

**MINISTERO DELL'ISTRUZIONE, DELL'UNIVERSITÀ E DELLA RICERCA
PROGRAMMI DI RICERCA - ANNO 2008**

**COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA
prot. 2008X2PNYX**

Coordinatore Scientifico	Bianca GASPARRINI
Ateneo	Università degli Studi di Napoli Federico II
Titolo della Ricerca	Strategie per il miglioramento dell'efficienza delle biotecnologie riproduttive nella specie bufalina
Finanziamento assegnato	Â EuroÂ 154.320
Durata	24 Â MesiÂ

**Obiettivo della Ricerca
(come da progetto presentato)**

L'importanza e la competitività dell'allevamento bufalino in Italia, rispetto alle altre realtà zootecniche ormai consolidate, è dimostrata dall'incremento del patrimonio nazionale che si è registrato in questi ultimi anni. Il trend in crescita della richiesta di latte e la necessità di abbattere i costi fissi di produzione rendono indispensabile l'adozione di una pianificazione a livello aziendale improntata al miglioramento produttivo. In questo scenario le biotecnologie della riproduzione assumono estrema importanza in quanto consentono di concretizzare gli indirizzi selettivi ed il loro conseguimento in tempi brevi. Inoltre l'utilizzo di tali tecnologie è di importanza fondamentale per sopperire alle crescenti richieste di materiale genetico nostrano da parte di diversi Paesi in via di sviluppo, per effettuare incroci di sostituzione di popolazioni locali a prevalente attitudine al lavoro con la razza Mediterranea capace di elevate prestazioni produttive. Le tecnologie riproduttive che in questa specie offrono maggiori potenzialità sono l'inseminazione strumentale (IS) e l'Ovum pick-up (OPU) associato alla produzione embrionale in vitro (IVEP). Allo stato attuale l'utilizzo della IS rimane limitato in quanto l'efficienza è ancora bassa e fortemente condizionata dalla stagionalità della specie. Inoltre, sebbene l'efficienza del sistema IVEP sia aumentata enormemente in termini di produzione di blastocisti trasferibili, le percentuali di gravidanze a termine ottenute da embrioni crioconservati sono ancora troppo basse perché questa tecnologia possa essere utilizzata in campo. L'ottimizzazione dell'efficienza di queste tecnologie è attualmente indispensabile per la valorizzazione di questa risorsa zootecnica unica al mondo. Uno dei fattori che potrebbe inficiare l'efficienza delle tecnologie riproduttive innovative in questa specie è rappresentato dalla stagionalità della stessa. In particolare, nella specie bufalina una delle principali cause di ipofertilità nella stagione a fotoperiodo positivo è rappresentata dal fenomeno della mortalità embrionale (ME) che si osserva anche in condizioni di monta naturale ma assume un'incidenza maggiore nel caso in cui si utilizzino biotecnologie riproduttive, quali l'IS e la IVEP.

A tal proposito si ipotizza che tale fenomeno sia da attribuire sia ad una cattiva qualità degli oociti sia, principalmente, ad una cattiva funzionalità del corpo luteo che si traduce in una minore secrezione di progesterone. Il problema della ME assume un peso maggiore quando si utilizza la tecnologia IVEP, perché in questo caso entra in gioco un altro fattore, cioè la minore vitalità degli embrioni prodotti in vitro. È noto infatti che le condizioni sub ottimali di coltura condizionano tutti gli eventi post-impianto. Ne consegue che un fattore che potrebbe inficiare l'efficienza IVEP nel bufalo è l'inadeguatezza del sistema di coltura embrionale utilizzato, estrapolato dalla specie bovina, senza tener conto delle differenze specie-specifiche.

Alla luce di quanto detto si ritiene necessaria una caratterizzazione dell'ambiente tubarico di questa specie, nei diversi giorni del ciclo, ai fini di formulare dei terreni dinamici definiti specie-specifici, che consentano di migliorare l'efficienza IVEP. Inoltre si ritiene fondamentale andare a studiare le cause che intervengono nel ridurre la fertilità di questa specie qualora si ricorra alle principali biotecnologie riproduttive e porre dei rimedi che possano massimizzarne la loro efficienza. Attraverso le attività previste dagli obiettivi del seguente progetto si cercherà, quindi di migliorare il sistema IVEP e di approfondire la conoscenza dei meccanismi molecolari responsabili della ME, al fine di individuare nuovi bersagli terapeutici utili a incrementare la percentuale di gravidanza in seguito all'applicazione delle suddette biotecnologie riproduttive.

Pertanto, lo scopo fondamentale del progetto è di individuare delle strategie finalizzate ad ottimizzare l'efficienza delle tecnologie riproduttive nella bufala Mediterranea Italiana. A tale fine, la ricerca, articolata in due anni, si propone due obiettivi principali separati ma non impermeabili che, grazie proprio allo scambio prezioso di informazioni nei due sensi, confluiscono in un'unica proiezione che definisce il senso compiuto del progetto.

Tali obiettivi sono:

- 1) l'ottimizzazione dell'efficienza IVEP, mediante la formulazione di media sintetici di coltura in vitro stadio e specie specifici;
- 2) la valutazione dell'influenza della stagione sulla qualità degli oociti e sul fenomeno della ME.

Allo scopo di OTTIMIZZARE L'EFFICIENZA IVEP ci si prefigge di:

- A) caratterizzare, mediante analisi biochimica, il microambiente tubarico di bufalo in corrispondenza dei giorni del ciclo in cui hanno luogo gli eventi riproduttivi precoci;
- B) formulare un nuovo sistema di coltura in vitro specifico per il bufalo, dinamico e stadio-dipendente, sulla base della caratterizzazione biochimica del fluido tubarico;
- C) valutare se il nuovo sistema di coltura migliori l'efficienza IVEP in termini quantitativi (blastocisti prodotte);
- D) valutare la vitalità degli embrioni prodotti in un sistema di coltura tradizionale e nel nuovo sistema di coltura in vitro specifico per il bufalo, mediante una serie di test accreditati, completati dall'analisi dell'espressione di un pannello di geni candidati coinvolti nel controllo dello sviluppo embrionale;
- E) valutare l'efficienza degli embrioni prodotti in vitro nei diversi media di coltura (nuovo sistema culturale vs controllo) a svilupparsi a termine dopo trasferimento embrionale (ET) in bufale riceventi sincronizzate. Gli interventi di ET saranno pianificati sulle basi dei risultati emersi nel corso dello studio parallelo sull'influenza stagionale.

Allo scopo di studiare L'INFLUENZA DELLA STAGIONE si effettueranno:

- A) la valutazione dell'incidenza della ME e della funzionalità del corpo luteo (CL) attraverso la determinazione del flusso ematico e del profilo ormonale in soggetti inseminati in due periodi dell'anno caratterizzati da differente fotoperiodo (Ottobre-Dicembre vs. Gennaio-Aprile).
- B) la valutazione in vitro della funzionalità del CL, mediante determinazione dei meccanismi ormonali ed enzimatici che ne regolano l'attività e la durata di vita. Tale approccio sarà eseguito sia in bufale non gravide a diversi giorni post-estro che in bufale a diverso stadio di gestazione nei due periodi dell'anno caratterizzati da differente fotoperiodo. Tale studio consentirà di acquisire nuove conoscenze di base atte a comprendere i meccanismi che, in condizioni fisiologiche, intervengono nella formazione e regressione del CL;
- C) lo studio del profilo di espressione genomica e proteomica di placente prelevate da bufale a diverso stadio di gestazione nei due periodi dell'anno a differente fotoperiodo;
- D) la valutazione dei meccanismi che intervengono nell'eziopatogenesi della ME e nello sviluppo placentare. Questo intervento sarà effettuato sia mediante la valutazione della funzionalità del CL in soggetti che presenteranno ME e fetale, sia attraverso la ricostruzione del profilo di espressione genomica e proteomica della placenta in diversi stadi e in diverse stagioni dell'anno. La comparazione di placente di animali andati incontro a ME e fetale con quelle di animali fisiologicamente gravidi, potrà fornire ulteriori indicazioni sui meccanismi patologici che intervengono nel fenomeno;
- E) la valutazione dell'influenza della stagione sulla competenza degli oociti di bufalo a produrre embrioni vitali dopo IVF, al fine di individuare eventuali differenze e, nel caso, la stagione ottimale in cui effettuare il prelievo (che sarà utilizzata per il confronto media). Anche in questo caso l'ET sarà effettuato nella stagione suggerita dagli studi precedenti.

Stato dell'arte nel campo (come da progetto presentato)

Negli ultimi anni si è registrato un incremento dell'interesse mondiale nei confronti dell'allevamento bufalino. Nei Paesi tropicali le condizioni climatiche ed ambientali fanno del bufalo un produttore di latte insostituibile, in quanto dove la bovina non riesce ad esprimere il proprio potenziale produttivo, il bufalo è la specie che meglio si presta a soddisfare la richiesta di proteine animali perché si adatta molto facilmente, è rustica, longeva e resistente ai parassiti. Vale la pena ricordare che circa il 98% della popolazione bufalina mondiale è allevata nei Paesi in via di sviluppo che guardano con vivo interesse al materiale genetico italiano da latte. Ciò è dimostrato anche, nella nostra esperienza, da un sensibile aumento della richiesta di seme e di embrioni di bufalo di razza Mediterranea Italiana. Il trend in crescita della richiesta di latte e la necessità di abbattere i costi fissi di produzione rendono indispensabile l'adozione di una pianificazione a livello aziendale improntata al miglioramento produttivo. In questo scenario la competitività dell'allevamento bufalino in Italia sarà vincolata all'utilizzo delle biotecnologie della riproduzione, che consentono di programmare gli indirizzi selettivi ed il loro conseguimento in tempi brevi. L'utilizzo di tali tecnologie è di importanza fondamentale per sopperire alle richieste di materiale genetico da parte di diversi Paesi in via di sviluppo ed effettuare incroci di sostituzione di popolazioni locali a prevalente attitudine al lavoro con la razza Mediterranea capace di elevate prestazioni produttive. Le tecnologie riproduttive che in questa specie offrono maggiori potenzialità sono da una parte l'inseminazione strumentale (IS), che è lo strumento d'elezione per esaltare il contributo paterno e dall'altra l'Ovum pick-up (OPU) associato alla produzione embrionale in vitro (IVEP), tecnologia che consente di ottenere da ciascuna femmina un notevole numero di embrioni trasferibili (Gasparrini, 2002. *Theriogenology*,57:237-256). Allo stato attuale l'utilizzo della IS rimane limitato in quanto l'efficienza è ancora bassa e fortemente condizionata dalla stagionalità della specie (Campanile et al, 2005. *Theriogenology*,63:2334-40). Inoltre, sebbene l'efficienza del sistema IVEP sia aumentata enormemente in termini di produzione di blastocisti trasferibili (Neglia et al, 2003. *Theriogenology*,59:1123-30; Gasparrini et al, 2006. *Theriogenology*,65:275-287), le percentuali di gravidanze a termine ottenute da embrioni crioconservati (Neglia et al, 2004. *Vet Res Comm*,28:233-236; Sá Filho et al, 2005. *Atti 3° Congr Naz Allev Bufalo*:250; Hufana-Duran et al, 2004. *Theriogenology*,61:1429-1439) sono ancora troppo basse perché questa tecnologia possa essere utilizzata in campo. L'ottimizzazione dell'efficienza di queste tecnologie è attualmente indispensabile per la valorizzazione di questa risorsa zootecnica unica al mondo.

Uno dei fattori che potrebbe inficiare l'efficienza delle tecnologie riproduttive in questa specie è rappresentato dalla stagionalità. La bufala è una specie tendenzialmente stagionale a fotoperiodo negativo; purtroppo la sua stagionalità contrasta con le esigenze di mercato nel nostro Paese, in quanto la richiesta di latte di bufalo aumenta in primavera-estate, cioè nella stagione sfavorevole all'attività riproduttiva della specie alle nostre latitudini. Ne consegue la necessità di ricorrere alla tecnica di destagionalizzazione, che consiste nell'interruzione della promiscuità sessuale da Settembre a Marzo, al fine di modificare il calendario dei parti in conformità alle richieste di mercato. Questa pratica, ormai adottata in più del 60% delle aziende nella regione Campania, si traduce in indiscutibili vantaggi economici ma comporta una riduzione della fertilità, in quanto gli animali si riproducono in una stagione sfavorevole. In particolare, una delle principali cause di ipofertilità nella stagione a fotoperiodo positivo è rappresentata dal fenomeno della mortalità embrionale (ME) che si osserva anche in condizioni di monta naturale, ma assume un'incidenza maggiore nel caso in cui si utilizzino biotecnologie riproduttive, quali l'IS e l'ET di embrioni prodotti tramite IVEP.

A tale proposito si riporta che nei soggetti inseminati artificialmente durante la stagione caratterizzata da un maggior numero di ore di luce è stata descritta una elevata (20-40%) incidenza di ME (Campanile et al, 2005. *Theriogenology*,63:2334-2340; Campanile et al, 2007 *Theriogenology*,67:1393-1398; Campanile et al, 2007 *It J Anim Sci*,6 - (2)-1:680-683), mentre in Brasile, nel periodo a luce decrescente, tale evenienza si è manifestata solo nel 7% degli animali (Baruselli et al, 1997 *Proc. V World Buffalo Congress*:776-778). Questo fenomeno si accentua ulteriormente con la tecnologia IVEP. In una recente esperienza effettuata dall'unità operativa (UO) 1 dal trasferimento di embrioni IVEP è stata ottenuta una percentuale di gravidanza del 50% a 25 giorni che si è ridotta al 10% a termine, a causa della ME che è intervenuta tra i 25 e i 50 giorni.

Nella specie bufalina, analogamente alle specie bovina ed ovina (Garrett et al, 1988. *J Reprod Fertil*,84:437-446; Mann et al, 1999. *Reprod in Dom Anim*,34: 269-274; Mann et al, 2001. *Reproduction*,121:175-180), la ME è principalmente dovuta ad una ridotta secrezione di progesterone (P4) da parte del corpo luteo (CL) (Campanile et al, 2005. *Theriogenology*, 63:2334-2340; Campanile et al, 2007. *It J Anim Sci*,6(2),1:680-683). È stato osservato che l'attività del CL è principalmente influenzata dalla stagione di parto (Zicarelli, 1994. *Agricoltura e Ricerca*,153:55-81) ed è in funzione del numero di ore di luce, che influenzano l'attività ipotalamo-ipofisaria e di conseguenza, l'attività ovarica (Kaker et al, 1981. *J Reprod Fertil*,60:419). Durante il periodo di transizione che corrisponde al pieno inverno in Italia, si registra una riduzione dell'attività del CL dal 5% al 50% nel bufalo (Campanile et al, 1992. *Proc Int Symp Prospect of buffalo production in the mediterranean/middle east*:385-388). Diversi studi indicherebbero che alla base del fenomeno della ME ci sia un'adeguata funzionalità del CL e, quindi, una ridotta concentrazione di P4 nel periodo dell'impianto transitorio.

La valutazione del flusso di sangue mediante eco-color-doppler potrebbe fornire ulteriori informazioni circa la funzionalità del CL e quindi essere utilizzata come indice di valutazione di gravidanza e ME precoce. In uno studio preliminare (UO 4) è stato osservato che il flusso sanguigno del CL influenza l'incidenza di bufale gravide ai giorni 25 e 45 dopo AI. In effetti è noto che un ridotto flusso di sangue riduce l'attività delle cellule luteiniche e lo sviluppo embrionale. Nel 2008 Neglia et al. (Neglia et al, 2008. *Theriogenology*,69:953-960) hanno ritrovato un aumento del tasso di gravidanza in bufale sottoposte ad AI durante il periodo di transizione e trattate con un analogo delle PGF2 α (cloprostenolo) il giorno dell'inseminazione. Ciò potrebbe essere imputabile al fatto che le prostaglandine aumentano il flusso sanguigno (Miyamoto et al, 2005 *Domest Anim Endocrinol*,29:329-339) e i livelli di P4 al giorno 10 dopo AI (Neglia et al, 2008. *Theriogenology*,69:953-960).

È ampiamente riconosciuto che le prostaglandine (PGs) svolgono un ruolo chiave nel regolare la vita del CL. La PGF2 α è il principale fattore luteolitico, mentre la PGE2 è un importante fattore luteotrofico e antiluteolitico (Niswender et al, 2000 *Physiological Reviews*,80:1-29; Davis et al, 2002 *Frontiers in Bioscience*,7:1949-1978; Wiltbank et al, 2003. *Reprod Biol Endocrinol*,1:91; Boiti et al, 2005. *Endocrinology*,146:1293-1300). In molte specie, il CL stesso sintetizza la PGF2 α e la PGE2, le cui produzioni sono regolate da una vasta gamma di fattori locali e sistemici, suggerendo così per queste due PGs un ruolo paracrino e/o autocrino. I peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sono recettori nucleari/fattori di trascrizione coinvolti in diversi processi quali la steroidogenesi, l'angiogenesi, il rimodellamento tissutale, la regolazione del ciclo cellulare e l'apoptosi, processi cruciali per la normale funzione ovarica. I meccanismi che i PPARs utilizzano nella regolazione della funzione ovarica sono sconosciuti ma in altri modelli tissutali è stato osservato che il PPARgamma blocca i geni che codificano la COX2 e l'ossido nitrico sintasi, enzimi implicati nel controllo dell'ovulazione e del CL (Froment et al, 2006. *J Endocrinol*,189:199-209). Ad oggi i meccanismi cellulari che regolano la funzionalità dei CL delle bufale sono poco studiati e, pertanto, si ritiene importante effettuare una caratterizzazione completa dei fattori che risultano implicati nella regolazione della durata di vita del CL.

Sebbene siano anche descritte una ME precoce ed una mortalità fetale, nel bufalo è stata osservata una più elevata incidenza di tarda mortalità embrionale (tra 25 e 45 giorni post-inseminazione). È possibile che quest'ultima non sia dovuta al mancato riconoscimento materno fetale della gravidanza, ma probabilmente a problemi durante le fasi di impianto transitorio e placentazione. Infatti, il riconoscimento materno fetale della gravidanza avviene intorno ai 16-18 giorni post-inseminazione ed è legato alla produzione di adeguate quantità di IFN τ in grado di bloccare la luteolisi da parte dell'embrione.

Le evidenze sperimentali ottenute negli ultimi anni dimostrano il ruolo fondamentale dei meccanismi epigenetici nella realizzazione coordinata e finemente regolata dei diversi eventi che portano alla fecondazione dell'occita, all'impianto dell'embrione, ad un corretto sviluppo placentare ed allo sviluppo fetale a termine (Maher et al, 2003 *Hum Reprod*,18:2508-2511). Nei mammiferi i geni imprintati hanno un ruolo molto importante nello sviluppo fetale-placentare. Essi sono coinvolti nella crescita, nella morfologia e nella capacità di trasferire il nutrimento della placenta e nella crescita fetale growth (Reik et al, 2003 *J Physiol*,547:35-44). L'imprinting di tipo materno risulta essere più frequente in geni espressi prevalentemente nei tessuti extra-embryonali (placenta), mentre quello paterno è caratteristico dei geni espressi nei tessuti embrionali. Inversioni in questo tipo di espressione, espressione disomica o totale perdita dello stato imprintato, possono determinare anomalie dello sviluppo fetale, alterazioni placentari e ME (Swales et al, 2005 *Reproduction*,130:389-99). Alla luce di quanto detto, si ritiene estremamente importante effettuare un'analisi del profilo di espressione genica in tessuti placentari e studiare i meccanismi fisiopatologici che regolano la placentazione attraverso un approccio proteomico, che rappresenta uno strumento di indagine avanzato e promettente per l'individuazione di nuovi bersagli terapeutici per ridurre l'incidenza della ME.

Un risultato interessante, emerso in uno studio effettuato nel 2005 (Campanile et al, 2005 *Theriogenology*,63:2334-2340) è che nel 51% di bufale che erano andate incontro a ME le concentrazioni di P4 ai giorni 10 e 20 post-IS erano sovrapponibili a quelle degli animali gravidi. Ne consegue che il problema della ME nella bufala è un fenomeno complesso che ancora non è stato completamente compreso e che probabilmente riconosce un'eziologia multifattoriale. Uno dei fattori che può giocare un ruolo importante è la qualità dei gameti, in quanto, influenzando fortemente la competenza allo sviluppo embrionale, può interferire con la normale prosecuzione di una gravidanza iniziata. A suffragare tale ipotesi si riporta che i geni imprintati vengono marcati durante la maturazione dei gameti per cui mantengono la memoria molecolare della propria origine parentale e mostrano una espressione allele-specifica.

Attualmente la pianificazione dei programmi OPU ed IVEP viene effettuata a prescindere dalla stagionalità, in quanto si è ritenuto che gli oociti, allontanati dall'ambiente follicolare e sottratti all'influenza del fotoperiodo, possano svilupparsi in embrioni trasferibili che siano in grado di impiantarsi e svilupparsi a termine.

Al contrario, in altre specie domestiche stagionali, come il cavallo e la pecora, la tendenza attuale è quella di non ricorrere all'utilizzo delle biotecnologie riproduttive nel periodo stagionale sfavorevole. Nella pecora, che è la specie più affine alla bufala per quanto riguarda la stagionalità, è stato dimostrato che nel periodo di anaestros stagionale la percentuale di cleavage che si ottiene dopo fecondazione in vitro di oociti ovulati è nettamente inferiore a quella ottenuta nella stagione riproduttiva (Stenbak et al, 2001 *Theriogenology*,56:51-64).

È stato osservato, inoltre, un effetto della stagione sulla risposta alla superovulazione, con una riduzione della percentuale di oociti non fecondati sul totale delle ova recuperate ed un miglioramento della qualità degli embrioni recuperati in ottobre rispetto ad aprile (Mitchell et al, 2002 *Anim Reprod Sci*,74:163-174).

L'unica esperienza condotta nel bufalo Mediterraneo Italiano, in cui la stagionalità è fortemente legata al fotoperiodo, ha evidenziato che il numero di follicoli e di complessi cumulo-oociti (COC) recuperabili mediante OPU si riduce nel periodo primaverile-estivo rispetto al periodo autunno-vernino (Di Palo et al, 2001 *Theriogenology*,55:404).

Un aspetto che a nostro avviso è fondamentale investigare è l'effetto della stagione sulla competenza degli oociti allo sviluppo embrionale, intesa sia in termini quantitativi sia qualitativi, cioè sulla competenza degli embrioni prodotti a sostenere gravidanze a termine dopo trasferimento embrionale.

Un altro fattore che potrebbe inficiare l'efficienza IVEP nel bufalo è l'inadeguatezza del sistema di coltura embrionale utilizzato. Le prime esperienze di IVEP nel

bufalo sono state effettuate estrapolando il sistema usato nel bovino tal quale, senza tener conto delle differenze specie-specifiche e ciò si è tradotto in una scarsa efficienza. Gli embrioni prodotti in vitro sono meno vitali e meno resistenti alla crioconservazione e mostrano differenze sia a livello cellulare (Boni et al, 1999 Biol Reprod,61:1050-534; Khurana et al, 2000 Biol Reprod,62:847-56) sia a livello di espressione genica (Miles et al, 2008 Mol Reprod Dev,75:976-88) rispetto a quelli che si sviluppano in vivo. È ormai noto che le condizioni subottimali di coltura determinano una serie di alterazioni quali allungamento della gestazione, ME e fetale, ridotte percentuali di gravidanze, anomalie fetali, mortalità neonatale e perinatale, anomalie placentari e incremento del peso alla nascita, tutte stimate della sindrome della macrosomia fetale (McEvoy et al,1999 Theriogenology,51:247). Allo stato attuale, nonostante gli innumerevoli sforzi effettuati allo scopo di migliorare i sistemi colturali in vitro, l'ovidutto rimane insostituibile per lo sviluppo embrionale. Fino ad oggi la composizione dell'ODF, molto ben caratterizzata in altre specie, è poco conosciuta nella specie bufalina (Vecchio et al, 2007 Ital J Animal Sci 6 (2),2, 731-734. Ne consegue che la conoscenza della composizione del fluido tubarico di bufalo nei primi giorni del ciclo assume una importanza decisiva perché si giunga alla costituzione di terreni sintetici, specie-specifici, la cui composizione rifletta quanto più possibile quella dell'ambiente in cui gli embrioni in vivo risiedono nelle prime fasi dello sviluppo. Ciò è possibile grazie alla messa a punto di una tecnica chirurgica per la cannulazione delle tube che permette di effettuare la raccolta giornaliera di fluido tubarico per lunghi periodi, già utilizzata in altre specie (Clewe et al, 1960 J Reprod Fert,1:146-150; Restall, 1966 Aust J Biol Sci,19:181-186; Engle et al,1970 Am J Vet Res,31:1889-1896; Carlson et al, 1970 J Reprod Fertil,22:549-552; Kavanaugh et al, 1992 J Invest Surg,5:11-17).

Criteri di verificabilità (come da progetto presentato)

Come ampiamente descritto precedentemente, questo programma di ricerca mira ad individuare strategie finalizzate al miglioramento dell'efficienza delle tecnologie riproduttive nella specie bufalina e si avvale di una collaborazione già consolidata tra cinque unità operative, ciascuna con elevate competenze scientifiche nell'ambito di fisiologia della riproduzione, biotecnologie riproduttive, biologia molecolare, biochimica e proteomica. Per raggiungere lo scopo finale di questo progetto, le UO saranno focalizzate su scopi specifici ma interagiranno sinergicamente con un approccio multidisciplinare. Come detto precedentemente, le interazioni tra i componenti saranno facilitate da frequenti incontri, da resoconti scientifici semestrali, fondamentali per scambiarsi le informazioni acquisite in corso d'opera e da 2 incontri formali, uno dopo 12 mesi e l'altro dopo 24 mesi (incontro finale).

Durante e al termine del progetto saranno resi disponibili:

- documentazione tecnico/scientifica sulle metodologie impiegate nelle varie fasi della ricerca
- promozione e divulgazione delle competenze e dei risultati della sperimentazione del progetto
- presentazione dei risultati preliminari a congressi Nazionali e internazionali
- pubblicazioni scientifiche su riviste nazionali ed internazionali dei risultati ottenuti.

I criteri specifici suggeriti per il monitoraggio del buon andamento di questo progetto di studio possono essere schematicamente raggruppati nelle seguenti categorie:

1. Monitoraggio della progressione delle diverse attività sperimentali e concettuali della ricerca
 2. Monitoraggio della coerenza degli step successivi con il disegno originale del progetto
 3. Verifica dell'effettivo sinergismo tra le UOO valutato alla luce del numero dei progetti collaborativi e delle pubblicazioni scientifiche comuni.
- In generale, è possibile utilizzare marcatori riconosciuti della qualità dell'attività scientifica (pubblicazioni recensite dalla comunità scientifica internazionale mediante ISI-PubMed) e controllati in termini di qualità. Si deve anche considerare, la totalità e la coerenza del numero degli esperimenti e dei dati ottenuti e pubblicati ed anche di quelli che non raggiungono la maturazione e consolidamento necessari per la pubblicazione ma che possono comunque costituire un risultato preliminare per una successiva sperimentazione. La verifica sostanziale richiede una valutazione approfondita ed esperta, tesa al raggiungimento della valutazione del reale peso del dato sperimentale nel contesto generale delle conoscenze, e a un riconoscimento oculato di tipo oggettivo e non soggettivo, tenendo anche conto della correttezza statistica delle procedure di ottenimento dei dati sperimentali. Tutto ciò deve essere ovviamente condotto nella approfondita conoscenza del problema sperimentale sia da parte degli sperimentatori sia dei valutatori.

Elenco delle Unità di Ricerca

Sede dell'Unità	Università degli Studi di Napoli Federico II
Responsabile Scientifico	Bianca GASPARRINI
Finanziamento assegnato	Â EuroÂ 37.080

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

La presente ricerca, articolata in due anni, è finalizzata al miglioramento dell'efficienza IVEP nel bufalo e si propone due obiettivi principali:

- A) Valutare l'influenza della stagione sulla competenza degli oociti di bufalo a produrre embrioni vitali dopo IVF, capaci di svilupparsi a termine dopo il trasferimento in animali riceventi;
 - B) Formulare un sistema di coltura in vitro specifico per il bufalo, dinamico e stadio-dipendente, sulla base della caratterizzazione biochimica del fluido tubarico
- Tutti i protocolli sperimentali che prevedono l'utilizzazione di animali saranno effettuati in accordo con il D.L. n.116/92.

I FASE (12 mesi)

Durante il primo anno del progetto si procederà in parallelo con il prelievo del fluido tubarico e la valutazione dell'effetto stagione sulla competenza oocitaria.

I FASE - PRELIEVO DI FLUIDO TUBARICO - Da un punto di vista dell'organizzazione ed integrazione del lavoro tra le U.O. coinvolte sarà necessario eseguire prima di tutto gli interventi di cannulazione tubarica sulle bufale ed i prelievi di fluido tubarico in funzione del ciclo estrale, che avranno presumibilmente una durata di 4 mesi. In questo modo sarà possibile consentire sia all'U.O. 2 di effettuare le analisi biochimiche dei campioni di fluido tubarico raccolti sia alla U.O. 3 di effettuare i diversi dosaggi ormonali nell'arco del primo anno del progetto, step propedeutici al secondo obiettivo della nostra U.O., cioè formulare dei media sintetici specie-specifici e stadio-specifici, previsto per il secondo anno del progetto.

A tale scopo 10 bufale preferibilmente nella fase luteinica del ciclo saranno selezionate come donatrici e sottoposte ad un intervento chirurgico di cannulazione delle tube, che sarà effettuato utilizzando la tecnica operatoria descritta da Kavanaugh et al. (30), adattata alla specie bufalina. Tale adattamento è necessario in considerazione delle ridotte dimensioni dell'apparato riproduttivo di questa specie rispetto a quella bovina (31) e della minore estensibilità delle corna uterine dovuta alla diversa inserzione del legamento intercornuale (32). Precedentemente all'intervento, ogni soggetto sarà esaminato mediante palpazione rettale, per sincerarsi che le dimensioni e i rapporti spaziali dell'utero permettano una corretta manipolazione dell'ovidutto attraverso la breccia operatoria.

Sull'animale in decubito costale sinistro, opportunamente sedato e anestetizzato localmente, mediante l'uso di acepromazina, xilazina al 2% e lidocaina al 5%, anteriormente e parallelamente al tensore della fascia lata sarà effettuata una incisione della cute di circa 20 cm discontinuando i piani sottostanti ed il peritoneo e si provvederà all'esteriorizzazione dell'apice del corno uterino destro e della relativa salpinge. Attraverso l'ostio infundibulare si inserirà un catetere a livello ampollare per circa 3 cm, provvedendo al suo ancoraggio mediante tre punti di sutura distanziati di circa 1 cm l'uno dall'altro, avendo preventivamente cura di verificare la pervietà del catetere stesso mediante l'immissione di soluzione fisiologica all'interno del catetere provvisoriamente ancorato all'ovidutto mediante pinze dog. Fissato il catetere, l'utero sarà riposizionato nella sua posizione fisiologica. Il catetere utilizzato per la cannulazione è un catetere a doppia anima, costituito da un tubo di polietilene (Intramedic PE-60, Clay Adams) del diametro interno di 0,76 mm ed esterno di 1,22 mm e della lunghezza di 97 cm inserito in un tubo di silastic medical-grade (602-205, Dow Corning), della lunghezza di 87 cm, avente diametro interno di 1,02 mm e esterno di 2,16 mm, fornito ad un'estremità di almeno tre

punti di ancoraggio che garantiscono la fissazione del catetere stesso all'ovidutto. L'estremità libera del catetere verrà fatta fuoriuscire a livello della regione del fianco attraverso la breccia operatoria. Infine il catetere sarà collegato ad un sistema di raccolta costituito da una cryovial in polietilene del volume di 2 ml (Dow Corning) fornita di un tappo modificato in modo da poter accogliere il catetere ed un filtro per la ventilazione. L'apparato di raccolta sarà infine assicurato all'animale mediante una tasca di raccolta in tessuto traspirante, applicata a livello della fossa del fianco mediante l'utilizzo di una sostanza adesiva biocompatibile (Tag Cement, NASCO, fort Atkinsons, WI).

Gli animali saranno mantenuti in stalla singola per evitare di danneggiare il catetere, per l'intera durata della prova. Dopo la cannulazione, gli animali saranno monitorati giornalmente e le vial contenenti il fluido oviduttale prodotto nelle 24 ore precedenti saranno rimosse e sostituite con quelle nuove, previa pulizia e disinfezione del sistema di raccolta. Ogni 5 giorni, per almeno 3 volte, saranno effettuati prelievi di sangue, che saranno inviati all'U.O. 3 per la valutazione della progesteronemia. Ciò consentirà di distinguere le bufale acicliche da quelle cicliche, che riceveranno un'iniezione di PGF2alfa (375 mcg; Prosolvin®, Intervet) in corrispondenza ad un valore di progesterone superiore a 1,5 ng/ml, indice di un corpo luteo funzionante. L'ovulazione sarà valutata in maniera indiretta, in funzione del picco di LH, in quanto la tecnica dell'esame ecografico per via trans-rettale, comporterebbe dei rischi di ablazione del catetere dall'ostio tubarico. Ciò è possibile in quanto è noto che in questa specie l'ovulazione avviene a circa 35,5 ore dal picco di LH (34, 35). A tal fine, in seguito alla somministrazione delle prostaglandine, si provvederà ad effettuare ogni 2 ore prelievi di sangue, mediante l'uso di vacutainer eparinizzati. I campioni di plasma ottenuti dopo centrifugazione verranno congelati e successivamente inviati all'U.O. 3 che provvederà alla determinazione delle concentrazioni di LH mediante ELISA. Inoltre, giornalmente i campioni di fluido tubarico raccolti saranno catalogati e stoccati in azoto liquido fino al momento in cui saranno inviati all'U.O. 2 per le successive analisi.

Mediante il protocollo riportato sarà dunque possibile suddividere gli animali in ciclici ed aciclici, e su questi ultimi individuare le diverse fasi del ciclo estrale e in particolare:

- a) fase diestrale ($P4 > 1.5$ ng/ml);
- b) fase pre-ovulatoria (dalla caduta del $P4 < 1.5$ ng/ml fino all'ovulazione presunta);
- c) fase ovulatoria (ovulazione prevista in funzione del picco di LH);
- d) fase post-ovulatoria (dall'ovulazione alla risalita dei livelli ematici di $P4$ al disopra di 1.5ng/ml).

Dopo circa 5 giorni dal momento dell'estro, sarà effettuato un nuovo prelievo di sangue, che consentirà di verificare la fase luteinica e la ciclicità dei soggetti, che potranno quindi essere nuovamente trattati con un'iniezione di PGF2alfa. Si ipotizza di seguire gli animali per diversi cicli estrali indotti consecutivi.

I FASE - VALUTAZIONE DELL'INFLUENZA DELLA STAGIONE SULLA COMPETENZA DEGLI OOCITI RECUPERATI MEDIANTE OPU -

Questa fase, della durata di 12 mesi, è finalizzata a verificare se la competenza allo sviluppo embrionale degli oociti di bufalo è influenzata dalla stagione. Il prelievo in vivo di oociti sarà effettuato mediante la tecnica dell'Ovum pick-up (7) su 20 bufale, selezionate sulla base delle condizioni igienico-sanitarie e della popolazione follicolare. La ciclicità degli animali sarà valutata mediante 2 prelievi di sangue a distanza di 10 giorni che saranno inviati all'U.O. 3 per il dosaggio di progesterone. L'OPU sarà effettuato durante un periodo in cui le ore di buio prevalgono su quelle di luce (mese di Ottobre-Dicembre) su 10 bufale e su altre 10 in un periodo a ore di luce crescente (Gennaio-Aprile). L'effetto della stagione sarà valutato sullo sviluppo follicolare, sulla popolazione oocitaria, sulla percentuale di oociti di buona qualità, sulla resa in blastocisti dopo fecondazione in vitro (IVF) ed infine sulle percentuali di gravidanze dopo trasferimento in animali riceventi. È ormai noto che a fronte della messa a punto di una serie di test morfologici, enzimatici, metabolici, genetici per la valutazione della qualità embrionale, l'unico vero parametro che ci consente di attestare la vitalità di un embrione è il suo sviluppo a termine.

Per ogni seduta di OPU, saranno pertanto registrati il numero di follicoli visualizzati, di quelli aspirabili e dei complessi cumulo-oocita (COC) recuperati in ciascun soggetto. I COCs recuperati verranno valutati in base a criteri morfologici, attenendosi ad una classificazione precedentemente riportata (7), in maniera da registrare l'incidenza dei COCs di buona qualità sul totale di quelli recuperati. I COCs verranno poi lavati in TCM 199 tamponato con Hapes e maturati in vitro in TCM 199 tamponato con bicarbonato di sodio ed addizionato con il 10% di siero fetale, 0,5 mcg/ml di FSH, 5 mcg/ml di LH, 1 mcg/ml di 17 beta-estradiolo, 50 micromol di cisteamina e 0,3 mM di cistina (8). Le piastre di maturazione saranno incubate a 38,5°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ per 22 ore. Gli oociti maturi saranno poi fecondati con spermatozoi congelati/scongelati provenienti da un toro già testato per la IVF nel medium Tyrode Albumine Lactate Pyruvate (TALP; 36), addizionato di 0,2 mM penicillamina, 0,1 mM ipotaurina e 0,01 mM eparina, nelle stesse condizioni d'incubazione utilizzate per la maturazione. Dopo circa 20 ore di co-incubazione con gli spermatozoi, i presunti zigoti saranno denudati dalle cellule del cumulo e coltivati in vitro in medium SOF (37) addizionato di aminoacidi ed albumina sierica bovina. Si procederà con la valutazione del cleavage (divisione a 2 cellule) e della percentuale di blastocisti rispettivamente al giorno 5 e al giorno 7 (con giorno 0 = giorno della fecondazione). Da esperienze precedenti si è osservato che ogni bufala produce mediamente 0,22 embrioni per seduta, nel sistema in vitro tradizionalmente impiegato, per cui un prelievo bisettimanale condotto per 3 mesi consecutivi su 10 bufale darebbe, quindi, circa 50 embrioni trasferibili, in ciascuno dei periodi considerati. Le blastocisti prodotte verranno vitrificate mediante la tecnica del Cryotop, precedentemente utilizzata con successo (38,39) e conservate in azoto liquido fino al momento in cui saranno inviate all'U.O. 4 che effettuerà i trasferimenti in animali riceventi opportunamente sincronizzati che saranno monitorati fino al termine della gestazione.

II FASE (12 mesi) - FORMULAZIONE DI UN SISTEMA DI COLTURA IN VITRO SPECIFICO PER IL BUFALO, DINAMICO E STADIO-DIPENDENTE -

La seconda fase del progetto, della durata di 12 mesi, si propone, sulla base dei risultati sulla composizione del fluido tubarico ottenuti dall'U.O. 2, di costituire dei terreni sintetici, sequenziali che riproducano in vitro, in modo dinamico, l'ambiente tubarico di bufalo e che, quindi, meglio si prestino a soddisfare le esigenze in coltura dei gameti e degli embrioni di questa specie, che stando a quanto si verifica in vitro (40), si modificano nel corso dello sviluppo. Infatti, solo mimando quanto più fedelmente possibile l'ambiente naturale in cui gli eventi riproduttivi precoci hanno luogo, sarà possibile ottenere un miglioramento effettivo dell'efficienza IVEP in questa specie, particolarmente in termini di qualità e vitalità embrionale e, conseguentemente, di gravidanze a termine.

Un terreno per la fecondazione in vitro sarà allestito cercando di mimare, pertanto, in vitro la composizione del fluido tubarico in corrispondenza dei giorni 0-1. Per quanto riguarda la coltura si formuleranno almeno due terreni per le fasi rispettivamente precoce e tardiva dello sviluppo embrionale, variando la concentrazione dei diversi componenti del medium in funzione dello stadio di sviluppo. In un primo momento (circa 8 mesi) della sperimentazione si valuterà l'efficienza del nuovo sistema colturale utilizzando ovaia da macello come materiale di partenza.

A tale scopo ovaia di bufalo saranno prelevate al macello e trasportate in laboratorio in soluzione fisiologica antibiotata a 30-35°C entro 4 ore dal prelievo. I complessi cumulo-oocita (COC) saranno recuperati mediante aspirazione dei follicoli visibili sulla superficie delle ovaie con un ago di 18 G collegato ad una pompa a vuoto, operante ad una pressione controllata negativa di 40 mm Hg. I COC recuperati verranno selezionati in base a criteri morfologici e maturati in vitro come precedentemente descritto (7,8). Sarà valutata prima l'efficienza del nuovo terreno di fecondazione senza variare il terreno colturale e, quindi gli oociti maturi saranno fecondati in vitro sia nel nuovo medium costituito, denominato BFSOF (Buffalo Fertilization Synthetic Oviduct Fluid) sia nel terreno normalmente impiegato nel nostro laboratorio (Tyrode Albumine Lactate Pyruvate; 36), utilizzato come terreno di controllo. Successivamente, una volta identificato il miglior medium di IVF, si procederà al confronto tra i terreni di coltura. Dopo 20-22 ore di co-incubazione con gli spermatozoi, i presunti zigoti saranno denudati dalle cellule del cumulo e coltivati in vitro nei nuovi media formulati, denominati BeSOF (Buffalo Early Synthetic Oviduct Fluid) e BISOF (Buffalo Late Synthetic Oviduct Fluid) e nel medium di controllo normalmente impiegato nel nostro laboratorio (SOF addizionato di aminoacidi ed albumina sierica bovina; 37). Si procederà con la valutazione del cleavage (divisione a 2 cellule) e della percentuale di blastocisti rispettivamente al giorno 5 e al giorno 7 (con giorno 0 = giorno della fecondazione). Si verificherà, quindi, l'efficacia dei nuovi media sulla produzione embrionale in termini quantitativi e qualitativi. Per valutare la qualità degli embrioni si effettuerà la conta delle cellule ed il rapporto nodo embrionale/trofoectoderma su un campione rappresentativo di blastocisti, previa fissazione e colorazione. La vitalità embrionale sarà valutata anche utilizzando il test di vitalità della fluoresceina diacetato, precedentemente utilizzato nel bovino come marker intracellulare di vitalità embrionale (41), che consente di valutare sia l'integrità di membrana sia l'attività esterasica. Un altro gruppo di blastocisti sarà congelato mediante una tecnica di vitrificazione precedentemente descritta (38,39) e conservato in azoto liquido per almeno 10 giorni. La vitalità degli embrioni sarà accertata dopo scongelamento e messa in coltura per 24-48 ore, mediante valutazione della morfologia, della riespansione del blastocite e dello sgusciamiento dalla zona pellucida. Inoltre, gli embrioni prodotti nei diversi sistemi saranno inviati all'U.O. 5 che provvederà a valutare l'espressione di un pannello di geni candidati che giocano un ruolo chiave nel controllo dello sviluppo embrionale (BAX, SOX, Cx31, IFN-tau, LIF ecc).

L'ultima fase della sperimentazione, della durata di circa 4 mesi, è finalizzata a verificare l'efficacia del nuovo sistema colturale ideato, nel sostenere gravidanze a termine dopo trasferimento embrionale. A tale scopo 10 bufale saranno utilizzate come donatrici di oociti da destinarsi alla produzione embrionale in vitro. La ciclicità degli animali sarà valutata mediante 2 prelievi di sangue a distanza di 10 giorni che saranno inviati all'U.O. 3 per il dosaggio di progesterone. Il prelievo in vivo di oociti sarà effettuato mediante la tecnica dell'Ovum pick-up (7) per un periodo di 4 mesi in modo da ottenere un numero significativo di embrioni trasferibili. I COC saranno maturati in vitro (8) ed il nuovo sistema di fecondazione e coltura in vitro sarà comparato con il sistema tradizionale.

Le blastocisti ottenute nei due sistemi a confronto saranno congelate mediante vitrificazione (38,39) e conservate in azoto liquido fino al momento in cui saranno inviate all'U.O. 4 per il trasferimento in animali riceventi sincronizzati.

Sede dell'Unità	Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"
Responsabile Scientifico	Maria Luisa BALESTRIERI
Finanziamento assegnato	Â EuroÂ 26.230

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

L'obiettivo del presente progetto è l'analisi della composizione biochimica dell'ODF e lo studio proteomico della placenta nella specie bufalina. Infatti noi ipotizziamo che riprodurre la composizione dell'ODF nella preparazione dei mezzi di coltura consentirà un miglioramento dell'efficienza della tecnica IVEF, in particolare per quel che riguarda la sopravvivenza embrionale. Inoltre, lo studio proteomico della placenta ci consentirà di far luce su molecole di segnale che prendono parte ai meccanismi molecolari coinvolti nella mortalità embrionale dovuta ad un alterato meccanismo di placentazione. Tali molecole potrebbero rappresentare potenziali bersagli terapeutici per il trattamento di tale fenomeno che riduce notevolmente l'efficienza dell'IVEF. L'ODF sarà prelevato mediante cannulazione durante le varie fasi del ciclo ormonale al fine di avere una conoscenza completa sulla composizione dell'ambiente in vivo che è alla base di una formulazione specie-specifica dei mezzi per la fertilizzazione e la coltura. Più in dettaglio, l'obiettivo di questo progetto sarà raggiunto nell'arco di 2 anni come descritto:

Fase I: Caratterizzazione biochimica dell'ODF bufalino

Fase II: Studio del profilo proteomico della placenta bufalina

Fase I: Caratterizzazione biochimica dell'ODF bufalino

Trattamento dei campioni di ODF. I campioni di ODF saranno forniti dalla UO1. Prima dell'analisi i campioni di ODF saranno scongelati a temperatura ambiente. Dopo determinazione del volume (ml/24 ore), i campioni saranno centrifugati a 1400 rpm per 15 min in tubi eppendorf da 2ml. Dopo centrifugazione l'ODF sarà diviso in due aliquote; un'aliquota (120 µl) sarà utilizzata per la determinazione del glucosio, lattato e piruvato mentre la restante parte del campione sarà conservato a -80°C fino a successivo utilizzo.

Analisi degli ioni.

I campioni di ODF da analizzare saranno scongelati in ghiaccio. Ioni sodio, potassio, calcio, magnesio, nonché ioni cloro e fosfato saranno determinati mediante analizzatore di elettroliti Kodak-Ektachem 700XR C (Kodak Rochester, NY USA). Le possibili interferenze dovute ai tubi di polietilene saranno valutate con campioni di controllo costituiti da acqua distillata e soluzione fisiologica conservati per 2 mesi in tubi di polietilene nelle stesse modalità dei campioni di ODF.

Caratterizzazione degli ioni inorganici mediante elettroforesi capillare (CE). La concentrazione di ioni inorganici contenuti nell'ODF sarà determinata mediante CE. Questa tecnica utilizza capillari del diametro di 20-200 µm i.d. per separare ioni mediante l'utilizzo di un alto voltaggio (10-30 kV), raggiungendo così una elevata efficienza ($N > 105$), risoluzione e sensibilità. Le proprietà di separazione e l'elettroferogramma che si ottiene hanno sia caratteristiche dell'elettroforesi su gel di poliacrilammide che della cromatografia in HPLC. Tuttavia, la CE offre opportunità diverse rispetto alla cromatografia in fase liquida e all'elettroforesi. Infatti, la caratteristica principale di questa tecnica è la sua versatilità (che permette l'analisi a partire da ioni inorganici fino a larghi frammenti di DNA), l'utilizzo di diversi modi di separazione con una diversa selettività, piccoli volumi, costi ragionevoli e la possibilità di connessione con uno spettrometro di massa (CE-MS). L'analisi mediante CE sarà eseguita con uno strumento Water Quanta 4000 che utilizza un software Millennium.

Determinazione del glucosio, lattato e piruvato. Per la determinazione del glucosio, lattato e piruvato i campioni di ODF saranno scongelati e trattati a +80°C per 5 min al fine di inattivare gli enzimi presenti nell'ODF che possono dare problemi di interferenza durante la determinazione spettrofotometrica. Dopo tale trattamento i campioni di ODF saranno centrifugati e analizzati. Le concentrazioni di glucosio, lattato e piruvato saranno determinate mediante saggio enzimatico colorimetrico utilizzando uno spettrofotometro UV (Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS SPECTROMETER®) in modalità Time-Drive per 25 min. Soluzioni standard di ciascun analita saranno conservate in tubi di polietilene e utilizzate come standard.

Determinazione del contenuto lipidico e proteico. La concentrazione fosfolipidica dell'ODF sarà determinata mediante saggio enzimatico colorimetrico (Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS SPECTROMETER®) utilizzando un kit Phospholipids (ref. 17320, Sentinel Diagnostics). Analogamente, l'analisi spettrofotometrica sarà applicata anche per la determinazione della concentrazione proteica con sistema automatizzato Agilent 2100 Bioanalyzer® che utilizza il kit Agilent Protein 230 (n. 5067-1517, Agilent Technologies®).

Caratterizzazione proteica dell'ODF mediante 2-DIGE. L'elettroforesi su gel bidimensionale (2-DIGE) è la tecnica più utilizzata per ottenere una mappa delle proteine di un campione dalle quali è possibile ottenere informazioni circa i livelli di espressione, le isoforme e le modifiche post-traduzionali. Questa tecnica si basa sulla separazione delle proteine in una prima dimensione, in base al loro punto isoelettrico, seguita da una separazione in seconda dimensione per peso molecolare su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). Per i nostri studi utilizzeremo una 2-DIGE con separazione in prima dimensione mediante un gradiente immobilizzato di pH (IPG) che offre il vantaggio di una maggiore riproducibilità, risoluzione ed efficienza di separazione per proteine molto acide o molto basiche. Infatti, l'utilizzo di un gradiente di pH tra 2.5-12 ci permetterà di analizzare anche proteine molto basiche. Inoltre strisce di gel molto sottili con gradiente preformato hanno un'ottima risoluzione ($\Delta pI=0.001$) e ciò, unitamente a metodi di pre-frazionamento, consente di rilevare anche proteine poco abbondanti.

Fase II: Studio proteomico della placenta bufalina.

Preparazione del campione, elettroforesi bidimensionale ed elettroforesi bidimensionale differenziale (2D-DIGE)

L'analisi proteomica dei campioni di placenta di bufalo sarà effettuata prima con la classica elettroforesi bidimensionale e, successivamente, analizzati mediante 2D-DIGE utilizzando il service della Applied Biomics (CA, USA), come descritto precedentemente (Balestrieri et al 2008). I campioni di placenta saranno forniti dall'UO4. Brevemente, per l'effettuazione dell'elettroforesi bidimensionale, i campioni saranno omogeneizzati e lisati aggiungendo lo specifico buffer di lisi (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NP-40 1%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF, 1 mM, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/mL, NaF 1 mM, Na3VO4 1 mM). I campioni saranno sottoposti ad agitazione per 30 min a 4°C e centrifugati. Il saggio per le proteine totali del supernatante sarà eseguito con il metodo Bio-Rad per la concentrazione proteica. Le proteine saranno precipitate con acetone-TCA (90:10, v:v). I campioni saranno sospesi in 30 mM Tris-HCl, pH 8.8, contenente 7 M urea, 2 M tiourea e 4% CHAPS. Le strip IPG (13 cm, pH 3-10) saranno reidratate con 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 20 mg/ml DTT, 1% formalite e tracce di blu di bromofenolo prima del caricamento. Le immagini dei gel opportunamente colorati saranno raccolte con un sistema di acquisizione di immagini per gel bidimensionali in luce UV-visibile ProXpress (Perkin-Elmer) e analizzate con l'ausilio del software Melanie-2. Le spot di interesse saranno escisse dal gel, decolorate e sottoposte a digestione con tripsina. I digeriti triptici saranno analizzati in massa con l'apparecchio LC-MS ESI-ION TRAP (Agilent) e le proteine di provenienza dei peptidi saranno identificate mediante il software online della Mascot.

La 2D-DIGE offre la possibilità di un'accurata analisi quantitativa di proteine poco espresse. Infatti, nella 2D-DIGE i campioni sono legati covalentemente a sonde fluorescenti (CyDye DIGE). Tali sonde interagiscono con le proteine e sono completamente compatibili con le successive analisi quali la degradazione di Edman e l'analisi mediante spettrometria di massa. Inoltre, l'utilizzo di tali sonde fluorescenti consente di caricare fino a tre campioni sullo stesso gel, eliminando così le variabili dovute all'utilizzo di più gels. Per la separazione mediante 2D-DIGE e successiva analisi delle proteine mediante spettrometria di massa sono necessari circa 5-10 mg di tessuto di placenta che verrà opportunamente lavato in PBS per eliminare le contaminazioni di sangue. Per i nostri studi la 2D-DIGE sarà eseguita utilizzando il service della Applied Biomics (CA, USA). Le immagini della mappa proteica bidimensionale saranno analizzate mediante software Image Quant (5.0, Amersham BioScience) e software DeCyder 6.0 (Amersham BioSciences). Le spot di proteine di interesse saranno prelevate mediante Ettan Spot Picker (Amersham BioSciences), analizzate mediante software DeCyder, sottoposte a digestione in-gel con tripsina e identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems).

Analisi mediante immunoblot. Le proteine di interesse identificate saranno ulteriormente caratterizzate mediante analisi Western blot con specifici anticorpi. I campioni di tessuto di placenta, opportunamente omogeneizzati e sottoposti a trattamento con tampone di lisi saranno separati mediante SDS-PAGE su gel al 12.5% e trasferiti su filtro di nitrocellulosa opportunamente trattato per 2 ore con 3% albumina di siero bovino in soluzione Tris-HCl (pH 7.4) con 0.1% Tween 20 (TBS-T). La reazione con gli anticorpi primari sarà effettuata per tutta la notte. Dopo incubazione con gli anticorpi secondari il segnale sarà rilevato mediante chemiluminescenza

e l'analisi semiquantitativa sarà effettuata utilizzando lo strumento Scan LKB (Amersham Pharmacia). La normalizzazione sarà effettuata mediante l'utilizzo di anticorpi policlonali contro la tubulina (GTU-88) (Sigma).

Microscopia confocale tramite immunofluorescenza. La caratterizzazione e la localizzazione cellulare delle proteine identificate nella placenta bufalina sarà effettuata anche specifica analisi con microscopia confocale. A tal riguardo, i campioni saranno incubati per tutta la notte a 37°C con anticorpi specifici e poi con anticorpi secondari coniugati a Alexafluor 633 (1:1000) o Alexafluor 488 (1:1000) per 1 ora a temperatura ambiente. Le determinazioni saranno effettuate con un microscopio confocale Zeiss LSM 510 equipaggiato con un obiettivo piano-apocromatico X 63 (NA 1.4) a immersione a olio. L'emissione della fluorescenza di Alexa 488 e di Alexa 633 sarà acquisita in modo multi-track usando i filtri LP 505 e LP650, rispettivamente. Per minimizzare il disturbo, saranno mediate sedici acquisizioni dell'immagine. Le immagini tridimensionali saranno ricostruite con il software Zeiss LSM 510 3D. La colocalizzazione dei fluorofori sarà determinata con il software ImageJ.

Analisi mediante microscopia elettronica. I campioni di placenta saranno analizzati anche mediante Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) e Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM). La microscopia elettronica offre alla ricerca biologica una serie di potenzialità investigative per la visualizzazione e l'analisi sia di superficie che ultrastrutturale delle cellule e dei loro costituenti. Inoltre, tale metodologia investigativa è in grado di analizzare un ampio spettro di dettagli che vanno dal livello superficiale sino alla visualizzazione di determinati organuli cellulari, indicandone anche lo stato funzionale. Il SEM è uno strumento versatile che garantisce un'eccellente risoluzione laterale, dell'ordine di qualche nanometro, con un'eccezionale profondità di campo e consente infine di raccogliere informazioni microanalitiche. Per l'osservazione al SEM, i campioni saranno fissati in glutaraldeide (2.5% in tampone fosfato) e successivamente post-fissati in tetrossido di osmio (1% in tampone fosfato). I campioni saranno poi sottoposti ad una serie di disidratazioni in etanolo e acqua a concentrazione crescente. Infine, sarà effettuata una disidratazione finale con un Critical Point Drier ed una metallizzazione con oro. Il FESEM (Zeiss SUPRA™ 40) utilizzato per tale progetto di ricerca è un SEM di nuova generazione il cui vantaggio è rappresentato dalla possibilità di ottenere immagini ad altissima risoluzione anche alle bassissime tensioni di accelerazione, caratteristica che si rivela utile nel caso di osservazione di campioni particolarmente delicati.

I campioni saranno analizzati anche mediante Energy-filtered transmission electron microscopy (EFTEM) (LEO LIBRA 120) che fa parte TEM di nuova generazione. Tale microscopio garantisce immagini di altissima qualità; un altissimo contrasto, grazie alla possibilità di escludere gli elettroni scatterati inelasticamente o elasticamente dall'immagine. Per l'analisi al TEM, i tessuti saranno tagliati in piccole sezioni di circa 1 mm cubo, fissati per tutta la notte in glutaraldeide (2.5% in tampone fosfato) e successivamente fissati in tetrossido di osmio (1% in tampone fosfato). I campioni saranno poi disidratati con una serie di concentrazioni di alcol e acetone, trattati con ossido di propilene ed inclusi in resina epossidica. Da tali inclusioni saranno poi ottenute sezioni ultrafini con lama di diamante che verranno poi osservate a TEM.

Balestrieri ML, et al. High glucose downregulates endothelial progenitor cell number via SIRT1. *Biochim Biophys Acta (Proteins and Proteomics)* 2008 1784, 936-945

Sede dell'Unità Università degli Studi di CAMERINO (TRASFERITO)

Responsabile Scientifico Giuseppe CATONE

Finanziamento assegnato Â EuroÂ 40.150

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

Questo programma di ricerca, diviso in due anni, è progettato per meglio comprendere i meccanismi cellulari che regolano l'attività dei corpi lutei (CL) delle bufale Mediterranee Italiane durante il normale ciclo estrale e la gravidanza.

In particolare, la nostra unità operativa si pone gli obiettivi di valutare i meccanismi ormonali ed enzimatici che regolano l'attività del corpo luteo in bufale non gravide a diversi giorni post-estro e in bufale a diverso stadio di gestazione in due periodi dell'anno caratterizzati da differenti fotoperiodi (Ottobre-Dicembre vs. Gennaio-Aprile). Inoltre, al fine di valutare l'efficienza della tecnologia della produzione embrionale in vitro (IVEP) (Unità Operativa 1, UO1), e lo sviluppo placentare e la mortalità embrionale tardiva (UO4), l'attività del CL sarà valutata anche in soggetti gravidi in seguito ad inseminazione strumentale o a trasferimento embrionale. Infine, sui prelievi di sangue effettuati in tutti gli animali che saranno utilizzati per il prelievo di liquido tubarico (UO1), l'inseminazione strumentale e il trasferimento embrionale (UO4), saranno valutate le concentrazioni di estrogeni, progesterone e prostaglandine.

PRIMO ANNO

LIVELLI ORMONALI PLASMATICI

Lo stato riproduttivo delle bufale utilizzate per il prelievo di liquido tubarico dalla UO1 e per l'inseminazione strumentale dalla UO4 sarà stabilito valutando con metodo RIA i livelli plasmatici di progesterone, estradiolo, PGF2alpha e PGE2. Inoltre per determinare il momento dell'ovulazione nelle bufale incannulate dall'UO1 per il prelievo del fluido oviduttale da analizzare dall'UO2, verrà determinato, con metodo ELISA, il livello di LH in campioni di plasma prelevati ogni due ore dopo la somministrazione di prostaglandina.

INCUBAZIONI IN VITRO

La valutazione dell'attività del corpo luteo, durante il primo anno, sarà effettuata su biopsie di CL prelevate da bufale macellate in diverse stagioni. In particolare, l'UO4 fornirà, per ogni stagione riproduttiva (Ottobre-Dicembre e Gennaio-Aprile), corpi lutei ottenuti da bufale macellate a 5, 10 e 15 giorni dall'inizio dell'estro e a 30, 60, 90 e 120 giorni di gravidanza. Le metodiche di laboratorio utilizzate sono state precedentemente descritte da Boiti et al (2001, 2005).

In primo luogo, per calcolare la minima dose efficace delle sostanze da utilizzare, ciascun tipo di CL dell'estro e della gravidanza sarà suddiviso in gruppi corrispondenti a cinque concentrazioni crescenti delle sostanze (PGF2alpha, PGE2, PPAR agonista ed antagonista). I tessuti saranno incubati in 1 ml terreno di coltura (199 con Earles Balanced Salt Solution contenente 2.2 mg/ml sodio bicarbonato, 2.3 mg HEPES e 3% BSA) a 37°C in aria con il 5% di CO2. Il terreno di ogni pozzetto verrà raccolto dopo 8 h di incubazione e conservato a -20°C. Il contenuto di progesterone verrà dosato per stabilire le dosi minime efficaci. Successivamente, ciascun tipo di CL (5, 10, e 15 giorni dopo l'inizio dell'estro e 30, 60, 90, e 90 giorni di gravidanza) sarà suddiviso nei seguenti gruppi sperimentali ed incubato come sopra riportato:

- 1) Controllo
- 2) PGE2
- 3) PGF2alpha
- 4) 15d-PGJ2 (PPARgamma agonista)
- 5) PPARgamma antagonista
- 6) PGE2 + 15d-PGJ2
- 7) PGF2alpha + 15d-PGJ2
- 8) PGE2 + PPARgamma antagonista
- 9) PGF2alpha + PPARgamma antagonista
- 10) 15d-PGJ2 + COX 1 inibitore
- 11) PPARgamma antagonista + COX 1 inibitore
- 12) 15d-PGJ2 + COX 2 inibitore
- 13) PPARgamma antagonista + COX 2 inibitore

Il terreno di ogni pozzetto sarà raccolto dopo 8 ore di incubazione e conservato a -20°C per la successiva determinazione dei livelli di estradiolo, progesterone, 15d-PGJ2, PGE2, e PGF2alpha mediante metodiche RIA o ELISA, mentre i tessuti saranno conservati a -80°C per i successivi esperimenti. Anche per gli esperimenti sui tessuti, si utilizzeranno metodiche precedentemente descritte (Boiti et al 2005, Zerani et al 2007). In particolare, saranno effettuate analisi di immunoistochimica, Real Time PCR (RT-PCR) e analisi enzimatiche.

In primo luogo, nei CL, sarà valutata immunostochimicamente la presenza di COX1, COX2, PGD2-11-chetoreductasi (PGD2-11-K), PGE2-9- chetoreductasi (PGE2-9-K) e PPARgamma. I campioni di tessuto verranno fissati in una soluzione di formalina tamponata al 10% per 24-48 ore; successivamente saranno disidratati nella serie crescente degli alcool (70, 95 e 100%), chiarificati in xilolo e inclusi in paraffina. Sezioni seriali di 4 µm, verranno deparaffinate in xilolo e reidratate con etanolo; successivamente, per lo smascheramento antigenico, saranno sottoposte, in un appropriato tampone, a trattamento in forno microonde per 10 minuti a 700 W e poi raffreddate a temperatura ambiente. Le sezioni saranno, quindi, immerse in una soluzione al 3% di H₂O₂ in metanolo per 1 ora per l'inattivazione delle perossidasi endogene e sottoposte a lavaggi in TBS. Verranno poi incubate per 30 minuti con siero normale di capra (NGS) al fine di ridurre al minimo i legami non specifici.

Il passaggio successivo prevede l'incubazione delle sezioni con l'antisiero primario opportunamente diluito in una soluzione di TBS contenente lo 0.2% di Triton X-100 e lo 0.1% di albumina serica bovina (BSA) per la durata di un'intera notte a 4° C. Le sezioni, dopo 3 lavaggi della durata di 5 minuti ognuno in TBS, verranno nuovamente trattate con NGS e poi incubate con l'anticorpo secondario biotinilato diluito 1:200 in una soluzione di TBS, contenente lo 0.2% di Triton X-100 e lo 0.1% di BSA, per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo lavaggi con TBS, le sezioni saranno trattate con il complesso avidina-biotina-perossidasi (ABC Kit) per 30 minuti; la visualizzazione dei siti di legame verrà effettuata usando la diaminobenzidina come cromogeno (DAB Kit). Dopo due lavaggi di 5 minuti ognuno in acqua distillata, le sezioni saranno disidratate, chiarificate in xilolo e montate con Eukitt per la microscopia ottica. Le sezioni, in cui l'anticorpo primario verrà omesso, costituiranno il controllo negativo.

Successivamente i tessuti saranno utilizzati per la valutazione dell'RNA di COX1, COX2, PGD2-11-K, PGE2-9-ketoreductase e PPARgamma. I tessuti saranno omogeneizzati in 1 ml di soluzione Trizol. La concentrazione totale e la purezza del RNA saranno determinate spettrofotometricamente. L'integrità dei campioni sarà valutata con l'elettroforesi di 3 µg di RNA nel gel di agarosio formaldeide utilizzando la colorazione etidio bromuro. La contaminazione di DNA genomico sarà eliminata con deossiribonucleasi L'RNA totale (1µg/µL) sarà trascritto inversamente in cDNA in 20 µl di una miscela finale di reazione di sintesi. La contaminazione di DNA genomico sarà verificata mediante campioni senza trascrittasi inversa. Un'aliquota (1.0 µl) del cDNA sarà utilizzata come modello per la successiva PCR semi-quantitativa. Questa (25.0 µl), sarà eseguita con 0,2 ul Taq DNA polimerasi (5 U/ul), 1.0 ul dNTPs (10 mM), 5.0 ul tampone Taq, 1.0 ul (10 uM) primers. Per ridurre al minimo gli errori, all'interno di ogni esperimento, il gene analizzato sarà co-amplificato con 18S primer durante lo stesso ciclo di PCR. Le amplificazioni saranno eseguite su termocicizzatore. All'interno d'ogni esperimento, la serie completa di campioni sarà processata in parallelo in una singola PCR. I prodotti ottenuti con la PCR (20 µl di 25 ul del volume totale di reazione) saranno analizzati con elettroforesi in gel 2% agarosio utilizzando la colorazione etidio bromuro. Ogni prodotto sarà sottoposto a elettroforesi su singolo gel insieme ad un controllo negativo. Le immagini dei gel saranno acquisite con una fotocamera digitale. L'intensità delle bande, corretta dello sfondo, sarà misurata con un software quantitativo. Per valutare i cambiamenti temporali nei livelli relativi di mRNA, l'intensità della banda del gene analizzato sarà normalizzata rispetto a quella del co-prodotto dal mRNA 18S.

Infine, sarà valutata l'attività enzimatica delle COX1, COX2, PGD2-11-K e PGE2-9-K e la sintesi in vitro di PGD2, 15d-PGJ2, PGE2 e PGF2alpha. L'attività delle COX1 e COX2 nei CL sarà determinata misurando la diminuzione del substrato radioattivo [3H]acido arachidonico. I campioni saranno omogeneizzati in 1 ml di tampone fresco (50 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA, pH 8.0), centrifugati a 20000 x g per 60 minuti a 4°C. Per ogni provetta d'incubazione saranno aggiunti 50 ul di supernatante e 50 ul di tampone, contenente 150.000 dpm [3H]acido arachidonico, ognuno con o senza un inibitore selettivo della COX2. Provette con il campione ed il substrato ed un inibitore non selettivo della COX saranno utilizzati per determinare la diminuzione non enzimatica dell'[3H]acido arachidonico. La provetta verranno incubate a 37°C per 10 min. La reazione verrà bloccata mediante l'aggiunta di isopropanol/n-eptano/1 N acido solforico (1:4:0.1, v/v/v). Le due fasi risultanti, saranno separate con l'aggiunta di 400 ul di H₂O e 1 ml di n-eptano. Lo strato superiore organico, contenente l'[3H]acido arachidonico non trasformato, sarà trasferito in una seconda provetta e lo strato acquoso sarà estratto di nuovo con 1 ml di n-eptano. Gli strati organici saranno uniti con 1 ml di n-eptano con 150 mg di silice gel 60. La miscela verrà accuratamente mescolata e quindi centrifugata. L'[3H]acido arachidonico nel supernatante sarà quantificato con la scintillazione liquida. L'attività della COX1 sarà determinata dal valore della diminuzione dell'[3H]acido arachidonico incubato con l'inibitore selettivo della COX2. L'attività della COX2 sarà determinata attraverso il valore della diminuzione dell'[3H]acido arachidonico incubato senza l'inibitore selettivo COX2, e sottraendo a questo valore quello della COX1. I valori della COX1 e COX2 saranno corretti sottraendo il valore della diminuzione non enzimatica dell'[3H]acido arachidonico.

L'attività della PGDE2-11-K e della PGE2-9-K sarà determinata misurando la trasformazione della [3H]PGD2 o della [3H]PGE2 in [3H]PGF2alpha. I tessuti saranno omogeneizzati in 1 ml di tampone fresco (20 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA e 10 mM beta-mercaptoetanolo, pH 7.4). L'omogenato sarà filtrato e immediatamente utilizzato per il test di attività enzimatica. 100 ul di omogenato e 50 ul di tampone contenente NADPH₂ (3 mg/ml) e 150.000 dpm di [3H]PGD2 o [3H]PGE2 verrà aggiunto alla provetta d'incubazione. La miscela verrà incubata a 37°C per 10 minuti. La reazione verrà bloccata mediante l'aggiunta di 100 ul 0,1 M HCl. Le PGs saranno estratte con etere etilico e risospese in 500 ul tampone RIA. 200 ul RIA tampone contenente antisiero anti PGF2alpha specifico verrà aggiunto ai campioni e la miscela verrà incubata a 4°C per 16 ore. La frazione contenente il complesso [3H]PGF2alpha-antisiero verrà separata con carbone-destano e quantificata con la scintillazione liquida.

La sintesi in vitro di PGD2, 15d-PGJ2, PGE2 e PGF2alpha sarà determinata misurando la conversione dell'[3H]acido arachidonico in [3H]PGD2, [3H]15d-PGJ2, [3H]PGE2 e [3H]PGF2alpha. 50 microlitri di supernatante, ottenuto come sopra descritto, e 50 ul di tampone di incubazione (50 mM Tris, 1 mM EDTA e 1 mM EGTA, pH 7.4) contenente 150.000 dpm di [3H]acido arachidonico verranno aggiunti alla provetta di incubazione. La miscela di campione e substrato contenente un inibitore non selettivo della COX sarà usata come bianco. La miscela verrà incubata a 37°C per 10 minuti e poi bloccata con 100 ul 0,1 M HCl. Le [3 H]PGs saranno estratte e quantificati con antisieri specifici come sopra riportato.

SECONDO ANNO

Durante il secondo anno, le analisi effettuate durante il primo anno saranno ripetute su biopsie di CL fornite dall'UO4 durante la stagione a maggiore incidenza di mortalità embrionale. In base ai risultati ottenuti durante primo anno, sarà individuato il momento più opportuno per effettuare le biopsie. Saranno poi prelevate al macello biopsie di CL di animali che manifesteranno mortalità embrionale tardiva (n=3), mortalità fetale (n=3) o gravidanza normale (n=3). Su tutti i campioni biopsici saranno eseguite le stesse analisi cellulari e molecolari descritte nel primo anno. Inoltre, al fine di valutare lo stato riproduttivo delle bufale utilizzate dalle UO1 e UO4, rispettivamente per la produzione di fluido oviduttale, per l'inseminazione strumentale e il trasferimento embrionale, saranno analizzati prelievi di sangue per la valutazione dei livelli plasmatici di progesterone, estradiolo, PGF2alpha e PGE2 mediante metodo RIA.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di Napoli Federico II
Responsabile Scientifico	Marco RUSSO
Finanziamento assegnato	Â EuroÂ 26.770

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

Obiettivo di questa ricerca è valutare la funzionalità del corpo luteo, lo sviluppo della placenta e la mortalità embrionale in due periodi dell'anno caratterizzati da differente fotoperiodo (Ottobre-Dicembre e Gennaio-Aprile). Lo studio sarà effettuato in due anni sia in bufale sottoposte ad inseminazione strumentale che in soggetti utilizzati come riceventi per trasferimento embrionale. Le ulteriori conoscenze sui meccanismi coinvolti in questi processi consentiranno l'ottimizzazione dei protocolli di sincronizzazione dell'estro e / o delle tecniche di trasferimento embrionale per migliorarne le performance riproduttive. Inoltre questi studi forniranno maggiori informazioni sull'utilizzo di trattamenti farmacologici per incrementare l'attività del corpo luteo e favorire la placentazione al fine di ridurre la mortalità embrionale.

Primo anno

Durante il primo anno, la ricerca sarà effettuata in due periodi, caratterizzati da differente fotoperiodo (Ottobre-Dicembre e Gennaio-Aprile), con approccio sia "in vitro" che "in vivo".

Lo studio in vivo sarà eseguito su 200 bufale di razza Mediterranea Italiana (100 capi per ciascun periodo sperimentale), selezionate attraverso esame clinico (palpazione rettale di ovaie, follicoli e corpi lutei per la valutazione della ciclicità riproduttiva e dell'utero per anomalie di altra natura, comprese raccolte fluide intraluminari) prima dell'inseminazione strumentale e solo quelle ritenute in condizioni ottimali da un punto di vista riproduttivo saranno incluse nello studio. Prima del trattamento di sincronizzazione, saranno effettuati due prelievi di sangue per il dosaggio di Progesterone, PGF2alfa e PGE2 eseguito dall'Unità Operativa 3. Le bufale saranno sincronizzate con il protocollo Ovsynch-TAI, già sviluppato per la bovina (Pursley et al., 1995) e in precedenza utilizzato nella bufala (Neglia et al., 2003). In breve, esso consiste nella somministrazione di un agonista del GnRH al Giorno 0, un analogo della prostaglandina PGF2alfa al giorno 7, e un'ulteriore iniezione di GnRH-agonista al giorno 9. Le inseminazioni strumentali saranno eseguite dallo stesso operatore e ogni capo sarà inseminato due volte, 16 ore e 40 ore

dopo la seconda iniezione di agonista del GnRH. A causa della relativamente scarsa entità di manifestazioni estrali nella specie bufalina (Ohashi, 1994), gli animali saranno sottoposti ad esplorazione rettale (subito prima dell'inseminazione strumentale) per valutare la condizione estrale (follicolo > 1,0 cm, utero tonico ed eventuale scolo mucoso vaginale). Venticinque giorni dopo l'inseminazione le bufale saranno sottoposte ad ecografia trans-rettale per valutare lo sviluppo embrionale. La valutazione ultrasonografica sarà effettuata con un apparecchio portatile Sonoace Pico (Medison) con sonda lineare da 10 MHz appositamente adattato per l'esame transrettale in grossi animali. La diagnosi di gravidanza sarà confermata ai giorni 45 e 70 dopo l'inseminazione strumentale attraverso esplorazione rettale. Per le bufale ritenute gravide al giorno 25, ma non al giorno 45 sarà emessa diagnosi di mortalità embrionale tardiva (LEM). Allo stesso modo, per i soggetti gravidi al giorno 45, ma non al giorno 70, si parlerà di mortalità fetale (FM). Nei giorni 10, 20 e 25 dopo l'inseminazione saranno visualizzati i corpi lutei delle bufale attraverso indagine ecografica con metodica color-Doppler per la valutazione della vascolarizzazione dell'organo. L'applicazione della modalità spettrale sarà utilizzata per calcolare l'indice di resistenza (RI) e di pulsatilità (PI). Inoltre, saranno registrate le dimensioni del corpo luteo. Campioni di sangue saranno raccolti nei giorni 10, 20 e 25 dopo l'inseminazione in tutte le bufale. I campioni di sangue saranno valutati per la determinazione del progesterone ematico e delle prostaglandine PGF2alfa e PGE2 attraverso metodica di RIA dall'Unità Operativa 3. Saranno inoltre rapportate le variazioni dei livelli di progesterone, le acquisizioni ecografiche eseguite in modalità "B-mode real time" e "color-Doppler" e le dimensioni del corpo luteo.

Lo studio in vitro, sarà eseguito su 27 bufale macellate per ogni periodo sperimentale. Trenta soggetti non gravidi (15 per ogni stagione) saranno sincronizzati con il programma Ovsynch-TAI come descritto in precedenza. Due campioni di sangue saranno raccolti prima del trattamento di sincronizzazione, per la determinazione del progesterone ematico, che sarà effettuata dall'U.O 3. Le bufale saranno macellate in giorni diversi dopo l'estro. In particolare, biopsie post-mortem dai corpi lutei saranno effettuate a 5 giorni (CL precoce; 5 animali a stagione), 10 giorni (CL maturo; 5 animali a stagione) e 15 giorni (CL tardivo; 5 animali a stagione) dopo l'estro, mantenute in soluzione fisiologica e inviate all'U.O 3. Al fine di valutare lo sviluppo della placenta, saranno macellate altre bufale gravide, a vari stadi di gestazione. Per ogni stagione, sarà macellato un totale di 12 animali gravidi, a 30, 60, 90 e 120 giorni per la valutazione del corpo luteo e della placenta. I corpi lutei saranno inviati alla U.O 3, mentre le placente saranno inviate alle U.O 2 e 5.

SECONDO ANNO

Durante il secondo anno alcuni animali saranno inseminati durante il periodo caratterizzato dalla più elevata incidenza di mortalità embrionale. Saranno trattate Bufale (n = 50) alla fine della carriera produttiva e riproduttiva come descritto sopra e sottoposte ad inseminazione strumentale. In tutti gli animali saranno eseguite biopsie dei corpi lutei, in corrispondenza del periodo di riduzione funzionale dell'attività del corpo luteo, come indicato dalla diminuzione dei livelli di progesterone e del flusso ematico al corpo luteo stesso, osservata durante il primo anno in bufale che sono andate incontro a mortalità embrionale. Le successive valutazioni ecografiche consentiranno di distinguere le bufale gravide sia ai giorni 25 e 45 da quelle che mostreranno segni di mortalità embrionale. L'analisi delle biopsie dei corpi lutei, eseguita presso l'U.O 3, e le immagini di eco-Doppler, realizzate dalla nostra U.O, in entrambe le categorie di animali, permetteranno di valutare le differenze nel flusso ematico al corpo luteo e le espressioni recettoriali. Inoltre, saranno macellate un totale di dieci bufale (tre che mostreranno mortalità embrionale tardiva, tre con mortalità fetale, due con gravidanza normale a 45 giorni e due gravide a 70 giorni) e saranno raccolte le placente da inviare alle U.O 5 e U.O 2. Dagli stessi animali saranno raccolti i corpi lutei da inviare alla U.O 3. Al fine di valutare l'impianto e lo sviluppo embrionale, alcune bufale non gravide saranno utilizzate come riceventi per il trasferimento embrionale. Tutti gli embrioni prodotti durante il primo (in due diverse stagioni) e il secondo anno (in due diversi mezzi di coltura) dall'U.O 1 saranno trasferiti durante la stagione caratterizzata da una bassa incidenza di mortalità embrionale, in base ai risultati ottenuti dalla nostra U.O 4 e dalla U.O 3 durante il primo anno. Due campioni di sangue saranno raccolti prima del trattamento di sincronizzazione, per la determinazione del progesterone ematico, della PGF2alfa e della PGE2, che saranno effettuate dalla U.O 3. Solo le bufale cicliche saranno sottoposte a trattamento di sincronizzazione e saranno utilizzate per il trasferimento embrionale a 6 giorni dopo l'estro. La funzionalità del corpo luteo sarà valutata anche in questi animali nei giorni 10, 20 e 25 dopo l'estro e la diagnosi di gravidanza sarà effettuata nei giorni 25, 45 e 70, al fine di valutare l'incidenza di mortalità embrionale tardiva e di mortalità fetale.

Sede dell'Unità

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CESSATO DAL SERVIZIO)

Responsabile Scientifico

Maria STRAZZULLO

Finanziamento assegnato

Â EuroÂ 24.090

Compito dell'Unità (come da progetto presentato)

Scopo di questa ricerca è investigare gli eventi trascrizionali ed i meccanismi regolativi coinvolti nella riproduzione del bufalo per ottenere nuove conoscenze di tipo molecolare sulla vitalità e lo sviluppo di embrioni ottenuti attraverso l'impiego di biotecnologie riproduttive. In questo progetto adotteremo un approccio genome su larga scala per ottenere una mappa globale del comportamento trascrizionale della placenta di bufalo. Sulla base di questa mappa l'attenzione verrà focalizzata su specifici geni che risulteranno interessanti. Un approccio gene-specifico verrà invece attuato per ottenere informazioni molecolari relative alla profilo di espressione in embrioni ottenuti in vitro. Il progetto sarà organizzato come schematizzato di seguito.

Obiettivo 1: Ottenere una collezione di campioni di DNA ed RNA estratti da placenta in corrispondenza di differenti fasi di sviluppo in collaborazione con la UO 4 (primo e secondo anno).

Obiettivo 2: Analizzare e comparare il profilo di espressione genica in placenta a differenti stadi di sviluppo (primo anno).

Obiettivo 3: Individuare i geni di maggiore interesse per la struttura e la funzione di placenta; caratterizzare le prerogative trascrizionali e regolative di questi geni; valutare il ruolo di questi geni in tessuti placentali ottenuti dopo inseminazione artificiale (primo e secondo anno).

Obiettivo 4: Valutare un pannello di alcuni geni target principali coinvolti nella vitalità embrionale e nello sviluppo precoce di embrioni prodotti in vitro dalla UO 1 in sistemi colturali ottimizzati, sviluppati sulla base del fluido oviduttale prodotto dalla UO 2 (secondo anno)

Obiettivo 1: Ottenere una collezione di campioni di DNA ed RNA estratti da placenta in corrispondenza di differenti fasi di sviluppo in collaborazione con la UO 4 (primo e secondo anno).

Al momento esistono poche informazioni molecolari sulle fasi fini dello sviluppo embrionale bufalino. Una primo approccio fondamentale per ottenere dati sperimentali specifici è ottenere una collezione di campioni che siano rappresentativi delle fasi di sviluppo fisiologico e di placente prodotte in condizioni diverse quali periodi riproduttivi non fisiologici o mediante inseminazione artificiale. I campioni verranno prodotti dalla UO 4. Durante il primo anno un totale di 12 animali gravidi per ciascuna stagione verranno macellati a 30, 60, 90 e 120 giorni di gravidanza per prelevare la placenta. Durante il secondo anno del progetto campioni di placenta verranno prelevati da un totale di 9 bufali (3 che mostreranno mortalità embrionale tardiva, 3 che mostreranno mortalità fetale e 3 animali gravidi).

Ciascun campione sarà conservato in una soluzione di RNAlater per preservare l'integrità della struttura tissutale. Compatibilmente con le condizioni tecniche le parti embrionale e materna del placentoma, cotiledone e caruncola, rispettivamente, saranno separate. Da ciascun campione verrà estratto DNA ed RNA ed una parte del tessuto sarà crioconservato per consentire l'attuazione di ulteriori analisi (analisi su proteine e sulla cromatina) in un secondo momento. L'estrazione del DNA sarà ottenuta utilizzando un protocollo standard basato su proteinaseK ed una purificazione con fenolo-cloroformio. L'estrazione di RNA sarà ottenuta usando il protocollo con Trizol dopo omogeneizzazione tissutale ottenuta mediante Tissue-lyser.

Obiettivo 2: Analizzare e comparare il profilo di espressione genica in placenta a differenti stadi di sviluppo (primo anno).

Nonostante la notevole importanza economica della specie bufalina, la disponibilità di dati genomici su questa specie è ancora molto limitata e di conseguenza non sono ancora commercialmente disponibili macroarray specie-specifici. Comunque, la genomica comparata e funzionale forniscono utilissimi strumenti per cercare di risolvere tali problemi (O'Brien SJ, 1999). La specie bovina è strettamente correlata con la specie bufalina dal punto di vista filogenetico ed i dati genomici relativi a tale specie sono di grande utilità anche per lo studio del bufalo. Esistono in commercio set di microarray di bovino (Il GeneChip® Bovine Genome Array contenente oltre 23,000 trascritti bovini). Tali microarray adottando opportune modificazioni di protocollo (Bar-Or C et al, 2007) potranno essere ibridati con sonde preparate con RNA bufalino per ottenere un profilo di espressione. Tale esperimento verrà effettuato in collaborazione con la microarray facilities dell'IGB-A. Buzzati-Traverso, CNR. Nel corso del primo anno, pianifichiamo di ibridare i microarray bovini con RNA estratto da placente ottenute dopo 30, 60, 90 e 120 giorni di gravidanza (fornite dalla UO 4). I profili di espressione risultanti saranno comparati. Per l'ibridazione del microarray l'RNA verrà estratto dal tessuto di interesse e sarà usato come stampo per la preparazione di cRNA. Con ciascuna analisi sarà possibile comparare due diverse condizioni. Per questa ragione ciascun cRNA verrà marcato ripetitivamente con Cys3 e Cys5 per ottenere segnali differenziali. Ibridazione, lavaggio ed analisi dei dati verranno attuati secondo protocolli standardizzati (Ness et al, 2007) e loro modificazioni (Bar-Or C et al, 2007). I risultati ottenuti per ciascun RNA verranno poi analizzati e comparati tra di loro e valutati rispetto alle informazioni esistenti in letteratura su altre specie informative (bovino, suino, uomo, topo).

Obiettivo 3: Individuare i geni di maggiore interesse per la struttura e la funzione di placenta; caratterizzare le prerogative trascrizionali e regolative di questi geni; valutare il ruolo di questi geni in tessuti placentari ottenuti dopo inseminazione artificiale (primo e secondo anno).

Le analisi effettuate nello step precedente, potranno evidenziare un ampio numero di geni utili alla caratterizzazione di nostro interesse. L'attenzione verrà focalizzata su i geni che, anche in base ai dati di letteratura, risulteranno essere più interessanti per la comprensione delle diverse fasi dello sviluppo, sia nella formazione della placenta che nella vitalità embrionale. Poiché i risultati saranno riferiti ad un microarray bovino, per la validazione dovranno essere clonati i corrispettivi geni di bufalo. A tale scopo seguiremo un approccio di genomica comparata, così come schematizzato di seguito: ricerca in banche dati (NCBI) con specifici algoritmi (BLASTn) di sequenze nucleotidiche dei geni di interesse nelle specie correlate al bufalo filogeneticamente o molto informative dal punto di vista genomico (bovino, ovino, suino, uomo, topo); allineamento delle sequenze mediante algoritmo ClustalW per ottenere le regioni di maggiore conservazione nucleotidica; disegno dei primer, anche degenerati; clonaggio della sequenza specifica di bufalo mediante amplificazioni per PCR; primer walking per ottenere l'eventuale trascritto intero. Una volta ottenuta la sequenza specifica di bufalo i risultati dei microarray verranno validati mediante esperimenti di RealTime-PCR usando cDNA derivanti dagli stessi RNA usati per le ibridazioni. Questi esperimenti verranno realizzati mediante RealTime PCR, in collaborazione l'IGB-A. Buzzati Traverso, CNR) I livelli del trascritto in esame verranno ulteriormente analizzati in diversi tessuti ed in diverse condizioni sperimentali in modo da ottenere un quadro rappresentativo del comportamento trascrizionale di questi geni. Inoltre andremo a valutare alcune caratteristiche regolative di questi geni quali la presenza di isole CpG associate ai promotori di tali trascritti ed eventualmente lo stato di metilazione di tali isole; il codice istonico del promotore. Per valutare l'esistenza di un meccanismo di imprinting nella regolazione dell'espressione bisogna verificare l'esistenza di una espressione monoallelica. A tale scopo cercheremo all'interno della sequenza del trascritto la presenza di polimorfismi nucleotidici che ci consentano di distinguere i due alleli ed eventualmente associarli alla derivazione materna o paterna. Durante il secondo anno del progetto analizzeremo il profilo di espressione di questi geni (mediante RealTime PCR, in collaborazione con l'IGB-A. Buzzati Traverso, CNR) in tessuti placentari derivanti da IA, e forniti dalla UO4. In particolare analizzeremo l'espressione di questi geni in RNA estratti da tessuti placentari derivanti da 3 bufali che mostrano mortalità embrionale tardiva, 3 che mostrano mortalità fetale e 3 animali gravidi. Alterazioni dell'espressione di questi geni in queste condizioni sperimentali saranno analizzate e discusse.

Obiettivo 4: Valutare un pannello di alcuni geni target principali coinvolti nella vitalità embrionale e nello sviluppo precoce di embrioni prodotti in vitro dalla UO 1 in sistemi colturali ottimizzati, sviluppati sulla base del fluido oviduttale prodotto dalla UO 2 (secondo anno)

In parallelo con l'analisi molecolare in tessuto placentare, durante il secondo anno di questo progetto, pianifichiamo di collaborare con la UO 1 per analizzare le caratteristiche molecolari degli embrioni prodotti in vitro da questa unità. In questa fase in particolare contiamo di contribuire a valutare l'efficacia di nuovi mezzi colturali prodotti da questa unità. A tale scopo verrà utilizzato un approccio gene-specifico. Analizzeremo il livello di espressione di alcuni trascritti che, in base ai dati di letteratura esistenti su bovino ed altre specie (Lepikov K et al 2008, Rizos D et al 2002), risulteranno importanti per la vitalità embrionale e lo sviluppo. In prima istanza la nostra attenzione si soffermerà su gene rappresentativi di alcune funzioni cellulari fondamentali: BAX (apoptosi), Cx31 (comunicazione attraverso le Gap junction), SOX (stress ossidativo), IFN- τ (ricognizione materna della gravidanza) e LIF (differenziamento e impianto). Queste analisi verranno attuate mediante esperimenti di RealTime PCR (in collaborazione con l'IGB-A. Buzzati Traverso, CNR) su RNA estratti da embrioni prodotti in differenti mezzi di coltura. Per realizzare queste dovranno essere disegnati degli oligonucleotidi specifici per il bufalo. A tale scopo si adatterà un approccio di genomica comparata come descritto nell'aim3. I trascritti che mostreranno un profilo trascrizionale interessante sotto diverse condizioni colturali, saranno ulteriormente caratterizzati per le loro caratteristiche regolative.
