UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie

Coordinatrice: Prof. Adriana Ferlazzo

Curriculum:

SCIENZE CLINICHE

Effetti dell'età e dei media di maturazione sulla qualità e capacità di sviluppo di oociti prelevati da ovaie di cavalle dopo macellazione

Tesi di:

Dott.ssa Marilena Rizzo

Tutor:

Ch.mo Prof. Santo Cristarella

Co-Tutor:

Ch.ma Prof. Marta de Ruijter-Villani

Ciclo XXIX

INDICE

1. Introduzione **pag. 1**

1.1 Raccolta degli oociti **pag. 4**

1.2 Maturazione e competenza meiotica degli oociti **pag. 8**

2. Materiali e Metodi **pag. 15**

2.1 Raccolta delle ovaie al macello **pag. 15**

2.2 Raccolta degli oociti **pag. 17**

2.3 Maturazione degli oociti **pag. 19**

2.3.a I Metodica **pag. 20**

2.3.b II Metodica **pag. 22**

2.4 Rimozione del cumulo **pag. 23**

2.4.a Oociti maturati con la I metodica **pag. 25**

2.4.b Oociti maturati con la II metodica **pag. 27**

2.5 Criteri analitici **pag. 28**

2.5.a I metodica **pag. 28**

2.5.b II metodica **pag. 32**

2.6 Analisi statistica **pag. 33**

3 Risultati **pag. 34**

3.1 I metodica **pag. 34**

3.1.a Morfologia **pag. 36**

3.1.b DNA **pag. 39**

3.2 II metodica **pag. 41**

4 Discussioni **pag. 45**

4.1 Effetti dell'età delle cavalle **pag. 45**

4.2 Morfologia del cumulo ooforo **pag. 48**

4.3 Media di maturazione **pag. 52**

5 Conclusioni **pag. 56**

6 Appendice **pag. 58**

7 Bibbliografia **pag. 62**

1 INTRODUZIONE

L'Iniezione Intracitoplasmatica di Spermatozoi (Intracytoplasmatic Sperm Injection, ICSI) è oggi una tecnica comunemente usata per la produzione di embrioni equini *in vitro* (Hinrichs, 2005).

Essa consiste nell'iniettare mediante micromanipolatore un singolo spermatozoo, fresco o congelato-scongelato, direttamente nel citoplasma dell'oocita maturo, dove per oocita maturo si intende lo stadio di metafase della meiosi II (Hinrichs, 2005; Stout, 2006).

Con l'uso dell'ICSI, ogni oocita fecondato che si sviluppi in blastocisti e trasferito in utero è potenzialmente in grado di generare un puledro (Hinrichs, 2005).

Le tecniche di riproduzione assistita garantiscono la produzione di embrioni da oociti di cavalle sportive, cavalle con gravi problemi riproduttivi, cavalle decedute o

macellate (Mari et al., 2005), nonché l'utilizzo di seme di scarsa qualità o con bassa concentrazione spermatica (Hinrichs, 2005; Hinrichs, 2012). Più oociti possono essere raccolti da una o entrambe le ovaie e di conseguenza più oociti di una stessa fattrice possono essere fecondati (Hinrichs, 2005; Hinrichs, 2010).

Dopo l'ICSI, l'oocita fecondato può essere direttamente trasferito nell'ovidotto della cavalla ricevente per via laparotomica o coltivato *in vitro* fino allo stadio di blastocisti e in seguito trasferito in utero con tecnica non chirurgica (Tremoleda et al., 2003). Tuttavia, il tasso di gravidanza sembra essere migliore quando gli oociti sono direttamente trasferiti nell'ovidotto delle cavalle riceventi (75-83%), mentre solo il 10% di oociti fecondati *in vitro* sono in grado di svilupparsi in blastocisti e solo il 60% di questi si traduce in gravidanza (Hinrichs, 2010; Hinrichs et al., 2012; Galli et al., 2007).

È stato già dimostrato che gli oociti equini immaturi sono in grado di completare la meiosi *in vitro*, sebbene i risultati sull'ICSI e sullo sviluppo embrionale siano ancora molto scarsi (Carneiro et al., 2001).

1.1 Raccolta degli oociti

La raccolta degli oociti può essere effettuata su cavalla viva o appena deceduta. Sulla cavalla viva la raccolta degli oociti, oggi conosciuta come Ovum Pick Up, viene effettuata mediante aspirazione eco-guidata del liquido follicolare per via transvaginale. Con la suddetta tecnica possono essere raccolti sia oociti immaturi che oociti maturi dal follicolo dominante pre-ovulatorio dopo 24-35 h dalla somministrazione di hCG o GnRH analoghi.

Nel caso di cavalle decedute o macellate, si procede con l'asportazione immediata delle ovaie e raccolta degli oociti entro 6-8 ore post-mortem.

Il recupero di oociti equini da follicoli immaturi risulta essere difficile se comparato alle altre specie, sia su cavalla viva che dalle ovaie raccolte al macello, a causa della stretta adesione degli oociti alla parete follicolare. Da un confronto morfologico in situ di complessi cumulo-oocita tra cavalla e

bovina risulta che a differenza della bovina, l'oocita di cavalla si trova più vicino alla membrana basale, il cumulo forma un angolo più ottuso con la granulosa murale e manca di finestrature; le cellule del cumulo dispongono di processi che si estendono all'interno della teca sottostante, ancorando il complesso cumulo-oocita in situ (Hawley et al., 1995). Di conseguenza, l'ago-aspirazione del liquido follicolare si traduce in un basso tasso di recupero di oociti, soprattutto di quelli provenienti da follicoli atresici, in quanto questi si presentano in genere parzialmente o completamente denudati dal cumulo (Hinrichs, 1991; Dell'Aquila et al., 2001).

Al contrario elevati tassi di recupero di oociti aventi cumuli compatti, si ottengono con la tecnica del raschiamento della parete dei follicoli, ovvero dello strato delle cellule della granulosa con a seguito l'oocita ancorato (Hinrichs e Di Giorgio, 1991). Questo metodo offre anche l'opportunità di

valutare ogni singolo follicolo in relazione alla qualità degli oociti recuperati, come anche la valutazione delle cellule del cumulo e della granulosa associati a ciascun oocita al momento dell'identificazione (Hinrichs, 2010).

Lo stretto ancoraggio dell'oocita alla parete del follicolo influenza negativamente anche la raccolta mediante aspirazione per via transvaginale. Infatti, con la sola aspirazione dei follicoli immaturi (vale a dire, non pre-ovulatori), la percentuale di raccolta è generalmente bassa (12-25%) (Brück et al., 1992; Cook et al., 1993; Duchamp et al., 1995; Mari et al., 2005).

Tassi di recupero relativamente più alti (45-60%) sono stati riportati con l'uso di tecniche di aspirazione che includono il lavaggio ripetuto di ciascun follicolo, fino a 8-10 volte, attraverso aspirazione con ago a doppio lume, con canali di afflusso e deflusso separati, previa manipolazione dell'ovaia e dell'ago al fine di ottenere un parziale raschiamento delle

pareti dei follicoli (Meintjes et al., 1995;. Bøgh et al., 2002; Colleoni et al., 2007).

Percentuali elevate di raccolta di oociti (65-85%) si ottengono dall'aspirazione di follicoli dominanti pre-ovulatori, dopo 24-35 h dalla stimolazione con gonadotropine (Hinrichs et al., 1990;. Carnevale e Ginther, 1995;. Hinrichs et al., 2000. Carnevale et al., 2005). Ciò è dovuto all'espansione delle cellule del cumulo e di conseguenza all'allentamento del complesso cumulo-ovocita dalla parete del follicolo in prossimità dell'ovulazione.

1.2 Maturazione e competenza meiotica degli oociti

Uno studio effettuato da Hinrichs et al. (1997) ha dimostrato che i complessi cumulo-oocita aventi aspetto espanso (oociti espansi) hanno una più alta e significativa incidenza di maturazione nelle metafasi I e II rispetto a quelli compatti (Hinrichs e Williams, 1997). Inoltre, gli oociti espansi hanno mostrato una più bassa percentuale di degenerazione e richiedono meno tempo nella preparazione della ripartizione della vescicola germinale (germinal vesicle break-down, GVBD) (Hinrichs e Williams, 1997; Alm e Hinrichs, 1996). Tale differenza può essere dovuta al fatto che gli oociti compatti originano da follicoli vitali, ma giovani, che non hanno ancora acquisito competenza meiotica (Hinrichs e Williams, 1997); l'acquisizione della competenza meiotica, infatti, sembra avvenire quando i follicoli hanno un diametro di 20 mm (Hinrichs e Schmidt, 2000) e la maggior parte dei follicoli processati durante

l’ovum pick up sono di dimensioni inferiori. Di contro, gli oociti espansi provengono da follicoli atresici la cui capacità di sopprimere l'acquisizione della competenza meiotica è ormai persa; pertanto, questi oociti sono in grado di maturare anche se recuperati da follicoli di piccole dimensioni (Hinrichs e Schmidt, 2000; Hinrichs, 2013).

Una rigorosa selezione degli oociti viene effettuata prima della maturazione; ad esempio, nella bovina vengono selezionati e destinati all’ICSI solo complessi cumulo-oocita aventi aspetto compatto.

Nella cavalla, tuttavia, la maggior parte degli oociti compatti non hanno una sufficiente competenza meiotica per la maturazione *in vitro* fino alla metafase II (Hinrichs, 2010), pertanto una simile selezione in questa specie eliminerebbe a priori la maggior parte degli oociti altrimenti competenti (oociti espansi) (Hinrichs, 2010).

La maturazione degli oociti equini è un processo complesso caratterizzato da diversi cambiamenti di sviluppo interessanti il nucleo e il citoplasma.

La maturazione del nucleo include non solo la ripartizione della vescicola germinale ma anche la riorganizzazione e la segregazione dei cromosomi.

La maturazione del citoplasma richiede l'accumulo di mRNA, proteine, substrati e nutrienti ma anche la migrazione dei granuli corticali, importante *step* per la realizzazione delle competenze di sviluppo degli oociti (Goudet et al., 1997; Watson, 2007).

L'oocita deve essere maturo al fine di poter sopravvivere, diventare fecondabile e capace di svilupparsi ulteriormente (Rambags et al., 2014).

Sono stati valutati diversi tipi di media e periodi differenti d'incubazione per la maturazione degli oociti equini (Carneiro et al., 2001). Tuttavia, la maturazione a

metafase II è stata deludente per la maggior parte di essi (Tremoleda et al., 2001).

La competenza meiotica degli oociti equini, inoltre, non dipende solo da fattori tecnici e follicolari (Hinrichs, 2010).

Nella maggior parte dei mammiferi, il successo riproduttivo diminuisce con l'aumentare dell'età materna (Rambags et al., 2014). L'invecchiamento dell'apparato riproduttore induce cambiamenti multifattoriali i quali, a loro volta, agiscono sulla competenza oocitaria probabilmente attraverso l'alterazione della funzionalità mitocondriale (Altermatt et al., 2009). I mitocondri sono coinvolti in diversi processi riguardanti l'oocita e sembrano essere particolarmente predisposti a risentire del danno ossidativo dal momento che il loro DNA (mtDNA) è molto vicino al sito di generazione dei ROS (specie reattive all'ossigeno).

In un recente studio di Rambags et al. (2014) è stato osservato che l'invecchiamento materno era associato all'aumento della suscettibilità al danno e alla perdita mitocondriale in oociti equini durante la maturazione *in vitro*. Infatti, all'aumento dell'età materna seguiva la diminuzione della quantità di mtDNA negli oociti dopo maturazione *in vitro* (Rambags et al., 2014).

Diverse cause dipendenti dall'età materna influiscono sul successo riproduttivo.

È stato dimostrato che gli oociti provenienti da donne di età compresa tra i 40-45 anni mostrano maggiori anomalie nel posizionamento dei cromosomi se comparati con oociti provenienti da donne più giovani (20-25 anni). L'organizzazione dei microtubuli, infatti, risulta anormale o disordinata; i cromosomi non sono strettamente allineati, con uno o più di essi considerevolmente maldisposti rispetto alla piastra metafasica (Battaglia et al., 1996).

Durante la maturazione dell'oocita, il posizionamento dei cromosomi è collegato al processo di assemblaggio del fuso meiotico, il quale può essere disfunzionale negli individui più vecchi. Le anomalie del fuso possono essere causate dai cambiamenti dei fattori regolatori dello stesso e/o da un alterato tempismo delle fasi della meiosi risultante da irregolarità dei microtubuli e da un inusuale posizionamento dei cromosomi (Battaglia et al., 1996).

Come nella donna, anche nella specie equina le anomalie cromosomiche degli oociti sono considerate causa di perdita precoce della gravidanza, tuttavia attualmente non ci sono dati disponibili in letteratura sulla loro incidenza (Rambags et al., 2005).

La maggior parte degli studi presenti in letteratura riguardano i topi da laboratorio e non esistono informazioni sulla qualità degli oociti equini in relazione all'età del soggetto.

Lo scopo di questo studio è di focalizzare l'attenzione sugli effetti dell'età materna, dell'aspetto iniziale del cumulo ooforo e dei media di maturazione sulla qualità di oociti raccolti da ovaie di cavalle dopo macellazione, basandosi sulla morfologia e le fasi di replicazione.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Raccolta delle ovaie al macello

Nei mesi di Novembre-Dicembre 2014 e Giugno-Dicembre 2015 sono state raccolte, presso il macello privato Euro Meat Group di Mouscron (Belgio) 321 ovaie, rispettivamente 54 da 27 cavalle di età compresa tra i 2 e i 26 anni e 267 da 134 cavalle di età compresa tra i 3 e 28 anni.

Le ovaie asportate sono state suddivise in due gruppi: il primo gruppo era costituito da ovaie di cavalle avente età < 14 anni (giovani); il secondo gruppo era costituito da ovaie di cavalle di età ≥ 15 anni (vecchie). Le ovaie di ogni singola cavalla venivano conservate separatamente in sacchettini di plastica, posti in contenitori di polistirolo e mantenuti ad una temperatura di circa 30° C per essere

trasportati nell'arco di 4 ore presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze Equine, Sezione di Riproduzione e di Utrecht.

Giunti in laboratorio, le ovaie venivano pulite dai tessuti in eccesso e sottoposte a lavaggi seriali per tre volte con acqua corrente alla temperatura di 30 °C, 3 volte con Ringer Lattato-PS (Ringer Lattato + Peni-Streptomicina, 1:100) e infine 3 volte in PBS-PS (Phosphate Buffered Saline + Peni-Streptomicina, 1:100), entrambi pre-riscaldati.

2.2 Raccolta degli oociti

Gli ovociti venivano recuperati previa puntura della parete follicolare con lama da bisturi n°11 il fluido follicolare veniva raccolto in piastre Petri di 9 cm riempite con 3 ml di Euroflush-eparina (Heparine 400 µl/L, LEO Pharma BV, Denmark; Euroflush, IVM Technologies, The Netherlands).

Subito dopo la raccolta del liquido veniva effettuato il raschiamento della parete del follicolo con l'ausilio di "*bone curettes*"; la cavità veniva lavata per almeno due volte, spruzzando energicamente mediante siringa e ago da 18 gauge, PBS-PS (Penicillina-streptomicina in PBS, 1:250).

Il fluido follicolare e i liquidi di lavaggio raccolti venivano sottoposti a filtrazione e valutati allo stereo-microscopio.

Le piastre Petri e i media utilizzati durante tutta la procedura di raccolta degli oociti, venivano preventivamente pre-riscaldati ad una temperatura di 37 °C.

Tra i vari passaggi ciascuna piastra Petri veniva accuratamente lavata con euroflush e ricontrollata, al fine di escludere l'eventuale presenza di ulteriori oociti.

Gli oociti raccolti venivano lavati per quattro volte in H-SOF medium (Hepes-Synthetic Oviduct Fluid, Galli C. - Avantea, Italia) e quindi trasferiti nei rispettivi media di coltura.

2.3 Maturazione degli oociti

Per la maturazione degli oociti sono state testate due differenti metodiche.

Nella prima metodica è stata valutata la morfologia e maturazione degli oociti utilizzando due differenti media; con mentre, nella seconda metodica è stata valutata la competenza meiotica utilizzando un solo medium.

2.3.a *I Metodica*

Nell'anno 2014 abbiamo utilizzato e messo a confronto due diversi media di maturazione da testare su oociti provenienti da cavalle giovani e da cavalle vecchie.

Il primo medium, "**SR**" (**Serum replacement**), conteneva 3,6 ml di DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco – The Netherlands), 400 µl di **Serum Replacement** (Gibco – The Netherlands), 4 µl di hEGF (Human Epidermal Growth Factor, Peprotech – USA), 40 µl Cysteine+Cysteamine (Sigma – USA), 40 µl di Lactate solution (Sigma – USA), 4 µl di ITS (Insuline-Transferin-Selenite, VWR International BV – The Netherlands) e 4 µl di FSH (Follicle Stimulating Hormone, Sigma – USA).

Il secondo medium ("**FCS**" **medium**) differiva dal precedente per la sostituzione del Serum Replacement con

400 µl di **FCS** (**Fetal Calf Serum**, Gibco – The Netherlands).

Sono stati utilizzati in totale 170 oociti suddivisi come descritto di seguito:

- Gruppo 1: IVM+SR – 39 oociti giovani;
- Gruppo 2: IVM+FCS – 33 oociti giovani;
- Gruppo 3: IVM+SR – 43 oociti vecchi;
- Gruppo 4: IVM+FCS – 55 oociti vecchi.

Tutti i gruppi sono stati incubati a 38.5 °C al 5% di CO_2 e O_2 per 24-36 ore in provette contenenti 500 µl del rispettivo medium (max 25 oociti/provetta).

2.3.b *II Metodica*

Alla luce dei risultati ottenuti dall'applicazione della precedente metodica, nel 2015 abbiamo selezionato ed utilizzato il solo IVM medium con **FCS** al fine di testare e mettere confronto la competenza meiotica di oociti provenienti da cavalle giovani e vecchie. Sono stati recuperati 815 oociti, suddivisi in relazione all'età e alla morfologia del cumulo al momento della raccolta (compatti ed espansi), come descritto di seguito:

- COCs vecchi – compatti: 202
- COCs vecchi – espansi: 112
- COCs giovani – compatti: 339
- COCs giovani – espansi: 162

Ciascun gruppo è stato incubato a 38.5 °C al 5% di CO_2 e O_2 per 24-36 ore, in piastre con pozzetti contenenti 500 µl/cadauno di medium IVM+FCS ricoperti da 500 µl di olio minerale (max 15 oociti/pozzetto).

2.4 Rimozione del cumulo

Tutti gli oociti, di entrambi le metodiche, sono stati sottoposti alle medesime procedure di denudazione.

Dopo 24 ore di maturazione, gli oociti venivano trasferiti in piastre Petri di 3 cm contenenti H-SOF + ialuronidasi (1:100) (H-SOF, Hepes-Synthetic Oviduct Fluid, Galli C. - Avantea, Italia; Hyaluronidase, Sigma – USA). La rimozione delle cellule del cumulo veniva effettuata meccanicamente pipettando su e giù gli oociti mediante uso di pipetta capillare.

Gli oociti venivano messi per 1,30 min in una soluzione 1:100 di Tripsina (Sigma, USA) in H-SOF, e poi trasferiti in H-SOF + 10% di FCS per inattivare gli effetti della precedente soluzione. Infine, venivano nuovamente pipettati e lavati in H-SOF per la rimozione delle cellule del cumulo restanti. Durante tutta la procedura, i gruppi venivano trattati separatamente.

Dopo la rimozione del cumulo, gli oociti provenienti dalle due differenti metodiche sono stati sottoposti a differenti criteri di valutazione.

Gli oociti provenienti dalla prima metodica sono stati sottoposti a fissazione e colorazione per valutare la morfologia e la maturazione del nucleo; mentre, gli oociti provenienti dalla seconda metodica sono stati osservati direttamente, senza fissazione e colorazione, per valutare la competenza meiotica dopo maturazione.

2.4.a *Oociti maturati con la I metodica*:

Gli oociti sono stati fissati in una soluzione di paraformaldeide al 4 % (PFA) (Klinipath BV, The Netherlands) per 1 ora a temperatura ambiente e poi trasferiti in PFA all'1% e conservati a 4 °C. Tutti gli oociti venivano lavati in PBS+PVP 3mg/ml (Sigma, USA) 3 volte per 5 min prima di procedere con la colorazione. Questa veniva effettuata incubando gli oociti di ciascun gruppo a temperatura ambiente, in assenza di luce, per 15 min in PBS contenente 0,1 µg/ml di DAPI (fluorescent membrane-impermeable DNA stain 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (Molecular Probes Europe BV, The Netherlands).

Dopo la colorazione, gli oociti venivano montati su vetrino Superfrost Plus (Menzel, Braunschweig, Germany), utilizzando uno spaziatore suddiviso in pozzetti con 10 µl di

Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame – CA), infine coperto con vetrino copri-oggetti sigillato con smalto.

Tutti gli oociti sono stati valutati per la morfologia e la maturazione del nucleo. Per l'analisi del DNA e per la morfologia è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza (BH-2RFCA, Olympus – Japan) con ingrandimento a 10x e 20x.

Tutti gli oociti sono stati infine fotografati con fotocamera digitale Canon E-330.

2.4.b ***Oociti maturati con la II metodica****:*

Dopo denudazione, gli oociti di ciascun gruppo venivano trasferiti in apposite piastre Petri contenenti un massimo di 12 gocce da 10 µl di H-SOF (1-2 oociti per goccia), ricoperte da olio minerale, ed osservati singolarmente mediante l'uso di micromanipolatore Eppendorf TransferMan® NK2.

2.5 Criteri Analitici

2.5.a *I metodica*

Tutti gli oociti (n=170) sono stati classificati sulla base di precedenti osservazioni secondo le quali negli oociti equini un citoplasma eterogeneo è associato con una più alta competenza meiotica.

Questo aspetto viene frequentemente osservato in oociti espansi; mentre, maggior parte degli oociti compatti hanno un citoplasma omogeneo e sono associati ad una ridotta competenza meiotica (Hinrichs, 2010).

Per le ***caratteristiche morfologiche*** gli oociti venivano classificati i 5 gruppi indicati con le lettere A-E:

- oociti di forma sferica, citoplasma omogeneo e corpo polare visibile **(A)**;
- oociti di forma non completamente sferica e citoplasma omogeneo **(B)**;

- oocita non completamente sferico, citoplasma non interamente omogeneo e presenza di alcuni artefatti **(C)**;
- oociti con forma e citoplasma anormale, parzialmente degenerato o frammentato **(D)**;
- oociti non valutabili per la presenza di troppe cellule del cumulo o artefatti **(E)** **(Figura 1)**.

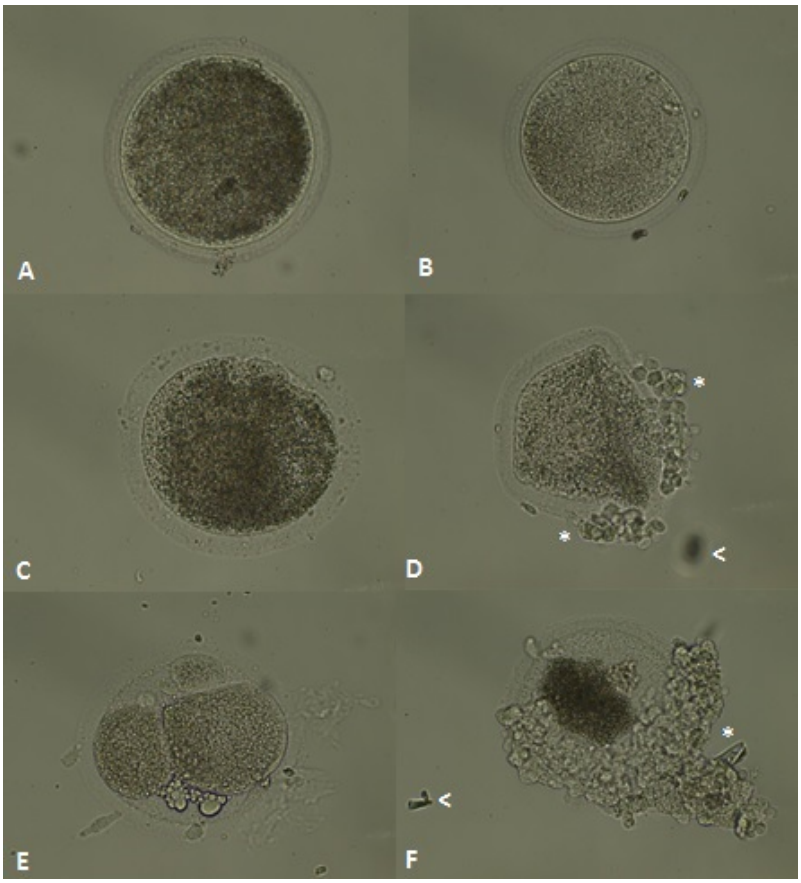

Figure 1. **Equine oocyte after in vitro maturation for 24 hours, fluorescence microscope (10-20x).**

A and B: round shaped, homogeneous cytoplasm oocytes (A class.), C: not a full round shape, homogeneous cytoplasm (B class.), D: not a full round shape, full homogeneous cytoplasm (C class.), E: abnormal shape and cytoplasm, could be degenerated or fragmentated (D class.), F: Not analyzable due to cumulus cells or artefacts (E class.). * cumulus cells < artefact

Per la ***valutazione del DNA*** gli oociti venivano classificati in 5 gruppi indicati con le lettere F-L:

- stadio di vescicola germinale o GV **(F)**;
- Metafase I **(G)**;
- Metafase II **(H)**;
- frammentato o degenerato **(I)**;
- non analizzabile a causa di troppe cellule del cumulo o DNA non colorato **(L)** (**Figura 2**).

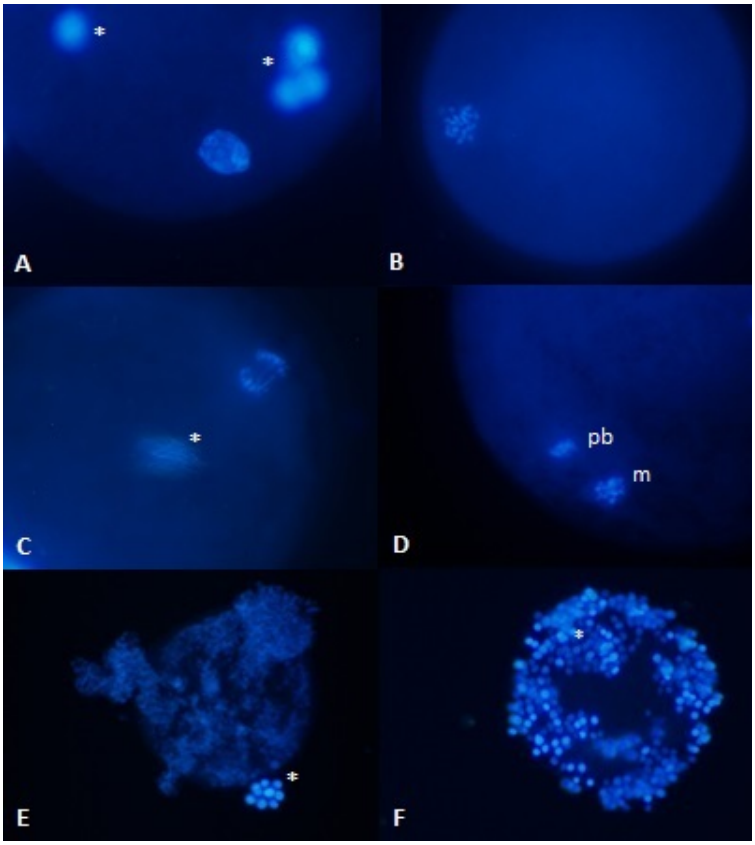

Figure 2. **Equine oocyte after DNA staining with fluorescence microscope (10-20x)**

A: Germinal vesicle breakdown (F class.), B: Metaphase I (G class.), C: Anaphase I, D: Metaphase II (m) and the first polar body (pb) (H class.), E: Degenerated (I class.), F: Not analyzable due to many cumulus cells (L class.). * cumulus cells

2.5.b. *II Metodica*

Tutti gli oociti (n=815) venivano classificati, in base alla competenza meiotica raggiunta dopo la maturazione, in 3 gruppi:

- **MII**: presenza del primo corpo polare, pro-metafase della seconda meiosi;
- **MI**: assenza del corpo polare, pro-metafase della prima meiosi;
- **Degenerato**: citoplasma e nucleo frammentato e degenerato.

2.6 Analisi Statistica

L'analisi dei dati è stata eseguita mediante SPSS Statistics Data Editor 22.0.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). I diversi gruppi sono stati tra loro comparati usando un T test indipendente per valutarne la significatività. Le differenze venivano considerati statisticamente significative solo per valori di $P < 0,05$.

3 RISULTATI

3.1 *I Metodica*

Sono stati processati in totale 553 follicoli su 54 ovaie (25 giovani e 29 vecchie) dai quali sono stati recuperati 337 oociti (60,94%). Sulle 25 ovaie di cavalle giovani sono stati sottoposti alla procedura di "*scraping*" 221 follicoli, con una media di 8,84 (follicoli/ovaia), e 332 follicoli sulle 29 ovaie di cavalle vecchie, con una media di 11,44 (follicoli/ovaia).

Dalle ovaie di cavalle giovani sono stati recuperati 153 oociti (69,23%), contro 184 oociti (55,42%) raccolti dalle ovaie di cavalla vecchie, con una lieve differenza percentuale a favore di quelli provenienti da cavalle giovani (**Tabella 1**).

Date	Age	n. ovaries	n. follicles	n. oocytes	Percentage[1]
05-11-2014	Young	8	112	68	60,7%
	Old	9	112	72	64,3%
19-11-2014	Young	6	53	46	86,8%
	Old	8	54	30	55,6%
27-11-2014	Young	11	56	39	69,0%
	Old	12	166	82	49,0%

Table 1. **Collection of equine ovaries. Total amount of scraped follicles and collected oocytes.**
[1] Percentages based on number of oocytes collected out of number of follicles

Dei 337 oociti totali raccolti solo 170 sono stati inclusi nel presente studio.

Dei 170 oociti analizzati dopo maturazione, 28 oociti sono stati esclusi dallo studio poiché persi o rotti durante la manipolazione.

I 142 oociti selezionati sono stati analizzati per la morfologia e per la maturazione del nucleo (IVM-SR giovani n=32; IVM-FCS giovani n=23; IVM-SR vecchi n=43; IVM-FCS vecchi n=44).

3.1.a *Morfologia*:

Per quanto riguarda la morfologia, su un totale di 55 oociti (32 SR + 23 FCS) provenienti da cavalle giovani, 28 oociti sono stati classificati come A (51%), 16 oociti come B (29%), 2 oociti come C (3,6%) e 9 oociti come D (16,4%); invece, degli 87 oociti provenienti da cavalle anziane (43 SR + 44 FCS), 40 oociti sono stati classificati come A (46%), 32 oociti come B (36,8%), 8 oociti come C (9,2%), 5 oociti come D (5,7%) e 2 oociti come E (2,3%) (**Tabella 2**).

Morphology Age (SR+FCS)	A	B	C	D	E	Tot
YOUNG	28	16	8	9	0	55
OLD	40	32	8	5	2	87
						142
Morphology Media (young+old)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**Tot**
SR	32	28	4	9	2	75
FCS	36	20	6	5	0	67
						142

***Table 2*: Analitical Criteria - Morphology. A) Oocyte with homogenous cytoplasm, round shape and a polar body; B) Oocyte with homogenous cytoplasm, not a full round shape; C) not a full round shape and not fully homogeneous cytoplasm; D) abnormal shape, abnormal cytoplasm, could be degenerated or fragmentated; E) Oocyte is not analyzable due to many cumulus cells or artefacts.**

In relazione ai media utilizzati, sommando tra loro gli oociti morfologicamente classificati come A e B, quelli maturati con FCS presentavano un aspetto solo lievemente migliore (83% FCS vs 80% SR) ed un complesso cumulo-oocita più espanso che li rendeva più facili da denudare (**Figura 3**, A e B).

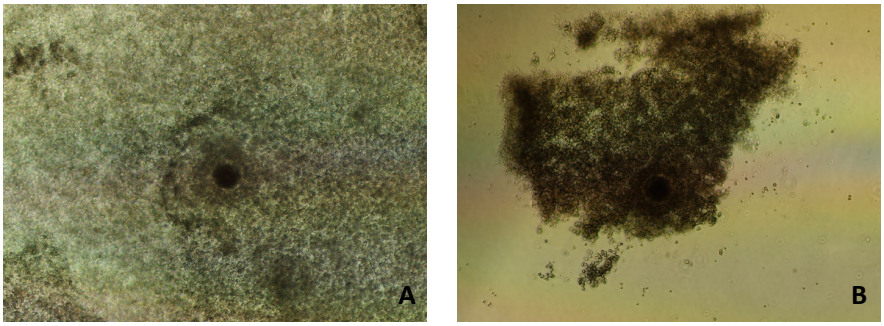

Figure 3. **Equine oocytes after 24 to 36 hours of *in vitro* maturation.**

A: Expanded cumulus oocyte complex, matured in IVM medium containing SR, B: Compact cumulus oocyte complex, matured in IVM medium containing FCS.

Tuttavia, non sono state osservate differenze morfologiche statisticamente significative tra i vari gruppi, indipendentemente dall'età o dal medium di maturazione.

3.1.b *DNA:*

Per quanto riguarda la valutazione del DNA, 59 oociti su 142 sono stati classificati come E, ovvero non analizzabili, e pertanto esclusi poiché impossibile stabilire lo stadio di maturazione del nucleo.

Sebbene non siano state riscontrate notevoli differenze nella maturazione del DNA oocitario nei due gruppi d'età, la percentuale di oociti maturati a metafase II (categoria C) era lievemente più alta nelle cavalle anziane 84,6% rispetto a quelle giovani 67,7%, con un totale del 78,3% indipendentemente dai gruppi (età e media) (**Tabella 3**).

DNA Age (SR+FCS)	A	B	C	D	Tot	E	Tot+E
YOUNG	0	4	21	6	31	24	55
OLD	1	1	44	6	52	35	87
						59	**142**
DNA Media (young+old)	**A**	**B**	**C**	**D**	**Tot**	**E**	
SR	0	3	26	7	36	39	75
FCS	1	2	39	5	47	20	67
						59	**142**

***Table 3*: Analitical Criteria - DNA. F) Germinal Vesicle Stage; G) Metaphase I; H) Metaphase II; I) Degenerated; L) Not analyzable (cumulus)**

Infine, seppure non vi erano differenze significative tra i due media, la percentuale di oociti maturati a metafase II (categoria C) nel medium con Fetal Calf Serum era pari al 83% rispetto a quelli maturati nel medium con il Serum Replacement pari, invece, al 72%.

3.2 *II Metodica*

Sono stati processati 1559 follicoli presenti sulle 267 ovaie (149 giovani + 118 vecchie). Su 149 ovaie di cavalle giovani sono stati sottoposti alla procedura di "*scraping*" 972 follicoli, con una media di 6,52 (follicoli/ovaia), e 587 follicoli dalle 118 ovaie di cavalle vecchie, con una media di 4,97 (follicoli/ovaia). Sono stati recuperati in totale 815 oociti, di cui 501 (51,54%) provenienti dalle ovaie di cavalle giovani e 314 dalle ovaie di cavalle vecchie (53,49 %).

Tra i 501 oociti di cavalle giovani, 339 (67,66 %) presentavano un cumulo d'aspetto compatto mentre i restanti 162 (32,34%) avevano aspetto espanso; invece, dei 314 oociti di cavalle vecchie, 202 (64,33%) si presentavano compatti e 112 espansi (35,67%) (**Tabella 4**).

Age	n.mares	n.ovaries	n.follicles	n.oocytes	compact	expanded
Young	75	149	972	501	339	162
Old	59	118	587	314	202	112
Tot	134	267	1559	815	541	274

Table 4: **Collection of equine ovaries, 2015. Total amount of scraped follicles and collected oocytes.**

Tutti gli oociti di ciascun gruppo, sono stati osservati singolarmente al micromanipolatore e classificati in **Degenerati**, **Metafase I** e **Metafase II**, come precedentemente descritto (**Tabella 5**).

	Tot	n.Deg	%	n.MI	%	n.MII	%
Young Compact	339	230	67,9	37	10,9	72	21,2
Young Expanded	162	76	46,9	12	7,4	74	45,7
Old Compact	202	106	52,5	32	15,8	64	31,7
Old Expanded	112	47	42,0	7	6,2	58	51,8

Table 5: **Deg: degenerate; MI: metaphase I; MII: metaphase II**

Per quanto riguarda gli oociti provenienti dalle cavalle giovani, su 339 oociti del gruppo compatti, 230 si

presentavano Degenerati (67,9%), 37 in Metafase I (10,9%) e 72 in Metafase II (21,2%); invece, su 162 oociti del gruppo espansi, 76 erano Degenerati (46,9%), 12 in Metafase I (7,4%) e 74 in Metafase II (45,7%). Altresì, Per quanto riguarda gli oociti provenienti dalle cavalle vecchie, su 202 oociti aventi aspetto compatto, 106 si presentavano Degenerati (52,5%), 32 in Metafase I (15,8%) e 64 in Metafase II (31,7%); invece, su 112 oociti del gruppo espansi, 47 erano Degenerati (42%), 7 in Metafase I (6,2%) e 58 in Metafase II (51,8%) (**Tabella5**).

Indipendentemente dall'aspetto del cumulo, la percentuale di maturazione, ovvero di oociti che hanno raggiunto la metafase II, di quelli provenienti da cavalle vecchie (38,9% MII; 64 C + 58 E su 314) era lievemente più alta rispetto agli oociti provenienti da cavalle giovani (29,1% MII; 72 C + 74 E su 501) (**Tabella 6**).

Indipendentemente dall'età delle cavalle, la percentuale di oociti espansi che hanno raggiunto la metafase II (48,2%) era nettamente più alta rispetto agli oociti dal cumulo compatto (25,1%) (**Tabella 6**).

	Tot C+E	n.Deg	%	n.MI	%	n.MII	%
Young	501	306	61,1	49	9,8	146	29,1
Old	314	153	48,7	39	12,4	122	38,9
	Tot Y+O	**n.Deg**	**%**	**n.MI**	**%**	**n.MII**	**%**
Compact	541	336	62,1	69	12,8	136	25,1
Expanded	274	123	44,9	19	6,9	132	48,2
	Tot Y+O	**n.Deg**	**%**	**n.MI**	**%**	**n.MII**	**%**
C+E	815	459	56,3	88	10,8	268	32,9

***Table 6*: C: compact; E: expanded; Deg: degenerate; MI: metaphase I; MII: metaphase II**

Infine, la percentuale di maturazione totale è stata del 32,9 % (268 MII su 815) indipendentemente dai gruppi (età e morfología del cumulo).

4 DISCUSSIONI

Con il presente studio abbiamo voluto descrivere gli effetti dell'età, dell'aspetto del cumulo ooforo (compatto vs espanso) e dei media di maturazione sulla qualità e capacità di sviluppo degli oociti equini prelevati da ovaie raccolte al macello.

4.1 *Effetti dell'età delle cavalle*

Sebbene è stato precedentemente descritto che la maturazione di oociti in vitro di cavalle anziane è caratterizzata da un'alta suscettibilità alla perdita e al danno mitocondriale (Rambags et al., 2014), i risultati del nostro studio sembrano non mostrare effetti significativi dell'età materna sulla qualità e capacità di sviluppo degli oociti equini dopo maturazione in vitro.

In uno studio di Carnevale et al. (2000), hanno messo a confronto la morfologia di oociti di cavalle giovani (3-10 anni) e vecchie (>19 anni) con l'uso di un microscopio elettronico; gli oociti provenienti dalle cavalle vecchie contenevano grandi vescicole (>1% del volume dell'area totale dell'oocita) e il numero medio di grandi vescicole per oocita era più alto nel gruppo delle anziane. Gli oociti delle cavalle anziane, inoltre, tendevano ad avere meno granuli corticali e delle aree più grandi di reticolo endoplasmatico liscio circondato da mitocondri. Altri mostravano forme atipiche, sezioni di oolemma con radi microvilli e sezioni di ooplasma senza organelli. Gli Autori hanno suggerito che l'aumento delle vacuolizzazioni possa essere causato da un danno accumulato negli oociti equini (Carnevale et al., 2000; Madill, 2002).

Più spesso, oociti di donne e di topi di laboratorio di età avanzata, mostrano cambiamenti nell'assemblaggio e nell'organizzazione del fuso meiotico.

Poiché i dati circa l'effetto dell'invecchiamento materno sulla qualità degli oociti equini sono scarsi, sono necessarie ulteriori ricerche per capire se l'aumento dell'età materna può essere associato ad una diminuzione della qualità e delle competenze di sviluppo.

4.2 *Morfologia del cumulo ooforo*

Nel presente studio gli oociti ottenuti dopo maturazione in vitro in IVM medium contenente FCS presentavano una più larga espansione delle cellule del cumulo ooforo rispetto a quelli maturati in IVM medium con SR.

In uno studio di Leibfried-Rutlegde et al. (1986), è stato suggerito che il Fetal Calf Serum può essere un componente essenziale per l'espansione del cumulo FSH indotto, per il grado di sopravvivenza delle stesse cellule, e per il completamento della prima divisione meiotica negli oociti di criceto e bovina.

Carneiro et al. (2001), invece, hanno dimostrato che se il FCS era assente, l'IGF-I aveva un effetto positivo sulla maturazione in vitro di oociti equini, suggerendo che il FCS possa avere un effetto nelle interazioni dell'IGF-I o sulle loro proteine di legame. Dato che non si conosce molto

circa gli effetti del FCS nell'IVM medium, sono necessarie ulteriori indagini per confermare gli effetti dei due diversi media sull'espansione del cumulo ooforo.

Come conseguenza di una ridotta espansione del cumulo, il processo di denudazione era decisamente più difficile negli oociti maturati con SR, di cui 39 su 75 (52%), infatti, non erano analizzabili a causa di un forte attaccamento delle cellule del cumulo attorno all'oocita (Figura 1. F).

In relazione all'aspetto del cumulo e alla sua possibile influenza sulla capacità di maturazione dell'oocita, mettendo a confronto le percentuali di oociti che hanno raggiunto la metafase II tra i gruppi compatti ed espansi, nel nostro studio si evince una netta differenza a favore di quelli che prima della maturazione *in vitro* presentavano un aspetto espanso, indipendentemente dall'età della cavalla. Tuttavia, la più alta percentuale ottenuta (51,8%)

apparteneva al gruppo di oociti espansi provenienti da cavalle anziane il cui numero totale di oociti espansi raccolti era, in proporzione, lievemente più alto che nelle giovani.

Hinrichs e Williams (1997) hanno dimostrato che i complessi cumulo-oocita aventi aspetto espanso hanno una più alta e significativa incidenza di maturazione nelle metafasi I e II rispetto a quelli compatti; inoltre, in uno studio di Alm e Hinrichs (1996), gli oociti espansi mostravano una più bassa percentuale di degenerazione e richiedevano meno tempo nella preparazione della ripartizione della vescicola germinale (GVBD).

La competenza meiotica degli oociti equini e la durata dei tempi di coltura, necessaria per ottenere la massima percentuale di maturazione, dipendono dalla configurazione iniziale del cumulo ooforo, dalle dimensioni del follicolo da cui è stato recuperato e dal periodo di tempo intercorso tra

l’asportazione dell’ovaia e la raccolta dell'oocita (Hinrichs, 2010).

L’acquisizione della competenza meiotica, infatti, sembra avvenire quando i follicoli hanno un diametro di 20 mm (Hinrichs e Schmidt, 2000) e la maggior parte dei follicoli processati durante l’Ovum Pick Up sono di dimensioni inferiori, come anche quelli di cavalle molto anziane nelle cui ovaie il numero di follicoli atresici è di solito maggiore.

4.3 *Media di maturazione*

Nel nostro studio sono stati utilizzati dei media di maturazione diversi rispetto a quelli usati in altri reports.

Abbiamo utilizzato un medium di maturazione in vitro a base di DMEM, in combinazione con diversi supplementi (EGF umana, Cisteina e Cisteamina, Lattato, ITS, FSH, SR o FCS).

I vari media di maturazione sono stati valutati al fine di ottenere la più alta percentuale di maturazione di ovociti.

Alcuni laboratori utilizzano media a base di colture tissutali (TCM199 o M199) (Pereira et al., 2012), altri a base di B2 o Ham'sF10 (Galli et al., 2007), entrambi in combinazione con una diversa concentrazione di ormoni, siero o fluido follicolare. E' stato dimostrato che l'aggiunta del fattore di crescita epidermico (EGF) aumenta la percentuale di fertilizzazione nei suini (Hinrichs et al.,

2002) e anche la maturazione nucleare nella cavalla (Lorenzo et al., 2002).

Pereira et al. (2011) hanno osservato che la percentuale di maturazione degli oociti equini è aumentata a seguito dell'aggiunta dell'ormone della crescita equina (eGH) in combinazione con IGF-1.

La percentuale di maturazione tra i diversi laboratori varia da 20 a 85%, con una media del 60% di oociti che maturano fino alla metafase II (Galli et al., 2007; Hinrichs, 2010).

Nel 1981, Fulka e Okolski hanno riportato la prima maturazione in vitro di oociti equini ed hanno osservato che il 68% di essi avevano raggiunto la metafase II (Hinrichs, 2010).

Galli et al. (2007) utilizzando un DMEM medium hanno ottenuto una più alta percentuale di sviluppo delle blastocisti (26%) rispetto a oociti maturati in M199

modificato (12%). Tuttavia, Hinrichs et al. (2013) hanno riportato che la più alta percentuale di blastocisti (42%) ottenute in vitro è stata osservata dopo l'utilizzo di un IVM medium che includeva M199 con Sali di Earle, 10% di Siero fetale Bovino (FBS) e 5 mU mL-1 FSH bovino; gli oociti/embrioni venivano incubati in atmosfera umidificata con 5% di CO2 a 38.2 °C (Hinrichs, 2010; Hinrichs, 2012).

Nel presente studio, non è stata eseguita l'ICSI con gli oociti maturati e pertanto non abbiamo nessuna informazione concernente le percentuali di sviluppo in blastocisti; l'obiettivo è stato quello di testare i diversi media al fine di ottenere le più alte percentuali di maturazione e individuare quindi la combinazione migliore.

Entrambi i media utilizzati si sono dimostrati parimenti adeguati nell'ottenimento di oociti in metafase II; le percentuali di maturazione, infatti, differivano solo di

poco: 83% per il medium IVM con FCS (39/47) contro il 72% per il medium IVM con SR (26/36).

5 CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti emerge che né l'età materna né i media hanno mostrato effetti significativi sulle capacità di sviluppo e sulla qualità degli oociti prelevati da ovaie di cavalle dopo macellazione.

Sebbene sia stata notata una differenza nell'espansione del cumulo tra gli oociti dei due diversi media, non abbiamo registrato significative differenze nella loro qualità e capacità di sviluppo. Al contrario, possiamo confermare quanto riportato in letteratura, ovvero che l'aspetto del cumulo ooforo prima della maturazione *in vitro* influenza la competenza meiotica degli oociti, a favore di quelli espansi rispetto a quelli compatti.

Possiamo quindi concludere che entrambi i nostri media potrebbero essere usati per la maturazione *in vitro* di oociti equini.

È possibile, tuttavia, che con i correnti metodi abbiamo sottostimato gli effetti dell'età materna; uno studio che valuti la morfologia del fuso meiotico e l'allineamento dei cromosomi o la coesione dei centromeri potrebbe possibilmente rivelare in modo più preciso, come nelle altre specie, gli effetti dell'età sulla capacità di organizzazione e assemblaggio del fuso meiotico. Pertanto, sono necessarie indagini più approfondite al fine di comprendere meglio gli effetti dell'età materna sulla qualità degli oociti nelle cavalle.

6 APPENDICE

Lista di materiale usato

Ovary collection		
Large beakers	Schott & Gen Mainz	JENA ^{ER} Glas
Plastic bags		
Perspex box		
Scissors		
Ringer Lactate	B. Braun, Melsungen, Germany	
PBS	B. Braun, Melsungen, Germany	REF. 8344A162
Pen/Strep	Live Technologies,	REF. 15140122

Oocyte collection		
warm plate		
Microscope	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany	REF. Wild M3C
Cell strainer 70 um	BD Falcon, USA	REF. 352350
3 cm petridish	BD Falcon, USA	REF. 351008
9 cm petridish	BD Falcon, USA	REF. 633102
Bone curette		
Tweezers		
20 ml Injeckt ® Luer Solo	B. Braun, Melsungen, Germany	REF. 4606205V
Sterican ® Needles (1.20 x 40 mm & 0.80 x 40 mm)	B. Braun, Melsungen, Germany	REF. 4038088-01
Scalpelholder		
Pointed scalpel (No. 11)	Swann-Morton, Sheffield, United Kingdom	REF. 0203
Sterile cloths and paper	University of Utrecht, Faculty Veterinary Medicine, Utrecht, The Netherlands	
Sterile disposable graduated transfer pipets 3ml, 15.2 cm	VWR, The Netherlands	REF. 612-4473
Beaker for disposing fluid		
P20 / P200 / P1000	Rainin NL, Mettler-Toledo BV, The Netherlands	
Sterile tips	Rainin NL, Mettler-Toledo BV, The Netherlands	
Euroflush	IMV Technologies, The Netherlands	REF. 19450
Heparin	LEO Pharma A/S, Denmark	REF. 01372
H-SOF	purchase from Avantea	

Oocyte maturation		
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco, the Netherlands	REF. 31330-038
Serum Replacement	Gibco, the Netherlands	REF. 10828010
Fetal Calf Serum	Gibco, the Netherlands	REF. 26170043
Human Epidermal Growth Factor (H-EGF)	Peprotech, USA	REF. AF-100-15
Cysteine	Sigma, USA	REF. 7477
Cysteamine	Sigma, USA	REF. M6500
Lactate Solution	Sigma, USA	REF. L7900
Insuline, Transferin, Selenite (ITS)	VWR, The Netherlands	REF. 3922505
Follicle Stimulating Hormone (FSH)	Sigma USA	REF. F4021
Eppendorf 0,5 ml	BIOplastics BV, Landgraaf, The Netherlands	REF. B71954
Microscope	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany	REF. Wild M3C
5 ml tubes	Sterilin, United Kingdom	REF. Z5PE
Sterile disposable graduated transfer pipets 3ml, 15.2 cm	VWR, The Netherlands	REF. 612-4473
P20 / P200 / P1000	Rainin NL, Mettler-Toledo BV, The Netherlands	
Sterile tip	Rainin NL, Mettler-Toledo BV, The Netherlands	
Incubator	Forma Scientific, Thermo Scientific, USA	

Oocyte denudation		
3 cm petridish	BD Falcon, USA	REF. 351008
Glass capilairy pipettes (150 mm)	WU Mainz, Germany	REF. 10216234
P20 / P200 / P1000	Rainin NL, Mettler-Toledo BV, The Netherlands	
Sterile tip	Rainin NL, Mettler-Toledo BV, The Netherlands	
4 well plate	Nunc A/S, Denmark	REF. 179830
Sterile disposable graduated transfer pipets 3ml, 15.2 cm	VWR, The Netherlands	REF. 612-4473
Mound pipet		
Microscope	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany	REF. Wild M3C
Microtubes 2 ml Clickfit	TreffLab, Switzerland	REF. 96.9329.9.01
Hyaluronidase	Sigma, USA	REF. H4272
Trypsine	Sigma, USA	REF. T4799
Fetal Calf Serum	Gibco, the Netherlands	REF. 26170043
H-SOF	purchase from Avantea	Formulation not known

Oocyte fixation		
4 well plate	Nunc A/S, Denmark	REF. 176740
Glass capilairy pipettes (150 mm)	WU Mainz, Germany	REF. 10216234
Mound pipet		
Microscope	Olympus, Japan Wild Heerbrugg	REF. SZ-STS REF. 205932
4% Paraformaldehyde	Klinipath BV, Duiven, The Netherlands	REF. 4286
1 % Paraformaldehyde (4% in PBS)	Klinipath BV, Duiven, The Netherlands	REF. 4286 REF. 8344A162

Oocyte staining		
Cell culture dishes	Greiner Bio-one, Germany	REF. 627170
Glass capilairy pipettes (150 mm)	WU Mainz, Germany	REF. 10216234
Mound pipet		
P20 / P200 / P1000	Rainin NL, Mettler-Toledo BV, The Netherlands	
Sterile tip	Rainin NL, Mettler-Toledo BV, The Netherlands	
Eppendorf 0,5 ml	BIOplastics BV, Landgraaf, The Netherlands	REF. B71954
Microscope	Olympus, Japan Wild Heerbrugg	REF. SZ-STS REF. 205932
Platform Vari Mix	Thermolyne	
PVP	Sigma, USA	REF. P0930
PBS	B. Braun, Melsungen, Germany	REF. 8344A162
DAPI	Sigma, USA	REF. D9542
Aluminum foil		

Oocyte analyze		
Microscope	Olympus, Japan Wild Heerbrugg	REF. SZ-STS REF. 205932
Microscope slides (76 x 26 mm) Menzel-Gläzer	Thermo Scientific, USA	REF. 2400484
Microscope cover slides (21 x 26 mm)		
Vaseline	Unilever Nederland B.V., The Netherlands	
Vectashield	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA	REF. H-1000
Nail polish		
Mound pipette		
Camera	Canon BV, Tokyo, Japan	E-330
Fluorescence Microscope	Olympus, Japan	REF. BH-2-RFCA

Experiments		
0.2% Triton X	Sigma, USA	REF. 9002-93-1
0.2% Tween-20	ICN Biomedicals, Ohio, USA	REF. 9005-64-5
PVP	Sigma, USA	REF. P0930-50 gr
CREST positive Plasma	Fitzgeral	REF. 90C-CS1058
Alexa Fluor ® 488 Goat Anti-Human IgG (H+L) antibody	Molecular Probes	REF. A-11013
Alexa Fluor ® 647 Goat Anti-Mouse	Molecular Probes	REF. A1383063
Anti-a-tubulin IgG	Sigma, USA	REF. T.5168
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride	Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands	REF. D9542-10MG
Hoechst	Sigma, USA	REF. 33342

7 BIBLIOGRAFIA

1. **Alm H, Hinrichs K**. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. J Reprod Fertil 1996 Jul;107(2):215-20.

2. **Altermatt J, Suh T, Stokes J, Carnevale E**. Effects of age and equine follicle-stimulating hormone (eFSH) on collection and viability of equine oocytes assessed by morphology and developmental competency after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Reproduction, Fertility and Development 2009; 21(4):615-23.

3. **Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR**. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. Hum Reprod 1996 Oct; 11(10):2217-22.

4. **Bøgh IB, Bezard J, Duchamp G, Baltsen M, Gerard N, Daels P, Greve T**. 2002. Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes. Theriogenology 57:1765–1779.

5. **Brück I, Raun K, Synnestvedt B, Greve T**. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique (short communication); 1992. Equine Vet J 24:58–59.

6. **Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, Ball B, Anderson G, Liu I**. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. Biol Reprod 2001 Sep;65(3):899-905.

7. **Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Panzani D, Stokes JE, Squires EL**. 2005. Factors affecting the

success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. Theriogenology 64:519–527.

8. **Carnevale E, Maclellan L, Coutinho da Silva M, Scott T, Squires E**. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. Theriogenology 2000;54(6):981-7.

9. **Carnevale E, Ginther OJ**. 1995. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. Biol Reprod Monograph 1:209–214.

10. **Carnevale E**. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. Theriogenology 2008;69(1):23-30.

11. **Choi YH**, **Love CC, Love LB, Varner DD, Brinsko S and K. Hinrichs K**. Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with

fresh or frozen–thawed spermatozoa. Reproduction (2002) 123, 455–465.

12. **Colleoni S, Barbacini S, Necci D, Duchi R, Lazzari G, Galli C**. 2007. Application of ovum pick-up, intracytoplasmic sperm injection and embryo culture in equine practice. Proc Am Assoc Equine Pract 53:554–559.

13. **Cook NL, Squires EL, Ray BS, Cook VM, Jasko DJ**. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. Equine Vet J 1993. (Suppl) 15:71–74.

14. **Duchamp G, Bezard J, Palmer E**. 1995. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimetres in mares. Biol Reprod Mono 1:233–241.

15. **Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G**. Developmental competence of equine oocytes and

embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. Anim Reprod Sci 2007;98(1):39-55.

16. **Goudet G, Bezard J, Duchamp G, Gerard N, Palmer E**. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: Effect of follicle size and hormonal environment. Biol Reprod 1997 Aug;57(2):232-45.

17. **Hawley LR, Enders AC, Hinrichs K. 1995**. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. Biol Reprod Mono 1:243–252.

18. **Hinrichs K, Betschart RW, McCue PM, Squires EL**. 2000. Effect of timing of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in mares. J Reprod Fertil (Suppl) 56:493–498.

19. **Hinrichs K, Choi Y, Norris JD, Love LB, Bedford-Guaus SJ, Hartman DL, Velez IC**. Evaluation of foal production following intracytoplasmic sperm injection and blastocyst culture of oocytes from ovaries collected immediately before euthanasia or after death of mares under field conditions. J Am Vet Med Assoc 2012;241(8):1070-4.

20. **Hinrichs K, DiGiorgio LM**. 1991. Embryonic development after intrafollicular transfer of equine oocytes. J Reprod Fertil (Suppl) 44:369–374.

21. **Hinrichs K, Kenney DF, Kenney RM**. 1990. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. Theriogenology 34:107–112.

22. **Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD**. In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: Effect of maturation medium, duration

of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. Biol Reprod 2002 Jul; 67(1):256-62.

23. **Hinrichs K, Schmidt AL. 2000**. Meiotic competence in horse oocytes: Interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. Biol Reprod 62:1402–1408.

24. **Hinrichs K, Williams KA**. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. Biol Reprod 1997 Aug;57(2):377-84.

25. **Hinrichs K**. Application of assisted reproductive technologies (ART) to clinical practice. Proc am assoc equine pract; 2010.

26. **Hinrichs K**. Assisted reproduction techniques in the horse. Reproduction, Fertility and Development 2012;25(1):80-93.

27. **Hinrichs K**. In vitro production of equine embryos: State of the art. Reproduction in Domestic Animals 2010;45(s2):3-8.

28. **Hinrichs K**. The equine oocyte: Factors affecting meiotic and developmental competence. Mol Reprod Dev 2010;77(8):651-61.

29. **Hinrichs K**. Update on equine ICSI and cloning. Theriogenology 2005;64(3):535-41.

30. **Hinrichs K**. Assisted reproduction techniques in the horse. Reproduction, Fertility and Development, 2013, 25, 80–93.

31. **Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, First NL**. Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and

hamster cumulus-oocyte complexes. Biol Reprod 1986 Nov;35(4):850-7.

32. **Lorenzo P, Liu I, Carneiro G, Conley A, Enders A**. Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. Equine Vet J 2002; 34(4):378-82.

33. **Madill S**. Reproductive considerations: Mare and stallion. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 2002 12; 18(3):591-619.

34. **Mari G, Merlo B, Iacono E, Belluzzi S**. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. Anim Reprod Sci, 2005.88:299–308.

35. **Mari G, Barbara M, Eleonora I, Stefano B**. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. Anim Reprod Sci 2005;88(3):299-308.

36. **Meintjes M, Bellow MS, Paul JB, Broussard JR, Li LY, Paccamonti D, Eilts BE, Godke RA**. 1995.

Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. Biol Reprod Monograph 1:281–292.

37. **Pereira GR, Lorenzo PL, Carneiro GF, Ball BA, Gonçalves PBD, Pegoraro LMC, Bilodeau-Goeseels S, Kastelic JP, Casey PJ, Liu IK**. The effect of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on in vitro maturation of equine oocytes. Zygote 2012; 20(04): 353-60.

38. **Rambags B, Krijtenburg P, Van Drie H, Lazzari G, Galli C, Pearson P, Colenbrander B, Stout T**. Numerical chromosomal abnormalities in equine embryos produced in vivo and in vitro. Mol Reprod Dev 2005;72(1):77-87.

39. **Rambags B, van Boxtel D, Tharasanit T, Lenstra J, Colenbrander B, Stout T**. Advancing maternal age predisposes to mitochondrial damage and loss during

maturation of equine oocytes in vitro. Theriogenology 2014;81(7):959-65.

40. **Stout T**. Equine embryo transfer: Review of developing potential. Equine Vet J 2006;38(5): 467-78.

41. **Tremoleda J, Schoevers E, Stout T, Colenbrander B, Bevers M**. Organisation of the cytoskeleton during in vitro maturation of horse oocytes. Mol Reprod Dev 2001;60(2):260-9.

42. **Tremoleda JL, Stout TA, Lagutina I, Lazzari G, Bevers MM, Colenbrander B, Galli C**. Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. Biol Reprod 2003 Dec;69(6):1895-906.

43. **Watson AJ**. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. J Anim Sci 2007 Mar;85(13 Suppl):E1-3.