzimatiche) costituisce una prova diretta dell'espressione del genoma embrionale. Utilizzando questo approccio sperimentale è stata dimostrata la comparsa nell'embrione a 8 blastomeri delle forme isoenzimatiche paterne della GPI-1 (glucosofosfatotoisomerasi-1) (Brinster, 1973), della β-glucuronidasi (Wudl e Chapman, 1976), e di antigeni di istocompatibilità minori (non-H_2). Più recentemente Sawicki e coll. (1981) hanno dimostrato che già l'embrione a 2 blastomeri sintetizza una variante elettroforetica di derivazione paterna della proteina β_2-microglobulina.

Infine, un'ultima linea di evidenza sperimentale a favore dell'interpretazione che il genoma embrionale è precocemente espresso viene da studi in cui è stata misurata in embrioni XX e XY a vari stadi di sviluppo l'attività di enzimi codificati dal cromosoma X. Questi studi mostrano che allo stadio a 8-16 blastomeri l'attività degli enzimi HPRT (ipoxantina fosforibosil trasferasi) (Kratzer e Gartler, 1978) e α-galattosidasi (Adler e coll., 1977) è doppia negli embrioni femmina rispetto a quelli maschi (Epstein e coll., 1978). Se ne deve dedurre che a questo stadio entrambi i cromosomi X sono attivi negli embrioni di topo femmina. In accordo con questa conclusione è anche il fatto che embrioni privi di cromosoma X (YO) muoiono molto precocemente (allo stadio a 2-8 cellule, Morris, 1968).

Anche l'antigene della specificità maschile (H-Y) è espresso da metà degli embrioni di topo a 8 blastomeri (Krco e Goldberg, 1976). Gli embrioni che vengono danneggiati o uccisi dal siero anti H-Y sono soltanto quelli di sesso maschile (Epstein e coll., 1980). La presenza dell'antigene H-Y sulla superficie delle cellule maschili è stata di recente sfruttata a fini zootecnici, per selezionare in base al sesso embrioni bovini preimpianto da trapiantare (Shapley, 1983).

In conclusione, il considerevole corpus di dati biochimici e genetici che ho sinteticamente illustrato indica chiaramente che l'embrione di topo, e probabilmente quello della maggior parte dei mammiferi, fino allo stadio a 2 blastomeri utilizza RNA materni, regolando pertanto a livello post-trascrizionale la sintesi proteica. Durante lo stadio a due blastomeri l'embrione comincia ad attivare e ad esprimere i propri geni, mentre gran parte dell'mRNA materno viene inattivato. Questa attività genetica è essenziale perché l'embrione possa continuare a svilupparsi oltre lo stadio a 2 blastomeri.

3. *La coltura in vitro*

La maggior parte delle informazioni che possediamo sui processi del differenziamento embrionale del mammifero, e soprattutto quelle biochimiche, sono state ottenute grazie a un meticoloso lavoro di messa a punto di metodologie colturali idonee a far sviluppare l'embrione in vitro in mezzi chimicamente definiti (privi cioè di siero o altri fluidi biologici) attraverso tutti gli stadi pre-impianto. Questo lavoro è stato facilitato dall'uso delle tecniche di superovulazione, che hanno aumentato il numero di embrioni utilizzabili in ciascun esperimento, e dall'introduzione di tecniche biochimiche miniaturizzate, che hanno permesso di superare l'handicap dovuto alla scarsità del materiale a disposizione, consentendo così lo studio del metabolismo dell'embrione pre-impianto, e quindi la definizione delle sue necessità nutritive in coltura.

Il primo importante passo fu fatto quando Whitten scoprì nel 1956 che l'embrione di topo a 8 blastomeri si sviluppava fino allo stadio di blastocisti in un semplice mezzo chimicamente definito basato sul Krebs-Ringer-bicarbonato, arricchito di glucoso e albumina. Questo stesso mezzo è stato poi usato come base della maggior parte dei mezzi utilizzati negli studi successivi. Ancora una volta, la specie di cui sono note nel modo più esauriente le necessità nutrizionali in coltura è il topo. Oltre a quelli di topo, anche embrioni di coniglio e di ratto possono venire coltivati con successo in mezzi chimicamente definiti attraverso tutto il periodo pre-impianto (v. rassegna di Brackett, 1981). Gli embrioni degli altri animali da laboratorio e domestici (Wright e Bondioli, 1981) sembrano assai più difficili da coltivare in mezzi definiti.

Il successivo passo avanti fu fatto ancora da Whitten, che scoprì (1957) che l'aggiunta di lattato al mezzo di coltura consentiva anche agli embrioni di topo a 2 blastomeri di svilupparsi. Dovevano poi passare 10 anni prima che Biggers e coll. scoprissero che il piruvato era l'unico substrato energetico che poteva venire utilizzato dallo zigote o dall'ovocito ovarico di topo (l'altro substrato utilizzato, l'ossalacetato, viene probabilmente decarbossilato a piruvato). Brinster (1967) dimostrò che il 90-100% dell'ossigeno consumato dall'embrione nei primi due giorni di vita viene utilizzato per ossidare piruvato. Anche il coniglio e la scimmia Rhesus (Brinster, 1968 e 1971) ossidano preferenzialmente il piruvato negli stadi iniziali di sviluppo.

È evidente da quanto abbiamo detto che l'embrione di topo va incontro durante lo sviluppo pre-impianto ad un graduale ampliamento delle sue capacità metaboliche (Tab. 3), fino a raggiungere caratteristiche metaboliche (e richieste energetiche) simili a quelle della maggior parte delle cellule adulte.

TABELLA 3 - EFFETTO DI DIVERSI SUBSTRATI ENERGETICI SULLO SVILUPPO IN COLTURA DELL'OVOCITO E DELL'EMBRIONE PRE-IMPIANTO DI TOPO

Substrato	*Stadio di sviluppo all'inizio della coltura*			
	ovocito	1 cellula	2 cellule	8 cellule
Fosfoenolpiruvato	—	—	+	+
Piruvato	+	+	+	+
Lattato	—	—	+	+
Ossalacetato	+	+	+	+
Glucoso	—	—	—	+

(+) il substrato consente lo sviluppo in coltura
(—) il substrato non consente lo sviluppo in coltura

Dati riassunti da: Brinster (1967); Brinster e Thompson (1966); Biggers e coll. (1967).

Altre condizioni colturali che appaiono specifiche per l'embrione pre-impianto di topo sono l'optimum di osmolarità (276 mosm, Brinster, 1965), che è alquanto inferiore a quello dei normali mezzi di coltura e del siero (circa 308), e l'optimum di pressione parziale di ossigeno, che è 5%. Una pressione parziale di ossigeno del 20% (che è quella generalmente usata per la coltura di cellule) ha effetti dannosi sull'embrione pre-impianto di topo in coltura (Whitten, 1971). Quinn e Harlow (1978) hanno chiaramente dimostrato un ritardo di sviluppo (con formazione di blastocisti con un numero di cellule inferiore al normale) in embrioni coltivati a concentrazioni di ossigeno superiori al 5%.

Ringraziamenti

Le ricerche personali descritte in questo articolo sono state eseguite con fondi del Ministero del Lavoro (Fondo Speciale Infortuni), del Ministero della Pubblica Istruzione (40% e 60%) e del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Progetto Finalizzato Medicina Preventiva).

BIBLIOGRAFIA

1) ABREU S.L. and BRINSTER R.L. (1978): Synthesis of tubulin and actin during the preimplantation development of the mouse. Exp. Cell Res. *114*, 135-141.
2) ADLER D.A., WEST J.D., and CHAPMAN V.M. (1977): Expression of α-galactosidase in preimplantation mouse embryos. Nature *267*, 838-839.
3) BACHVAROVA R. (1974): Incorporation of triated adenosine into mouse ovum RNA. Develop. Biol. *40*, 52-58.
4) BACHVAROVA R. and DE LEON V. (1980): Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. Develop. Biol. *74*, 1-8.
5) BIGGERS J.D., WHITTINGHAM D.G. and DONAHUE R.P. (1967): The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc. Natl. Acad. Sci. *58*, 560-567.
6) BORLAND R.M., BIGGERS J.D. and LECHENE C.P. (1976): Kinetic aspects of rabbit blastocoele fluid accumulation: an application of electron probe microanalysis. Develop. Biol. *50*, 201-214.
7) BRACHET J., FICQ A. and TENCER R. (1963): Amino acid incorporation into proteins of nucleate and anucleate fragments of sea urchin eggs: effect of parthenogenetic activation. Exp. Cell Res. *32*, 168-170.
8) BRACHET J., DENIS H. and DE VITRY F. (1964): The effect of actinomycin D and puromycin on morphogenesis in amphibian eggs and *Acetabularia mediterranea*. Develop. Biol. *9*, 398-434.
9) BRACKETT B.G. (1981): In vitro culture of the zygote and embryo. In: Fertilization and embryonic development in vitro. L. Mastroianni e J.D. Biggers eds., Plenum Press, New York, pp. 61-79.
10) BRAUDE P.R. (1979): Time-dependent effects of α-amanitin on blastocyst formation in the mouse. J. Embryol. Exp. Morph. *52*, 193-202.
11) BRAUDE P., PELHAM H., FLACH G. and LOBATTO R. (1979): Post-transcriptional control in the early mouse embryo. Nature *282*, 102-105.
12) BRINSTER R.L. (1965): Studies on the development of mouse embryos in vitro. I. Effect of osmolarity and hydrogen ion concentration. J. Exp. Zool. *158*, 49-58.
13) BRINSTER R.L. (1967): Carbon dioxide production from lactate and pyruvate by the preimplantation mouse embryo. Exp. Cell Res. *47*, 634-637.
14) BRINSTER R. (1968): Carbon dioxide production from glucose by the preimplantation rabbit embryo. Exp. Cell Res. *51*, 330-334.
15) BRINSTER R.L. (1971): Oxidation of pyruvate and glucose by oocytes of the mouse and rhesus monkey. J. Reprod. Fert. *24*, 187-191.

16) BRINSTER R.L. (1973): Parental glucose phosphate isomerase activity in three-day mouse embryos. Biochem. Genet. *9*, 187-191.
17) BRINSTER R.L., WIEBOLD J.L. and BRUNNER S. (1976): Protein metabolism in preimplanted mouse ova. Develop. Biol. *51*, 215-224.
18) BRINSTER R.L., CHEN H.Y., TRUMBAUER M.E. and AVARBOCK M.R. (1980): Translation of globin messenger RNA by the mouse ovum. Nature *283*, 499-501.
19) CASCIO S.M. and WASSARMAN P.M. (1982): Program of early development in the mammal: post-transcriptional control of a class of proteins synthesized by mouse oocytes and early embryos. Develop. Biol. *89*, 397-408.
20) CHEN H.Y., BRINSTER R.L. and MERZ E.A. (1980): Changes in protein synthesis following fertilization of the mouse ovum. J. Exp. Zool. *212*, 355-360.
21) CLEGG K.B. and PIKÒ L. (1977): Size and specific activity of the UTP pool and overall rates of RNA synthesis in early mouse embryos. Develop. Biol. *58*, 76-95.
22) CLEGG K.B. and PIKÒ L. (1978): Size distribution of poly (A) tracts in maternally inherited and newly synthesized RNA from early mouse embryos. J. Cell Biol. *79*, 168a.
23) CLEGG K.B and PIKÒ L. (1982): RNA synthesis and cytoplasmic polyadenylation in the one-cell mouse embryo. Nature *295*, 342-345.
24) CROSS M. (1973): Active sodium and chloride transport across the rabbit blastocoele wall. Biol. Reprod. *8*, 566-575.
25) DAVIDSON E.H., HOUGH-EVANS B.R. and BRITTEN R.J. (1982): Molecular biology of the sea urchin embryo. Science *217*, 17-26.
26) DAWID I.B., KAY B.K. and SARGENT T.D. (1983): Gene expression during Xenopus laevis development. In: Gene Structure and Regulation in Development. S. Subtelny and F.C. Kafatos eds., pp. 171-182, Alan R. Liss, New York.
27) DUCIBELLA T. and ANDERSON E. (1975): Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: pre-requisites for morphogenesis in the blastocyst. Develop. Biol. *47*, 45-58.
28) DUCIBELLA T., UKENA T., KARNOWSKI M. and ANDERSON E. (1977): Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. J. Cell Biol. *74*, 153-167.
29) EDWARDS R.G., PURCY J.M., STEPTOE P.C. and WALTERS D.E. (1981): The growth of human preimplantation embryos in vitro. Am. J. Obstet. Gynecol. *141*, 408-417.
30) EPSTEIN C.J. and DAENTL D.L. (1971): Precursor pools and RNA synthesis in preimplantation mouse embryos. Develop. Biol. *26*, 517-524.
31) EPSTEIN C.J., SMITH S., TRAVIS B. and TUCKER G. (1978): Both X

chromosomes function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos. Nature *276*, 500-503.
32) EPSTEIN C.J., SMITH S. and TRAVIS B. (1980): Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. Tissue Antigens *15*, 63-67.
33) FLACH G., JOHNSON M.H., BRAUDE P.R., TAYLOR R.A.S. and BOLTON V.N. (1982): The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. EMBO J. *1*, 681-686.
34) GAMOW E.I. and PRESCOTT D.M. (1970): The cell life cycle during early embryogenesis of the mouse. Exp. Cell Res. *59*, 117-123.
35) GOLBUS M.S., CALARCO P.G. and EPSTEIN C.J. (1973): The effects of inhibitors of RNA synthesis (α-amanitin and actinomycin D) on preimplantation mouse embryogenesis. J. Exp. Zool. *186*, 207-215.
36) GOLDBARD S.B. and WARNER C.M. (1982): Genes affect the timing of early mouse embryo development. Biol. Reprod. *27*, 419-424.
37) GRANHOLM N.H. and JOHNSON P.M. (1978b): Enhanced identification of lethal yellow ($^{y}/A^{y}$) mouse embryos by means of delayed development of four-cell stages. J. Exp. Zool. *205*, 327-333.
38) GROSS P.R. and COUSINEAU G.H. (1964): Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development. Exp. Cell Res. *33*, 368-395.
39) GURDON J.B. (1974): The control of gene expression in animal development. Clarendon Press, Oxford.
40) HANSMANN I., GEBAUER J., BIHL L. and GRIMM T. (1978): Onset of nucleolus organizer activity in early embryogenesis and evidence for its regulation. Exp. Cell Res. *114*, 263-268.
41) HILLMAN N., HILLMAN R. and WILEMAN G. (1970): Ultrastructural studies of cleavage stage t^{12}/t_{12} mouse embryos. Am. J. Anat. *128*, 311-340.
42) JACKSON B.W., GRUND C., SCHIMID E., BURKI K., FRANKE W.W. and ILLMENSEE K. (1980): Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. Differentiation *17*, 161-179.
43) JOHNSON M.H. (1979): Intrinsic and extrinsic factors in preimplantation development. J. Reprod. Fert. *55*, 255-265.
44) KIDDER G.M. and PEDERSEN R.A. (1982): Turnover of embryonic messenger RNA in preimplantation mouse embryos. J. Embryol. Exp. Morph. *67*, 37-49.
45) KNOWLAND J. and GRAHAM C. (1972): RNA synthesis at the two-cell stage of mouse development. J. Embryol. Exp. Morph. *27*, 167-176.
46) KRATZER P.G., and GARTLER S.M. (1978): HGPRT activity changes in preimplantation mouse embryos. Nature *274*, 503-504.
47) KRCO C.J. and GOLDBER: E.H. (1976): H-Y (male) antigen: detection on eight-cell mouse embryos. Science *193*, 1134-1135.
48) LEVEY I.L., STULL G.B. and BRINSTER R.L. (1978): Poly (A) and

synthesis of polyadenylated RNA in the preimplantation mouse embryo. Develop. Biol. *64*, 140-148.
49) LEWIS S.E. (1978): Developmental analysis of lethal effects of homozygosity for the c^{25h} deletion in the mouse. Develop. Biol. *65*, 553-537.
50) LEWIS W.H. and GREGORY P.W. (1929): Cinematography of living developing rabbit eggs. Sciences *69*, 226-229.
51) LO C.W. and GILULA N.B. (1979): Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. Cell *18*, 399-409.
52) LUTHARDT F.W. and DONAHUE R.P. (1975): DNA synthesis in developing two-cell mouse embryos. Develop. Biol. *44*, 210-216.
53) MAGNUSON T. (1983): Genetic abnormalities and early mammalian development. In: Development in Mammals. Vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 209-249.
54) MAGNUSON T. and EPSTEIN C.J. (1981): Genetic control of very early mammalian development. Biol. Rev. *56*, 369-408.
55) MANGIA F., ERICKSON R.P. and EPSTEIN C.J. (1976): Synthesis of LDH-1 during mammalian oogenesis and early development. Develop. Biol. *54*, 146-150.
56) MINTZ B. (1964): Synthetic processes and early development in the mammalian egg. J. Exp. Zool. *157*, 85-100.
57) MOLINARO M., SIRACUSA G. and MONESI V. (1972): Differential effects of metabolic inhibitors on early development in the mouse embryo, at various stages of the cell cycle. Exp. Cell Res. *71*, 261-264.
58) MONESI V., MOLINARO M., SPALLETTA E. and DAVOLI C. (1970a): Effect of metabolic inhibitors on macromolecular synthesis an early development in the mouse embryo. Exp. Cell Res. *59*, 197-206.
59) MONESI V., MOLINARO M. and SIRACUSA G. (1970b): Sintesi di RNA e proteine ed influenza della actinomicina durante la segmentazione nei mammiferi. Riv. Istochim. norm. patol. *16*, 1-6.
60) MORRIS T. (1968): The XO and OY chromosome constitution in the mouse. Genet. Res. *12*, 125-137.
61) MUGGLETON-HARRIS A., WHITTINGHAM D.G. and WILSON L. (1982): Cytoplasmic control of preimplantation development *in vitro* in the mouse. Nature *299*, 460-462.
62) NIWA K., ARAKI M. and IRITANI A. (1980): Fertilization in vitro of eggs and first cleavage of embryos in different strains of mice. Biol. Reprod. *22*, 1155-1159.
63) OLDS P.J. STERN S. and BIGGERS J.D. (1973): Chemical estimates of the RNA and DNA contents of the early mouse embryo. J. Exp. Zool. *186*, 39-46.
64) PANIGEL M., KRAEMER D.C., KALTER S.S. SMITH F.C. and HEBERLING R.L. (1975): Ultrastructure of cleavage stages and preimplantation embryos of the baboon. Anat. Embryol. *147*, 45-62.
65) PETZOLDT U., HOPPE P.C. and ILLMENSEE K. (1980): Protein syn-

thesis in enucleated fertilized and unfertilized mouse egg. Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol. *189*, 215-219.
66) PIKÒ L. and CLEG: K.B. (1982): Quantitative changes in total RNA, total poly (A), and ribosomes in early mouse embryos. Develop. Biol. *89*, 362-378.
67) QUINN P. and HARLOW G.M. (1978): The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. J. Exp. Zool. *206*, 73-80.
68) REEVE W.J.D. (1981): The distribution of ingested horseradish peroxidase in the 16-cell mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. *66*, 191-207.
69) SAWICKI J.A., MAGNUSON T. and EPSTEIN C.J. (1981): Evidence for the expression of the paternal genome in the two-cell mouse embryo. Nature *294*, 450-451.
70) SCHLAFKE S. and ENDERS A.C. (1967): Cytological changes during cleavage and blastocyst formation in the rat. J. Anat. *102*, 13-32.
71) SCHULTZ G.A. (1975): Polyadenylic acid-containing RNA in unfertilized and fertilized eggs of the rabbit. Develop. Biol. *44*, 270-277.
72) SHAPLEY D. (1983): Techniques for sexing embryos now possible. Nature *301*, 101.
73) SHERMAN M.I. (1979): Developmental biochemistry of preimplantation mammalian embryos. Annu. Rev. Biochem. *48*, 443-470.
74) SIRACUSA G. (1973): RNA polymerase during early development in mouse embryo. Exp. Cell Res. *78*, 460-462.
75) SIRACUSA G. (1976): Attività genetica durante l'embriogenesi iniziale del mammifero. Rassegna sintetica. Acta Embryol. Exp. *1*, 115-135.
76) SIRACUSA G. and VIVARELLI E. (1975): Low-salt and high-salt RNA polymerase activity during preimplantation development in the mouse. J. Reprod. Fert. *43*, 567-569.
77) SIRACUSA G., COLETTA M. and MONESI V. (1975): Duplication of DNA during the first cell cycle in the mouse embryo. J. Reprod. Fert. *42*, 395-398.
78) SIRACUSA G., WHITTINGHAM D.G. MOLINARO M. and VIVARELLI E. (1978): Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. J. Embryol. Exp. Morph. *43*, 157-166.
79) SMITH L.D. and ECKER R.E. (1965): Protein synthesis in enucleated eggs of *Rana pipiens*. Science *150*, 777-779.
80) STEPTOE P.C., EDWARDS R.G. and PURDY J.M. (1971): Human blastocysts grown in culture. Nature *229*, 132-133.
81) STREFFER C., VAN BEUNINGEN D., MOLLS M., ZAMBOGLOU N. and SCHULZ S. (1980): Kinetics of cell poliferation in the pre-implanted mouse embryo *in vivo* and *in vitro*. Cell Tissue Kinet. *13*, 135-143.
82) TROUNSON A.O., MOHR L.R. WOOD C. and LEETON J.F. (1982): Effect of delayed insemination on in-vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. J. Reprod. Fert. *64*, 285-294.

83) VAN BLERKOM J. (1979): Molecular differentiation of the rabbit ovum. III. Fertilization-autonomous polypeptide synthesis. Develop. Biol. *72*, 188-194.
84) WARNER C.M. (1977): RNA polymerase activity in preimplantation mammalian embryos. In: Development in Mammals. Vol 1 (ed. M.H. Johnson). North Holland, Amsterdam, pp. 99-136.
85) WHITTEN W.K. (1956): Culture of tubal mouse ova. Nature *176*, 96-97.
86) WHITTEN W.K. (1957): Culture of tubal ova. Nature *179*, 1081-1082.
87) WHITTEN W.K. (1971): Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. Adv. Biosci. *6*, 129-139.
88) WHITTEN W.K. and BIGGERS J.D. (1968): Complete development in vitro of the preimplantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. J. Reprod. Fert. *17*, 399-410.
89) WHITTINGHAM D.G. and BIGGERS J.D. (1967): Fallopian tube and early cleavage in the mouse. Nature *213*, 942-943.
90) WOODLAND H.R. and GRAHAM C.F. (1969): RNA synthesis during early development of the mouse. Nature *221*, 327-332.
91) WRIGHT R.W. and BONDIOLI K.R. (1981): Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci. *53*, 702-729.
92) WUDL L. and CHAPMAN V. (1976): The expression of β-glucuronidase during preimplantation development of mouse embryos. Develop. Biol. *48*, 104-109.
93) YOUNG R.J., STULL G.B. and BRINSTER R.L. (1973): RNA in mouse ovulatled oocytes. J. Cell Biol. *59*, 372a.

SUMMARY

In vivo and *in vitro* mammalian preimplantation development.

The present review is divided into three parts. We will initially examine the kinetics of cell proliferation and the morphological differentiation of the preimplantation mammalian embryo, up to blastocyst formation. We will then discuss the molecular mechanisms which regulate embryonic development, with particular emphasis on maternal RNA inheritance and the transition to embryonic gene expression. In the final part some general aspects of *in vitro* culture of mammalian embryos are very briefly reviewed. The review mainly deals with mouse embryos, since most of the data have been obtained in this species.

Cleavage is very slow in mammalian embryos, as compared with invertebrate and lower vertebrate embryos. The first mitosis occurs about 24 hr after fertilization in mouse embryos, 34 hr in human embryos. Subsequent cell cycles tend to be shorter (16-10 hr in human embryos). An important characteristic of the cell cycle of the 2-16 cell mouse embryo is the absence, or very short duration of the G_1 phase.

The morphological changes leading to formation of the blastocyst begin in the 8-cell embryo with a progressive extension of intercellular contacts and consequent «compaction» of the embryo. In a compact embryo the individual blastomeres are no larger discernible by light microscopy. Compaction is accompanied, among other changes, by polarization of blastomeres and appearance of specialized junctions between apposed blastomeres. Around the apical surface of the external blastomeres zonular tight junctions appear, which provide a permeability barrier between the embryo and the external environment, thus allowing the accumulation of blastocoelic fluid inside the embryo, and blastocyst formation.

During the relatively simple morphological development of the mouse from the 1- to the 4-cell stage macromolecular changes of extraordinary complexity occur. Polypeptide changes occur very soon after fertilization. These very early changes (such as the appearance at the early 2-cell stage of a complex of ∽ 35000 m.w. polypeptides) do not represent expression of the embryonic genome, but delayed translation of maternally inherited mRNAs, which are already present in the oocyte and ufertilized egg. Maternally inherited RNAs are rapidly eliminated during the late 2-cell stage, while a major activation of the embryonic genome occurs; studies with transcriptional inhibitors show that such activation is essential for further embryonic development. The embryonic genome is not only precociuosly transcribed, but also precociously translated, as shown by the very early appearance of paternal gene products.

Most of the biochemical studies on early embryonic differentiation in mammals have been made possible by preliminary meticulous work aimed to optimize *in vitro* culture conditions (such as optimal pH, pO_2, osmolarity, etc). in chemically defined media. In addition, these studies have shown that during preimplantation development the mouse embryo undergoes a progressive expansion in its ability to utilize exogenous energy sources, from being able to metabolize pyruvate only at the 1-cell stage to reaching less restricted energetic requirements at the 8-cell stage.

Although no similar studies have been made with human oocytes and embryos, these appear to be able to be fertilized and to develop in media generally devised for oocytes and embryos of other species. It may be hypothesized, however, that the high embryonic loss and low success of implantation and development which is currently accepted as «normal» in the human might be at least in part the consequence of sub-optimal culture conditions.

J.P. RENARD *

LA CONSERVAZIONE DEGLI EMBRIONI DI MAMMIFERI

INTRODUZIONE

L'idea di utilizzare il freddo per conservare i tessuti biologici fu sperimentata con successo la prima volta fin dal 1912 da Alexis Carrel che praticò degli innesti «a partire da una provvista di tessuti ossei in vita latente, costantemente pronti per essere utilizzati». Ma a segnare i veri inizi della criobiologia sono da una parte i lavori di Luyet e Gehenio (1940) che hanno messo in evidenza che la maggior parte degli organismi che resistono al congelamento in natura lo fanno in condizioni di disidratazione parziale, da un'altra parte quelli di Polge, Smith e Parkes (1949) che scoprirono le propietà criopotettrici del glicerolo utilizzato con successo per la conservazione dei globuli rossi e degli spermatozoi.

Alcuni anni più tardi, Smith (1952) stabiliva chiaramente che l'esposizione di embrioni di coniglio a basse temperature (–79° e –196°C) non era incompatibile con il proseguimento dello sviluppo per parecchie divisioni segmentative.

Ma è nel 1972 che due équipes, utilizzando embrioni di topo, hanno potuto stabilire la possibilità di ottenere dei neonati vitali a partire da embrioni conservati congelati in azoto liquido per parecchie settimane prima dello scongelamento e del trasferimento in una madre ricevente (Whittingham et al. 1972, Wilmut et al. 1972). Oggi è possibile congelare gli embrioni di 7 specie di mammiferi.

In questa rassegna ci proponiamo di descrivere, alla luce delle attuali conoscenze di criobiologia, i metodi utilizzati per il congelamento degli embrioni di mammiferi. L'impiego di questi metodi si sviluppa rapidamente sia per assicurare la costituzione di banche di embrio-

* INRA - Station de Physiologie animale - Jouy-en-Josas. Indirizzo attuale: Institut Pasteur - Unité de Genetique des Mammiferes - 25, Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15 - France.

ni (Renard et al. 1984) sia per rispondere ai bisogni dell'allevamento: in tal modo per la specie bovina si stima che nel 1983 più di 30.000 vitelli provenienti da embrioni congelati sono nati nel mondo dopo trasferimento nell'utero di una madre ricevente. L'applicazione di questi metodi all'embrione umano è divenuta una questione di attualità (Trounson et al. 1984) che ci sembra tuttavia porre più dei problemi etici e giuridici importanti per la nostra società, che interrogativi nuovi al criobiologo.

I - MODIFICAZIONI SUBITE DALLE CELLULE EMBRIONALI NEL CORSO DEL CONGELAMENTO-SCONGELAMENTO

I principi utilizzati per il congelamento degli embrioni sono stati descritti in questi ultimi anni in parecchie rassegne sintetche (Whittingham 1977, Polge e Willadsen 1978, Leibo 1981). Queste dimostrano che dal punto di vista della criobiologia le cellule embrionarie non sono differenti da altri tipi cellulari come i microorganismi o i globuli rossi. L'embrione può anche rivelarsi un buon modello per lo studio delle modificazioni che subiscono le cellule dopo la aggiunta di crioprotettore prima del congelamento fino al suo recupero dopo lo scongelamento.

A. - *Aggiunta del crioprotettore*

La sopravvivenza degli embrioni è possibile solo se si aggiunge un solvente organico al medium di sospensione. Queste sostanze, o crioprotettori, modificano le propietà fisiche delle soluzioni (Farrant e Woolgar 1970), sostituendosi in modo specifico ad una parte dell'acqua cellulare e abbassando il suo punto di congelamento. Parecchie molecole sono state usate con successo soprattutto il dimetilsulfossido (DMSO) ed il glicerolo (Whittingham 1980). Ma altri composti come il glicole etilenico (Miyamoto e Ishibashi 1978), il 1-2 Propandiolo (Renard e Babinet 1984), l'eritriolo (Miyamoto e Ishibashi 1981), il metanolo (Rall et al. 1984) si sono rivelati ugualmente molto efficaci. Queste sostanze possono essere aggiunte al mezzo di sospensione degli embrioni a temperatura ambiente ed il loro «effetto tossico» è poco marcato. Nel corso di questo periodo di equilibramento i crioprotet-

tori penetrano nelle cellule come è stato dimostrato per il glicerolo con embrioni di topo (Jackowki et al. 1980). Tuttavia l'effetto protettore può essere ottenuto senza penetrazione completa, poiché un'esposizione brevissima (6 secondi soltanto) degli embrioni di topo ad una soluzione contenente glicole etilenico assicura dopo scongelamento un tasso di sopravvivenza superiore all'80% (Leibo et al. 1974, Miyamoto e Ishibashi 1978). Gli studi effettuati con il glicerolo (tab. 1A) dimostrano che la permeabilità delle cellule embrionarie a questo crioprotettore dopo la fecondazione aumenta rapidamente nel corso dello sviluppo allo stadio di blastocisti: la penetrazione è circa 1000 volte più rapida nelle cellule della blastocisti di bovino che nell'uovo fecondato di topo. Il coefficente di permeabilità è indipendnte dalla concentrazione iniziale di glicerolo, ma aumenta con la temperatura. Nel topo, per esempio, esso aumenta di un fattore di 2,5, per ogni aumento di temperatura di 10°C (Jackowski et al. 1980).

In pratica l'osservazione delle modificazioni di volume degli embrioni nel corso della aggiunta del crioprotettore e poi il loro ritorno allo stato normale permette di determinare approssimativamente la durata minima di esposizione compatibile con la penetrazione nelle cellule. Per le blastocisti di bovino una durata di esposizione di 15 minuti a 20°C permette la penetrazione completa del glicerolo 1,5M; con questi embrioni (tab. 1B) la modalità di aggiunta del glicerolo – progressivamente per tappe o direttamente in una sola volta – ha poca influenza sulla vitalità dopo scongelamento.

B. - *Cambiamento di fase del mezzo*

Esso avviene a –4.2°C in presenza di glicerolo 1,5M. Le osservazioni al criomicroscopio (Leibo et al. 1975) mostrano che quando la cristallizzazione compare nel mezzo di sospensione degli embrioni questi vengono ad essere progressivamente attorniati dal ghiaccio extracellulare senza che si produca cambiamento di fase all'interno delle cellule: la proliferazione del ghiaccio viene dunque arrestata dalle barriere costituite dalle membrane. Queste sono sottoposte alle concentrazioni crescenti in soluti della fase ancora liquida del mezzo di sospensione. L'equilibrio osmotico del citoplasma è mantenuto dall'uscita di acqua fuori dalla cellula che diminuisce di volume. Se la cristallizzazione

TAB. 1

AGGIUNTA DEL CRIOPROTETTORE A TEMPERATURA AMBIENTE

A. - Permeabilità degli embrioni di Topo e di Bovino al glicerolo a temperatura ambiente (20°-23°C)

Specie	Stadio di sviluppo	Coefficiente di permeabilità (Cm/min)	Riferimento bibliografico
Topo	1 cellula non fecondata	2×10^{-6}	JACKOWSKI et al. 1980
	fecondata	$1,3 \times 10^{-6}$	
Bovino	Morula Blastocisti	$2,2 \times 10^{-3}$	SCHNEIDER et MAZUR 1984

B. - Effetto della modalità di aggiunta del glicerolo sulla vitalità della blastocisti di Bovino a temperatura ambiente. (RENARD et HEYMAN 1983)

Studio in vitro: Numero (%) di blastocisti sgusciate dopo 48 h di coltura.

Trattamento	Aggiunta in più passaggi 0,5M; 1,0M 1,5M 3 passaggi di 15 min	Aggiunta in un passaggio 1,5M - 15 min
congelati	9/15 (60,0)	13/21 (61,9)
controlli (non congelati)	8/11 (72,7)	7/11 (63,6)

Studio in vivo: Numero (%) dei feti a 90 giorni in rapporto al numero degli embrioni congelati.

Trattamento	Aggiunta in più passaggi 0,5M; 1,0M; 1,5M	Aggiunta in un passaggio 1,5M - 15 min
congelati	16/33 (48,5)	14/31 (45,1)

compare prima nelle cellule dell'embrione, i fenomeni si invertono e agli effetti meccanici di distruzione delle membrane interne da parte del ghiaccio intracellulare si aggiungono quelli provocati dalla penetrazione dell'acqua nelle cellule che si gonfiano. La forma dei cristalli che si formano possono deformare considerevolmente la zona pellucida (Jondet et al. 1984). Essa dipende anche dalla rapidità con la quale viene congelato il campione dopo la cristallizzazione (Leibo 1977).

In pratica si constata che il tasso di sopravvivenza degli embrioni non viene modificato quando il cambiamento di fase del mezzo viene indotto a temperature inferiori da 1 a 4°C circa al punto di congelamento delle soluzioni (Smorag 1977), ossia entro –6 e –9°C per una soluzione isotonica di NaC1 contenente 1,5M di glicerolo.

La disidratazione parziale delle cellule a temperatura ambiente, aumentando la concentrazione del citoplasma, permette di prevenire l'inizio della cristallizzazione all'interno della cellula: come vedremo più oltre, si può allora congelare direttamente gli embrioni senza ricorrere all'induzione della cristallizzazione.

C. - *Disidratazione delle cellule e congelamento*

Disidratazione nel corso del congelamento

Il grado di disidratazione delle cellule dell'embrione è legato alla durata del processo di congelamento. Questa durata è in generale definita dalla rapidità di variazione della temperatura fra l'inizio del congelamento (cambiamento di fase del mezzo extra-cellulare) e l'immersione in azoto liquido. Per una data temperatura il grado di disidratazione delle cellule dipende da tre parametri (Leibo 1977):

- il rapporto fra la superficie delle cellule e il loro volume;
- la conducibilità idraulica (coefficiente di permeabilità all'acqua);
- la sua attivazione d'energia (variazione di questo coefficiente con la temperatura).

Si sono potuti determinare i valori di questi tre parametri per l'embrione di topo allo stadio di una cellula (Leibo 1980). Comparati ai valori conosciuti per altri tipi di cellule (es. globuli rossi umani), sembra che l'embrione abbia conducibilità idraulica e rapporto superficie-volume bassi e un coefficiente di attivazione di energia elevato, ciò che riduce la rapidità con la quale la cellula si disidrata quando la tempe-

TAB. 2

VITALITÀ DEGLI EMBRIONI DI TOPO E DI BOVINO CONGELATI IN AZOTO LIQUIDO DOPO DISIDRATAZIONE A BASSA TEMPERATURA

Riferimento bibliografico	Metodo	Durata approssimativa (min)	Tasso di sopravvivenza (%) embrioni sviluppati / embrioni congelati	
			in vitro	*in vivo*
Topo				
WHITTINGHAM et al. (1979)	– cristallizzazione a –6°C – 0,3°C/min fino a –40°C poi in azoto liquido	~ 120	77/108 (71,2)	160/251 (63,7)
KASAI et al. (1980)	– cristallizzazione a –6°C – 10 min a –20°C – 10 min a –100°C poi in azoto liquido	~ 30	50/61 (82,0)	—
WOOD et FARRANT (1980)	– cristallizzazione a –9°C – 15 min a –20°C poi in azoto liquido	~ 20	15/23 (65.0)	—
MIYAMOTO et ISHABASHI (1983)	– pas de cristallizzazione – 10 min a –70°C poi in azoto liquido	~ 15	53/85 (62,0)	—

(segue)

Riferimento bibliografico	Metodo	Durata approssimativa (min)	Tasso di sopravvivenza (%) embrioni sviluppati / embrioni congelati	
			in vitro	*in vivo*
Bovino				
WILLADSEN et al. (1978)	– cristallizzazione a –7°C – 0,3°C/min fino a –35°C – 0,1°C/min fino a –60°C passaggio in azoto liquido	∽ 340	—	7/12 (58,3)
RENARD et al. (1982)	– cristallizzazione a –7°C – 0,3°C/min fino a –30°C – 15 min a –30°C passaggio in azoto liquido	∽ 95	—	11/22 (50,0)
LEHN-JENSEN (1983)	– cristallizzazione a –5°C – 1°C/min fino a –25°C passaggio in azoto liquido	∽ 30	—	7/16 (44,0)

ratura decresce. Questo spiega il fatto che i tempi di congelamento ottimali (determinati empiricamente) che permettono di disidratare le cellule dell'embrione di topo sono lenti, dell'ordine da 0,2 a 0,8°C/min. A queste velocità, la disidratazione delle cellule si realizza verso –60°C (Leibo 1980).

Ora, si è dimostrato, specialmente con embrioni di topo e di bovino, che la sopravvivenza non era diminuita quando si interrompeva il congelamento immergendo gli embrioni nell'azoto liquido a temperature comprese fra –20°C e –40°C. Le cellule embrionarie possono dunque sopportare una certa quantità di ghiaccio intracellulare. L'osservazione al criomicroscopio rileva che questo non si forma nel corso del congelamento, ma soltanto durante lo scongelamento lento (Rall et al. 1984). Ciò consente, modificando la rapidità d'abbassamento della temperatura o mantenendo gli embrioni a una temperatura data, di ridurre notevolmente (fino a 4 volte) la durata del congelamento senza alterarne l'efficacia (tab. 2).

Disidratazione parziale a temperatura ambiente

Ponendo gli embrioni in una soluzione contenente un soluto, come il saccarosio, che non penetra all'interno delle cellule, si può per semplice effetto osmotico realizzare una disidratazione parziale delle cellule prima del congelamento. Questo trattamento permette di conservare per parecchi giorni a 0°C embrioni di topo e di ratto (Kasai et al. 1983). Noi abbiamo dimostrato recentemente che si poteva associare questo effetto con l'azione di un crioprotettore permeabile (il propandiolo) per congelare direttamente a –30°C embrioni di coniglio (Renard et al. 1984). Sembra inoltre che la presenza di saccarosio nel mezzo di congelamento permetta di ridurre l'effetto tossico di forti concentrazioni intracellulari di crioprotettore (osservazioni non pubblicate), dunque di favorire la formazione di ghiaccio amorfo all'interno delle cellule. Questo approccio (tab. 3) dovrebbe permettere di semplificare i metodi di congelamento degli embrioni.

D. - *Scongelamento*

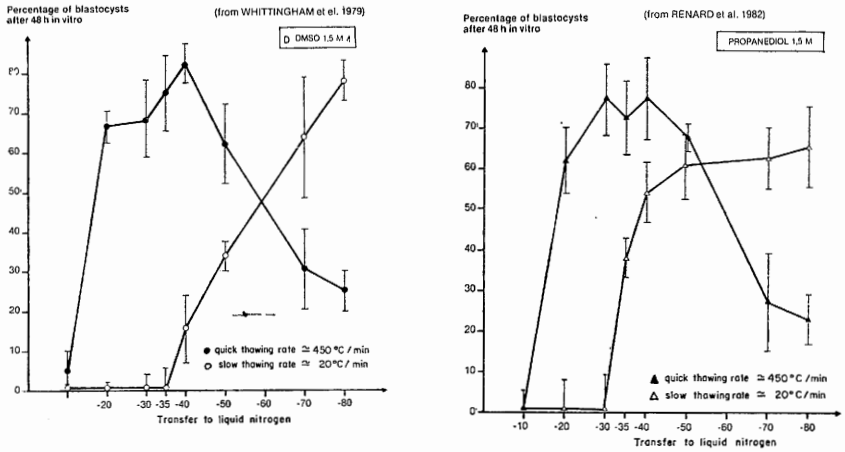
I lavori effettuati con gli embrioni di topo (Leibo et al. 1974; Whittingham et al. 1979) dimostrano che, quando le cellule sono for-

TAB. 3

VITALITÀ DEGLI EMBRIONI CONGELATI DOPO DISIDRATAZIONE PARZIALE A TEMPERATURA AMBIENTE IN PRESENZA DI SACCAROSIO

Specie (Rif. bibliogr.)	Pre-trattamento a +20°C	Congelamento Metodo	Durata (min)	Tasso di sopravvivenza (%) embrioni sviluppati / congelati *in vitro*	*in vivo*
Coniglio RENARD et al. (1984)	2,2M propanediol + 0,5M saccarosio	immersione in azoto liquido	< 0,5	4/48 (8,3)	—
		–30°C per 30 min, poi in azoto liquido	≃ 35	48/54 (88,8)	21/71 (33,8)
Topo TAKEDA et al. (1984)	3,0M glicerolo + 0,25M saccarosio	immersione in azoto liquido	< 0,5	59/65 (90,0)	—
Bovino BUI-XUAN NGUYEN (1984)	1,5M glicerolo + 1,0M saccarosio	–30°C per 30 min, poi in azoto liquido	≃ 35	33/53 (63,4)	7/21 (33,3)

temente disidratate – dunque dopo congelamento lento (0,18°C/min. a 0,57°C/min.) fino a temperature inferiori a –60°C – la loro sopravvivenza è elevata (superiore al 70%) quando si effettui un riscaldamento lento (3°C a 20°C/min.). Questo permette alla cellula nel corso dello scongelamento di riprendere progressivamente le sue dimensioni normali, limitando le variazioni osmotiche, più brutali a rapidità elevate (Farrant 1977). Questi effetti osmotici sulla cellula variano secondo la natura del crioprotettore impiegato. Essi sono elevati con il DMSO e il propandiolo, ma ridotti con il glicerolo. Con questo crioprotettore gli embrioni di topo congelati lentamente almeno fino a –50°C possono sopravvivere sia dopo scongelamento rapido che dopo scongelamento lento, mentre non è così con il DMSO o il propandiolo (Fig. 1). Queste differenze risultano direttamente correlate alle pro-



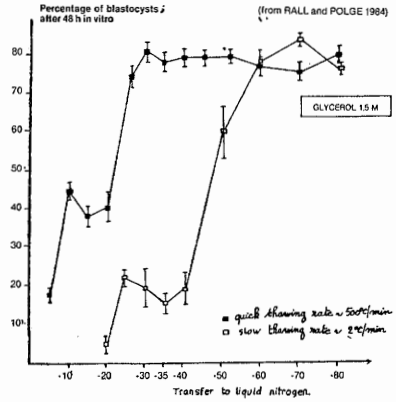


Fig. 1 - Effetto della velocità di scongelamento e del crioprotettore sul tasso di sopravvivenza degli embrioni congelati lentamente (0,3°C/min) allo stadio di 8 cellule prima dell'immersione in azoto liquido.

prietà fisiche dei crioprotettori: infatti il glicerolo, più viscoso del DMSO o del propandiolo, limita gli shocks osmotici nel corso dello scongelamento rapido.

Al contrario, quando le cellule contengono una certa quantità di ghiaccio intracellulare (cioè quando la rapidità di congelamento è elevata, o quando il passaggio degli embrioni direttamente nell'azoto liquido è effettuato prima di –50°C), la sopravvivenza è buona (>50%) solamente se la rapidità di scongelamento è elevata (>200°C/min.).

Il riscaldamento rapido limita l'importanza della ricristallizzazione del ghiaccio amorfo. Qui interviene ancora la natura del crioprotettore impiegato: quelli che, come il propandiolo, favoriscono la stabilità dello stato amorfo (Boutron e Kaufman 1979) permettono, anche a rapidità lenta, tassi di sopravvivenza più elevati. Questo permette di spiegare perché i tassi di sopravvivenza degli embrioni congelati lentamente fino a –40°C e scongelati lentamente (20°C/min.) sono più elevati quando si utilizzi il propandiolo del DMSO.

E. - *Allontanamento del crioprotettore*

L'allontanamento del crioprotettore è necessario per permettere la sopravvivenza ulteriore degli embrioni (Willadsen et al. 1976; Lehn-Jensen 1980). Contrariamente ad altri tipi cellulari come i globuli rossi (Woolgar e Morris 1973) gli embrioni sono sensibili agli shocks osmotici che si producono quando le cellule contenenti una concentrazione elevata di crioprotettore sono poste in un mezzo salino isotonico. I movimenti dell'acqua attraverso la membrana cellulare, più rapidi di quelli dei soluti, vanno a provocare il rigonfiamento delle cellule che tendono a realizzare l'equilibrio osmotico; questo rigonfiamento, anche se limitato meccanicamente dalla zona pellucida, è spesso sufficiente a provocare la loro rottura. I lavori di Mazur (1963) hanno permesso di definire, a partire da modelli matematici, le variazioni di volume della cellula nel corso della diluizione del crioprotettore. Questi dati applicati all'embrione permettono di ottimizzare le condizioni di diluizione. La figura 2 dimostra la variazione teorica di volume di una blastocisti di bovino nel corso dell'allontanamento del crioprotettore. In pratica la diluizione per tappe in soluzioni contenenti quantità decrescenti di crioprotettore permette di limitare la rapidità di pene-

trazione dell'acqua nella cellula. La diluizione in una sola tappa in presenza di un composto che non penetra nelle cellule (saccarosio) permette egualmente la diluizione progressiva del crioprotettore per semplice diffusione passiva, come è stato dimostrato nel topo (Leibo e al. 1975) e nel bovino (Renard e al. 1982; Leibo 1983).

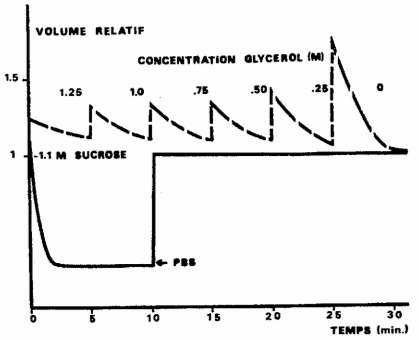


Fig. 2 - Variazioni di volume della blastocisti di bovino durante la diluizione del glicerolo 1,5 M in più passaggi (— — —) o con saccarosio (——). Modello secondo Schneider e Mazur (1984).

Conclusione: natura dei danni cellulari

La descrizione dei principali avvenimenti che si producono dopo l'aggiunta del crioprotettore prima del congelamento fino al suo allontanamento dopo lo scongelamento permette di precisare la natura dei principali danni ai quali sono esposte le cellule degli embrioni. Questi danni sono legati 1) alla formazione dei cristalli di ghiaccio; 2) alle modificazioni delle proprietà fisico chimiche delle soluzioni; 3) alle modificazioni delle membrane.

Allo stato congelato l'ambiente cellulare deve essere visto come una fine trama di ghiaccio che si interpenetra in una fase vetrosa (Luyet 1970). Anche a temperature bassissime (–60°C) una frazione delle soluzioni rimane non congelata ed è sottoposta a dei gradienti di concentrazione in soluti elevati. Le velocità di congelamento e di scongelamento giuocano un ruolo importante, poiché esse definiscono la forma dei cristalli: un congelamento lento favorisce la formazione di cristalli di tipo esagonale; quando la velocità è più elevata i cristalli pren-

dono una forma irregolare; con velocità molto alta, essi diventano piccoli (sfere).

L'ambiente cellulare e il mezzo di sospensione degli embrioni possono ambedue essere considerati come soluzioni composte, le cui proprietà fisicochimiche dipendono dalle relazioni fra gli ioni, le molecole non ionizzate e le molecole d'acqua che fortemente polarizzate tendono a circondare i soluti respingendo i solventi meno polari. Noi abbiamo menzionato precedentemente l'effetto benefico della viscosità delle soluzioni di glicerolo nel corso d'uno scongelamento rapido; tale effetto è legato alle variazioni di densità dei solventi organici con la temperatura.

Le conseguenze sui movimenti dell'acqua all'interno delle cellule o la cinetica delle reazioni enzimatiche sono ancora mal conosciute (Douzou 1977). Le membrane che separano le cellule dal mezzo esteriore, come pure i diversi scomparti cellulari sono egualmente sottoposti ad effetti meccanici importanti che cominciano ad essere oggi meglio conosciuti ed il concetto d'accrescimento totale della superficie cellulare (TSAI) viene attualmente proposto per spiegare le possibilità di sopravvivenza dopo scongelamento (Steponkus et al. 1981).

La visualizzazione diretta per «freeze fracture» dei danni subiti dalla membrana plasmatica dei globuli rossi dopo congelamento e/o scongelamento (Fujikawa 1980) suggerisce che il ghiaccio intracellulare disorganizza localmente il doppio strato di lipidi delle membrane. Questo compare sulla superficie esterna marcato da zone di depressione (da 400 a 3.000 Å di diametro) che rendono fragile la membrana e sono responsabili dell'emolisi dopo scongelamento. Il ghiaccio intracellulare e la tensione esercitata durante il congelamento nel mezzo esteriore sarebbero, principalmente per azione meccanica, responsabili delle modificazioni subite dalle membrane a bassa temperatura. Le modificazioni delle proteine sarebbero le principali responsabili dei danni irreversibili delle membrane. Lo stabilirsi di ponti di solfuro fra le loro molecole contribuisce alla dissociazione dei foglietti lipidici e alla «fissazione» irreversibile delle lacerazioni provocate dal ghiaccio (Levit e Dear 1970).

Questi dati dimostrano che un migliore approccio biofisico delle modificazioni subite dalle cellule nel corso del congelamento e dello scongelamento è oggi necessario per rendere più efficaci i metodi di conservazione degli embrioni a bassa temperatura.

TAB. 4

EFFICACIA ATTUALE DEI METODI DI CONGELAMENTO DEGLI EMBRIONI DI MAMMIFERO

$$\text{EFFICACIA} = \frac{\text{FETI o NEONATI VIVI}}{\text{EMBRIONI CONGELATI}}$$

Specie	Stadio di sviluppo dell'embrione congelato	% embrioni normali allo scongelamento (A)	% di impianto o gestazione (B)	Efficacia (A) x (B)	Osservazioni	Rif. bibliogr.
Topo	8 cellule	71,1	76,0 (57/75)	54,0	DMSO 1,5M	WHITTINGHAM et al. 1979
	» »	Tutti gli embrioni trasferiti	65,9 (124/188)	65,9	Propandiolo 1,5M	RENARD et BABINET 1984
Ratto	Morula	72,1	50,0 (11/22)	36,0	Ethylene glycol o glicerolo 1,5M	KASAI et al. 1982
	Blastocisti	52,1	52,1 (12/23)	30,0	DMSO 1,5M	WOOD e WHITTINGHAM, 1981
Coniglio	Morula	86,2	55,8 (46/86)	48,1	DMSO 1,5M	RENARD et al. 1982 b
Pecora	Morula – Blastocisti	Tutti gli embrioni trasferiti	43,0 (72/166)	43,0	Migliori risultati con DMSO o Ethylene glycol che con glicerolo	TERVIT et GOOLD 1984
Capra	8-16 cellule	—	36,0 (22/61)	36,0	DMSO o glicerolo	RAO et al. 1983
Bovino	Blastocisti	96,1	68,8 (296/430)	66,1	transferimento chirurgico	CHRISTIE et al. 1982
		Tutti gli embrioni trasferiti	46,8 (30/64)	46,8	transferimento cervicale	RENARD et al. 1983 b
Cavallo		73,9	53 (9/17)	39,1	Tasso di gestazione a 50 giorni	SLADE et al. 1984
Suino			Nessun successo			

II - EFFICACIA DEI METODI DI CONGELAMENTO

L'efficacia reale dei metodi di congelamento espressa dal tasso di feti o neonati ottenuti in rapporto al numero di embrioni congelati è indicata nella tabella 4. I risultati dimostrano che per parecchie specie, come il topo ed il bovino è possibile ottenere tassi di sopravvivenza superiori al 65%, vicini a quelli che risultano da trasferimento di embrioni non congelati.

A. - *Valutazione della vitalità degli embrioni dopo scongelamento*

Nel topo esiste una relazione stretta fra la percentuale di embrioni con aspetto morfologico normale dopo congelamento-scongelamento allo stadio di otto cellule, la percentuale di quelli che si sviluppano allo stadio di blastocisti dopo 48 ore di coltura e la percentuale di neonati vitali dopo trasferimento in vivo di embrioni coltivati (Maurer et al. 1977; Whittingham 1977). Si può dunque per questa specie valutare con precisione la vitalità degli embrioni dopo scongelamento. Non è questo il caso per le altre specie. Così nella coniglia e nella vacca la mortalità embrionaria dopo trasferimento di embrioni coltivati soltanto per 24 h. a +37°C è elevata (Binkerd e Anderson 1979; Renard et al. 1980). Nella vacca questa mortalità embrionaria si manifesta tardivamente in coincidenza con il momento dell'impianto, ossia oltre il 35° giorno di gestazione: in questo caso non si può valutare con precisione la vitalità degli embrioni conservati o congelati che a partire dai tassi di gestazione ottenuti oltre il secondo mese di gestazione (Renard et al. 1980).

Una valutazione rapida della vitalità può essere realizzata per mezzo di prove oggettive. A questo proposito la propietà dimostrata dalle cellule viventi di idrolizzare il diacetato di fluoresceina (FDA; composto poco tossico per le cellule) da parte delle esterasi delle membrane è stata applicata alla valutazione della vitalità degli embrioni di topo (Leibo e Mazur 1978) e di bovino (Renard et al. 1982) dopo scongelamento.

La fluoresceina è un composto polare il cui passaggio attraverso la membrana cellulare è più lento di quello dell'estere, composto non polare che penetra rapidamente. La fuorosceina in alcuni minuti si ac-

cumula nel citoplasma prima di diffondere all'esterno. Questa prova permette di reperire le cellule non vitali degli embrioni quando esse sono individualizzate prima dello stadio di compattazione. Così nel topo l'attitudine dell'embrione allo stadio di otto cellule a trattenere la fluorosceina dopo congelamento è fortemente correlata con la sua attitudine a proseguire il suo sviluppo a termine (Leibo 1981). A stadi ulteriori, come per esempio nella blastocisti di bovino questo metodo non permette una valutazione della vitalità più precisa della semplice osservazione morfologica dopo un breve periodo di coltura. In pratica combinando fra loro più metodi si possono selezionare quegli embrioni scongelati il cui tasso di sviluppo in vivo dopo trasferimento sarà presumibilmente elevato (Renard et al. 1982).

B. - *Stadio di sviluppo per il congelamento*

La scelta del miglior stadio di sviluppo per il congelamento degli embrioni è in generale definito dalle condizioni di raccolta e di trasferimento. Così nel bovino queste operazioni sono facilmente realizzabili quando l'embrione si trova nell'utero dell'animale e ciò corrisponde agli stadi di morula e di blastocisti. Soltanto gli embrioni di topo sono stati congelati con successo a tutti gli stadi di sviluppo dallo stadio di oocita non fecondato fino alla blastocisti (Whittingham et al. 1972; Whittingham 1974). In generale gli embrioni di questa specie sono congelati allo stadio di otto cellule; questo facilita la valutazione della loro vitalità dopo scongelamento, poiché si può facilmente osservare il loro cambiamento di forma in coltura in vitro allorquando si forma la blastocisti.

Ma la scelta dello stadio dipende anche dalla sensibilità dell'embrione all'abbassamento della temperatura, sensibilità che evolve nel corso dello sviluppo soltanto in certe specie. Così la sopravvivenza dell'embrione precoce di bovino è debole dopo un semplice raffreddamento momentaneo a 10°C (Wilmut et al. 1975) mentre non è così a stadi ulteriori di sviluppo (Trounson et al. 1976): tale migliore sopravvivenza embrionaria all'abbassamento della temperatura corrisponde al momento in cui si osserva la scomparsa delle numerosissime vescicole lipidiche che sono abbondanti allo stadio di otto cellule ma meno numerose allo stadio di blastocisti.

Quando l'embrione esce dalla sua pellucida (a partire dal 9° giorno dopo la fecondazione) la sopravvivenza dopo congelamento è di nuovo debole (Tervit et al. 1981): questo stadio è caratterizzato da una diminuzione del tenore in lipidi dell'embrione (Menezo et al. 1982). Le inclusioni lipidiche sembrano dunque giocare un ruolo nefasto nel mantenimento della vitalità dell'embrione dopo scongelamento. Nel maiale, il cui embrione non si è potuto a tutt'oggi né congelare e neanche raffreddare al di sotto dei 15°C con successo, le vescicole lipidiche sono importanti ed il loro aspetto viene profondamente modificato da ogni abbassamento della temperatura (Norberg 1976; Wilmut 1972).

C. - *Effetto della qualità dell'embrione*

Per un dato stadio di sviluppo il tasso di sopravvivenza dopo scongelamento diminuisce rapidamente, quando la qualità dell'embrione prima del congelamento è cattiva. La nozione molto soggettiva di qualità di un embrione deve essere compresa come definizione della sua attitudine a dare un neonato vitale dopo trasferimento.

Nella pratica, la qualità di un embrione si definisce per lo più a partire dal suo aspetto morfologico: così è per esempio per la blastocisti di bovino dove la presenza di blastomeri degenerati nel blastocele o fra l'embrione e la zona pellucida permette di distinguere gli embrioni «buoni», senza anomalia morfologica, dagli embrioni «medi» che presentano più blastomeri degenerati e dagli embrioni degenerati di cui i 2 tessuti che costituiscono il bottone embrionario e il trafoblasto sono disorganizzati. Queste anomalie modificano la velocità di sviluppo dell'embrione ed il suo grado di sincronizzazione con l'organismo materno (Seidel 1981). Ma la nozione di qualità si definisce anche a partire da dati sulla fisiologia dello sviluppo dell'embrione prima della sua utilizzazione. Questi dati possono concernere l'ovulazione (superovulazione per via ormonale od ovulazione naturale) o la fecondazione (*in vivo* o *in vitro*). La tabella 5 indica quale è l'effetto della qualità dei vari tipi di embrioni sulla loro vitalità dopo scongelamento. Essa mostra che in assenza di congelamento anomalie o manipolazioni dello sviluppo dell'embrione possono non avere conseguenze sul loro tasso di sopravvivenza dopo trasferimento; al contrario la conservazione a bassa temperatura può ridurre rapidamente la loro vitalità.

TAB. 5

EFFETTO DELLA QUALITÀ DELL'EMBRIONE PRIMA DEL CONGELAMENTO SUL TASSO DI SOPRAVVIVENZA DOPO SCONGELAMENTO

A. Vitalità delle blastocisti di bovino secondo la loro qualità alla raccolta.

Vitalità stimata	Trattamento	Qualità dell'embrione alla raccolta		Rif. bibliogr.
		Buona (nessuna anomalia)	Media (più blastomeri degenerati)	
in vitro	congelate	73,8 (31/42)	50,0 (10/20)	RENARD et al. 1983
	non congelate	100,0 (18/18	71,4 (10/14)	
in vivo	congelate	40,0 (197/496)	27,0 (21/78)	SHEA 1981
	non congelate	56,0 (376/672)	44,0 (57/130)	SHEA et al. 1983

B. Vitalità degli embrioni di topo prodotti per fecondazione *in vitro* o *in vivo*.

Vitalità stimata	Trattamento	Tasso di sopravvivenza secondo il tipo di fecondazione		Rif. bibliogr.
		in vivo	in vitro	
in vitro	2c/congelati	60,0 (102/174)	46,0 (40/87)	BERNARD e FULLER 1983
	2c/non congelati	93,0 (71/76)	72,0 (38/53)	
in vivo	blastocisti congelate	10,7 (11/103)	11,7 (16/137)	MASSIP et al. 1984

C. Vitalità di morule di coniglio prodotte per ovulazione naturale o dopo trattamento superovulatorio.

Vitalità stimata	Trattamento	Tipo di ovulazione		Rif. bibliogr.
		Naturale	Superovulazione	
in vivo (neonati / embrioni congelati)	congelate	55,8 (48/86)	27,7 (20/72)	RENARD et al. 1982
	non congelate	56,3 (76/135)	38,5 (67/174)	

D. - *Durata della conservazione*

Gli embrioni vengono per ragioni pratiche conservati in azoto liquido a –196°C o nei vapori di azoto a –150°C. A queste temperature, inferiori a quella che permette la transizione vetrosa del ghiaccio (–130°C), le sole reazioni che si possono produrre sono quelle indotte dalle radiazioni ionizzanti, i cui effetti si accumulano con la durata dello stoccaggio (Lyon et al. 1977). Benché gli embrioni di topo sembrino essere più sensibili alle radiazioni agli stadi di 4 e 8 cellule che allo stadio di blastocisti (Dufrain e Casarett 1976), è ora stabilito per questa specie che la vitalità non è alterata dopo un'esposizione per parecchi mesi all'azoto liquido pari all'equivalente di 2000 anni circa di radiazioni (Glenister et al. 1984). Non sembra dunque esistere ostacolo alla conservazione degli embrioni in azoto liquido per lunghissimi periodi.

Conclusione: Applicazione all'uomo

In una dozzina d'anni i metodi di conservazione degli embrioni di mammiferi si sono rapidamente sviluppati e la loro applicazione all'uomo è oggi all'ordine del giorno. Parecchie équipes hanno dimostrato nei loro esperimenti di laboratorio che la ripresa normale delle divisioni segmentative dell'embrione umano dopo congelamento può essere ottenuta applicando metodi messi a punto per il topo o per il bovino. Sul piano scientifico il congelamento dell'embrione umano non pone problemi veramente nuovi, contrariamente a quanto accade con certe specie come il maiale, e l'abbiamo già visto. Inoltre con il passare del tempo si constata che il congelamento dell'embrione di mammiferi non si accompagna all'aumento del tasso di anomalie dello sviluppo. L'effetto di «tutto o niente» del congelamento rende le tecniche proposte affidabili e soltanto la loro efficacia può essere migliorata.

La complessità dei problemi non è dunque di ordine scientifico, ma principalmente giuridico ed etico. Le numerose questioni sollevate dal congelamento dell'embrione umano sono sempre più frequentemente poste alla comunità scientifica dal mondo non scientifico (Revillard 1983; de Dinechin 1983). In Francia è stato creato recente-

mente un Comitato Consultivo Nazionale di Etica per le scienze della vita e della salute per promuovere un largo dibattito specialmente su queste questioni. Anche il Consiglio d'Europa si è interessato di questi problemi nuovi posti dalla applicazione della scienza (Albanese 1983).

Alcune delle risposte possono progressivamente essere date a parecchie di queste questioni come è stato dimostrato sul piano giuridico con la definizione di un diritto del bambino a nascere (Panthou 1982). La recente nascita in Australia di un bambino proveniente da un embrione congelato mette una volta di più la scienza in posizione di stimolo. Questo «passo travalicato» da qualche scienziato rende più che mai necessaria l'instaurazione di dibattiti sui traguardi delle nuove tecnologie.

Il congelamento affascina, poiché permette di sospendere il tempo. Gli scienziati non dovrebbero fermarsi di fronte a casi come quello sopra riportato per restituire alla Morale le sue vere attribuzioni?

BIBLIOGRAFIA

1) ALBANESE F. (1983): Genetic manipulation and human rights: resolution of the Council of Europe. In: C.H. Merrieux et M. Bonneau (eds). Transfert d'embryons chez les mammifères. Collection Fond Merrieux, 423-430.
2) BERNARD A. and FULLER B.J. (1983): Cryopreservation of *in vitro* fertilized two-cells mouse embryos using a low glycerol concentration and normothermic cryoprotectant equilibration: a comparizon with *in vivo* fertilized ova. Cryo-Letters *4*, 171-178.
3) BINKERD P.E. and ANDERSON G.B. (1979): Transfer of cultured rabbit embryos. Gamete Res. *2*, 65-73.
4) BOUTRON P. and KAUFMANN A. (1979): Stability of the amorphous state in the sistem water, 1-2 propanediol. Cryobiology *16*, 557-568.
5) BUI-XUAN-NGUYEN N., HEYMAN Y. and RENARD J.P. (1984): Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room temperature. Theriogenology (in press).
6) CHRISTIE B. (1982): Soc. for Low Temp. Biol. Autumn Meeting, London (Abstr.).
7) DE DINECHIN O. (1983): Limites éthiques du transfer d'embryons dans l'espèce humaine. In: C.H. Merrieux et M. Bonneau (eds). Transfert d'embryons dans les mammifères. Collection fond Merrieux, 403-406.
8) DOUZOU P. (1977): Properties of mixed solvents. In: P. Douzou (ed), Cryobiochemistry, Academic Press N.Y., 11-90.

9) DUFRAIN R.J. (1976): The effects of ionizing radiations on preimplantation mouse embryos developed *in vitro*. In: Basic aspects of freeze preservation of mouse steams. Ed. O. Muhlbock, Gustav Fisher Verlag, Stutgard, 73-83.
10) FARRANT J. (1980): General observation on cell preservation. In: Low temperature preservation in medicina and biology, 1-18. Eds H. J. Ashwood-Smith and J. Farrant.
11) FARRANT J. and WOOLGAR A.F. (1970): Possible relationship between the physical properties of solutions and cell damage during freezing. In: G.W.F. Wolstenholme and M. O'Connon (eds) The frozen cell, 97-114. J. & A. Churchill, London.
12) FUJKAWA S. (1980): Freeze fracture and etching studies on membrane damage on human erytrocites caused by formation of intracellular ice. Cryobiology *17*, 351-362.
13) GLENISTER P.H., WHITTINGHAM D.G. and LYON M.F. (1984): Further studies on the effect of radiation during the storage of frozen 8-cell mouse embryos at –196°C. J. Reprod. Fert. *70*, 229-234.
14) JACKOWSKI S.C., LEIBO S.P. and MAZUR P. (1980): Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. J. Exp. Zool. *212*, 329-341.
15) JONDET M., DOMINIQUE S. and SCHOLLER R. (1984): Effect of freezing and thawing on mammalian oocyte. Cryobiology *21*, 192-199.
16) KASAI M., NIWA K. and IRITANI A. (1983): Protective effects of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0°C. J. Reprod. Fert. *68*, 377-380.
17) KASAI M., NIWA K. and IRITANI A. (1982): Survival of rat embryos after freezing. J. Reprod. Fert. *66*, 367-370.
18) KASAI M., NIWA K. and IRITANI A. (1980): Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. J. Reprod. Fert. *59*, 51-56.
19) LEHN-JENSEN H. (1983): Survival of cow blastocysts using cooling rate of 1°C/min to –25°C. Theriogenology *19*, 138.
20) LEHN-JENSEN H. (1980): Bovine egg transplantation. Nord. Vet. Med. *32*, 523-532.
21) LEIBO S.P. (1983): A one step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. Cryo-Letters *4*, 387-400.
22) LEIBO S.P. (1981): Preservation of ova and embryos by freezing. In: New technologies in animal breeding. Academic Press N.Y., 127-139.
23) LEIBO S.P. (1980): Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. J. Membr. Biol. *53*, 179-188.
24) LEIBO S.P. (1977): Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In: Ciba Foundation Symposium, 52 (New Series). The freezing of Mammalian embryos. Elsevier Excerpta Medica, 69-91.
25) LEIBO S.P. and MAZUR P. (1978): Methods for preservation of mammalian embryos by freezing. In: J.C. Daniel (ed) Methods in Mammalian Reproduction. Academic Press N.Y., 179-201.

26) LEIBO S.P., McGRATH J.J. and CRAVALMO E.G. (1978): Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilzed mouse ova as a function of cooling rate. Cryobiology *15*, 192-199.
27) LEVIT J. and DEAR J. (1970): The role of membrane proteins in freezing injury. In: G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor (eds), The frozen Cell, J. & A. Churchill, London, 27-43.
28) LUYET B. (1970): Physical changes occurring in frozen solutions during rewarming and melting. In: G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor (eds), The frozen Cell, J. & A. Churchill, London, 27-43.
29) LUYET B. and GEHENIO P.M. (1940): Life and death at subzero temperatures. Biodynamica, Normandy, Missouri.
30) MASSIP A., VAN DER ZWAL-MEN P., PUISSANT F., CAMUS M. and LEROY F. (1984): Effect of *in vitro* fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. J. Reprod. Fert. *71*, 199-204.
31) MAURER R.R., BANK H. and STAPLES R.E. (1977): Pre and post natal development of mouse embryos after storage for different periods at cryogenic temperature. Biol. Reprod. *16*, 139-146.
32) MAZUR P. (1963): Kinetics of water loss from cells at subzero temperature and the likehood of intracellular freezing. J. Gen. Physiol. *47*, 347-369.
33) MENEZO Y., RENARD J.P., PAGEAUX J.F. and DELOBEL B. (1982): Kinetic study of fatty acid composition of day to day 14 cow embryos. Biol. Reprod. *26*, 787-790.
34) MIYAMOTO H. and ISHIBASHI T. (1983): Solid CO_2 freezing of mouse embryos. J. Reprod. Fert. *67*, 107-111.
35) MIYAMOTO H. and ISHIBASHI T. (1981): Survival of mouse embryos after freezing and thawing in the presence of erythritol. J. Exp. Zool. *216*, 337-340.
36) MIYAMOTO H. and ISHIBASHI T. (1978): Protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. J. Reprod. Fert. *54*, 427-432.
37) PANTHOU E. (1982): Embryons humains congelés: qui sont les parents? La Recherche *137*, 1196-1198.
38) POLGE C. and WILADSEN S.M. (1978): Freezing eggs and embryos of farm animals. Cryobiology *15*, 370-373.
39) RALL W.F. and POLGE C. (1984): Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. J. Reprod. Fert. *70*, 285-292.
40) RALL W.F., CZOLONKOWSKA M., BARTON S.C. and POLGE C. (1984): Cryoprotection of day four mouse embryos by methanol. J. Reprod. Fert. *70*, 293-300.
41) RAO W.H., SARMAN B.C., ANSARI M.R. and BHATTACHARYYA N.K. (1983): Survival of goat embryos after rapid freezing and thawing. In: Vth World Congr. Anim. Prod., Tokio 14-19 Aug. 1983, Abs., 107.

42) RENARD J.P. (1984): Methods of conserving gametes and embryos of farm animals. Prod. Sci. *11*, 49-59.
43) RENARD J.P. and BABINET C. (1984): High survival of mouse embryos after rapid freezing and thawing inside plastic straws with 1-2 propanediol as cryoprotectant. J. Exp. Zool. *330*, 443-448.
44) RENARD J.P., BUI-XUAN NGUYEN N. and GARNIER V. (1984): J. Reprod. Fert. *71*, 573-580.
45) RENARD J.P. and HEYMAN Y. (1983a): Effect of addition and dilution of cryoprotectant on the viability of frozen-thawed cows embryos. 16e Congr. Int. du Froid, Paris, Commission C1, 66-75.
46) RENARD J.P., HEYMAN Y., LEYMONIE P. and PLAT J.C. (1983b): Sucrose dilution: a technique for field transfer of bovine embryos frozen in straw. Theriogenology *19*, 145.
47) RENARD J.P., HEYMAN Y. and OZIL J.P. (1982a): Congelation de l'embryon bovin: une nouvelle mêthode de décongelation pour le transfert cervical d'embryons conditionés une seule fois en paillettes. Ann. Med. Vet. *126*, 23-32.
48) RENARD J.P., GARNIER V. and PARVEX R. (1982b): Production et congelation de l'embryon de lapin. In: Inst. Tech. Avi. et INRA eds, 3e J. de la Rech. Cunicole *18*, 1-13.
49) RENARD J.P., MENEZO Y. and HEYMAN Y. (1982c): Alternative tests to asses viability of bovine embryos. Theriogenology *17*, 106.
50) RENARD J.P., OZIL J.P. and HEYMAN Y. (1980): Cervical transfer of stored bovine embryos. 9th Int. Cong. on Anim. Reprod. and A.I., Madrid, Garsi ed., V, 627-630.
51) REVILLARD M.L. (1983): Problèmes juridiques soulevés par le transfert d'embryons dans l'espèce humaine. In: C.H. Merrieux et M. Bonneau (eds), Transfert d'embryons chez les mammifères. Collection Fond. M. Merrieux, 407-422.
52) SEIDEL G.E. (1981): Critical review of embryo transfer procedure with cattle. In: L. Mastroanni and J.D. Biggers (eds), Fertilization and embryonic development in vitro. Plenum Press, New York, 323-362.
53) SCHNEIDER U. and MAZUR P. (1984): Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to survival of frozen-thawed embryos. Theriogenology *21*, 68-79.
54) SHEA B.F. (1981): Evaluation of bovine embryos. Theriogenology *15*, 31-42.
55) SHEA B.F., JANZEN R.E., MCALISTER R.J. and DERMAND D.P. (1983): Freezing of bovine embryos: effects of embryo quality, time frow thawing to transfer and number frozen per vial. Theriogenology *20*, 205-212.
56) SLADE N.P., TAKEDA T., SQUIRES E.L. and ELDSEN R.P. (1984): Development and viability of frozen-thawed equine embryos. Theriogenology *21*, 263.

57) SMITH A.V. (1952): Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures. Nature *170*, 374-375.
58) SMORAG Z. (1977) In: Ciba Foundation Symposium, 52 (New Series), The freezing of mammalian embryos, Elsevier Excerpta Medica, 108-110.
59) STEPONKUS P.L., WOLFE J. and DOWGERT M.F. (1981): Stresses induced by contraction and expansion during a freeze-thaw cycle. In: G.J. Morris and A. Clark (eds), Effects of low temperatures on biological membranes. Academic Press, London, 307-322.
60) TAKEDA T., ELDSEN R.P. and SEIDEL G.E. (1984): Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. Theriogenology *21*, 266.
61) TERVIT H.R. and GOOLD P.G. (1984): Deep freezing of sheep embryos. Theriogenology *21*, 268.
62) TERVIT H.R., ELDSEN R.P. and FARRAND G.M. (1981): Deep freezing 7- to 8- and 10- to 11 days-old cattle embryos. Theriogenology *15*, 114.
63) TROUNSON A. and MOHR L. (1984): Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of eight-cell embryo. Nature *305*, 707-709.
64) TROUNSON A.O., WILLADSEN S.M., ROWSON L.E.A. and NEWCOMB R. (1976): The influence of in-vitro colture and cooling on the survival and development of cow embryos. J. Reprod. Fert. *46*, 173-178.
65) WHITTINGHAM D.G., (1974): The viability of frozen-thawed mouse blastocysts. J. Reprod. Fert. *37*, 159-162.
66) WHITTINGHAM D.G., WOOD M., FARRANT J., LEE H. and HASLEY J.A. (1979): Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from –196°C. J. Reprod. Fert. *56*, 11-21.
67) WHITTINGHAM D.G. (1977): Embryo storage in laboratory animals. In: Ciba Foundation Symposium, 5 (New Series), The freezing of mammalian embryos. Elsevier Excerpta Medica, 97-127.
68) WHITTINGHAM D.G., LEIBO S.P. and MAZUR P. (1972): Survival of mouse embryos frozen to –196°C and –269°C. Science *178*, 411-414.
69) WILLADSEN S.M., POLGE C. and ROWSON L.E.A. (1978): The viability of deep-frozen cow embryos. J. Reprod. Fert. *52*, 391-393.
70) WILMUT I. (1972): The low temperature preservation of mammalian embryos. I. Reprod. Fert. *31*, 513-514.
71) WILMUT I., POLGE C. and ROWSON L.E.A. (1975): The effects on cow embryos of cooling to 20°C, 0°C and –196°C. J. Reprod. Fert. *45*, 409-411.
72) WOOD M. and FARRANT J. (1980): Preservation of mouse embryos by two step freezing. Cryobiology *17*, 178-180.
73) WOOLGAR A.E. and MORRIS G.J. (1973): Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperatures on post hypertonic haemolisis of human red blood cells. Crybiology *10*, 82-86.

R.M. Moor *

IL RUOLO DELL'EMBRYO TRANSFER NELL'AMBITO DELLE NUOVE BIOTECNOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE

Il 27 aprile 1890 Walter Heape prelevò due embrioni da una coniglia Angora e li trasferì immediatamente nell'ovidutto di una coniglia Belga. A tempo debito la coniglia Belga diede alla luce i primi due nati da Embryo Transfer (E.T.). È stato proprio a partire da questo primo passo che la tecnica dell'E.T. è diventata una delle metodologie più efficaci nell'embriologia dei mammiferi. Infatti, la capacità di poter alterare sperimentalmente i rapporti tra l'embrione e il suo ambiente uterino è stata di fondamentale importanza negli studi sulla fecondazione, sul primo sviluppo embrionale e sulle interazioni madre feto.

La combinazione di micromanipolazione, analisi biochimiche ed E.T. ha, inoltre, gettato la base sulla quale sono avanzati gli studi sulla specializzazione cellulare e sulla differenziazione precoce. Oltre a ciò, la tecnica del transfer è stata di cruciale importanza per la comprensione dell'endocrinologia e della patologia della gravidanza, dell'interazione immunologica tra madre e feto e di molti altri aspetti della gravidanza. Queste applicazioni sperimentali sono state recentemente affiancate da nuovi modi di utilizzare l'E.T. In primo luogo, la tecnica del trapianto embrionale ha acquisito un'importanza commerciale notevole in campo zootecnico ed è correntemente usata per indurre ogni anno gravidanze selezionate in molte migliaia di bovini da carne e da latte.

Oltre a ciò l'E.T., accoppiato alla fecondazione in vitro, viene impiegato su scala sempre più vasta come terapia per l'infertilità umana.

Una discussione più dettagliata sulle applicazioni sperimentali, commerciali e mediche dell'E.T. va chiaramente al di là degli scopi di questo lavoro. Vorrei qui invece discutere lo stato attuale di questa

* Institute of Animal Physiology - Animal Research Station - 307 Huntingdon Road. - Cambridge CB30JQ - U.K.

metodica così come viene applicata agli animali domestici e, quindi, soffermarmi su alcune delle suggestive direzioni verso le quali si sta spingendo l'E.T.

Attuali impieghi dell'Embryo Transfer

Lo stimolo iniziale allo sviluppo dell'E.T. commerciale è fornito da tre eventi non correlati tra loro. Il primo fu lo sviluppo della tecnologia dell'E.T. che diede luogo ad un eccezionale tasso di gravidanza nel bovino (Rowson, Moor e Lawson, 1969). Ciò coincise con il risultato di una ricerca che dimostrò come la Charolais e altre razze bovine europee avessero un incremento ponderale significativamente migliore delle tradizionali razze britanniche (Milk Marketing Board, 1973-4).

In molti Paesi la conseguente domanda di nuove razze non potè essere soddisfatta con l'importazione a causa delle esistenti restrizioni dovute ai regolamenti della quarantena; l'E.T. procurò il mezzo ideale per ottenere molti vitelli dal ristretto numero di animali disponibili.

Considerazioni simili diedero luogo ad una rapida moltiplicazione per mezzo dell'E.T. di pecora Merino senza corna, di Wiltshire Horn e di capre Angora, in Australia, e di pecora Texel in Gran Bretagna.

Queste applicazioni comunque sono inevitabilmente cessate una volta che il numero degli animali desiderati è cresciuto a sufficienza per soddisfare la domanda.

La più importante applicazione attuale dell'E.T. è quella di aumentare il numero di giovani nati da animali di particolare pregio. Nonostante i prezzi esorbitanti pagati per i vitelli, sia Cunningham (1976) che Wilmut (1982) hanno dimostrato che l'impatto di ogni procedura sul miglioramento genetico dagli animali da latte probabilmente è molto piccolo. Al contrario, l'uso dell'E.T. nei programmi di miglioramento dei bovini da carne potrebbe essere di considerevole importanza nazionale (Land e Hill, 1975). Ciò in quanto gli animali da carne possono essere valutati già a 300-400 giorni di età e quindi sia i maschi che le femmine possono essere propriamente valutati per l'inclusione nei programmi di transfer. I tori superiori possono essere usati intensivamente per la fecondazione artificiale. Di uguale valore è l'uso dell'E.T. per produrre tori a doppia attitudine a partire da genitori scelti in base alle loro performance, dal momento che è possibile effettuare una selezione scientifica per le caratteristiche di produzione

sia di carne che di latte, combinando le informazioni sul tasso di crescita dei tori con un progeny test della produzione lattea delle figlie. (Krausslich, 1976).

Lo sviluppo di metodi efficaci per il congelamento degli embrioni è stato di notevole importanza, non solo nelle normali procedure di trasferimento embrionale commerciale, ma anche per l'esportazione di embrioni congelati di animali d'élite.

Esportare embrioni al posto di animali adulti è vantaggioso per i costi ridotti, per le più semplici procedure di quarantena e per una successiva minor mortalità. Quest'ultimo punto è di particolare importanza quando animali inglesi od europei vengono esportati in Africa od in altri paesi tropicali. Il grado di protezione ottenuto con vaccinazioni somministrate ad animali esotici prima dell'esportazione non può essere paragonato con l'immunità naturale conferita dalla matrigna indigena al neonato trasferito.

Concludendo è chiaro che, allo stato attuale, il valore commerciale dell'E.T. è limitato ad un ristretto numero di allevatori specializzati in grado di vendere animali selezionati a prezzi molto alti. Oltre a ciò la tecnica continua a rappresentare un prezioso mezzo di ricerca per lo studio dei problemi di infertilità della bovina. In ogni caso, è nella nuova era dell'allevamento animale resa possibile dall'ingegneria genetica e cellulare che l'E.T. potrà produrre il suo maggiore impatto.

Futuri sviluppi dell'allevamento animale

In campo zootecnico i progressi sono stati lenti sia a causa del lungo intervallo tra una generazione bovina e la successiva sia a causa della bassa ereditabilità di molti caratteri economicamente importanti. L'avvento della tecnica del DNA ricombinante e la prospettiva della clonazione potrebbero invece, modificare drasticamente i metodi di miglioramento genetico degli animali domestici. Un'adeguata fonte di uova ed embrioni risulta comunque indispensabile per lo sviluppo e la diffusione dei nuovi metodi di miglioramento della costituzione genetica dell'embrione. La discussione seguente considererà, quindi, le seguenti tre domande.

In primo luogo, con quali mezzi si può ottenere una fonte adeguata di uova da modificare geneticamente? Secondo, che contributo può

dare l'ingegneria genetica all'introduzione di caratteristiche desiderabili negli animali domestici? Infine, discuterò la possibilità che un fenotipo desiderabile possa essere preservato tramite una riproduzione asessuale o con la clonazione.

Fonti di oociti e embrioni per la manipolazione genetica

Gli embrioni per il transfer vengono generalmente raccolti dal tratto riproduttivo di animali superovulati. La inadeguatezza di questo approccio presenta il più serio limite all'E.T. commerciale oggi. Il piccolo numero di embrioni ottenuti e la imprevedibilità della risposta rende la superovulazione inaccettabile quale futuro mezzo di procurarsi embrioni per modifiche genetiche. Questa conclusione è stata sottolineata da una recente analisi delle relazioni tra gonadotropine somministrate e ovaio (Moor et al., 1984). Risulta evidente da questo studio che non ci si può aspettare un aumento del numero di embrioni vitali dai correnti metodi di superovulazione e di flushing uterino.

Tuttavia noi abbiamo suggerito che un metodo alternativo in grado di procurare in futuro il gran numero di uova necessarie comporta l'uso delle ovaie di animali macellati.

Gli oociti non sono in grado di dar luogo nemmeno alle prime fasi della vita embrionale fino a quando non hanno completato il loro processo di maturazione. La complessità di tale processo ha portato, fino a poco tempo fa, ad una incompleta maturazione «in vitro» e alla conseguente morte dell'embrione. Il nostro lavoro è stato perciò recentemente rivolto alla identificazione del processo mediante il quale viene conferita , durante la maturazione, la competenza all'oocita di mammifero (Moor et al., 1983).

Questi studi mostrano che le cellule follicolari, in determinati stadi della loro differenziazione, producono dei segnali chimici vitali che, trasmessi dall'ovocita, inducono modificazioni maturative intracellulari. Inoltre, le cellule follicolari trasportano delle sostanze nutritive essenziali nell'oocita attraverso gap junctions (Moor, 1983).

Un sistema «in vitro» comprendente tutti questi requisiti di base è stato recentemente messo a punto (Staigmiller e Moor, 1984). La tecnica è delineata nella Fig. 1.

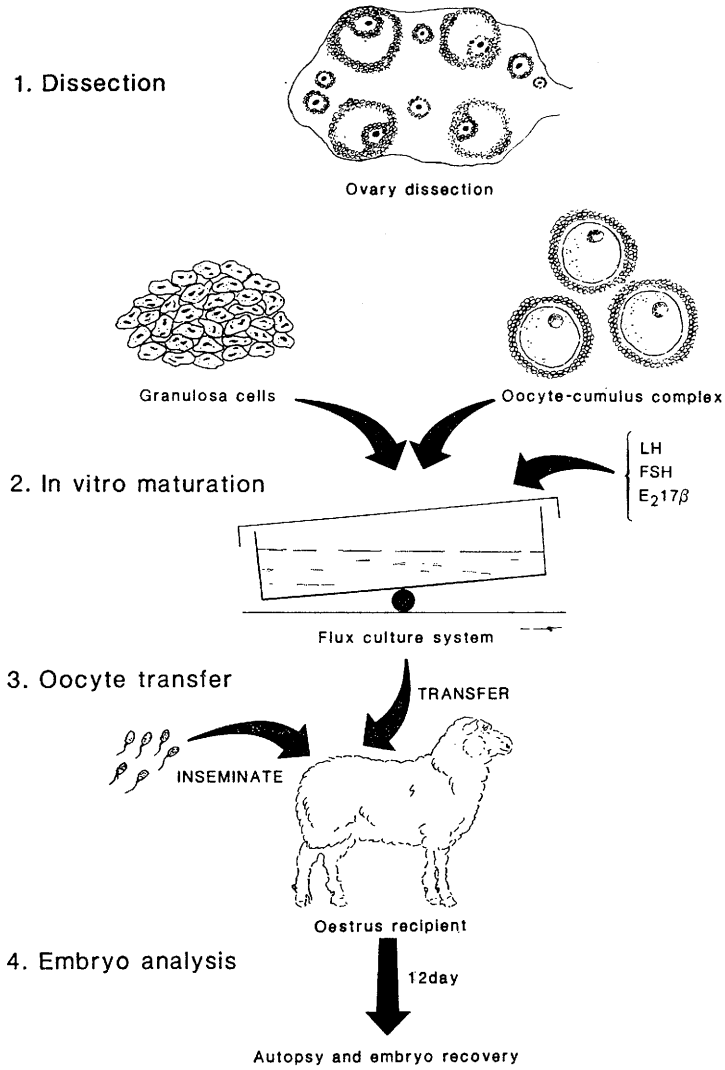


Fig. 1 - Rappresentazione schematica delle quattro fasi del processo di maturazione e della successiva analisi dello sviluppo potenziale di oociti coltivati in vitro. I complessi oocita-cumulo ooforo asportati da follicoli antrali sono stati coltivati per 24 ore in leggera e continua agitazione. Al medium di coltura M199 standard si è aggiunto il 10% di siero fetale bovino, estradiolo 17β (1μg/ml), LH (NIH 5μg/ml), FSH (NIH 2,5μg/ml) e cellule di granulosa ($1–5x10^6$/ml). La vitalità degli oociti maturi è stata determinata esaminando il loro grado di sviluppo 12 giorni dopo il loro trasferimento in una pecora ricevente inseminata in precedenza.

Il contatto vitale tra l'oocita e le cellule follicolari che lo circondano viene mantenuto coltivando l'intero complesso cumulo ooforo-oocita. Cellule delle granulosa aggiunte alla coltura forniscono alcuni dei segnali necessari alla maturazione in risposta all'FSH ed LH presenti nel medium.

Segnali steroidei essenziali vengono aggiunti direttamente al medium, dal momento che si è scoperto che in vitro non vengono sintetizzati estrogeni sufficienti ad assicurare una maturazione normale. Mantenendo poi la coltura in lieve agitazione si impedisce che le cellule follicolari aderiscano al fondo poiché ciò farebbe rapidamente perdere il corretto stato del differenziamento cellulare. L'effetto di ciascuno di questi fattori sullo sviluppo embrionale è riassunto nella Fig. 2.

Gli oociti denudati delle loro cellule follicolari e di conseguenza delle necessarie giunzioni, completano la meiosi in coltura, ma non si sviluppano ulteriormente. (Fig. 2a). La presenza dei collegamenti tra corona radiata ed oocita (Fig. 2b) non basta ad assicurare lo sviluppo di un embrione senza l'aggiunta di estrogeni e di cellule della granulosa (Fig. 2c). Se però le cellule della granulosa vengono lasciate aderire al supporto di coltura, esse vanno incontro a luteinizzazione impedendo così che l'oocita si sviluppi in blastocisti.

Se invece tutte le condizioni di coltura sono corrette, almeno il 60% delle uova evolve in blastocisti espanse e, successivamente in neonati (Staigmiller e Moor, 1984). La tecnica di maturazione in vitro è semplice ed il numero potenziale di ovociti che si possono ricavare da animali macellati è enorme. Sembra quindi verosimile che molte delle uova e degli embrioni necessari per la futura manipolazione genetica verranno ottenuti mediante maturazione in vitro.

Prima che questa previsione si avveri però, è urgente fare degli ulteriori progressi nel campo della fecondazione in vitro (FIV) di queste uova. Che un metodo affidabile per la FIV delle uova bovine possa essere presto disponibile, viene suggerito dagli studi di Brackett e collaboratori (Brackett et al., 1984), così come la nascita di suinetti da FIV mostra che la disponibilità di metodi adeguati di FIV per le specie domestiche è ormai prevedibile (Cheng e Polge, 1983).

Se, come viene previsto, saranno presto disponibili uova ed embrioni ottenuti con maturazione e fertilizzazione in vitro, come potrebbero essere sfruttati al meglio nell'allevamento animale del futuro?

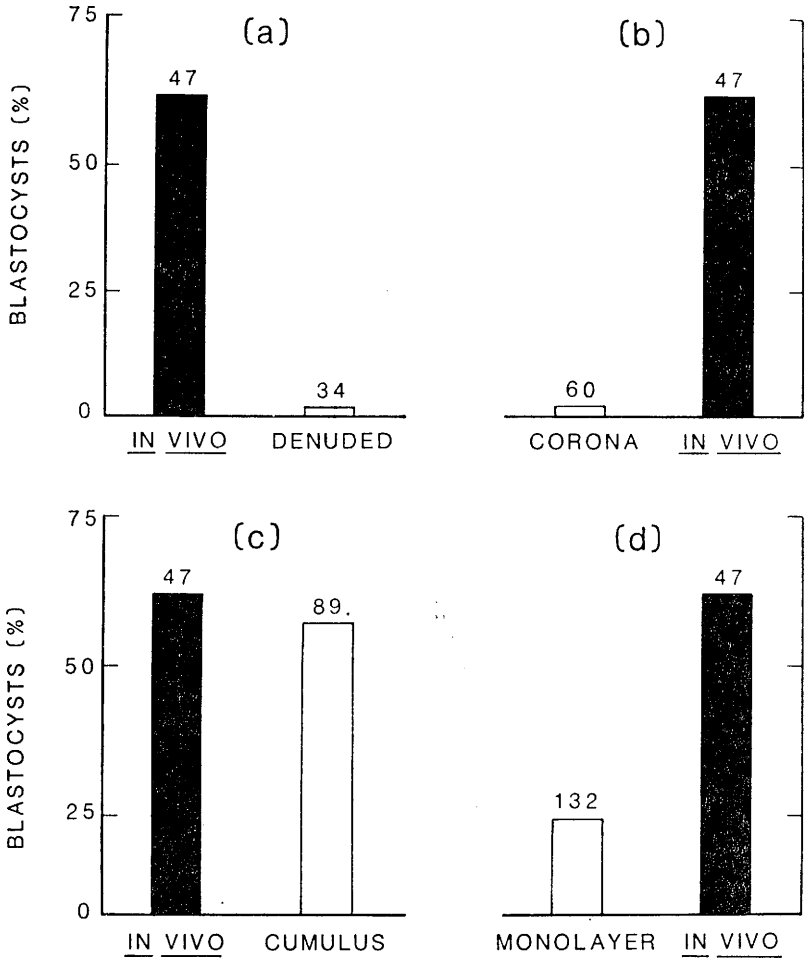


Fig. 2 - Effetto esercitato sullo sviluppo embrionale dalla modificazione quantitativa e qualitativa del supporto di cellule follicolari durante la maturazione in vitro. (vedi Fig. 1). Gli oociti privati delle cellule follicolari giungono fino allo stadio di metafase II ma poi non sono in grado di svilupparsi fino allo stadio di blastocisti (A). La presenza delle sole cellule della corona non conferisce agli oociti maturati in vitro alcuna capacità di sviluppo (B). L'aggiunta di cellule del cumulo e della granulosa attorno agli oociti, invece, porta allo sviluppo di blastociti normali e quindi alla nascita di individui perfetti (C). Lo sviluppo embrionale viene notevolmente ostacolato se le cellule della granulosa aggiunte al medium di coltura aderiscono alla superficie del contenitore e si differenziano in cellule luteiniche (D). I numeri posti sopra ciascun iistogramma mostrano il numero di embrioni raccolti 12 giorni dopo il trattamento in pecore riceventi.

Prima di alterare il patrimonio genetico dell'embrione mediante l'ingegneria genetica, sarà spesso desiderabile conoscerne il sesso.

Determinazione del sesso nell'embrione di mammifero.

Gli embrioni sono stati sessati per la prima volta da Gardner e Edwards nel 1968. Questi AA hanno asportato alcune cellule da blastocisti di conigli mediante un'operazione di microchirurgia; le cellule vennero fissate, colorate e esaminate per la presenza o l'assenza della cromatina sessuale (corpi di Barr).

Mentre questa tecnica permette il sessaggio nel coniglio, essa non può venir applicata agli embrioni degli altri animali domestici a causa della natura granulare densa del loro citoplasma che, in queste specie, non permette di vedere la cromatina sessuale. In ogni caso si è riusciti a sessare embrioni di pecora e di bovino mediante l'analisi cromosomica di micro biopsie del trofoblasto (Polge e Rowson, 1973; Hare et al., 1976). Questo metodo comunque, non ha trovato alcuna applicazione commerciale a causa della indaginosità e della lunghezza delle analisi citologiche, oltre al fatto che ben pochi embrioni sopravvivono al trattamento.

Gli interessi commerciali si sono invece concentrati sull'uso dell'antigene H-Y (o istocompatibilità-Y). La produzione di un anticorpo monoclonale H-Y legato a coloranti fluorescenti ha consentito a Wachtel (1984) di sessare embrioni bovini di 6-12 giorni di età. Il procedimento prevede la incubazione in presenza di anticorpo H-Y per 30 minuti e la successiva reazione con un'immunoglobulina di capra antitopo coniugata con istocianato di fluorescina (FITC). Dopo un lavaggio, gli embrioni vengono esaminati al microscopio a fluorescenza per individuare il FITC legato.

Questa tecnica non distrugge gli embrioni maschi nonostante il fatto che un anticorpo si leghi all'H-Y sulla superfice cellulare. Durante la sperimentazione in campo effettuata da Wachtel (1984) sono stati sessati e trasferiti 8 embrioni bovini. Sette di questi sono giunti a termine: tre sono stati correttamente identificati come maschi e 3 come femmine. Solo di una femmina è stato predeterminato il sesso sbagliato usando questa tecnica.

Wachtel sta ulteriormente semplificando il metodo mirando ad

un suo uso più generalizzato. Su queste basi si può concludere che il sessaggio, come tecnica di routine, è ormai a portata di mano.

Miglioramento del patrimonio zootecnico per mezzo dell'ingegneria genetica

La fecondazione rappresenta il momento in cui nuovi geni vengono introdotti per via naturale nel gamete femminile. Lo spermatozoo dopo la penetrazione va incontro ad un periodo di intensa riorganizzazione cromosomale e di attivazione genetica durante la sua trasformazione in pronucleo maschile (Kunkle et al., 1978; Wagner e Minhas, 1982). Durante tale periodo il pronucleo maschile contiene del DNA cromosomale liberamente accessibile e possiede una elevata capacità di ricombinarsi. Di conseguenza, si è supposto che questo costituisca ambiente adatto all'introduzione di nuovi geni nell'embrione precoce (Wagner et al., 1984).

Questa ipotesi è stata convalidata dai risultati ottenuti iniettando dei geni clonati nel pronucleo maschile di topo. Con questi esperimenti si è stabilito che geni iniettati vengono incorporati nel nucleo, a volte vengono espressi e possono essere trasmessi attraverso la linea germinale di topo (vedi la Review di Wagner et al., 1984). L'estensione logica di questo lavoro è la sua applicazione nell'allevamento di animali domestici economicamente importanti. Comunque bisogna superare dei grossi ostacoli tecnici prima di poter impiegare la ricombinazione genetica nell'allevamento del bestiame. Il primo di tali ostacoli è costituito dal fatto che il citoplasma delle uova degli animali domestici è relativamente opaco e quindi i pronuclei non possono essere visti con la microscopia convenzionale (Fig. 3).

Un possibile metodo per ovviare al problema dell'opacità citoplasmatica consiste nella colorazione fluorescente dei pronuclei durante l'iniezione (Wagner et al., 1984). Si è suggerito l'uso della colorazione vitale per il DNA con 4'-6'-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) per localizzare i pronuclei durante la microiniezione senza distruggere le potenzialità di sviluppo dell'embrione.

Se i metodi di colorazione fluorescente ci consentono di ovviare all'opacità citoplasmatica, un secondo più grave problema che deve

essere ancora superato è costituito dalla mancanza di informazione sui geni di grande importanza commerciale negli animali domestici.

Attualmente solo un piccolo numero di tali geni è stato identificato; essi comprendono i geni che codificano l'ormone della crescita, la digestione di lignina e cellulosa nel rumine, la resistenza alle ma-

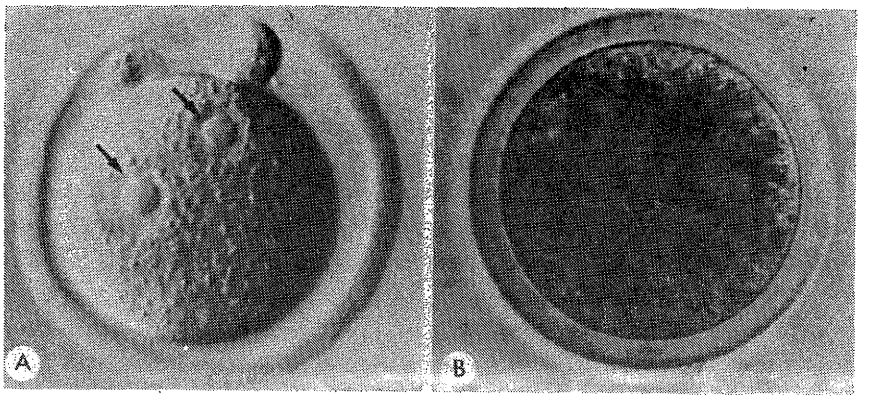


Fig. 3 - Confronto tra uova allo stadio di pronucleo di topo (A) e di pecora (B). I pronuclei chiaramente visibili (frecce) nell'uovo di topo sono mascherati in quello di pecora dall'opacità del citoplasma (la fotografia dell'uovo di topo è stata gentilmente fornita dal Dr. M.A.H. Surani).

lattie e la fertilità nelle pecore Boroola. Una conoscenza approfondita sull'identificazione dei geni è di particolare importanza perché è probabile che molti caratteri di importanza economica negli animali domestici siano controllati da geni multipli e non possano quindi essere manipolati.

Oltre all'identificazione dei geni, altri due aspetti della tecnica della ricombinazione del DNA richiedono altri studi.

In primo luogo sarà necessario comprendere gli eventi molecolari che regolano l'inizio e la modulazione dell'espressione di un gene inserito ed i mezzi mediante i quali può conferire una specificità tissutale. In secondo luogo è necessario comprendere appieno le conseguenze fisiologiche a lungo termine, causate attraverso l'ingegneria genetica, dall'alterazione di tratti specifici.

Chiaramente, ognuno di questi problemi è di una formidabile portata e può essere giustificato solo dal probabile ben più grande beneficio che il trasferimento genetico porterà all'allevamento animale.

In realtà, la futura importanza di questa tecnologia può già venire giudicata dai recenti esperimenti di Palmiter et al., (1982). Questi ricercatori hanno mostrato che i topi nati dopo l'iniezione dei geni dell'ormone della crescita presentavano alti livelli di tale ormone e crescevano almeno il doppio dei controlli (Fig. 4). Un simile risultato è prevedibile anche negli animali domestici dal momento che è già noto che la somministrazione giornaliera di ormone della crescita fa aumentare sia il ritmo di crescita che la produzione di latte (Muir et al., 1983; Machlin, 1973).

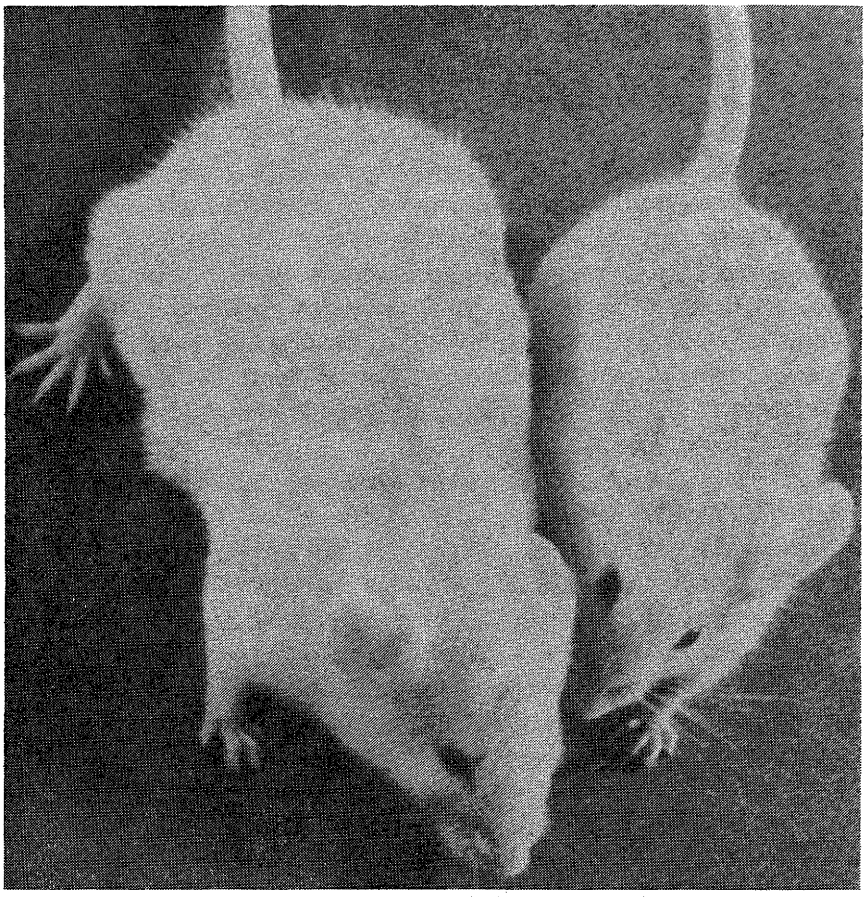


Fig. 4 - Effetto dell'iniezione dei geni dell'ormone nella crescita in uovo di topo allo stadio pronucleare dello sviluppo. Il topo più piccolo è un animale di controllo non iniettato ed è circa la metà del suo compagno (da Palmiter et al. 1982; fotografia di copertina da Nature, vol. 300 no. 5893).

È di grande importanza l'osservazione che l'ormone della crescita determina l'aumento della produzione di carne e latte attraverso l'aumento dell'indice di conversione degli alimenti negli animali trattati.

La potenziale importanza per l'allevamento animale della tecnologia del DNA ricombinante appare ora più grande che mai. L'E.T. di conseguenza assumerà ancor maggiore significato essendo l'unico mezzo per consentire che uova geneticamente «migilorate» possano impiantarsi con successo in femmine riceventi e svilupparsi così in giovani individui.

Sviluppo clonale nei mammiferi

La produzione di nuovi fenotipi mediante ingegneria genetica e la loro preservazione mediante clonazione sarebbe chiaramente di grande vantaggio economico nell'allevamento animale.

La riproduzione vegetativa e assessuata è comune nelle piante, negli invertebrati ed anche tra alcuni vertebrati come pesci, lucertole e anfibi. La clonazione nei mammiferi peraltro non è stata ancora raggiunta se non in maniera molto limitata mediante la dissezione degli embrioni in modo da produrre gemelli, trigemini o quadrigemini identici (Willadsen, 1981).

Le prospettive future della clonazione dipenderanno quasi certamente dai risultati delle ricerche di base condotte in tre aree diverse.

Innanzitutto, potrebbe essere possibile manipolare il processo meiotico in modo tale da produrre uova diploidi ed individui direttamente dagli oociti in completa assenza del gamete maschile. La produzione di simili embrioni partenogenetici di mammifero è già una procedura di routine in alcuni laboratori (Surani e Barton, 1983).

Gli embrioni partenogenetici di topo vanno incontro ad una estesa organogenesi, ma non sopravvivono mai oltre lo stadio di 25 somiti a meno che non vengano combinati, ad uno stadio molto precoce, con blastomeri di embrioni prodotti con una normale fecondazione. Un incoraggiamento per ulteriori lavori sulla clonazione per partenogenesi ci viene dalla dimostrazione che cellule partenogeniche danno luogo a tutti gli organi nelle chimere di «combinazione» (Surani e Barton, 1983).

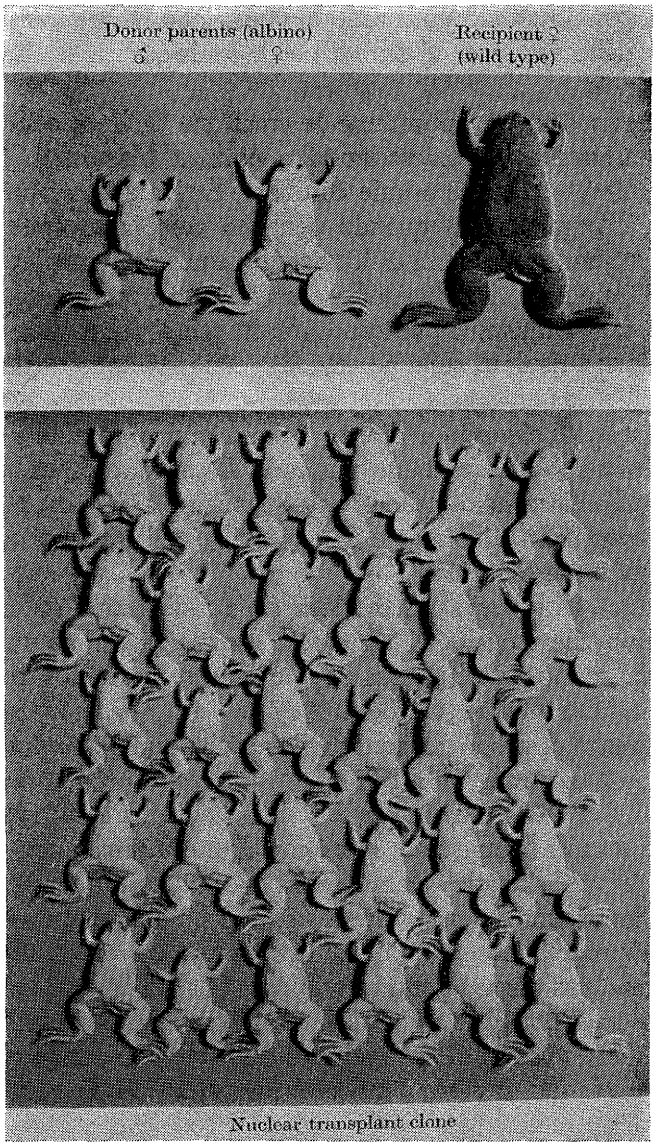


Fig. 5 - Clone di rane prodotte mediante trapianto di nuclei di un embrione ottenuto incrociando due genitori albini. I nuclei embrionali sono stati iniettati in uova provenienti da una femmina selvatica ed enucleate con raggi ultravioletti. Il 55% dei trapianti nucleari si sono sviluppati in ranocchie, tutte femmine albine (riprodotto da Gurdon, 1977).

Un secondo metodo potenziale di clonazione potrebbe essere dato in futuro dallo sviluppo di metodi per la moltiplicazione di embrioni in coltura.

In questa ottica è importante la creazione di linee cellulari totipotenti derivate da teratocarcinomi e normali blastocisti. (Evans e Kaufman, 1981). Queste cellule coltivate, derivate da embrioni, partecipano all'organogenesi quando vengano combinate con embrioni normali, ma non sono capaci di formare un embrione completo da sole. La grande mole di ricerche di base attualmente portata avanti sulle linee cellulari totipotenti può condurre, in tempi relativamente brevi, ad interessanti risultati sulla potenzialità dello sviluppo di sistemi cellulari derivati da embrione.

Il metodo di clonazione diretto e di maggior importanza commerciale è senza dubbi il trapianto nucleare. Il concetto di trapianto nucleare venne chiaramente delineato da Spemann (1938), ma fu soltanto con gli esperimenti di Briggs e King (1952) sugli anfibi che vennero superati gli ostacoli tecnici.

Da allora gli esperimenti condotti sulle rane hanno stabilito oltre ogni dubbio che i nuclei di una vasta gamma di cellule embrionali, quando vengono trasferiti in un uovo enucleato portano allo sviluppo di un individuo adulto. (Gurdon, 1977).

La capacità di produrre cloni di giovani individui identici con questa tecnica è mostrata nella Fig. 5.

Bromhall (1975) mostrò che il trapianto nucleare era fattibile anche nelle uova di mammifero; la nascita di topi normali dopo trapianto di nuclei embrionali è stata riferita più volte (McGrath e Sotter, 1983). Chiaramente, i nuclei derivati da cellule di embrioni precoci vengono riprogrammati dopo il trapianto e ripercorrono tutti i normali eventi nucleari associati con lo sviluppo. D'altra parte, i nuclei delle cellule di embrioni più tardivi e di adulti diventano progressivamente sempre meno capaci di dar luogo ad uno sviluppo completo qualora vengano trapiantati in uova enucleate (Briggs, 1979). In ogni caso, anche i nuclei completamente differenziati di cellule di adulto si sdifferenziano e presentano un certo grado di riprogrammazione dopo il trapianto (Gurdon, 1977).

Il grado di riprogrammazione può essere sostanziosamente aumentato da un periodo di «condizionamento» del nucleo prima del suo trapianto finale (vedi la metodica tracciata nella Fig. 6).

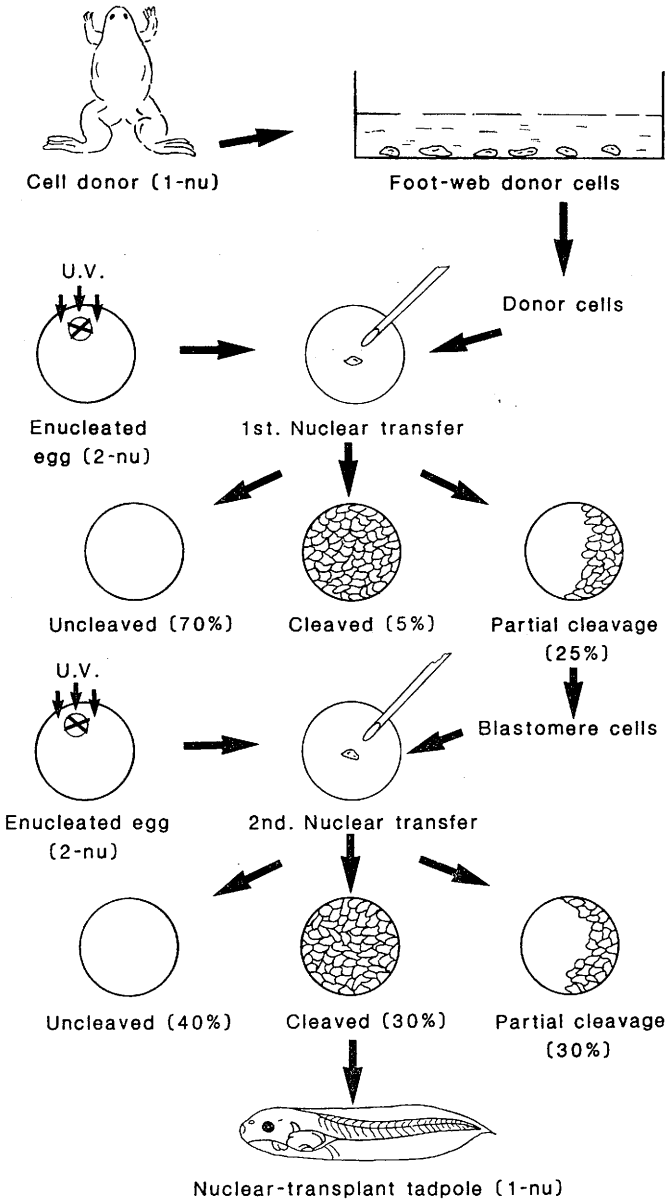


Fig. 6 - Schema della tecnica del trapianto nucleare in serie, sviluppata da Gurdon (1977). I nuclei di cellule cheratinizzate della cute delle zampe posteriori che contengono il marker genetico (1-nu) sono stati iniettati in uova irradiate con UV, deposte da femmine di tipo selvatico Xenopus (2-nu). Molti dei nuclei trapiantati hanno dato luogo a blastule parzialmente segmentate. I nuclei provenienti da queste blastule una volta trapiantati in un secondo nucleo irradiato tipo 2-nu hanno dato luogo ad una significativa quantità di girini. Il diagramma è una modifica di quello pubblicato da Gurdon (1977).

Nonostante ciò bisogna sottolineare che finora non si è mai ottenuto lo sviluppo di un individuo completo dal trapianto di nuclei di cellule adulte.

La selezione di un fenotipo adulto voluto e la sua successiva duplicazione mediante clonazione rimane l'obbiettivo finale della clonazione stessa. Se questo è lo scopo da raggiungere bisognerà trovare altri metodi per indurre la completa sdifferenziazione e la preparazione del nucleo somatico prima del trapianto. Ci sarà molta richiesta per questo, e ciò sembra possibile; sempre ammesso che non vi siano delle modificazioni permanenti del DNA durante lo sviluppo.

Conclusioni

Risulta evidente che gli ultimi due decenni sono stati molto importanti per lo sviluppo tecnico e la diffusione commerciale dell'E.T. nell'allevamento del bestiame. Il valore globale di questa tecnica, tuttavia, non potrà venir totalmente espresso finché il patrimonio genetico degli embrioni destinati al trapianto non venga significativamente migliorato.

Le possibilità di tale miglioramento nel futuro sono molto elevate. Risultati recenti suggeriscono l'ipotesi che ben presto sarà determinato prima del trasferimento. Oltre a ciò, la tecnologia del DNA ricombinante costituirà un potente mezzo per alterare o inserire specifici caratteri di particolare importanza senza alterare la fisiologia generale dell'animale. La potenzialità di queste tecniche può essere dedotta fin d'ora dai risultati ottenuti con la manipolazione genetica degli embrioni di topo.

La clonazione è una prospettiva più lontana, e come per altre nuove tecnologie, il suo eventuale inserimento nei futuri programmi di miglioramento del bestiame dipende da una gran mole di ricerca di base ancora da fare.

BIBLIOGRAFIA

1) BRACKETT B.G., KEEFER C.L., TROOP C.G., DONAWICK W.J. & BENNETT K.A. (1984): Bovine twins resulting from *in vitro* fertilization. Theriogenology *21*, 224.
2) BRIGGS R. (1979): Genetics of cell type determination. International Review of Cytology, Supplement *9*, 107-127.
3) BRIGGS R. & KING T.J. (1952): Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. *38*, 455-463.
4) BROMHALL J.D. (1975): Nuclear transplantation in the rabbit egg. Nature (London) *258*, 719-722.
5) CHENG W. & POLGE C. (1983): In vitro fertilization of pig oocytes. Proceedings of the Society for the Study of Fertility Winter meeting 1983. Abstract 30.
6) CUNNIGHAM E.P. (1976): The use of egg transfer techniques in genetic improvement. In: Egg Transfer in Cattle, ed. L.E.A. Rowson. Commission of the European Communities, Luxembourg, 1976, pp. 345-353.
7) EVANS M.J. & KAUFMAN M.H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature (London) *292*, 154-156.
8) GARDNER R.L. & EDWARDS R.G. (1968): Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. Nature (Lonlon) *218*, 346-349.
9) GURDON J.B. (1977): Egg cytoplasm and gene control in development. Proceedings of the Royal Society, London, *198*, 211-247.
10) HEAPE W. (1890): Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother. Proceedings of the Royal Society, London, *48*, 457-458.
11) HARE W.C.D., MITCHELL D., EAGLESOME K.J. & RANDALL G.C. (1976): Sexing 2-week old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer: preliminary methods and results. Theriogenology *5*, 243-253.
12) KRAUSSLICH H. (1976): Applications of superovulation and egg transplantation in A.I. programmes for dual purpose cattle. In: Egg Transfer in Cattle, ed. L.E.A. Rowson. Commission of the European Communities, Luxembourg, pp. 333-342.
13) KUNLE M., LONGO F.J. and MAGUN B.E. (1978): Nuclear protein changes in the maternally and paternally derived chromatin of fertilization. Journal of Experimental Zoology *203*, 371-378.
14) LAND R.B. & HILL W.G. (1975): The possible use of superovulation

and embryo transfer in cattle to increase response to selection. Animal Production *21*, 1-12.
15) MACHLIN L.J. (1973): Effect of growth hormone on milk production and feed utilization in dairy cows. Journal of Dairy Science *56*, 575-580.
16) MCGRATH J. & SOLTER D. (1983): Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. Science *220*, 1300-1302.
17) MOOR R.M. (1983): Contact, signalling and co-operation between follicle cells and dictyate oocytes in mammals. In: Current Problems in Germ Cell Differentiation, eds. A. McLaren & C.C. Wyllie, pp. 307-324. Cambridge University Press.
18) MOOR R.M., CROSBY I.M. & OSBORN J.C. (1983): Growth and maturation of mammalian oocytes. In: *In vitro* Fertilization and Embryo Transfer, eds. P.G. Crosignani & B.L. Rubin, pp. 39-63. Academic Press, London.
19) MOOR R.M. KRUIP TH.A.M. & GREEN D. (1984): Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. Theriogenology *21*, 103-116.
20) MUIR L.A., WIEN S., DUQUETT P.F. RICKES E.L. & CORDES E.H. (1983): Effects of exogenous growth hormone and diethylstilbesterol on growth and carcass composition of growing lambs. Journal of Animal Science *56*, 1315-1323.
21) PALMITER R.D., BRINSTER R.L., HAMMER R.E., TRUMBAUER M.E., ROSENFELD M.G., BIRNBERG N.C. & EVANS R.M. (1982): Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothioneingrowth hormone fusion genes. Nature (London) *300*, 611-615.
22) POLGE C. & ROWSON L.E.A. (1973): Recent progress in techniques for increasing reproductive potential in farm animals. Proceedings of the 3rd World Congress on Animal Production, pp. 633-643.
23) ROWSON L.E.A. MOOR R.M. & LAWSON R.A.S. (1969): Fertility following egg transfer in the cow: effect of method, medium and synchronization of oestrus. Journal of Reproduction and Fertility *18*, 517-523.
24) SPEMANN H .(1938): Embryonic development and induction, pp. 210-211. Yale University Press, New Haven, Connecticut.
25) STAIGMILLER R.B. & MOOR R.M. (1984): Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamete Research (in press).
26) SURANI M.A.H. & BARTON S.C. (1983): Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. Science *222*, 1034-1036.
27) WACHTEL S.S. (1984): H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. Theriogenology *21*, 18-28.
28) WAGNER T.E. & MINHAS B.S. (1982): Condensation and deconden-

sation of spermatozoal DNA. In: Prospects for Sexing Mammalian Sperm, eds. R.P. Amann & G.E. Seidel. pp. 49-60. Colorado Associated University Press, Boulder.
29) WAGNER T.E., MURRAY F.A. MINHAS B. & KRAEMAER D.C. (1984): The possibility of transgenic livestock. Theriogenology *21*, 29-44.
30) WILLADSEN S.M. (1981): The developmental capacity of blastomeres from 41 and 8-cell sheep embryos. Journal of Embryology and Experimental Morphology *65*, 165-172.
31) WILMUT I. (1982): Applications of egg transfer to animal production, breeding and research. In: Mammalian Egg Transfer, ed. C.E. Adams. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

C. Polge *

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Signor Presidente, Signori e Signore, è un grande onore per me essere qui, ma è anche una triste occasione. Triste infatti è prendere il posto del Prof. Aureli che, sono certo, era un personaggio molto amato e rispettato in questa Facoltà ed in questa Università. Nulla di ciò che dirò potrà essere all'altezza di questo vostro amico.

È in ogni modo per me un onore, ma anche una fortunata opportunità il poter partecipare a questa riunione. Attualmente infatti, sono ospite del Prof. Seren e dei suoi Colleghi dell'Istituto di Fisiologia dell'Università di Bologna, ed essi mi hanno invitato a prendere parte a questa Tavola rotonda. La cosa mi ha fatto molto piacere in quanto sono particolarmente interessato all'argomento trattato, non solo in termini personali, ma anche in quanto provengo da Cambridge in Inghilterra.

Infatti, presso l'Animal Research Station di Cambridge esiste ormai una lunga tradizione nel trapianto embrionale. Il primo trapianto di embrione di mammifero documentato ufficialmente venne effettuato dal prof. Heape nel 1890 al Dipartimento di Anatomia di Cambridge. In seguito la sua applicazione negli animali domestici, di cui oggi abbiamo discusso, venne sostenuta da Sir John Hammond, il primo direttore del nostro laboratorio e, sono certo, amico del Prof. Aureli.

Più tardi si deve prevalentemente a L.E.A. Rowson, sempre nel nostro laboratorio, lo sviluppo e l'uso di questa tecnica nel bovino, fino a renderla tale da poter essere estesa al campo pratico. Ed è grazie ai suoi esperimenti degli ultimi 12 anni che noi ne abbiamo visto la pratica applicazione. Questa è la ragione del mio interesse per questo Simposio.

* A.F.R.C. - Institute of Animal Physiology - Animal Research Station - 307 Huntingdon Road - Cambridge CB3 OJQ - G.B.

Menzionerò qui solo alcuni dei punti principali trattati quest'oggi.

Il Prof. Lauria ci ha descritto la risposta dell'ovaio alla sovrastimolazone mediante alcune preparazioni ormonali ed i problemi che si incontrano a causa della variabilità di reazione nei singoli animali. Ritengo che questa sia una grande sfida per i biologi: come si può agire più efficacemente sul reclutamento dei follicoli antrali tra la popolazione ovarica? Egli ci ha descritto alcuni recenti esperimenti con preparati ormonali molto purificati che, forse, ci porteranno ad un controllo più efficace.

Ci ha anche parlato dei problemi che insorgono nel profilo endocrino dell'animale dopo superovulazione e delle ripercussioni sulle prime fasi dello sviluppo embrionale. Io penso che questa sia un'altra vera sfida per i ricercatori nei prossimi anni.

Il Prof. Siracusa ci ha presentato una rassegna molto interessante sullo sviluppo «in vitro» dell'embrione di topo prima dell'impianto. Egli ha accennato a come, durante la coltura, in molti ceppi di topi si verifichi un blocco dello sviluppo embrionale allo stadio di due cellule. Da qui emerge un particolare interesse per lo studio delle implicazioni genetiche nel controllo dello sviluppo precoce.

Ci ha anche spiegato come, durante la segmentazione precoce, si verificano interessanti cambiamenti quali la polarizzazione e la compattazione dell'embrione e come la posizione spaziale delle cellule regoli gli stadi iniziali della differenziazione e dello sviluppo. Infine ci ha descritto l'argomento più interessante: la regolazione genetica dello sviluppo precoce e come viene attivato il genoma embrionale.

Personalmente penso che la regolazione dei primi stadi dello sviluppo da un punto di vista sia cellulare che genetico costituisca un campo di ricerca estremamente suggestivo, in quanto l'embrione ci fornisce i mezzi per investigare sui primi effetti del controllo dei geni.

Ritengo, inoltre, di grande importanza estendere ad altre specie gli studi descritti dal Prof. Siracusa al fine di poter acquisire maggiori conoscenze sulle differenze interspecifiche, in particolare per quanto riguarda il momento della prima attivazione del genoma.

Il Prof. Renard ci ha offerto un'eccellente descrizione di alcuni principi fondamentali della criobiologia e di come tali principi sono stati impiegati per sviluppare la tecnica che viene applicata con successo per la conservazione a lungo termine degli embrioni di mammifero mediante congelamento. È solamente dopo la comprensione di

alcuni dei basilari principi della criobiologia che si è potuto mettere a punto le tecniche del raffreddamento lento che consentono un sufficiente grado di disidratazione dell'embrione durante il congelamento in modo da prevenire la formazione di ghiaccio intracellulare.

Il Prof. Renard ed i suoi collaboratori hanno messo a punto alcune importanti modifiche tecniche, in particolare per quanto riguarda il tipo di crioprotettore impiegato e hanno dimostrato come, mediante l'uso di vari crioprotettori, si possa modificare e semplificare la tecnica di congelamento e di scongelamento. Ho trovato di particolare interesse poi la discussione sulle applicazioni pratiche della conservazione degli embrioni.

Per concludere ha parlato il mio collega Dr. Moor il quale ci ha illustrato come le attuali tecniche di trasferimento embrionale si vadano modificando ed ampliando grazie all'applicazione di alcune recentissime metodiche di laboratorio, con particolare riferimento alla superovulazione, come detto anche dal Prof. Lauria, oggi molto più controllabile grazie all'uso di alcuni preparati ormonali molto purificati.

È poi possibile applicare tecniche di micromanipolazione delle cellule embrionali, quali la dissezione dell'embrione, per ottenere gemelli identici o identici quadrigemini e saremo presto in grado di sessare gli embrioni mediante anticorpi monoclonali verso l'antigene H-Y.

Nella parte finale della sua esposizione il Dr. Moor ci ha parlato del futuro del trapianto embrionale nella prospettiva delle nuove tecniche attualmente in rapida evoluzione: la possibilità di trasferire geni e di individuare quelli di importanza economica negli animali domestici in modo da poterli trapiantare nell'embrione per ottenere migliori produzioni dalle specie di importanza zootecnica del futuro. Egli ci ha mostrato con i suoi esperimenti come la produzione di oociti per la manipolazione genetica mediante tecniche di maturazione «in vitro» ci potrà aiutare a raggiungere questi scopi. Ci ha anche illustrato prove sulla introduzione di geni con vari metodi sia mediante passaggio in cellule multipotenti, le quali possono poi venir introdotte negli embrioni per chimerismo o per mezzo di trapianto nucleare, sia con il diretto trasferimento del gene nel pronucleo maschile. Il Dr. Moor però ha avuto cura di aggiungere che coloro i quali pensano di poter clonare in un prossimo futuro animali partendo da nuclei di cellule

somatiche sono molto ottimisti. Questo potrà essere possibile, ma certo in tempi molto lontani.

Penso quindi che il Prof. Aureli avrebbe trovato particolarmente interessante questo Simposio e sarebbe stato soddisfatto della sua riuscita.

Da parte mia ritengo che l'insegnamento più importante che ne è derivato sia questo: l'importanza che la ricerca di base assume nel consentire sostanziali progressi in campo pratico. Gli argomenti discussi, cioè meccanismi di controllo dell'ovulazione, lo sviluppo dell'embrione «in vitro», il congelamento e conservazione dell'embrione e la sua futura manipolazione genetica, sono tutti sviluppi che dipendono da studi biologici di base.

Nella mia breve visita in Italia ho notato che vi è una forte tendenza a finanziare ricerche che abbiano un immediato riscontro pratico. Questa è una situazione comune a tutti i Paesi, ma, se intendiamo raggiungere i risultati di cui si è parlato oggi, è essenziale sostenere con grande sforzo economico anche ricerche strategiche di base in modo da aprire prospettive future più vaste delle attuali.

Queste sono le mie conclusioni, vi ringrazio per avermi offerto la possibilità di esporle e sono onorato, come già detto, di aver assistito a questo Simposio.

Grazie.

INTERVENTI PREORDINATI

BONO G., COMIN A., SILVESTRELLI L., DE POLLO V., OBEROSLER R., GUSPERTI A. *

SECREZIONE DI PROGESTERONE IN BOVINE SOTTOPOSTE A TRAPIANTO EMBRIONALE

Un gruppo di 33 manze di razza Pezzata Rossa, di 15-17 mesi di età e del peso di circa 450 Kg., sono state sottoposte ad un trattamento di sincronizzazione degli estri mediante doppia iniezione di 500 mcg di Estrumate (PG) a distanza di 11 giorni, nell'ambito di un piano di trapianto embrionale (ET) all'ottavo giorno del ciclo indotto. Otto di questi soggetti, non sottoposti ad ET, sono stati tenuti come controllo. Tutti gli animali sono stati osservati clinicamente mediante palpazione rettale al momento del 1° trattamento con PG e nel giorno dell'ET. La secrezione di progesterone (P4) è stata studiata con metodo immunoenzimatico (EIA) su campioni di sangue venoso periferico raccolti secondo il seguente protocollo: al momento della 2ª somministrazione di PG e dopo 12 e 24 ore; 4 e 2 giorni prima dell'ET; nel giorno dell'ET a –5, –2, +2, +5 ore dal trapianto; dopo 6, 11 e 13 giorni dall'ET. Successviamente, 30-40 giorni dopo l'ET, mediante palpazione rettale, si è confermato lo stato di gravidanza. I risultati ottenuti sono stati confrontati tra tre gruppi di animali: gruppo di controllo (ETN) (8 animali), gruppo con gravidanza confermata (ETG) (12 animali), gruppo di non gravide (ETV) (13 animali). Nella tabella sono riportati i dati statistici dell'ANOVA per il P4 nei tre gruppi di manze. L'analisi della varianza non ha evidenziato differenze significative nei livelli ematici di P4 ai diversi prelievi, salvo al 13° giorno dopo il trapianto (20°-22° giorno del ciclo estrale) nel quale i valori di P4 (ng/ml $\pm$ DS) sono risultati 6.47 $\pm$ 1.66 per ETG e 2.02 $\pm$ 2.62 per ETV ($P < 0.01$). Il livello minimo di P4 osservato nel gruppo ETG nel giorno dell'ET è stato di 1.46, quello massimo

* Istituto di Produzione Animale. Università di Udine, via S. Mauro, 2 - 33010 Pagnacco (UD).

		PG			EMBRYO TRANSFER								
ore		0	+12	+24			–5	–2	+2	+5			
giorni					–4	–2					+6	+11	+13
ETG	$\bar{X}$	4.85	1.47	0.57	0.26	1.61	3.96	3.97	4.04	4.78	4.76	6.05	6.48
	σ	1.75	0.92	0.34	0.21	1.05	1.40	1.16	1.82	2.17	1.98	2.40	1.66
ETV	X	5.28	1.66	0.54	0.52	2.02	2.86	3.47	4.09	4.98	4.82	4.94	2.02
	σ	3.70	0.95	0.36	0.54	1.48	2.23	2.01	2.67	1.22	2.42	3.25	2.62
ETN	X	5.56	1.61	0.65	0.52	2.14	4.17	4.25	4.26	4.61	—	—	—
	σ	1.84	0.57	0.19	0.78	0.68	0.69	1.33	0.98	0.63	—	—	—
	EMS	7.38	0.74	0:10	0.14	1.39	2.51	2.54	4.28	2.33	4.94	8.28	4.91
	F	0.18	0.16	0.29	1.84	0.58	1.76	0.49	0.03	0.12	0.004	0.92	2.53

xhPG: ore da PG; xdET: giorni da ET;
xhET: ore da ET; EMS: varianza d'errore.

di 7.58 ng/ml. Tutte le manze rimaste gravide (12/25) presentavano livelli di progesterone, al momento della 2ªPG, superiori a 2.23 ng/ml. L'analisi dettagliata del comportamento del P4 nel gruppo ETV (13/25) rivela la presenza di casi di irregolarità del ciclo (2/13), ciclo non perfettamente sincronizzato (4/13) o non avvenuta sincronizzazione (2/13). In questo ultimo caso i livelli di P4 al momento della seconda PG erano di 0.22 e 0.07 ng/ml. La determinazione dei livelli ematici di P4 può senza dubbio contribuire alla valutazione delle bovine riceventi, permettendo di escludere dall'ET i soggetti che alla sincronizzazione presentano tassi inadeguati di P4. La presunzione precoce di gravidanza basata sui livelli di P4 nel giorno dell'ET o nei precedenti si limita all'esclusione per quei soggetti che presentino tassi di P4 inequivocabilmente correlati ad una ipofunzionalità del corpo luteo.

SUMMARY

Secretion of progesterone in recipient heifers

A group of 33 Simmenthal heifers, aged between 15-17 months and weighing approximately 450 Kg. were synchronized using double inejections of 500 mcg of Estrumate (PG) at 11 day intervals. On the eight day of the induced cycle embryo transfer (ET) was performed on 25 of these animals. The remaining 8 animals were kept as controls. All the animals were checked clinically using rectal palpation at the moment of the first PG treatment and on the day of ET.

Progesterone secretion (P4) was studied using enzymatic immunoassay (EIA) on peripheral venous blood samples collected according to the following procedure: at the moment of the 2nd PG administration and after 12 and 24 hours; 4 and 2 days before ET; on the day of ET –5, –2, +2, +5 hours from transfers; 6, 11 and 13 days after ET. In the control group blood sampling ceased on the day of ET. 30-40 days after ET, using rectal palpation, pregnancy was confirmed.

The results obtained from 3 different groups of animals were compared: control group (ETN) 8 animals), pregnant group (ETG) (12 animals), non pregnant group (ETV) (13 animals). The table shows the statistics of ANOVA for P4 for the 3 groups; there was no significant difference between

P4 levels, except on the 13th day after ET, 20th-22nd day of induced oestrus cycle, when P4 values (ng/ml $\pm$ DS) were 6.47 $\pm$ 1.66 for ETG and 2.02 $\pm$ 2.62 for ETV ($P < 0.01$). The minimum level of P4 observed in ETG on the day of ET was 1.46, the maximum was 7.58 ng/ml. All the pregnant heifers (12/25) showed progesterone levels above 2.23 ng/ml at 2nd PG.

P4 patterns in ETV (13/25) revealed irregularities in the cycle (2/13), not strictly synchronized cycles (4/13) or no synchronization (2/13).

In the latter case P4 levels at 2nd PG were 0.22 and 0.07 ng/ml.

P4 determination around synchronization, on the day of ET, or before ET, can be useful in allowing exclusion of animals showing inadequate P4 levels.

BEGHELLI V. *, BOITI C. *, PARMIGIANI E. **,
SOANA S. **, ZANICHELLI S. **, BARBACINI S. **

STUDIO PRELIMINARE SU PROFILI ORMONALI E MOMENTO DI OVULAZIONE IN BOVINE SUPEROVULATE CON FSH

Introduzione

Nell'ambito di un programma di trasferimento embrionale nella specie bovina, la superovulazione e correlativa risposta rappresentano a tutt'oggi i punti più studiati e con maggiori incognite. Infatti, nonostante si sia sufficientemente approfondito lo studio circa la scelta ed i dosaggi dell'agente superovulante (Lauria e Coll., 1982a, Lauria e Coll., 1983, Parmigiani e Coll., 1983, Savage e Coll., 1984), rimangono ancora da chiarire alcuni aspetti molto interessanti di questa problematica, quali l'incostanza della risposta della donatrice alla stimolazione superovulatoria (Critser e Coll. 1980, Hill e Coll., 1984, Murphy e Coll., 1984) ed i rapporti esistenti fra variazioni dei livelli ormonali durante e dopo la superovulazione e la risposta ovarica, il momento di ovulazione, la qualità e la quantità degli embrioni estratti (Barnes e Coll., 1982, Booth e Coll., 1975, Greve e Coll., 1983, 1984, Henricks e Coll., 1973, Jensen e Coll., 1982, Schams e Coll., 1977, 1979).

Le finalità della nostra ricerca sono le seguenti:

I - cercare di ottimizzare il momento di ovulazione in bovine superovulate mediante la ricerca del picco ematico di LH durante l'estro da superovulazione al fine di poter eseguire interventi fecondativi più mirati e, possibilmente, ridurli come numero.

II - Verificare l'esistenza del rapporto intercorrente fra la risposta

* Ist. Fisiologia Vet. Univ. Perugia.
** Ist. Clin. Ostetrica e Ginecologica Vet. Univ. Parma.

ovarica alla stimolazione superovulatoria ed il tempo trascorso dalla somministrazione di PGF2α ed il picco di LH.
III - Confermare, durante l'estro da superovulazione, la correlazione fra le concentrazioni ematiche del 17 β-estradiolo e dell'LH e la qualità e quantità degli embrioni estratti.

Questa indagine rappresenta una nota preliminare di uno studio più approfondito attualmente in corso.

Materiale e metodi

La sperimentazione è stata effettuata su tre bovine di razza Frisona: una manza e due vacche.

La superovulazione è stata stimolata nel modo usuale: fra il nono ed il dodicesimo giorno del ciclo estrale iniezioni i.m. di mg 5 di FSH-P (Follicle Stimulating Hormone, Armour Pharm. Comp., Kankakee-Illinois) mattina e sera per quattro giorni consecutivi. Dopo 72 ore dall'inizio del trattamento si sono praticate due iniezioni i.m. di mg 0.750 di Cloprostenolo (Estrumate, Fatro-Bologna) a distanza di 12 ore l'una dall'altra. Gli interventi inseminativi sono stati eseguiti in tre tempi: il primo 12 ore dopo l'inizio dell'estro, gli altri due a distanza di 6 ore l'uno dall'altro. L'estrazione degli embrioni si è effettuata con metodo non chirurgico 7-8 giorni dopo il primo intervento fecondativo, previa valutazione delle dimensioni delle ovaie e rilevamento del numero dei corpi lutei.

I campioni ematici sono stati prelevati dalla vena giugulare secondo il seguente schema:

I - un prelievo ogni 24 ore durante il ciclo estrale precedente quello in cui si è stimolata la superovulazione.

II - Un prelievo ogni 2 ore per tutta la durata della fase estrale normale.

III - Un prelievo ogni 12 ore durante i primi tre giorni di trattamento superovulatorio.

IV - Un prelievo ogni 2 ore durante tutto il periodo della fase estrale in corso di superovulazione, iniziando 24 ore dopo la somministrazione di PGF2α.

I campioni di sangue sono stati centrifugati a 4.000 g/m per 10

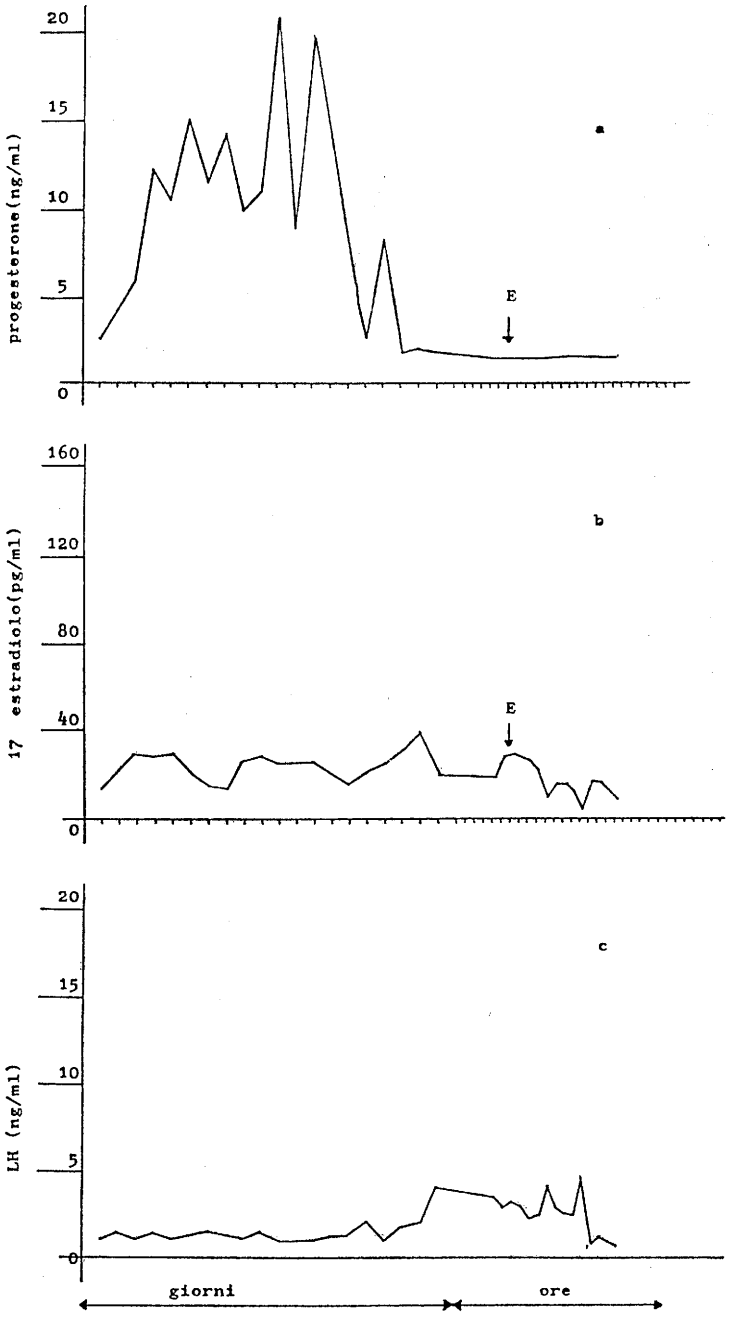


Fig. 1 - Schema dei livelli ormonali del progesterone (a) del 17 β-estradiolo (b) ed LH (c) della manza durante un ciclo fisiologico. E = estro.

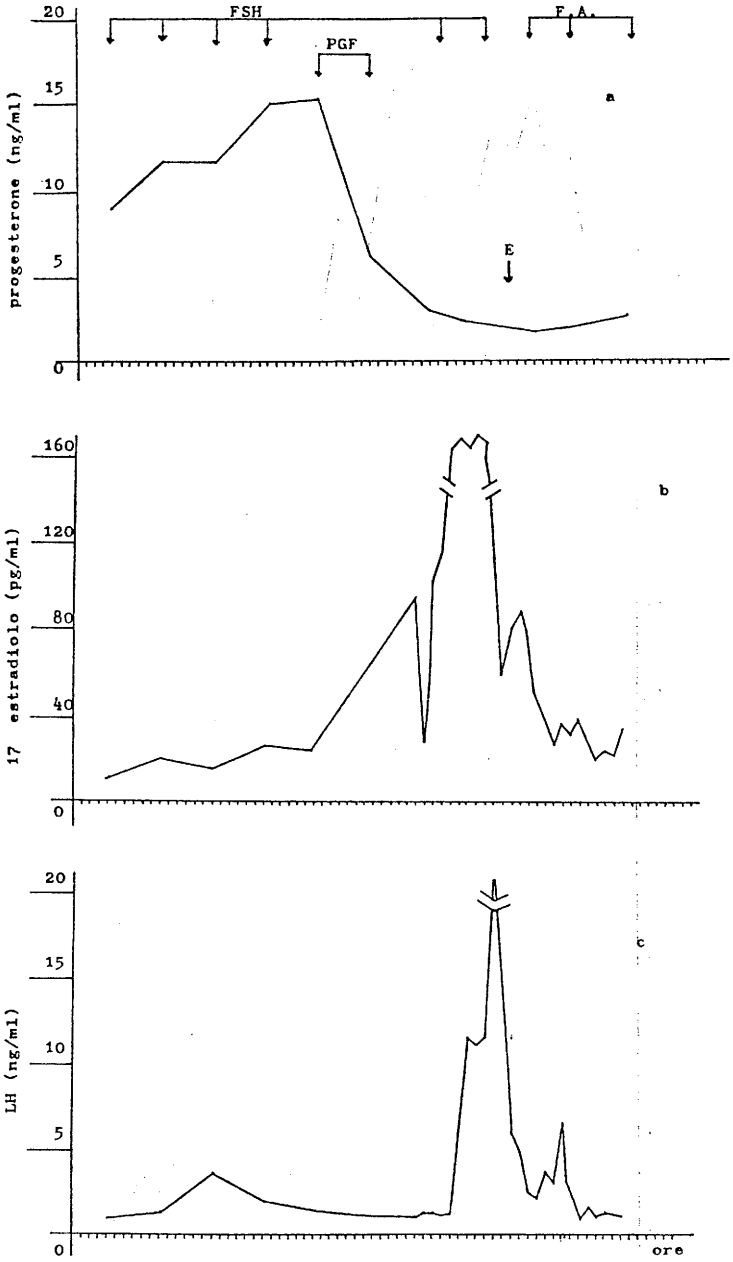


Fig. 1S - Schema dei livelli ormonali del progesterone (a), 17 β-estradiolo (b) ed LH (c) della manza durante la fase supervoulatoria. E = estro.

minuti ed il plasma conservato a –20°C. sino al momento delle analisi ormonali.

Le concentrazioni plasmatiche del progesterone, del 17 β-estradiolo e dell'LH sono state determinate con metodi RIA (Schams e Coll., 1969).

I dati ottenuti non sono stati sottoposti ad elaborazioni statistiche in quanto il numero di bovine preso in considerazione per questa indagine preliminare non è sufficientemente elevato per dei risultati significativi.

Risultati

Il quadro endocrino ematico della manza, rilevato durante il ciclo estrale fisiologico precedente la fase di superovulazione (Fig. 1) è risultato perfettamente normale, anche se non si è potuto rilevare con precisione il picco di LH (Fig. 1c) e quello del 17 β-estradiolo (Fig. 1b), ma solamente la fase d'incremento iniziale, a causa delle modalità di esecuzione dei prelievi.

Il trattamento superovulatorio della manza (Fig. 1S) è avvenuto correttamente durante la fase luteinica del ciclo estrale, come dimostrato dall'andamento delle concentrazioni plasmatiche del progesterone (10-15 ng/ml) (Fig. 1Sa).

Il trattamento con Cloprostenolo è risultato efficace nell'indurre luteolisi. Il picco degli estrogeni si è evidenziato 34-36 ore dopo la prima somministrazione di prostaglandine, raggiungendo valori di circa 160 pg/ml (Fig. 1Sb). Il picco di LH si è manifestato 36-40 ore dopo la somministrazione di PGF2α, ad una concentrazione di oltre 20 ng/ml (Fig. 1Sc). Sulla base di questo elevato picco ematico di LN si può dedurre che l'ovulazione è avvenuta circa 20-24 ore più tardi e quindi in prossimità del secondo intervento fecondativo.

Gli embrioni estratti sono stati 10: 5 di ottima qualità, 2 a sviluppo ritardato e 3 degenerati.

L'andamento del livello ematico del progesterone nella bovina n. 1 (Fig. 2a), durante un ciclo fisiologico rientra nei limiti della norma, mentre non è stato possibile individuare alcun picco significativo di 17 β-estradiolo in concomitanza con la manifestazione estrale (Fig. 2b). Il picco di LH tuttavia si è manifestato con regolarità (Fig.

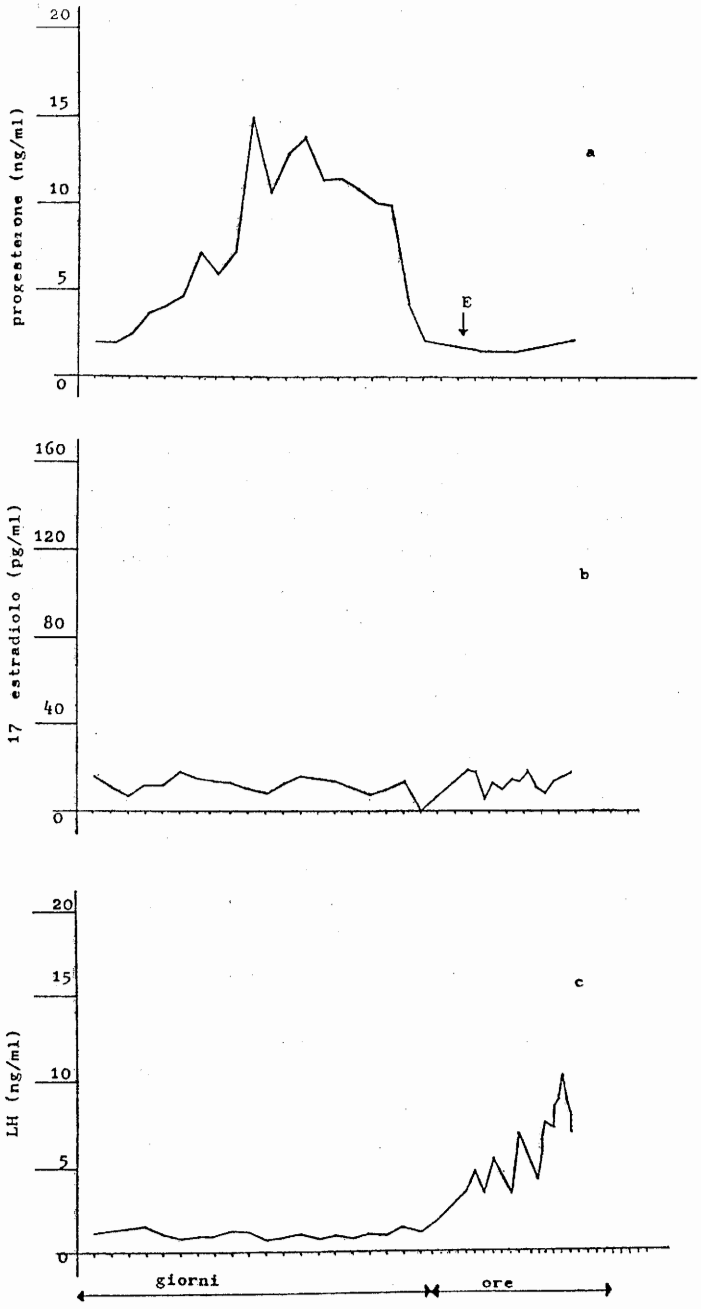


Fig. 2 - Schema dei livelli ormonali del progesterone (a), 17 β-estradiolo (b) ed LH (c) durante un normale ciclo fisiologico nella bovina n. 1.

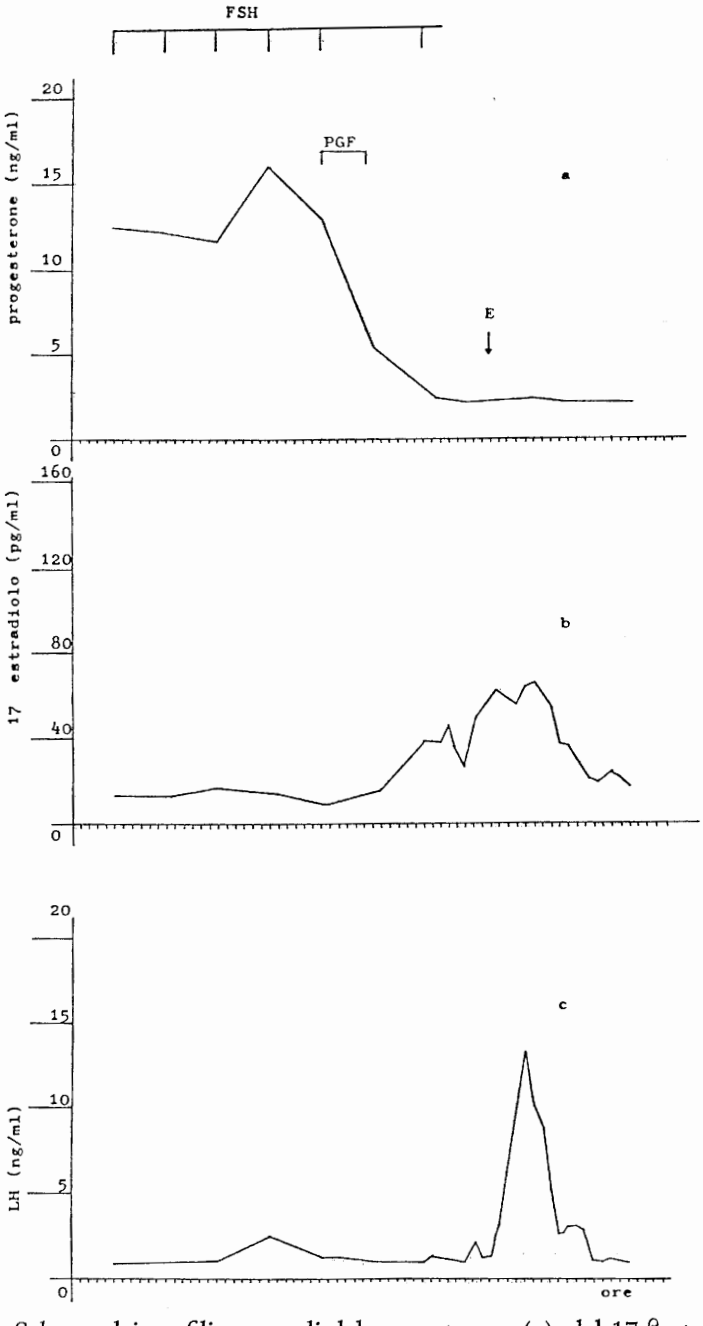


Fig. 2S - Schema dei profili ormonali del progesterone (a), del 17 βestradiolo (b) ed LH (c) durante la fase superovulatoria nella bovina n. 1.

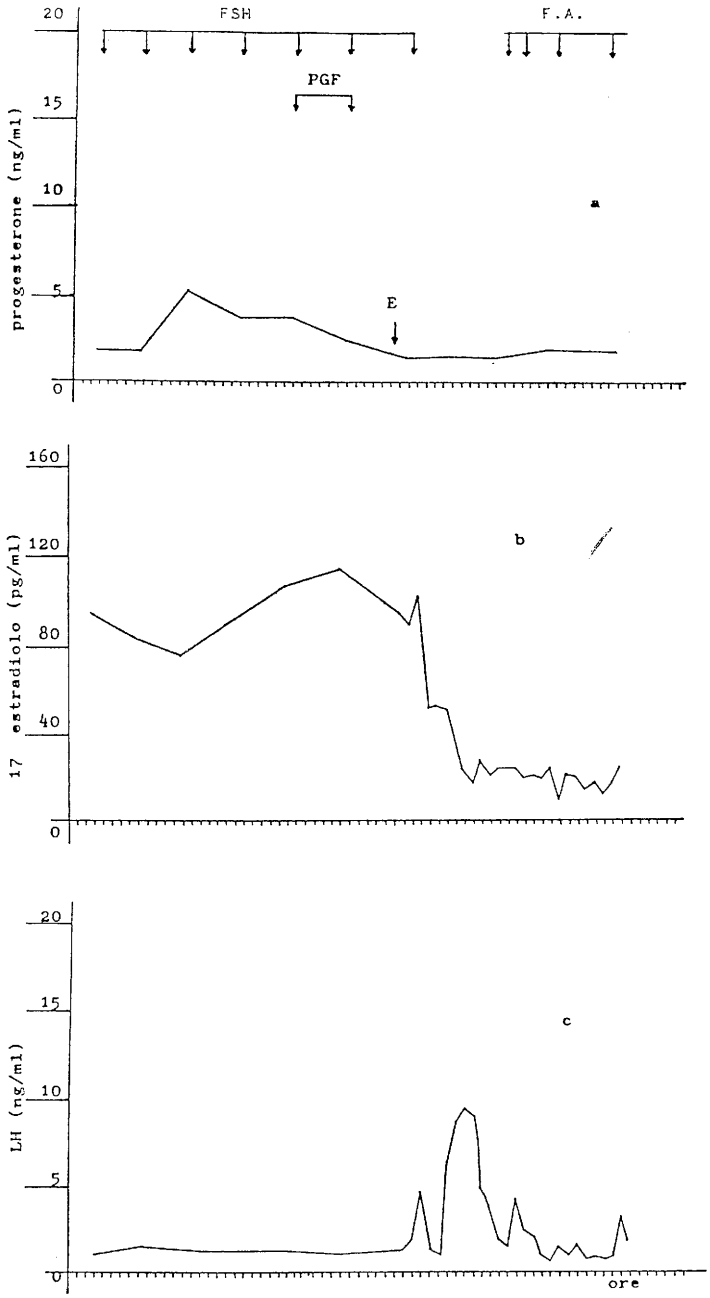


Fig. 3S - Schema dei livelli ormonali del progesterone (a), 17 β-estradiolo (b) ed L H(c) durante la fase super ovulatoria della bovina n. 2. E = estro.

2c) e questo fa supporre che si sia verificato anche un picco di 17 β-estradiolo, però nella fase anteriore a quella in cui si è proceduto ai prelievi di sangue ogni 2 ore.

La superovulazione (Fig. 2S) è stata iniziata regolarmente in fase diestrale e la somministrazione di PGF2α ha avuto effetto luteolitico. Il picco di 17 β-estradiolo si è evidenziato circa 44 ore dopo la somministrazione di PGF2α (Fig. 2Sb) ed il picco di LH si è manifestato circa 2-4 ore più tardi (Fig. 2Sc).

Gli embrioni estratti sono stati 7: 6 di ottima qualità e 1 degenerato.

I profili ormonali della bovina n. 2 sono evidenziati nella Fig. 3S. La stimolazione ovarica con FSH è iniziata mentre il progesterone era in concentrazione ematica modesta (2-3 ng/ml) (Fig. 3Sa). Anche l'effetto luteolitico della prostaglandina è stato di entità modesta. I livelli ematici di 17 β-estradiolo si sono comportati in modo lievemente dissimile rispetto ai cai precedenti, in quanto le concentrazioni basali sono risultate circa doppie (80-100 pg/ml) con un brusco decremento a valori di 20 pg/ml (Fig. 3Sb). L'inizio del picco di LH (Fig. 3Sc) è avvenuto in concomitanza con il decremento del 17 β-estradiolo con una concentrazione massima di circa 9 ng/ml che si è verificata 40 ore dopo la prima somministrazione di PGF2α.

In questa bovina l'esplorazione rettale ha evidenziato la presenza di 3 follicoli insieme a 4 corpi lutei. Sono stati estratti 2 embrioni, di cui 1 di ottima qualità, 1 ritardato ed inoltre un ovulo non fertilizzato.

Discussione e conclusioni

Analizzando i risultati della nostra indagine, si rileva che nella manza e nella bovina n. 1 i livelli ematici di 17 β-estradiolo e di LH hanno raggiunto picchi elevati durante l'estro nella fase superovulatoria. Contemporaneamente la risposta allo stimolo superovulante è stata buona: si sono raccolti embrioni in numero soddisfacente e di buona qualità.

Nel caso invece della bovina n. 2 i livelli ematici di 17 β-estradiolo e di LH non hanno dimostrato un incremento significativo e sono stati meno raggruppati nel tempo. Inoltre la quantità e la qualità degli embrioni estratti sono state modeste. Questo comportamento la-

scia supporre che fra i livelli ematici di 17 β-estradiolo e di LH e la qualità degli embrioni estratti possa sussistere una diretta correlazione, ipotesi questa sostenuta anche da altri A.A. (Greve e Coll., 1983, Schams e Coll., 1979).

Durante la fase di superovulazione il tempo intercorso fra la prima somministrazione di PGF2α ed il massimo livello ematico raggiunto dall'LH è stato di 36-40 ore nel primo caso e di 44 e 40 rispettivamente nel secondo e nel terzo. Tenendo presente che il momento dell'ovulazione avviene 20-24 ore dopo la comparsa del picco ematico di LH, se ne deduce che l'intervento fecondativo andrebbe effettuato circa 12 ore dopo l'inizio della manifestazione estrale. Questa solitamente ha inizio alla 48ª ora dalla prima somministrazione di PGF2α. In realtà l'inseminazione artificiale dovrebbe trovare il suo optimum 60 ore dopo il primo trattamento con PGF2α.

Le nostre osservazioni non concordano con quelle riportate da altri A.A. (Greve e Coll., 1983, Schams e Coll., 1977, 1979) relativamente al fatto che non si è identificata una correlazione inversa tra il tempo intercorso tra la somministrazione di prostaglandina e l'ascesa del picco di LH. Infatti nei nostri casi il picco di LH si è evidenziato costantemente all'incirca 40 ore dopo il trattamento con PGF2α, sia quando la risposta superovulatoria è stata buona sia quando è risultata scadente.

In conclusione, sulla base delle nostre indagini, si possono trarre le seguenti considerazioni:

I - il tempo intercorso dalla prima somministrazione di PGF2α all'ascesa del picco ematico di LH è stato abbastanza costante nei tre casi sperimentali. Da ciò si può trarre la considerazione che l'intervento fecondativo, quando conveniente, potrebbe essere ridotto numericamente ad uno solo se effettuato alla 60ª ora dopo la somministrazione di PGF2α.

II - Sussiste, secondo i nostri dati, una diretta correlazione fra livelli ematici di 17 β-estradiolo e di LH e qualità degli embrioni estratti.

III - Non si è evidenziata chiaramente l'esistenza di un rapporto fra risposta allo stimolo superovulatori e tempo trascorso dal trattamento con PGF2α ed ascesa del picco ematico di LH.

Il numero di animali sperimentali utilizzato in questa nostra indagine, è troppo modesto per poter considerare i dati ottenuti in modo

definitivo. Solo dopo uno studio approfondito su una più ampia casistica potremo riconsiderare positivamente le conclusioni orientative che abbiamo tratto da questa ricerca preliminare.

BIBLIOGRAFIA

1) Barnes M.A., Martinez Castellano A., Kazmer G.W., Wade R.J., Halman R.D. (1982): Effect of exogenous FSH on estrus, ovulation and endogenous hormone release in dairy cows. Theriogenology *18*, 311-323.
2) Booth W.D., Newcomb R., Strange H., Rowson L.E.A., Sacher H.B. (1975): Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. Vet. Record *97*, 366-369.
3) Critser J.K., Rowe R.F., Del Campo M.R., Ginther O.J. (1980): Embryo transfer in cattle: factors affecting superovulatory response, number of transferable embryos, and lenght of post-treatment estrous cycles. Theriogenology *13*, 397-406.
4) Greve T., Callesen H., Hyttel P. (1983): Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. Nord. Vet. Med. *35*, 408.
5) Greve T., Caloesen H., Hyttel P. (1984): Characterization of plasma LH-profiles in superovulated dairy cows. Theriogenology *21*, 237.
6) Greve T., Callesen H., Hyttel P. (1984): Plasma progesterone and embryos quality in superovulated dairy cows. Theriogenology *21*, 238.
7) Henricks D.M., Hill J.R., Dickey J.F., Lamond D.R. (1973): Plasma hormone levels in beef cows with induced multiple ovulations. J., Reprod. Fert. *35*, 225-233.
8) Hill K.G., Looney C.R., Schiewe M.C., Godke R.A. (1984): Effect of different lot numbers of follicle stimulating hormone (FSH-P) on superovulation response of donor cattle. Theriogenology *21*, 241.
9) Jensen A.M., Greve T., Madej A., Edquist L.E. (1982): Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2α treated cow. Theriogenology *18*, 33-44.
10) Lauria A., Genazzani A.R., Oliva O., Inaudi P., Cremonesi F., Monittola C., Aureli G. (1982a): Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotrophin. J. Reprod. Fert. *66*, 219-225.

11) LAURIA A., OLIVA O., GENAZZANI A.R., CREMONESI F., GANDOLFI F., BARBETTI M. (1983): Superovulation of dairy and beef cows using porcine FSH with defined LH content. Theriogenology *20*, 675-682.
12) MURPHY B.D., MAPLETOFT R.J., MANNS J., HUMPHREY W.D. (1984): Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. Theriogenology *21*, 117-125.
13) PARMIGIANI E., SOANA S., PEZZOLI G., BARBACINI S. (1983): Trattamenti superovulatori con PMSG e FSH in bovine da latte. Atti Soc. It. Buiatria *15*, 197-204.
14) SAVAGE N.C., MAPLETOFT R.J. (1984): Superovulation in the cow utilizing estradiol 17 beta or gonadotrophin releasing hormone in an FSHP regimen. Theriogenology *21*, 259.
15) SCHAMS D., KARG H. (1969): Radio immunologische LH-Bestimmung in Blutserum vom Rind unter besonderer Beruecksichtigung des Brunstzyklus. Acta Endocr. *61*, 96.
16) SCHAMS D., MENZER C., SCHLLENBERGER E., HOFFMANN B., HAHN J., HAHN R. (1978): Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: J.M.S. Reenan Ed. Martinus Nijhoff, The Hague, 122-143.
17) SCHAMS D., MENZER C., SCHALLENBERGER E., HOFFMANN B., PROKOOPP A., HAHN B., HAHN R. (1979): Superovulation beim Rind: Hormonprofile bei Stimulation mit Serum-gonadotropin (PMSG) bzw. hypophysaerem FSH. Zuchthyg. *145*, 11-25.

SUMMARY

Preliminary study about endocrine profiles and ovulation in cows superovulated with FSH

Endocrine profiles for progesterone, 17 β-E2 and LH have been radioimmunologically evaluated in one heifer and two cows. The animals have been superovulated with FSH-PGF2α regime. The blood samples have been taken every 2 hours, starting from 24 hours after the first PGF2 α administration. The results showed that when the estrogen and LH peaks were high also the ovarian response was good, with satisfactory number and quality of embryos. The LH peak has been in all three animals about 40 hours after the first PGF2α administration. This could be useful for a breeding service done with more precision and less semen expenditure.

PARMIGIANI E., SOANA S., BARBACINI S., ZANICHELLI S. *

OSSERVAZIONI SULL'USO DELLA PGF2α DOPO ESTRAZIONE EMBRIONALE IN BOVINE SUPEROVULATE

Introduzione

In questi ultimi anni numerose ricerche sulla superovulazione della bovina hanno contribuito a chiarire alcuni aspetti controversi su tale argomento, pur rimanendo ancora diverse incognite da risolvere. È stato provato che l'FSH induce una risposta superovulatoria che è preferibile, per diverse ragioni, a quella stimolata dal PMSG (Elsden e Coll., 1978, Parmigiani e Coll., 1983, Soana e Coll., 1983, Hill e Coll., 1984). È stato usato con successo anche l'HMG per stimolare una superovulazione (Lauria e Coll., 1982a, 1982b, Oliva e Coll., 1982), e con effetti comparabili a quelli dell'FSH (Critser e Coll., 1982). Infine, per stabilire quale tra le sostanze ormonali usate sia più conveniente per un'induzione superovulatoria costante ed attendibile, sono state messe a confronto le risposte stimolate con l'HMG, l'FSH ed il PMSG (Elsden e Coll., 1978, Lauria e Coll., 1982a, 1982b, Oliva e Coll., 1982, Parmigiani e Coll., 1983, Perry e Coll., 1984, Schams e Coll., 1979, Soana e Coll., 1983, Voss e Coll., 1983). Si è accertato inoltre il quantitativo ottimale di FSH da utilizzare in associazione con dosaggi ben definiti di LH (Lauria e Coll., 1983).

I tempi di recupero alla normale vita riproduttiva delle bovine superovulate rappresentano una problematica (Schilling e Coll., 1984) ancora da risolvere. A tal fine gli scopi di questa nota sono i seguenti:
I - verificare se il trattamento con PGF2α di bovine superovulate il giorno corrispondente all'estrazione embrionale possa contribuire ad un più rapido recupero della donatrice ai fini di una normale gravidanza o per una successiva superovulazione.

* Ist. Clinica Ostetrica e Ginecologica Vet., Università di Parma.

II - Stabilire se un ulteriore trattamento con PGF2α, eseguito 8 giorni dopo l'estrazione embrionale, sia più efficace di un singolo trattamento luteolitico.

Materiali e metodi

52 bovine da latte sono state sottoposte a due diversi trattamenti superovulatori. 19 sono state superovulate con una sola somministrazione di 3500 U.I. di PMSG i.m., dal nono al dodicesimo giorno del ciclo estrale. Dopo 72 ore dell'inizio del trattamento, le bovine sono state sottoposte a doppia somministrazione di PGF2α a distanza di 12 ore l'una dall'altra.

Il secondo gruppo di 33 bovine (cfr. Tab.), 30 vacche e 3 manze, è stato superovulato, sempre tra il nono ed il dodicesimo giorno del ciclo estrale, con 5 mg di FSH, mattina e sera per 4 giorni consecutivi. Anche in queste bovine la PGF2α è stata somministrata secondo uno schema di applicazione equivalente a quello del primo gruppo.

L'estro si è manifestato in tutte le bovine circa 48 ore dopo la somministrazione di prostaglandine.

In alcuni casi l'inseminazione è stata praticata con tre interventi fecondativi, in altri con due.

L'estrazione degli embrioni con metodo non chirurgico è stata effettuata al settimo o all'ottavo giorno dopo il primo intervento fecondativo, previo rilevamento per via rettale delle dimensioni delle ovaie e del numero dei corpi lutei.

Subito dopo l'estrazione degli embrioni, 12 delle 19 bovine superovulate con PMSG sono state trattate con 0,750 mg di Cloprostenolo (Estrumate - Fatro), mentre 7 sono state tenute come gruppo di controllo.

Fra le bovine superovulate con FSH, 22 hanno ricevuto una somministrazione singola di prostaglandina il giorno dell'estrazione embrionale, mentre 11 sono state trattate con prostaglandina due volte: il giorno dell'estrazione embrionale e 8 giorni dopo. La prostaglandina utilizzata anche in questi gruppi è stata il Cloprostenolo mg 0,750.

Tutte le donatrici sono state poi controllate tramite esplorazione rettale per tre volte: 8 giorni dopo il primo trattamento prostaglan-

dinico e successivamente, per due volte, a distanza di 10 giorni.

Lo scopo di questi controlli è stato quello di rilevare l'involuzione delle ovaie con presenza di un corpo luteo ciclico e quindi la completa normalizzazione dell'attività riproduttiva della bovina.

I dati raccolti sono stati sottoposti a confronto statistico.

Non si è effettuato alcun controllo dei livelli ormonali nel sangue.

Gli eventuali estri sono stati rilevati.

Risultati

Fra le 12 bovine superovulate con PMSG (Tab. 1), che presentavano al momento dell'estrazione embrionale una media di 10,3 corpi lutei, nessuna rivelò al primo controllo un'apprezzabile involuzione ovarica o presenza di corpo luteo ciclico. Al secondo controllo una sola (8,3%) presentò un corpo luteo ciclico, mentre al controllo eseguito 28 giorni dopo il trattamento con prostaglandina altre 3 bovine (25%) mostrarono una buona involuzione ovarica con presenza di corpo luteo ciclico. Relativamente a queste 4 bovine le manifestazioni estrali furono evidenti in 3, mentre in una l'estro è stato silente. Comunque 4 bovine su 12 (33,3%) avevano ciclato e si erano normalizzate entro 40 giorni dall'inizio della superovulazione.

Nel gruppo delle 7 bovine di controllo 2 (28,6%) dimostrarono un pieno recupero dell'attività riproduttiva a 28 giorni dall'estrazione embrionale. Queste bovine erano anche quelle che al trattamento superovulatorio avevano risposto con un numuero limitato di corpi lutei.

Il confronto fra le due percentuali non è risiultato significativo.

Per quanto riguarda il gruppo delle bovine trattate con FSH, fra le 22 che avevano avuto una sola iniezione di PGF2α, 3 si presentarono normalizzate al primo controllo (13,6%), 4 al secondo (12,2%), 5 al terzo (22,7%), con un totale di 12 bovine normalizzate (54,5%). Le rimanenti 11 bovine sottoposte a doppio trattamento prostaglandinico hanno avuto ai controlli successivi il seguente andamento: 2 (18,2%) normalizzate al primo, 6 (54,5%) al secondo, 2 (18,2%) al terzo, con un totale di 10 animali (90,9%) ritornati nei limiti della norma entro 40 giorni dall'inizio del trattamento superovulatorio.

Il confronto fra le percentuali dei due gruppi delle bovine superovulate con FSH è risultato significativo: $P<0,05$.

TABELLA 1

INVOLUZIONE OVARICA E NORMALIZZAZIONE DEL CICLO IN BOVINE SUPEROVULATE E TRATTATE CON PGF*2α DOPO ESTRAZIONE EMBRIONALE

Superovulazione	Trattamento	Bovine	Corpi Lutei $\bar{X} \pm SD$	Bovine Normalizzate I° Controllo	Bovine Normalizzate II° Controllo	Bovine Normalizzate III° Controllo	Totale** Bovine Normalizzate
FSH°	PGF2α 1 sommin.	22	8,7 ± 6,5	3 (13,6%)	4 (18,2%)	5 (22,7%)	12 (54,5%) a
	PGF2α 2 sommin.	11	9,3 ± 7,3	2 (18,2%)	6 (54,5%)	2 (18,2%)	10 (90,9%) b
PMSG°°	PGF2α 1 sommin.	12	10,3 ± 8,3	0	1 (8,3%)	3 (25%)	4 (33,3%)
	Controllo	7	11,4 ± 9,2	0	1 (14,3%)	1 (14,3%)	2 (28,6%)

° FSH-P, Burns-Biotec, Omaha-Nebraska.
° Follicle Stimulating Hormone, Armous Pharm. Comp., Kankakee - Illinois.
°° Folligon, Intervet-Milano.
* Estrumate, Fatro-Bologna.
** Il confronto fra le percentuali a –b è significativo $P<0,05$.

Discussione e conclusioni

I risultati da noi ottenuti dimostrano che il PMSG, oltre a fornire risposte superovulatorie meno attendibili rispetto a quelle dell'FSH, rallenta più del'FSH il rientro nella normalità della funzione ovarica. Il motivo per cui nessuna bovina abbia risposto positivamente al trattamento con PGF2α va ricercato nel fatto che la emivita del PMSG è più lunga rispetto a quella dell'FSH. A causa di ciò i livelli ematici di progesterone rimangono più elevati nel tempo ed il recupero delle bovine si prolunga. In ogni caso il trattamento con prostaglandina ha dimostrato di non essere in grado di abbreviare questi tempi di recupero.

Nelle bovine superovulate con FSH, il trattamento con due somministrazioni di prostaglandina si è rivelato molto utile per un più rapido recupero delle donatrici alla vita riproduttiva. Comunque anche in questo caso si è notato che gli animali più rapidamente normalizzati erano quelli che avevano avuto una reazione contenuta al trattamento superovulatorio.

In base ai risultati della nostra ricerca possiamo quindi concludere che:

I - una sola somministrazione di PGF2α effettuata il giorno dell'estrazione embrionale non è in grado di abbreviare il tempo per una normalizzazione funzionale ovarica delle bovine donatrici.

II - Due somministrazioni di PGF2α, la prima il giorno dell'estrazione degli embrioni e la seconda otto giorni più tardi, abbreviano sensibilmente il tempo necessario per poter fecondare la donatrice al fine di ottenere una normale gravidanza oppure per sottoporla ad una nuova superovulazione.

BIBLIOGRAFIA

1) Barnes M.A., Castellano A.M., Kazmer G.W., Wade R.J., Halman R.D. (1982): Effect of exogenous FSH on estrus, ovulation and endogenous hormone release in dairy cows. Theriogenology *18*, 311-323.

2) BETTERIDGE K.G. (1977): Embryo Transfer in farm animals. Monograph *16*, Canada Dept. Agric. Staton H. Ottawa K2H8P9 Canada.
3) BOOTH W.D., NEWCOMB R., STRANGE H., ROWSON L.E.A., SACHER H.B. (1975): Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation and egg recovery in the cow. Vet. Recrd *97*, 366-369.
4) BOUTERS R., MOYAERT I., CORYN M., SPINCEMAILLE J., VANDEPLASSCHE M. (1980: Premature regression of the corpora lutea in superovulated cows. Theriogenology *14*, 207-216.
5) CASIDA L.E., MEYER R.K., MC SHAN W.H., WISNICKY W. (1943): Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. Am. J. Vet. Res. *4*, 76-94.
6) CHUPIN D., COMBARNOUS Y., PROCUREUR R. (1984): Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. Theriogenology *21*, 229.
7) CRITSER E.S., CRITSER J.K., WINCH R.P., EILTS C. (1982): Efficacy of Perganol as superovulatory drug in cattle. Theriogenology *17*, 1-10.
8) CRITSER J.K., ROWE R.F., DEL CAMPO M.R., GINTHER R. (1980): Embryo Transfer in cattle: factors affecting superovulatory response, number of transferable embryos, and length of post-treatment estrous cycles. Theriogenology 13, 397-406.
9) ECHTERNKAMP S.E. (1984): Stress induced suppression of tonic LH release in restrained beef cows. Theriogenology *21*, 233.
10) ELSDEN R.P., HASLER J.F., SEIDEL G.E.Jr. (1976): Non surgical recovery of bovine eggs. Theriogenology *6*, 523-532.
11) ELDSEN R.P., LEWIS S., CUMMING I.A., LAWSON R.A.S. (1974): Superovulation in the cow following treatment with PMSG and Prostaglandin F2alpha. J. Reprod. Fert. *36*, 455-456.
12) ELSDEN R.P. NELSON L.D., SEIDEL G.E.Jr. (1978): Superovulation of cows with follicle stimulating hormone and pregnant mar'es serum gonadotropin. Theriogenology *9*, 17-26.
13) FOOTE R.H., ONUMA H. (1970): Superovulation, ovum collection, culture, and transfer: a review. J. Dairy Sci. *53*, 1681-1691.
14) GREVE T., CALLESEN H., HYTTEL P. (1983): Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. Nord. Vet. Med. *35*, 408.
15) GREVE T., CALLESEN H., HYTTEL P. (1984): Characterization of plasma LH-profiles in superovulated dairy cows. Theriogenology *21*, 237.
16) GREVE T., CALLESEN H., HYTTEL P. (1984): Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated dairy cows. Theriogenology *21*, 238.
17) HAHN J., SALI G. (1978): Trasferimento degli embrioni nella vacca: esperienze personali e risultati in Italia. Atti Soc. It. Buiatria *10*, 437.
18) HENRICKS D.M., HILL J.R., DICKEY J.F., LAMOND D.R. (1973): Plasma hormone levels in beef cows with induced multiple ovulations. J. Reprod. Fert. *35*, 225.

19) HILL K.G., LOONEY C.R., SCHIEWE M.C., GODKE R.A. (1984): Effect of different lot numbers of follicle stimulating hormone (FSH-P) on superovulation response of donor cattle. Theriogenology *21*, 241.
20) JENSEN M.A., GREVE T., MADEJ A., EDQUIST L.E. (1982): Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF2α Treated cow. Theriogenology *18*, 33-34.
21) LAURIA A., GENAZZANI A.R., OLIVA O., INAUDI P., CREMONESI F., AURELI G. (1980): World Conf. Instrum. Insem., in vitro Fertil. E.T., Kiel, Arch. Androl. *5* suppl., 128.
22) LAURIA A., GENAZZANI A.R., OLIVA O., INAUDI P., CREMONESI F., MONITTOLA C., AURELI G. (1982a): Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotropin. J. Reprod. Fert. *66*, 219-225.
23) LAURIA A., OLIVA O., GENAZZANI A.R., CREMONESI F., CROTTI S., BARBETTI M. (1982b): Improved method to induce superovulation in cattle using human menopausal gonadotropin. Theriogenology *18*, 357-364.
24) LAURIA A., OLIVA O., GENAZZANI A.R., CREMONESI F., GANDOLFI F., BARBETTI M. (1983): Superovulation of dairy and beef cows using porcine FSH with defined LH content. Theriogenology *20*, 675-682.
25) MURPHY B.D., MAPLETOFT R.J., MANNS J., HUMPHREY W.D. (1984): Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. Theriogenology *21*, 117-125.
26) OLIVA O., CREMONESI F., CROTTI S., LAURIA A. (1982): Incidenza della razza, dell'età e del tipo di trattamento sulla superovulazione della bovina. Atti Soc. It. Sc. Vet. *36*, 310-313.
27) PARMIGIANI E., SOANA S., PEZZOLI G., BARBACINI S. (1983): Trattamenti superovulatori con PMSG e FSH in bovine da latte. Atti Soc. It. Buiatria *15*, 197-204.
28) PERRY B., DONALDSON L. (1984): The use of cloprostenol, fenprostalen, and prostaglandin F2alpha in the superovulation of cattle. Theriogenology *21*, 250.
29) SAVAGE N.C., MAPLETOFT R.J. (1984): Superovulation in the cow utilizing estradiol 17beta or gonadotrophin releasing hormone in an FSH-P regimen. Theriogenology *21*, 259.
30) SCHAMS D., MENZER C., SCHALLENBERGER E., HOFFMANN B., HAHN HAHN R. (1978): Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: J.M. SREENAN, Ed. Martinus Nijhoff, The Hague, 122-143.
31) SCHAMS D., MENZER C., SCHALLENBERGER E., HOFFMANN B., PROKOPP A., HAHN R. (1979): Superovulation beim Rinr: Hormonprofile bei Stimulation mit Serum-gonadotropin (PMSG) bzw. hypophysaerem FSH. Zuchthyg. *14*, 11.

32) SCHILLING E., SMIDT D., JOECHLE W. (1984): Impiego dell'alfaprostol in esperimenti di embryo transfer nel bovino. Riv. Zoot. Vet. *12*, 89.
33) SEIDEL G.E.Jr. ELSDEN R.P. NELSON L.D., BOWEN R.A. (1978): Superovulation of cattle with pregnant mare's serum gonadotropin and follicle stimulating hormone. In: Duction in the cow. J.M. SREENAN Ed. Martinus Nijhoff, The Hague, 159-168.
34) SOANA S., PARMIGIANI E., ZANICHELLI S., BARBACINI S. (1983): Programma di E.T. nella bovina: correlazione tra risposta superovulatoria e lattazione. Atti Soc. It. Sc. Vet. *37*, 328-330.
35) SREENAN J.M., BEEHAN D. (1976): Methods of induction of superovulation in the cow and transfer results. In: Egg transfer in cattle. Ed. L.E.A. Rowson, E.E.C. Luxembourg. EUR 5491, 19-34.
36) VOSS H.J., OLIVERA-ANGEL M., HOLTZ W. (1983): Superovulation in beef cattle with PMSG and prostaglandins or progestins. Theriogenology *20*, 615-625.
37) WEST G., WEST C., RISLEY D., DONALDSON L. (1984): Effect of breeding regime on percent ova fertilized in superovulated cows. Theriogenology *21*, 273.

SUMMARY

Observations about PGF2α treatment after embryos recovery in superovulated cows.

A total of 52 dairy cows underwent two different superovulatory treatments. 19 were superovulated with PMSG 3500 I.U. and 33 were treated with FSH. The estrus was induced with prostaglandins, and the embryos were recovered non surgically seven or eight days after the first breeding service. The day of the non surgcial flushing, 12 of the PMSG cows were treated with 0.750 mg of Cloprostenol (Estrumate I.C.I.) and 7 were the control. Within the FSH group, 22 were treated with a single prostaglandin injection, and 11 with a double prostaglandin injection: the first the day of the flushing and the second 8 days later. All the animals were then controlled by rectal palpation three times the first eight days after the injection and the other two at ten days interval, to check the ovarian involution and the presence of a cyclic C.L. The treatment that gave most satisfactory results (90% normalization rate) has been the double prostaglandin treatment.

Finito di stampare
da La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia
nel giugno 1987