



Impiego di nuove tecniche riproduttive: ovum pick-up e icsi

Cutting edge technology Ovum Pick Up and ICSI

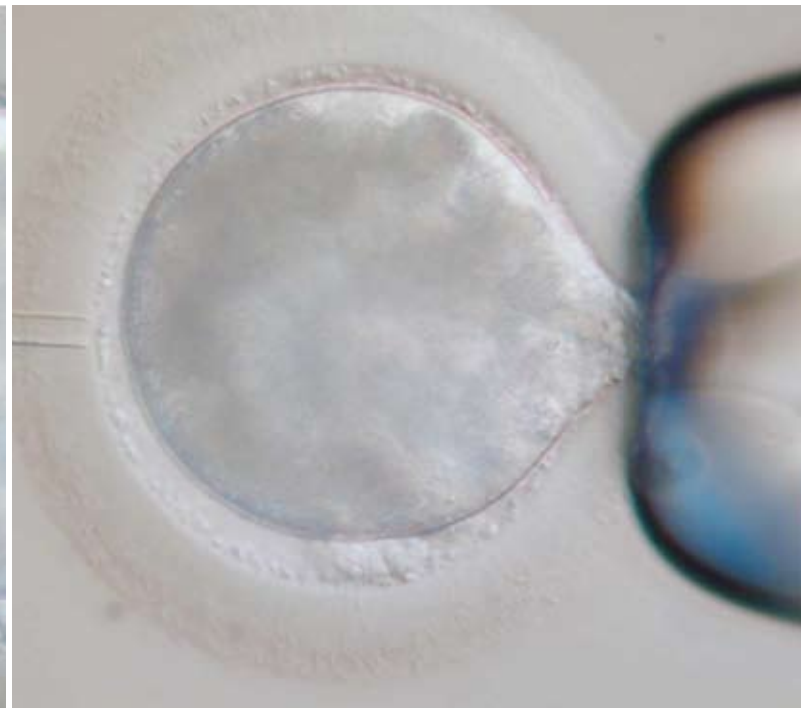


Dr. Denis Necchi,
DVM, Dipl. ECAR

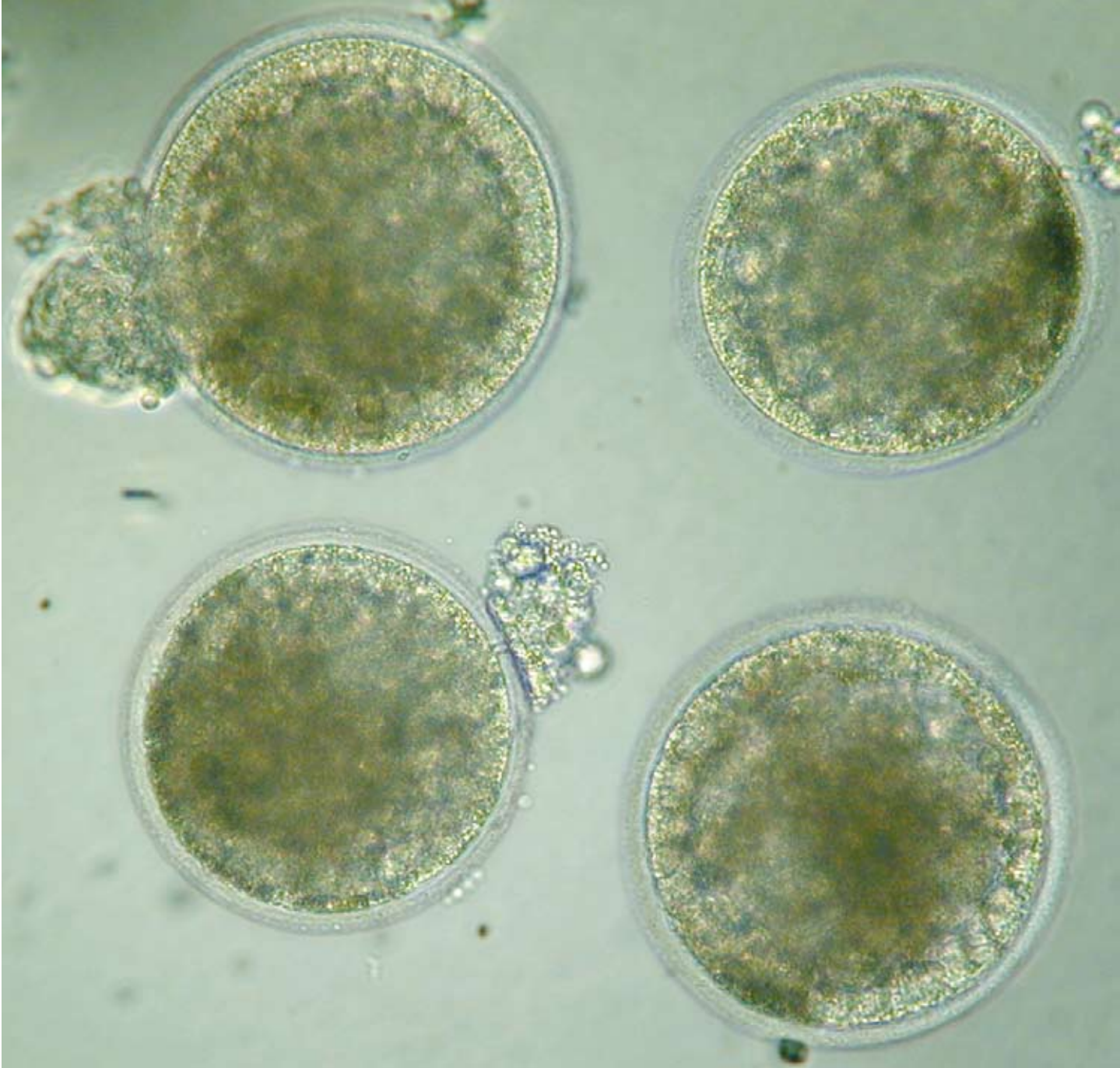
L'Inseminazione Artificiale (IA) e l'Embryo Transfer (ET) sono state per molti anni le tecniche di riproduzione assistita (TRA) più utilizzate nell'industria allevatoria equina, viceversa altre procedure, quali la produzione in vitro di embrioni, sono state adottate solo negli ultimi anni.

Alcune recenti ricerche hanno infatti dimostrato come sia possibile ottenere gravidanze e produrre puledri dopo aver fecondato in vitro, tramite iniezione Intracitoplasmatica di un unico spermatozoo (ICSI) in un oocita immaturo che sia stato raccolto tramite Ovum Pick Up (OPU) e successivamente maturato in vitro (IVM). Gli embrioni così ottenuti possono essere immediatamente trasferiti in riceventi opportunamente

For many years Artificial Insemination (AI) and Embryo Transfer (ET) have been the most widely used assisted reproductive techniques (ART) in the horse breeding industry, while other procedures based on in vitro production of equine embryos have emerged only in the last few years. In fact, a few recent scientific reports showed that it is possible to obtain pregnancies and live foals after collection of immature oocytes by Ovum Pick Up (OPU) followed by in vitro culture (IVC) for their maturation and fertilization by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) of a single sperm. These embryos can immediately be



Icsi: iniezione di uno spermatozoo all'interno dell'oocita - Icsi: intracytoplasmic sperm injection in a oocyte



Blastocisti equine di 9 giorni prodotte tramite ICSI dopo Ovum pick Up - Equine blastocysts of 9 days produced by ICSI after ovum pick up

sincronizzate, oppure congelati e trapiantati in un secondo momento. L'OPU è una tecnica che è stata impiegata per la prima volta 15 anni orsono da ricercatori Americani ed Australiani e permette di raccogliere gli oociti direttamente dai follicoli ovarici, tramite l'utilizzo di una sonda ultrasonografica transvaginale. L'opu può essere eseguito sulla stessa cavalla ogni 15 giorni, anche per 5-6 volte consecutive, senza causare alcun effetto collaterale negativo.

transferred to synchronized recipients or frozen for later transfer. OPU is a technique that allows oocytes to be collected directly from ovarian follicles by use of a trans-vaginal ultrasound probe. This technique was first described tilisation (IVF) by injecting a single about 15 years ago and has been subsequently refined by American and Australian researchers. OPU has been proven safe and repeatable in mares



Per eseguire la raccolta degli oociti è necessario posizionare l'ovaio della cavalla, tramite manipolazione trans-rettale, a contatto con la sonda ecografia trans-vaginale che è stata precedentemente introdotta all'interno della vagina della cavalla donatrice.

A questo punto si fa avanzare all'interno della sonda un ago "speciale" con il quale si penetrano i follicoli ovarici ed attraverso il quale viene fatto defluire un liquido di coltura in modo da "lavarli" ed aspirare gli oociti.

La procedura viene ovviamente eseguita su entrambe le ovaie.

Una volta raccolti, gli oociti vengono posti in un medium di coltura, lasciati a maturare per circa 24 ore e quindi vengono fecondati mediante l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo, Intracytoplasmatic Sperm Injection (ICSI).

and can be performed for 5-6 consecutive cycles and every 10-15 days without causing particular collateral effects.

For the collection procedure a trans-vaginal ultrasound probe is introduced into the donor mare's vagina. Right or Left ovary is positioned against the transducer face by manipulations per rectum. A special needle is then advanced into the ultrasound probe, used to puncture and vigorously flush the ovarian follicles. Transfer of procedure is then performed on the opposite ovary. Once collected, the oocytes are settled in a culture media, incubated for 24 hours than injected via Intracytoplasmatic Sperm Injection (ICSI).



Primo puledro nato dalla produzione commerciale di embrioni creati tramite ICSI e trapiantato dopo congelamento-scongelo. Ricevente (Aveglinese) e puledro (Argentinus x Zeus) - 7 giorni dopo la nascita (2005)
First foal born by the commercial production of embryos created by ICSI and transferred after frozen-thawed. Receiver (aveglinese) and foal (argentinus x zeus) - 7 days after Birth (2005)

Al contrario di quanto si verifica con L'oocyte Transfer (per il quale si utilizza un elevato numero di spermatozoi), l'ICSI permette di ottenere puledri utilizzando materiale seminale a bassa motilità e/o bassa fertilità in vivo.

Quando OPU, IVM e ICSI vengono utilizzati contemporaneamente danno il considerevole vantaggio di non dovere stimolare in alcun modo la donatrice (tramite la somministrazione di sostanze ormonali) a produrre più follicoli durante il "calore".

Questo aspetto è particolarmente importante nella specie equina, visto che tutt'ora i metodi di super-ovulazione (produzione elevata del numero di follicoli) sono estremamente costosi oltrechè illegali nel nostro paese.

Nel 2001, Select Breeders Service Italia ha iniziato a collaborare con il laboratorio delle tecnologie della riproduzione – CIZ (LTR-CIZ).

LTR-CIZ è un laboratorio di livello internazionale dove un gruppo di ricercatori guidati dal Prof. Cesare Galli esegue ricerche nei settori della biotecnologia e delle TRA applicate a varie specie di animali domestici.

Questa collaborazione è iniziata ponendosi l'obiettivo di mettere a punto una tecnica OPU-ICSI-IVM che potesse permettere di ottenere buoni risultati in termini di gravidanze.

Dopo aver realizzato alcuni esperimenti preliminari, nel periodo 2004-2009 LTR-CIZ e SBSItalia hanno eseguito 290 OPU commerciali su 123 cavalle donatrici di età compresa tra i 3 ed i 24 anni ed appartenenti a più razze. L'ICSI è stata eseguita utilizzando materiale seminale congelato di varia qualità e fertilità appartenente a 77 stalloni. Le fattrici sono state sottoposte ad OPU durante la fase di transizione autunnale o primaverile oppure in diestro senza la presenza di un follicolo dominante. Durante l'esecuzione dell'OPU si è provveduto ad aspirare tutti i follicoli aventi dimensioni superiori al centimetro nel tentativo di ottenere il più alto numero possibile di oociti. Tutti gli oociti che sono stati recuperati che sono stati recuperati tramite OPU sono stati sottoposti a maturazione

Although normal or higher numbers of fertile sperm are needed for oocyte transfer to be successful, ICSI provides a method to obtain offspring by using semen with low motility and/or poor reproductive performance in vivo. When used in combination, OPU, IVC and ICSI have the considerable advantage of not requiring any hormonal stimulation of the donor and this aspect is of particular importance in mares because superovulation still gives inconsistent results.

In 2001, Select Breeders Service Italia started a collaboration with Laboratorio di Tecnologie della Riproduzione - CIZ (LTR-CIZ), an internationally recognized laboratory where a group of scientists headed by Dr. Cesare Galli conducts research in the fields of biotechnology and ART of many domestic animal species. This collaboration was initiated with the goal of establishing an OPU-ICSI IVC technique that could lead to consistent commercial results.

Following a series of preliminary experiments, LTR-CIZ and SBSItalia performed 290 commercial OPU sessions on 123 donor mares aged between 3 to 24 years during the 2004 – 2009 seasons. The majority of the mares were Warmblood. Frozen-thawed semen from 67 stallions of varying quality and fertility was used. During the breeding season mares were subjected to OPU in diestrus in the absence of a dominant follicle if at all possible. All the ovarian follicles ranging from 0,5 to 4 cm diameter were aspirated by OPU and the recovered oocytes were then matured in vitro. The matured oocytes were fertilized by ICSI and allowed to develop to the blastocyst stage in vitro. The blastocysts were frozen in media containing 10%



in vitro e quelli maturati sono stati quindi fertilizzati in vitro tramite ICSI e messi in coltura fino a quando avessero raggiunto lo stadio di blastocisti (embrione di 7-8 giorni). Gli embrioni così prodotti sono stati congelati e successivamente conservati in azoto liquido. Gli embrioni sono stati congelati 6,7,8,9 giorni dopo l'ICSI, in base al periodo di tempo da loro impiegato a raggiungere lo stadio di blastocisti. Gli embrioni sono stati quindi trapiantati non chirurgicamente in cavalle riceventi che avessero oclato da 4 a 6 giorni.

Nelle 290 sessioni di OPU eseguite è stato possibile aspirare 4845 follicoli e recuperare 3150 oociti.

Di questi, 2029 (65%) hanno maturato e sono pertanto stati fertilizzati tramite ICSI; in totale sono state prodotte 171 blastocisti (0,6 per ogni sessione OPU-ICSI-IVM).

Di tutti gli embrioni prodotti dal 2004 al 2009, sono stati scongelati e trasferiti non chirurgicamente 128 embrioni che hanno dato origine a 75 gravidanze (58,6%).

I risultati ottenuti in questo breve periodo di impiego commerciale hanno dimostrato che OPU, ICSI E IVM possono essere impiegati con successo su cavalle e stalloni di elevato pregio.

Nonostante tutto però, OPU, ICSI E IVM non sostituiranno mai l'uso dell'Embryo Transfer convenzionale, visto che queste tecniche possono essere portate a termine solo in presenza di attrezzature sofisticate e costose, nonché personale altamente specializzato.

Tecniche di riproduzione assistita di livello avanzato quali l'OPU, l'ICSI e la IVM possono essere strumenti utilizzabili dall'allevatore nel caso in cui si renda necessario:

- Ottenere gravidanze da cavalle che non rimangono gravide nonostante nessuna patologia evidente
- Ottenere gravidanze da cavalle con evidenti problemi riproduttivi non risolvibili come piometra (accumulo di materiale purulento nell'utero) infiammazioni croniche e degenerative uterine, problemi o lacerazioni della cervice.

glycerol and subsequently stored in liquid nitrogen. Embryos were frozen on day 6, 7, 8 or 9 after ICSI in relation to the time when the blastocyst stage was achieved. Embryos were transferred nonsurgically to recipient mares 4 to 6 days (preferably 5 days) after ovulation.

During the 290 OPU sessions, 4845 follicles were aspirated and 3150 oocytes were recovered. Of these, 2029 (65%) oocytes matured and were fertilized by ICSI giving rise to 171 blastocysts (0.6 blastocysts per OPU-ICSI IVC session).

To date, 128 thawed embryos were nonsurgically transferred and 75 recipients (58,59%) mares were detected pregnant by ultrasonography.

The results obtained in this short period of commercial application suggest that the use of OPU-ICSI-IVC can lead to reasonable results and may have applications for highly valuable mares and stallions. Nevertheless, OPU-ICSI-IVC likely will not overcome the use of conventional Embryo Transfer because of the specialized equipment and skilled personnel needed to perform such procedures.

Advanced reproductive techniques such as OPU, ICSI, and IVC add to the tools available to breeders when it is necessary to:

- Obtain pregnancies from repeat breeder mares
- Obtain pregnancies from mares with reproductive problems like pyometra, degenerative endometriosis or irreparable cervical lacerations
- Obtain pregnancies from mares that are not able to carry a foal to term
- Obtain pregnancies by producing and freezing embryos for later transfer during



Lo stesso puledro a 2 anni di età - The same colt 2 years old

- Ottenere puledri da cavalle che non sono in grado di portare a termine una gravidanza.
- Ottenere gravidanze producendo e congelando embrioni durante le fasi di transizione primaverile ed autunnale (durante questi periodi è possibile reperire un elevato numero di follicoli nelle ovaie delle cavalle).
- Utilizzare seme congelato che abbia una scarsa qualità post-scongelo od una bassa fertilità in vivo.

the spring or fall transitional phase when large number of follicles can be detected on the mare's ovaries.

- Use frozen-thawed semen of very poor post-thaw quality or very limited in vivo fertility