

# Applicazione della ricerca di base: Moltiplicazione di embrioni: splitting e separazione di blastomeri

Muflore  
Ovis ammon musimon



Perché?



Uro  
Bovis primigenius



Processo di selezione degli animali domestici iniziato 11000 anni fa

# **Biotecnologie embrionali accelerano il progresso genetico delle razze**

**Sincronizzazione della attività ovarica e fecondazione artificiale**

**Superovulazione ed embryo transfer**

**Congelamento di gameti ed embrioni**

**Produzione embrionale in vitro**

**Moltiplicazione di embrioni “clonazione”**

**Separazione di blastomeri**

**“splitting” (divisione embrionale) di embrioni**

**Trapianto nucleare con cellule embrionali**

**Trapianto nucleare di cellule somatiche**

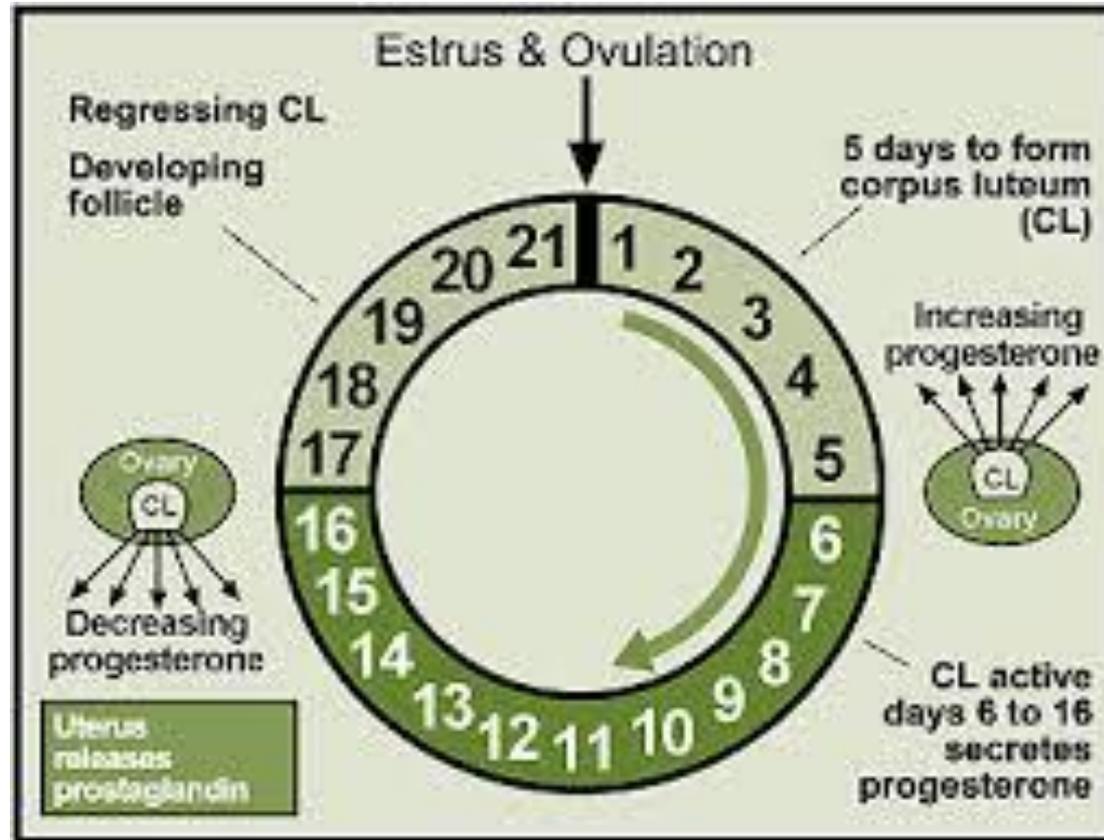
**Sessaggio embrionale**

**Predeterminazione del sesso (sessaggio degli spermatozoi)**

**Animali transgenici**

**Cellule staminali embrionali**

## Sintesi di un ciclo ovarico per studenti di Biotecnologie della Riproduzione



# Biotecnologie embrionali

## Sincronizzazione della attività ovarica e fecondazione artificiale

Superovulazione ed embryo transfer

Congelamento di gameti ed embrioni

Produzione embrionale in vitro

clonazione

Separazione di blastomeri

“splitting” (divisione embrionale) di embrioni

Trapianto nucleare con cellule embrionali

Trapianto nucleare con cellule somatiche

Sessaggio embrionale

Predeterminazione del sesso (sessaggio degli spermatozoi)

Animali transgenici

Cellule staminali embrionali

## Controllo ciclo estrale:

Trattamento per 13/14 giorni con analoghi di  
Sintesi del progesterone



## Sincronizzazione della attività ovarica e fecondazione artificiale Ovino modello primario



# Controllo del ciclo ovarico - Giovanni Manunta - Università di Sassari

## Ovino modello sperimentale fondamentale

Robinson JJ. Estrus synchronization in sheep by progesterone\_impregnated intravaginal sponges. *Nature* 1962, 324

## Tecnologia del materiale seminale - fecondazione artificiale Pietro Cappai , Istituto Zootecnico e Caseario, Sassari

Riproduzione e biotecnologie negli ovini. *Loi P., Cappai P.* L'allevatore di Ovini e Caprini, XVI, 2, 11-14 (1999)

Effetto ariete sull'attività ovarica nella pecora di razza Sarda dopo il parto. *Naitana S e Loi P.* Atti VIII SIPAOC, 1, 9-16 (1988)

Influenza del periodo del parto sulla durata dell'anaestro. *Naitana S., Cappai P., Branca A., Loi P., Filia F., Ledda S.* Meeting sullo studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico 95, Bergamo 101-105 (1990)

# 1) Prelievo e conservazione del materiale seminale

Andamento circannuale delle caratteristiche quanti-qualitative dell'ejaculato di muflone. *Loi P., Filia F., Ledda S., Cappai P., Marongiu A.* Atti IX Sipaoc 4, 10, grado (1990).

Osservazioni preliminari sulla possibilità di impiego del seme di muflone. *Naitana S., Loi P., Ledda S., Filia F., Cappai P., Branca A.* XI Convegno allevamento selvaggina, 217-219 (1989).

Inseminazione intrauterina con seme fresco e congelato di muflone. *Loi P., Ledda S., Filia F., Naitana S., Cappai P.* Atti S.I.S.Vet XLIII, 323-326 (1989).



*Costituita una banca di seme congelato (~3000 dosi)  
in azoto liquido*

## Crioconservazione del seme ovino – metodo Colas- Cappai

Medium per il congelamento del seme ovino:

medium base		medium a 30°C		medium a 4°C	
TRIS		Medium base	33,60 ml	Medium base	33,60 ml
Acido Citrico		H <sub>2</sub> O Milli Q	6,40 ml	Glicerolo	6,40 ml
Fruttosio	2,42 g	Tuorlo d'uovo	10,00 ml	Tuorlo d'uovo	10,00 ml
Penicillina	1,36g				
Streptomicina	1,00 g				
H <sub>2</sub> O Milli Q	100.000 U.I.				
	100 mg				
	67,20 ml				

# Crioconservazione del seme ovino – metodo Cogniè - Cappai



# Biotecnologie embrionali

Sincronizzazione della attività ovarica e fecondazione artificiale

**Superovulazione ed embryo transfer**

Congelamento di gameti ed embrioni

Produzione embrionale in vitro

clonazione

Separazione di blastomeri

“splitting” (divisione embrionale) di embrioni

Trapianto nucleare con cellule embrionali

Trapianto

Sessaggio embrionale

Predeterminazione del sesso (sessaggio degli spermatozoi)

Animali transgenici

Cellule staminali embrionali

# Superovulazione - embryo transfer di femmine d'élite

Aumento del tasso di ovulazione con ormone follicolo stimolante

Formulazione ormonali testate su pecora Sarda

PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin)

Follicle Stimulating Hormone (FSH): Schering,

Follicle Stimulating Hormone (FSH): Sigma

Follicle Stimulating Hormone (FSH): Y. Conbarnous

Follicle Stimulating Hormone (FSH): Fatropin

Follicle Stimulating Hormone (FSH):Pluset- Serono

Follicle Stimulating Hormone (FSH):Ovagen, ICP, New Zealand

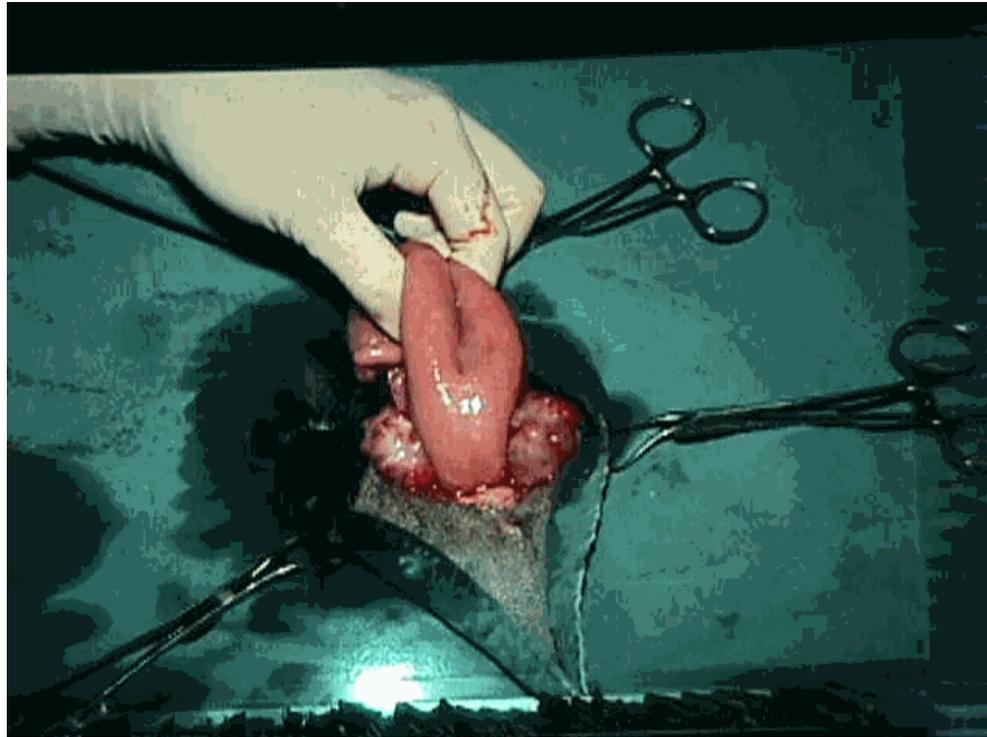
Impiego dell'HMG nella superovulazione della pecora di razza Sarda.

*Naitana S., Ledda S., Loi P., Filia F., Branca A., Cappai P* Atti IX Sipaoc 7, 3, Grado (1990)

Risposta superovulatoria nelle pecore di razza sarda trattate con una singola somministrazione di pFSH in PVP.

*Dattena M., Loi P., Branca A., Cappai P., Naitana S., Ledda S.* Atti XI S.I.P.A.O.C. 323-325 (1994)

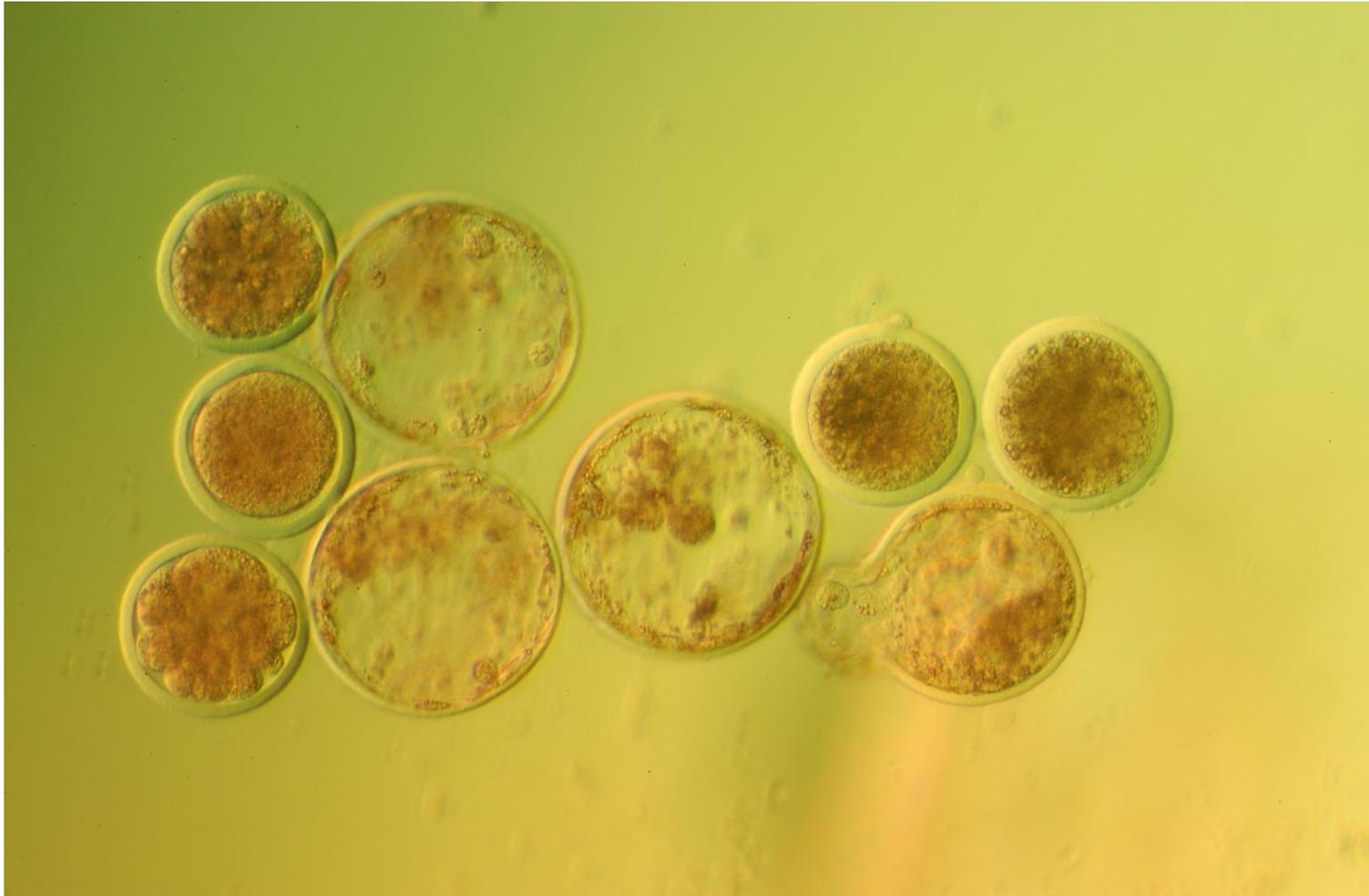
# Recupero embrionale chirurgico Trasferimento: chirurgico o laparoscopico



Catetere di Foley usato per il flushing uterino (20 ml c/a di medium 199 o PBS)

# Superovulazione ed Embryo transfer.....

Embrioni di pecora 7 giorni dopo la fecondazione (G. Ptak)



# 1) Superovulazione ed embryo transfer

Attività ovarica in  
*Filia F., Naitana S.*

Risposta del muflo  
dell'anno. *Ledda S.*  
XII Convegno Alle

Embryo-transfer c  
*Naitana S., Ledda S.*

Embryo recovery t  
and viability after  
*Dattena M., Gallu*  
Animal Reprod. Sc



LOI P., PTAK G., DATTENA M., LEDDA S., NAITANA S., CAPPAI P (1998)

. 26. Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction. *REPRODUCTION NUTRITION DEVELOPMENT*.  
vol. 38 pp. 615-628 ISSN: 0926-5287

## Superovulazione ed embryo transfer nella pecora di Razza Sarda

n. Ovulazioni (Media)	Embrioni recuperati (Media)	Embrioni trasferibili (Media)	Agnelli nati (Media)
11,6	9,1	7.0	5,2

Dati medi prodotti da 2360  
interventi di superovulazione ed  
embryo transfer su pecore di razza  
Sarda (1984-1998)

Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction.  
*Loi P., Ptak G., Dattena M., Ledda S., Naitana S., Cappai P.* Reprod. Nutr. Dev. 38, (1998)

Moltiplicazione di embrioni

**“splitting” (divisione embrionale) di embrioni**  
**Separazione di blastomeri**

Embryo splitting: produzione “artificiale” di gemelli monozigoti

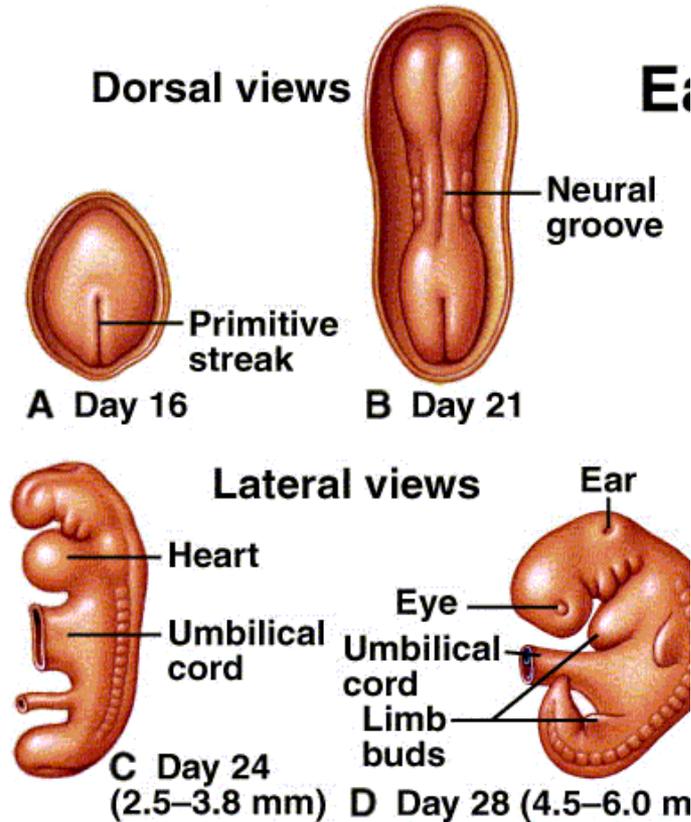


Cosa sono i gemelli monoovulari?



## ..altra modalità di generazione di gemelli monovulari

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission req



**Duplicazione della linea primitiva**

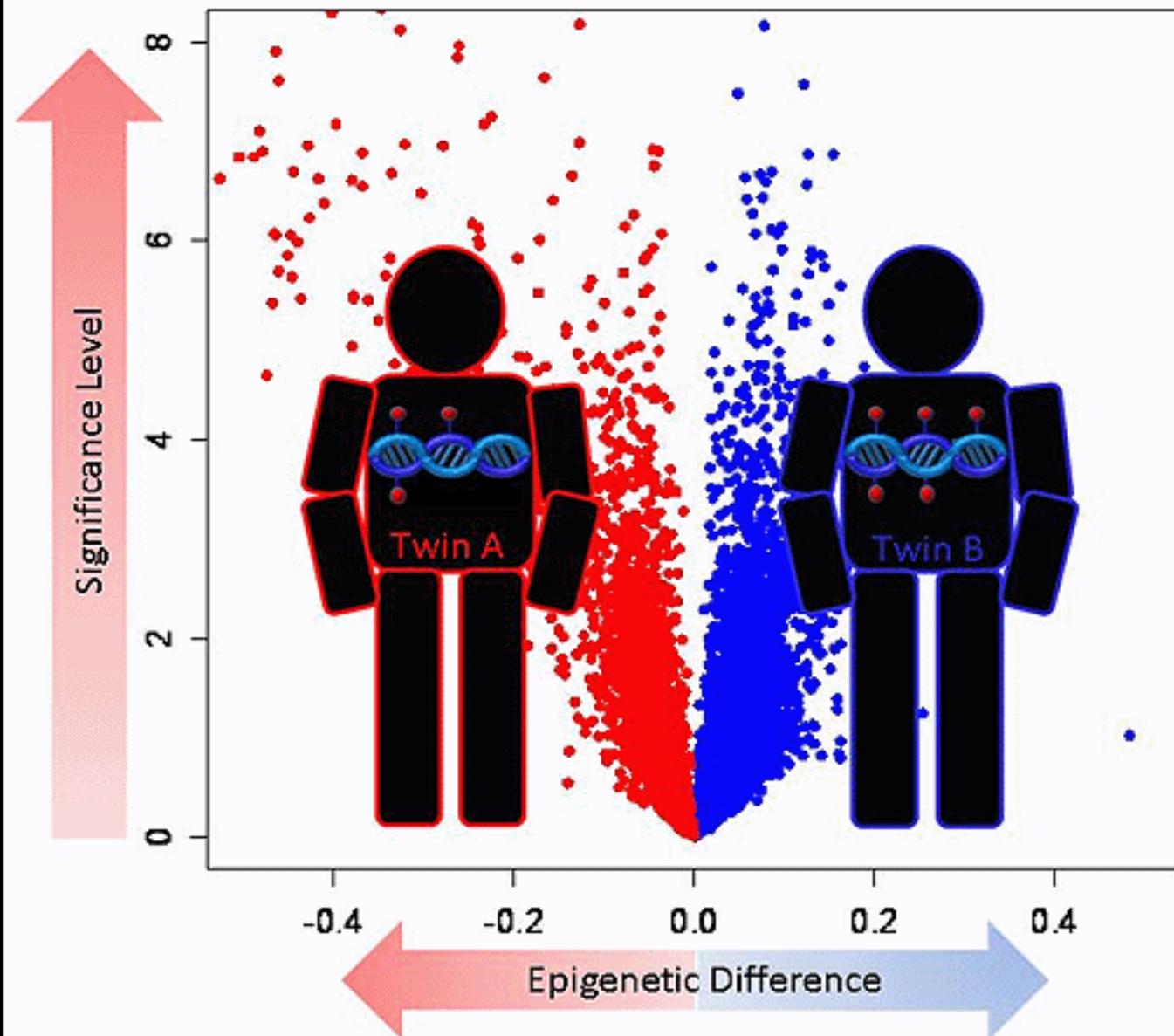
**Duplicazione incompleta o parziale= gemelli siamesi**

Gemelli monoovulari totalmente identici?



Fenotipicamente sì, epigeneticamente no

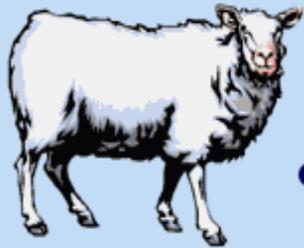
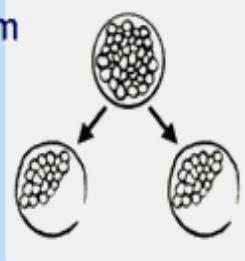
# Monozygotic Twin Differences



Tipi di micromanipolazione e stadio embrionale per lo splitting  
**schema procedurale**

## Cloning by Embryo Splitting

Embryo is split to form two half-embryos



Embryos are transferred to an unrelated surrogate mother



Pregnancy is monitored by ultrasound

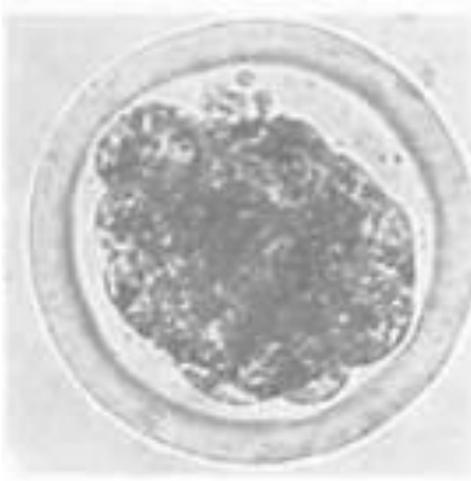


Sheep gives birth to identical twins

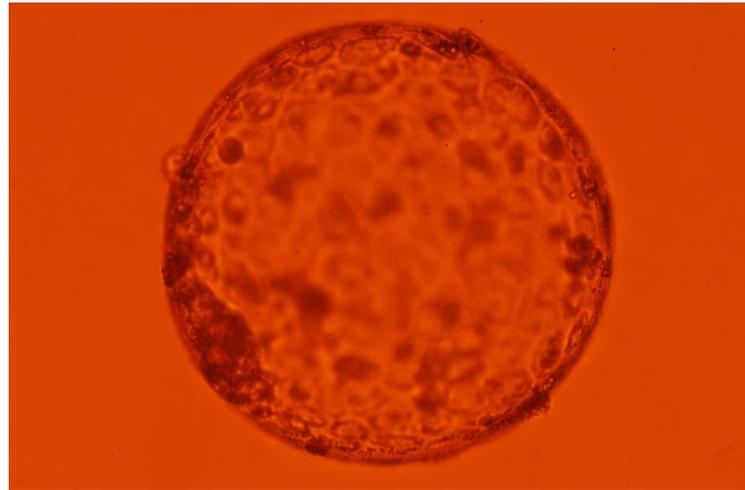
Willadsen S. A method for culture of micromanipulated **sheep embryos** and its use to produce monozygotic twins Nature. 1979 Jan 25;277(5694):298-300

**Tipi di micromanipolazione e stadio embrionale per lo splitting:  
Quale stadio embrionale?**

Morula compatta



Blastocisti



Risultati simili, entrambe pratiche: recupero dall'utero

## Esempi di micromanipolazione per realizzare lo splitting In morule e blastocisti

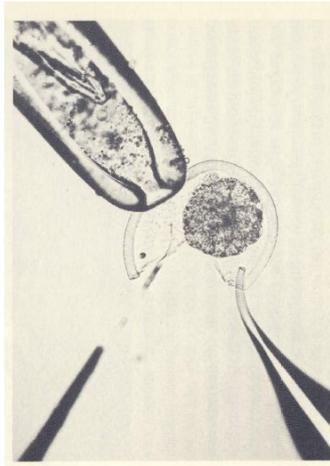


Figure 3 Morula from Figure 2 with opened zona.



Figure 4 Morula from Figure 2 split in two halves.

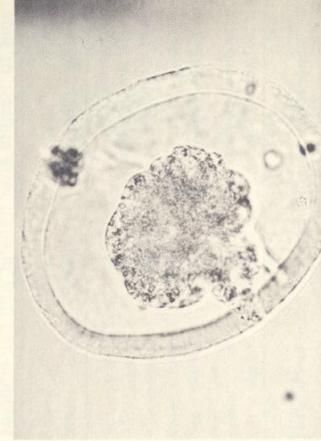
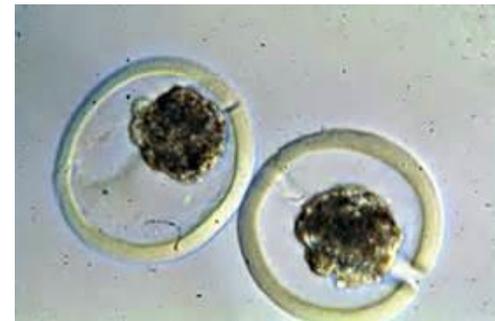
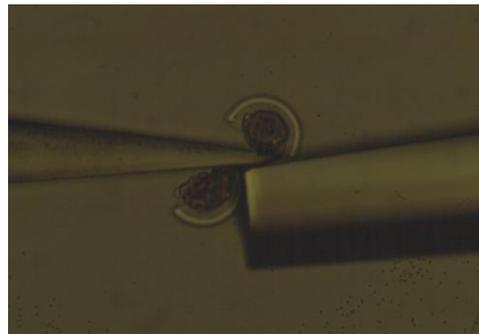
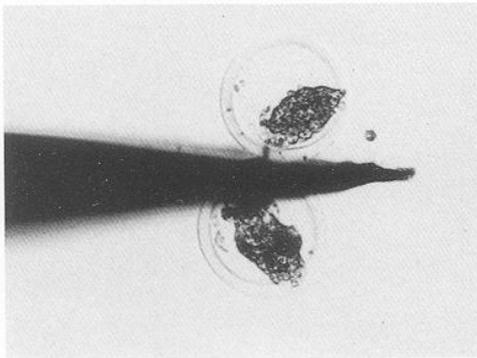
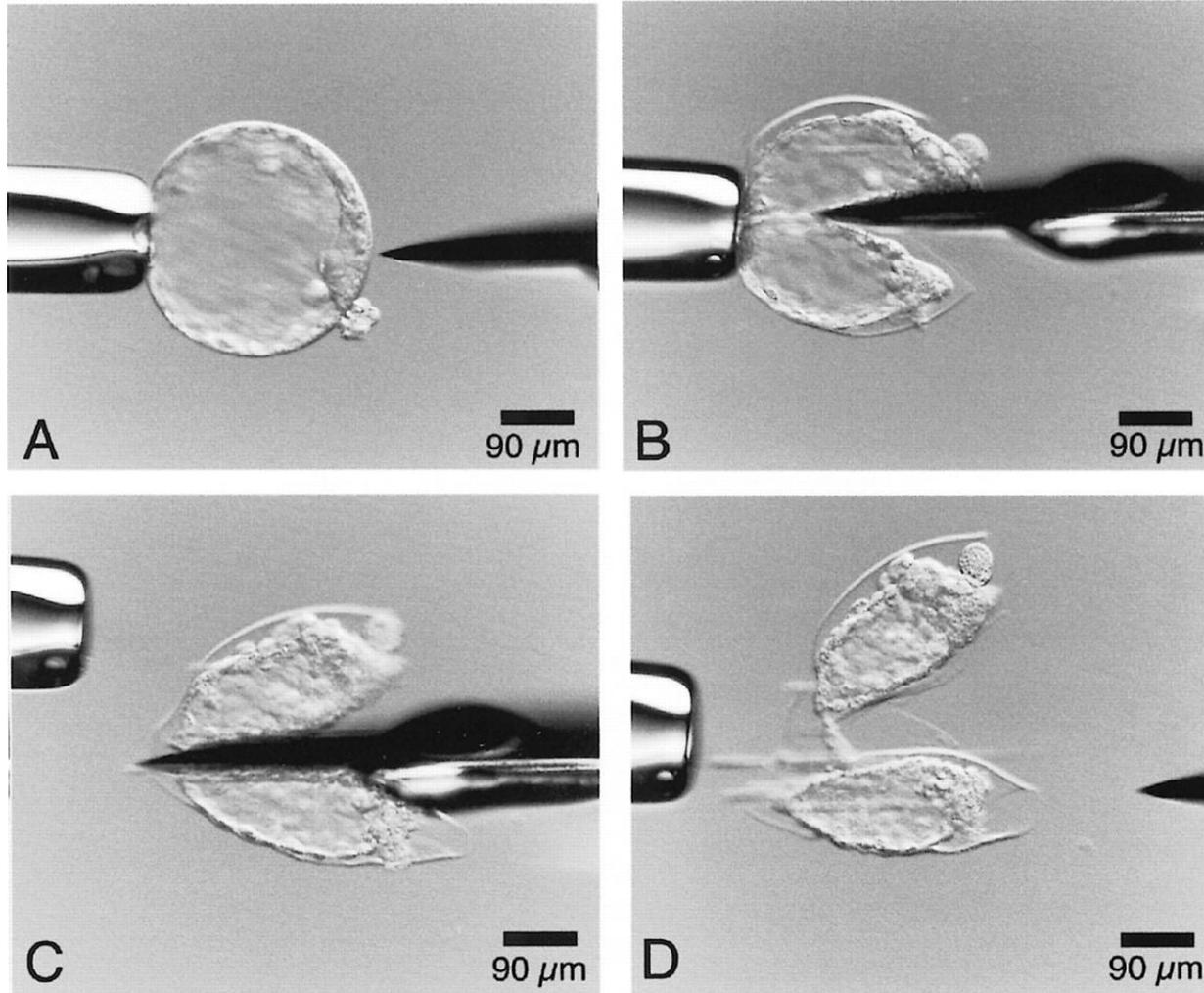


Figure 5 Half 1 in its own zona.



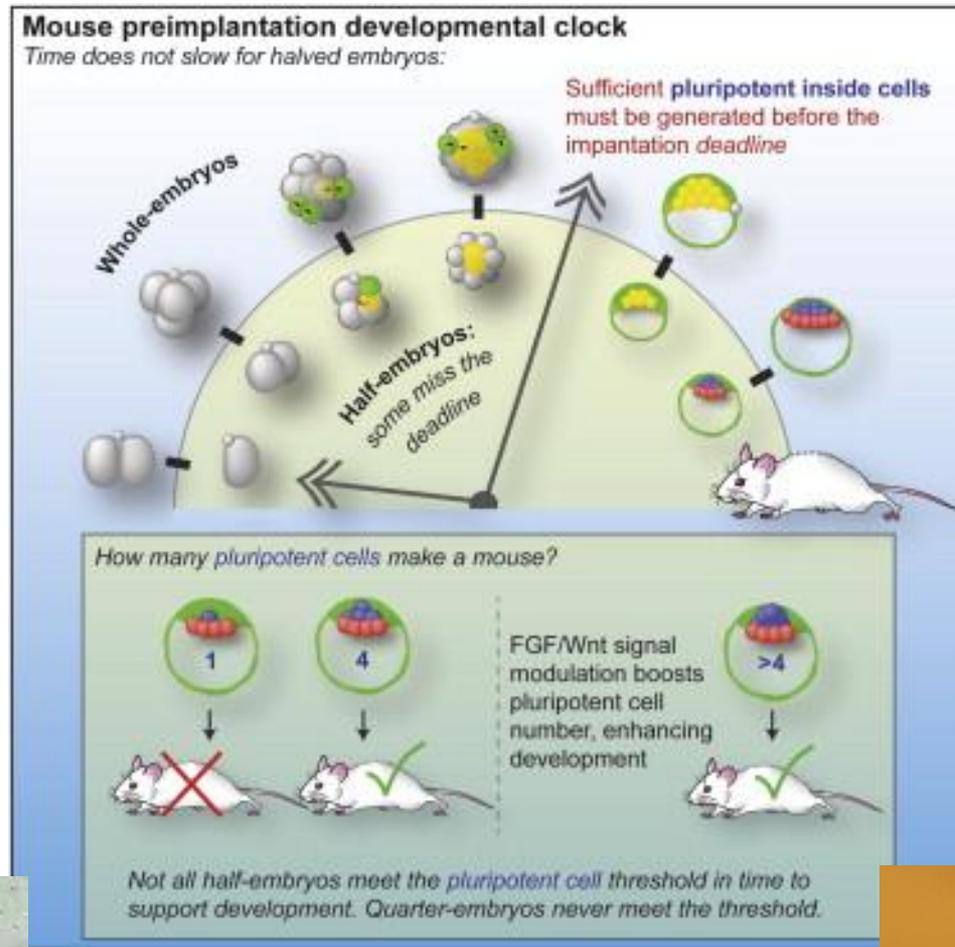
Emi-embrioni riposizionati in zone pellucide vuote

## Embryo twinning by blastocyst bisection.

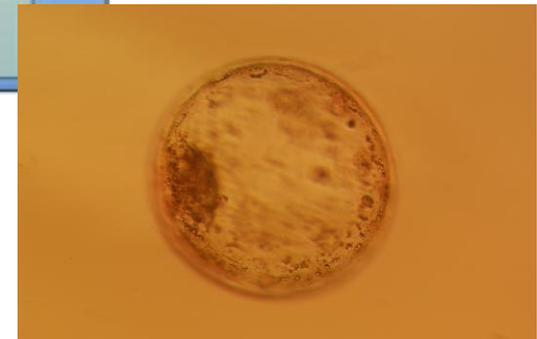


Mitalipov S M et al. Biol Reprod 2002;66:1449-1455

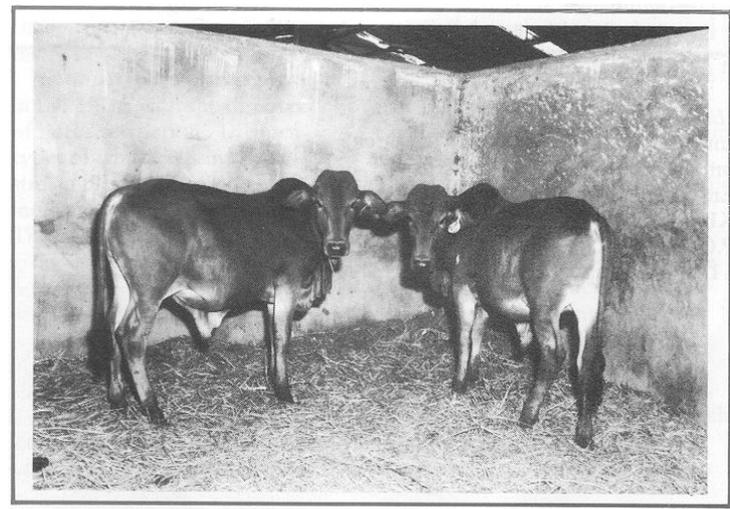
## Necessario un numero minimo di cellule ICM per generare un feto!



**Embrione divisibile solo in due!**



Identical twins prodotti in quasi tutte le specie da reddito e nel Resus Macaca



# Identical twins – gemelli monozigotici rilevanza



Moltiplicazione genotipi altamente produttivi  
o Particolari (specie da reddito!)

Produzione di modelli animali sperimentali  
- 1 coppia di twins = 40 animali random



Importanti modelli per studi di epigenetica

Efficienza limitata nell'embryo splitting, solo 2, si può fare di più?

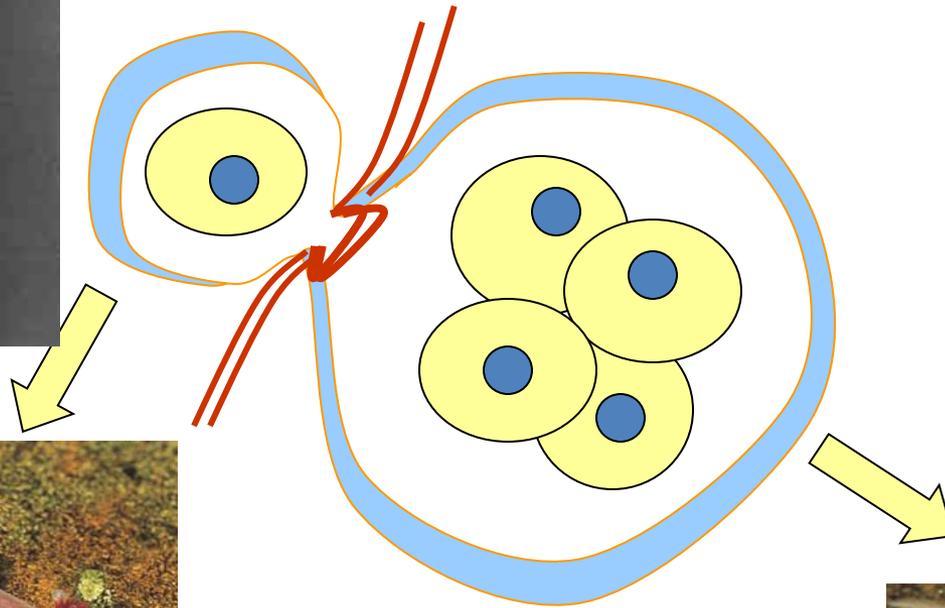
### **Blastomere separation**

Blastomeri di un embrione sono totipotenti

Totipotenza: capacità di generare tutti i tipi cellulari,

Trofoblasto compreso

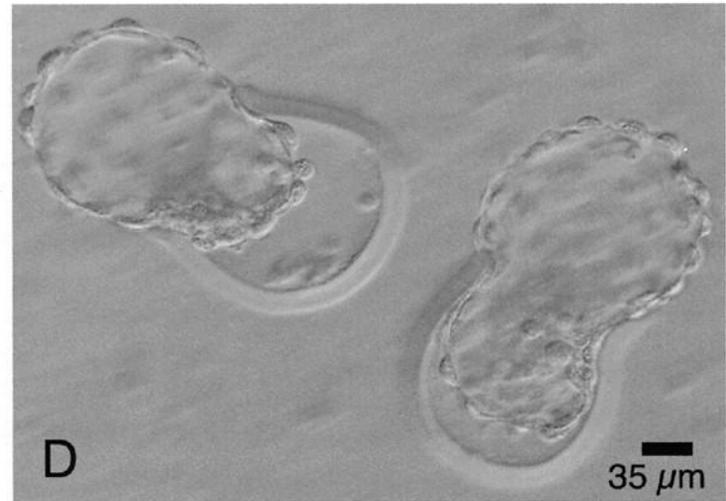
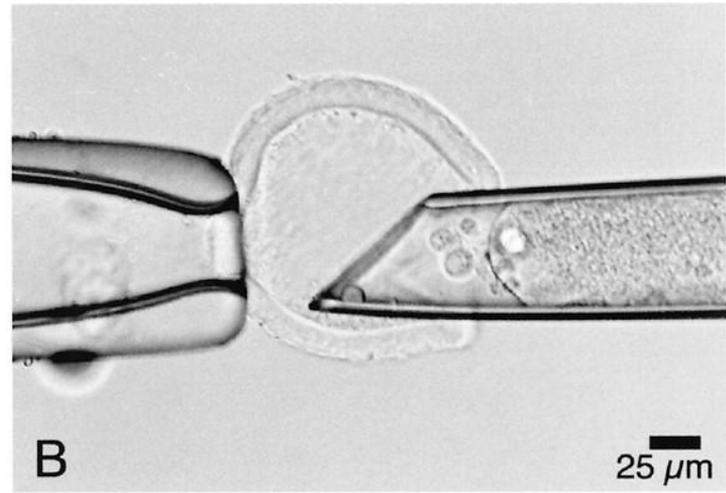
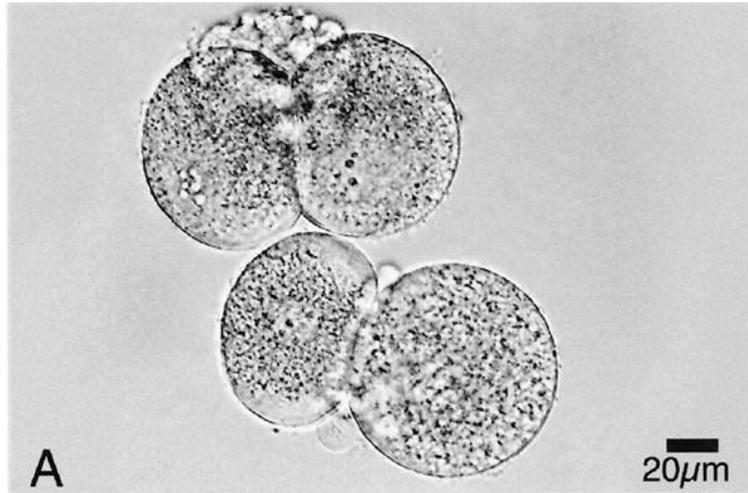
# Hans Spemann's experiment (1928)



Blastomeri prima della  
Attivazione genoma embrionario  
Sono totipotenti

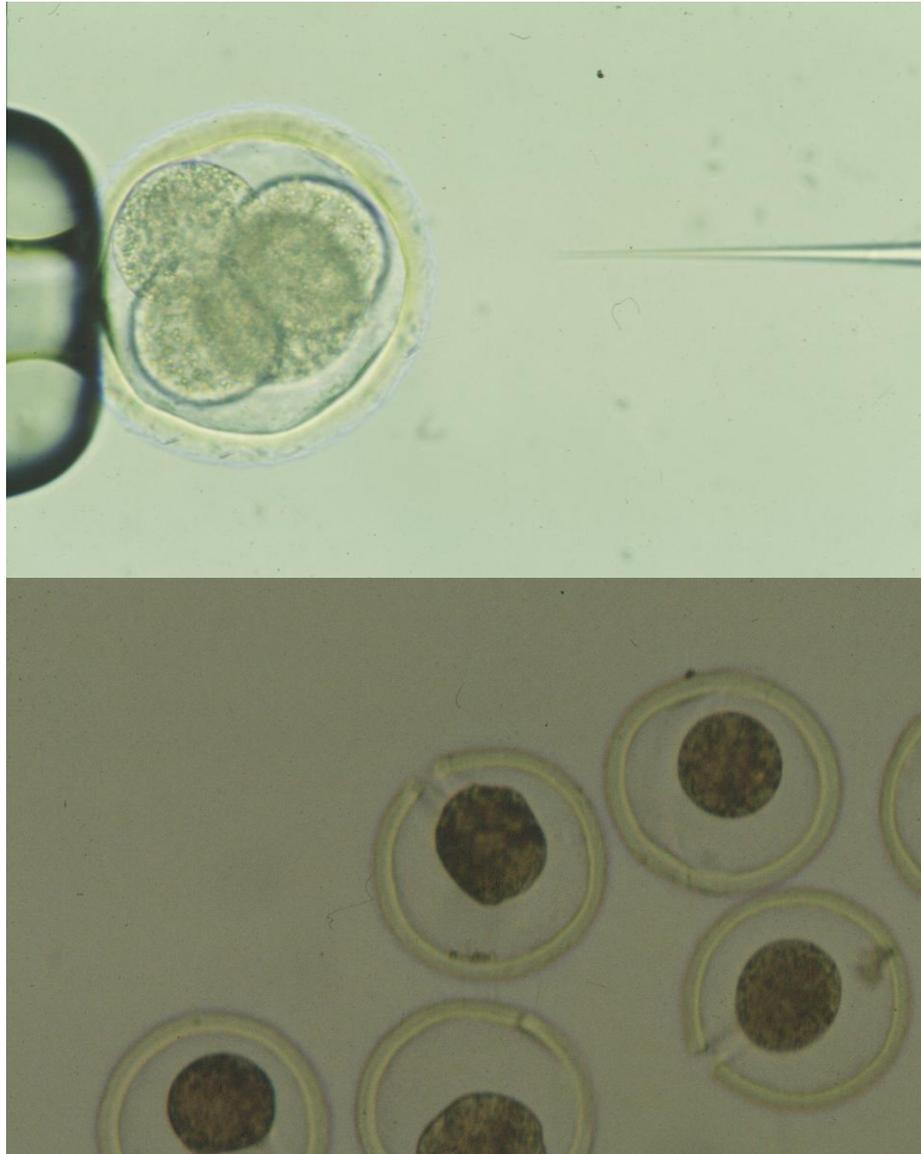


## Embryo twinning by blastomere separation Resus embryos.



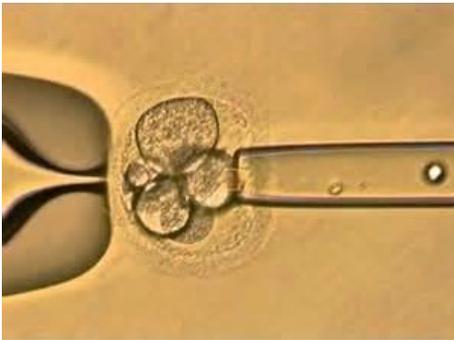
Mitalipov S M et al. Biol Reprod 2002;66:1449-1455

## Separazione di blastomeri in embrioni di pecora. Loi 1991



## Separazione di blastomeri: **workflow**

Siliconizzare le pipette di micromanipolazione



Rimozione Zona Pellucida – acid tyrode, proteasi

Differenze tra specie-

Ago di vetro - quest'ultimo mio preferito

Effettuare la separazione di blastomeri in medium  
Senza FCS e  $\text{Ca}^{++}$  free!

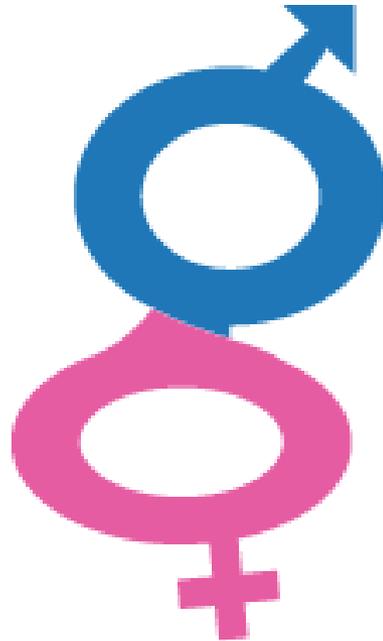
Effettuare le micromanipolazioni in presenza di inibitori  
Dell'actina (Citocalasina B)

# Clone di tre agnelle identiche (Loi 1991)

Vantaggi.....

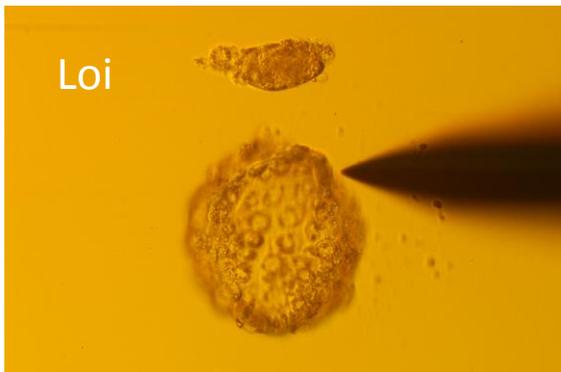
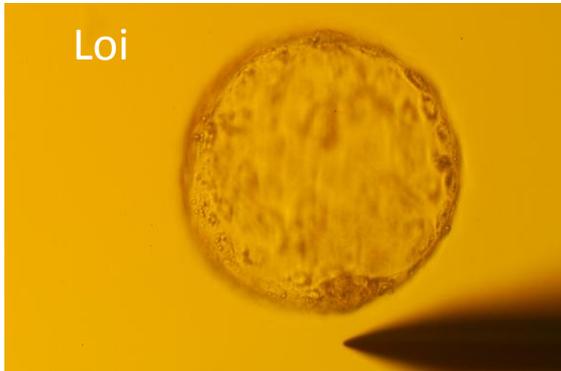


# Ottimizzazione delle tecniche di micromanipolazione: Sessaggio/predeterminazione del sesso dell'embrione



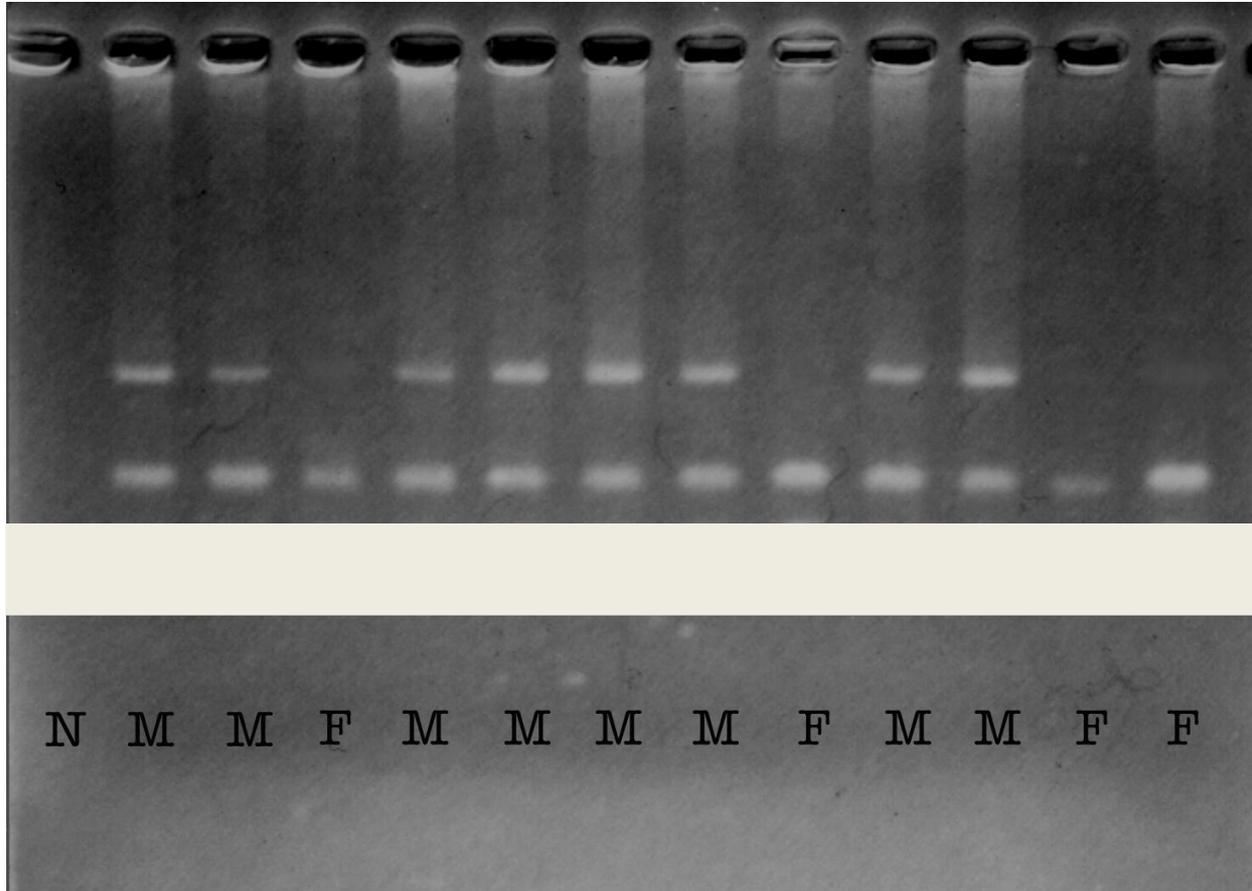
# Sessaggio dell'embrione Con Polimerase Chain Reaction...(?) Come si fa?

Primo, biopsia embrionale



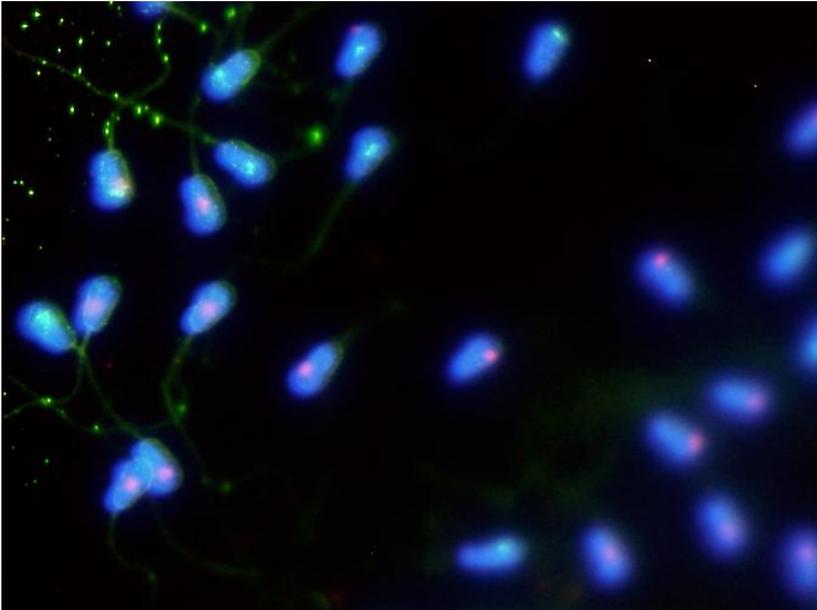
Analisi del frammento bioptico con PCR

## Risoluzione del DNA amplificato in elettroforesi



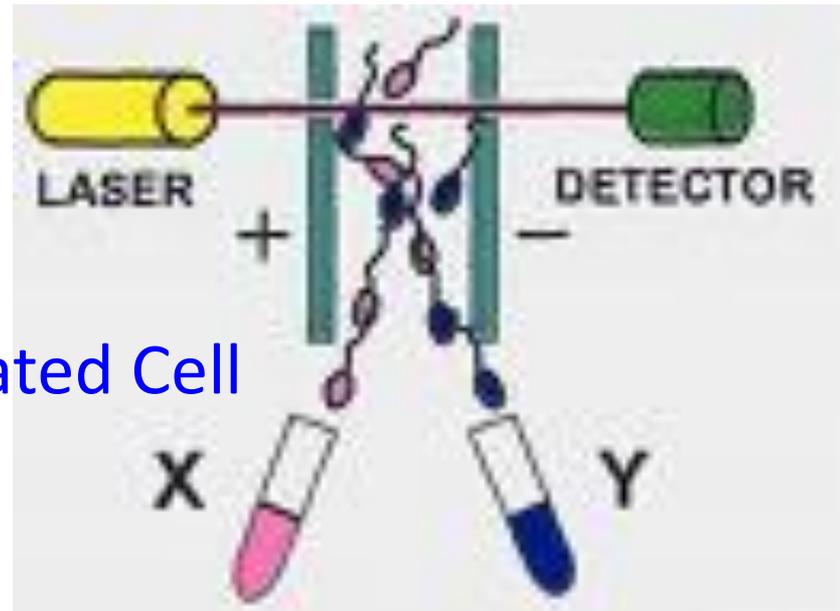
In ogni test-tube:  
Primer housekeeping  
Actina  
Primer per la sequenza  
SRY del cromosoma Y

## Predeterminazione del sesso



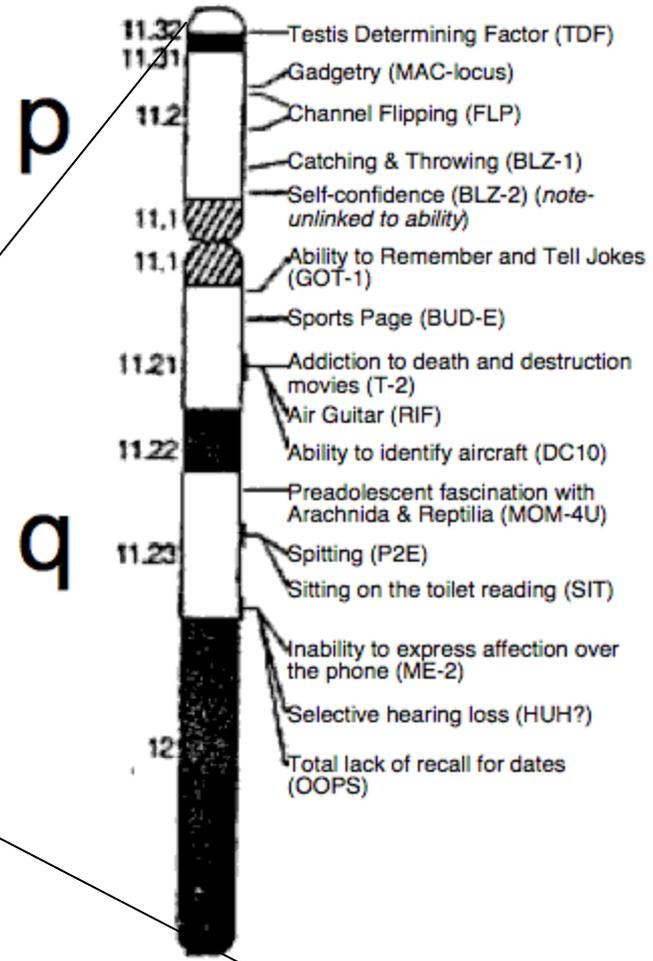
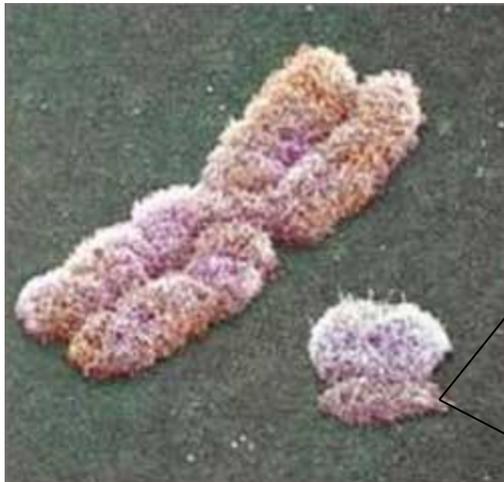
**Spermatozoi**  
**Con Y hanno il 10%**  
**In meno di DNA**  
**Di quelli X**

**Differenze tra specie**



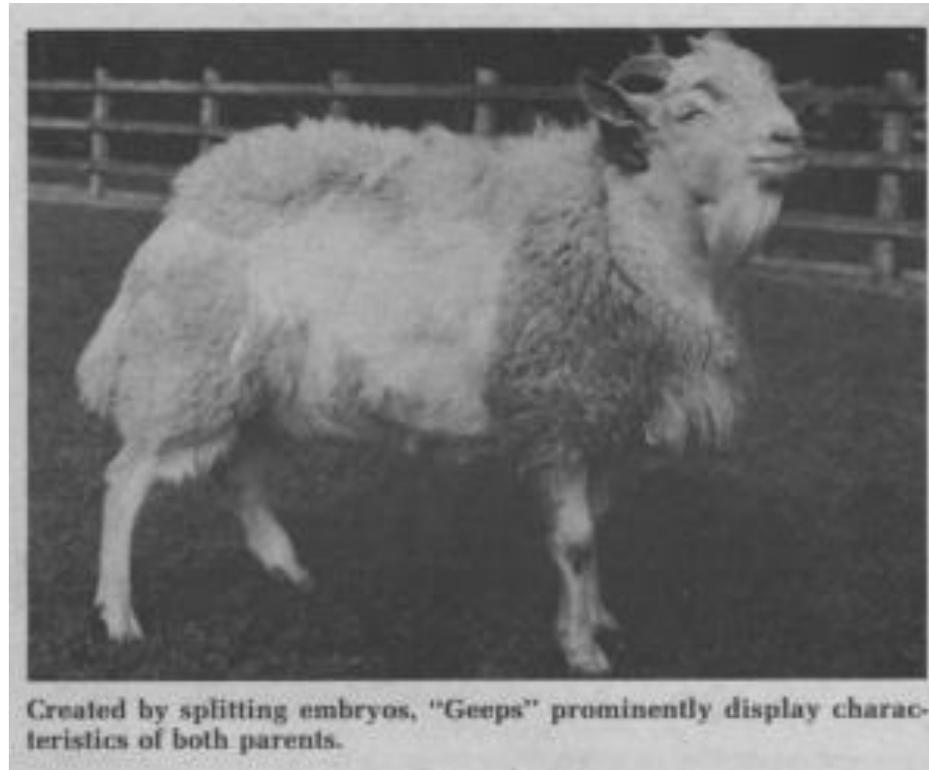
**FACS = Fluorescence Activated Cell  
Sorter**

Detentore del brevetto: X & Y limited, USA



Aggregazione di blastomeri/ICM prima modalità sperimentale per produrre chimere

Fehilly CB, Willadsen SM, Tucker EM. Experimental chimaerism in sheep.  
J Reprod Fertil. 1984 Jan;70(1):347-51.



Fehilly CB, Willadsen SM, Tucker Interspecific chimaerism between sheep and goat. Nature. 1984 Feb 16-22;307(5952):634-6.

Chimere prodotte con:

Aggregazione di blastomeri di embrioni pre-impianto

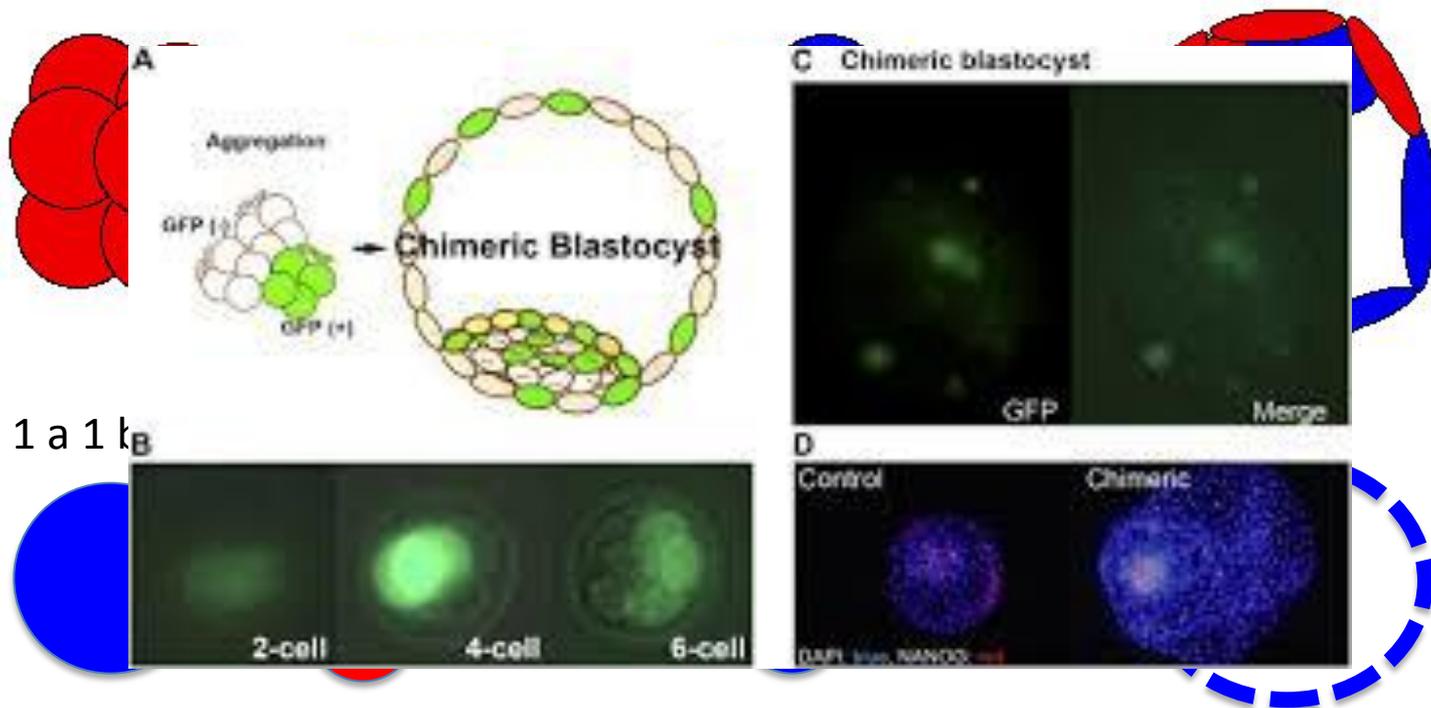


Iniezione di ICM in blastocisti

Iniezione di cellule staminali embrionali in blastocisti/morule

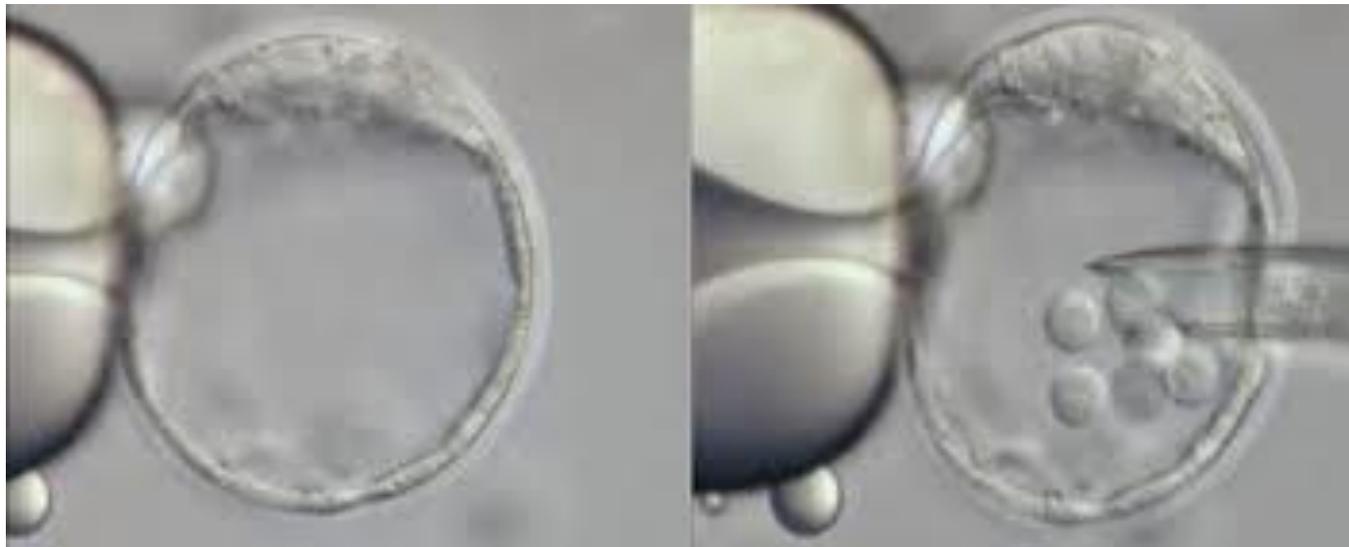


## Aggregazione di blastomeri di embrioni pre-impianto



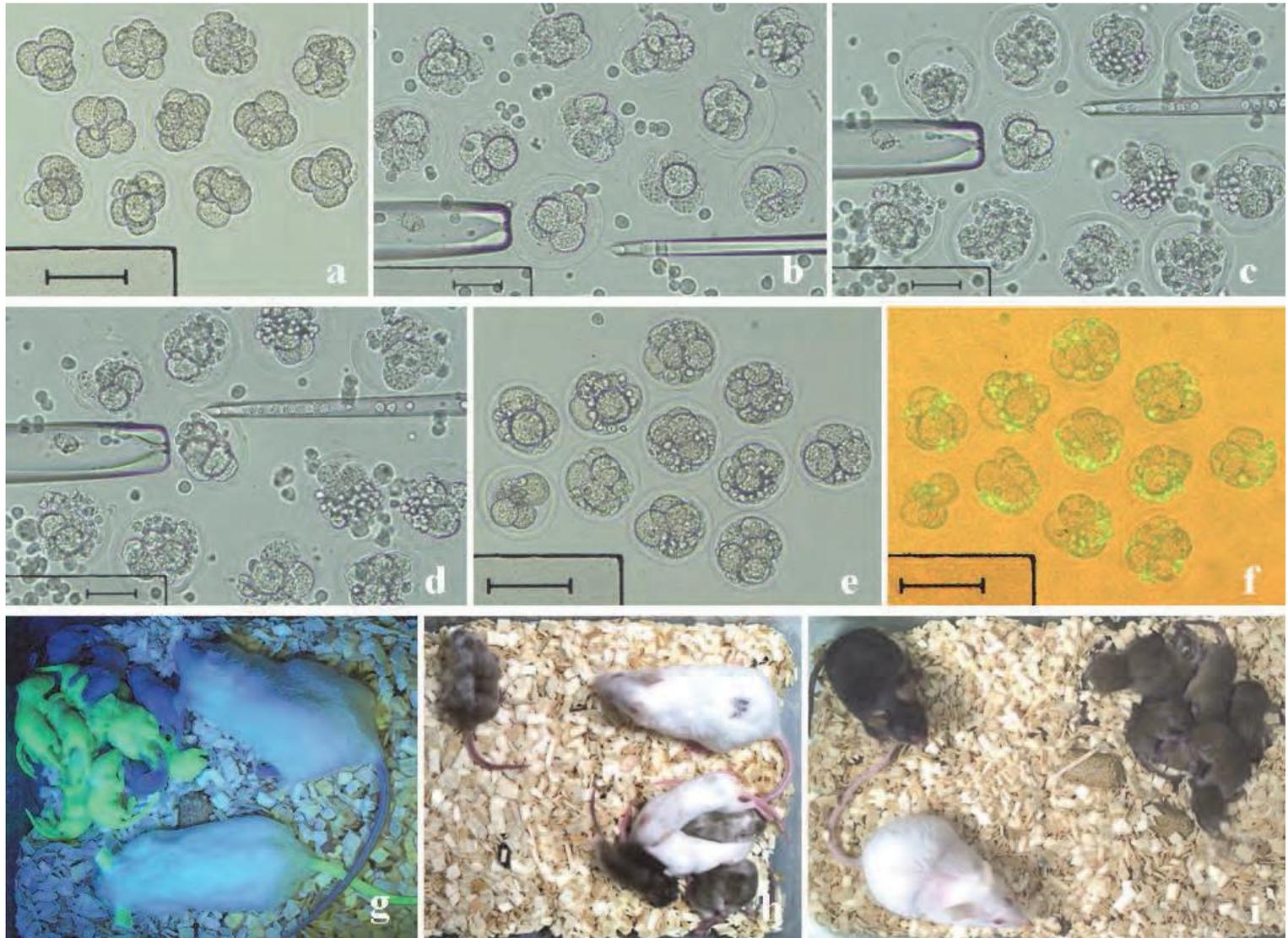
**Stadi più avanzati di sviluppo tendono a contribuire alla ICM**

## Produzione di chimere con iniezione di ICM

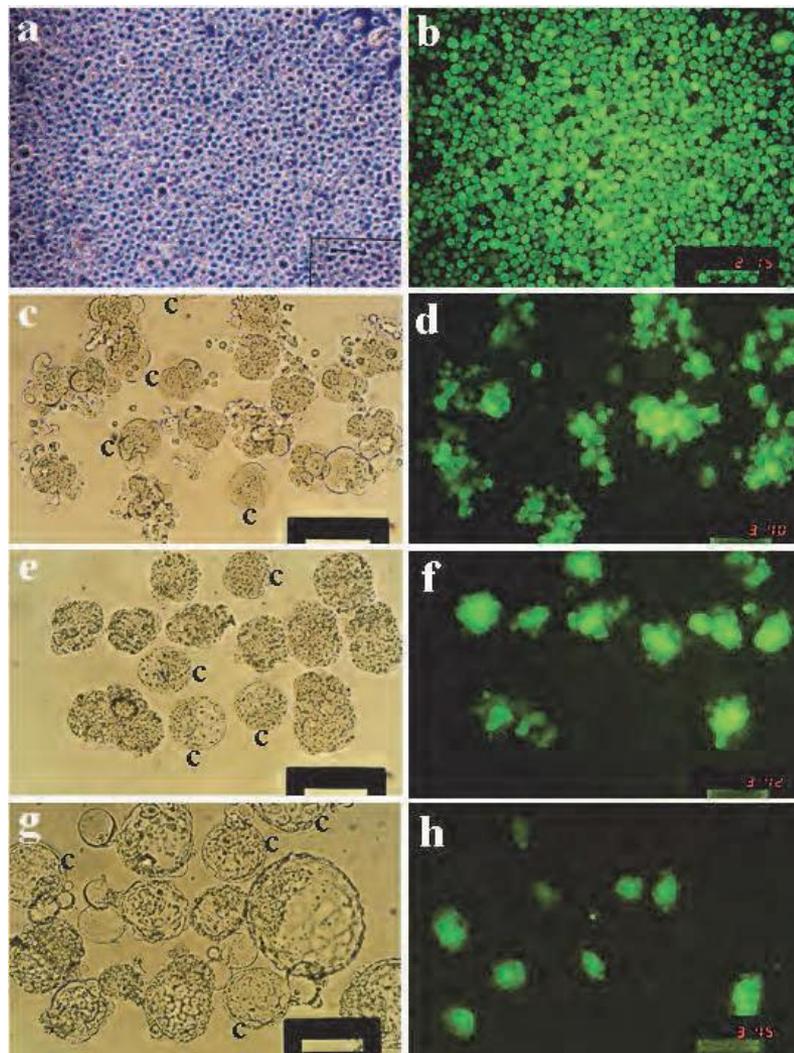


[http://wn.com/Blastocyst\\_Microinjection](http://wn.com/Blastocyst_Microinjection)

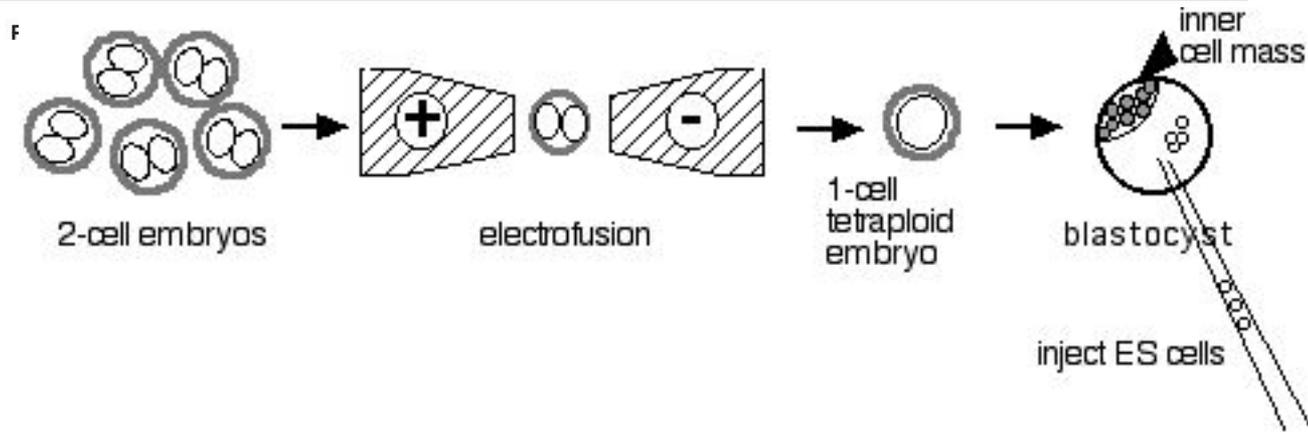
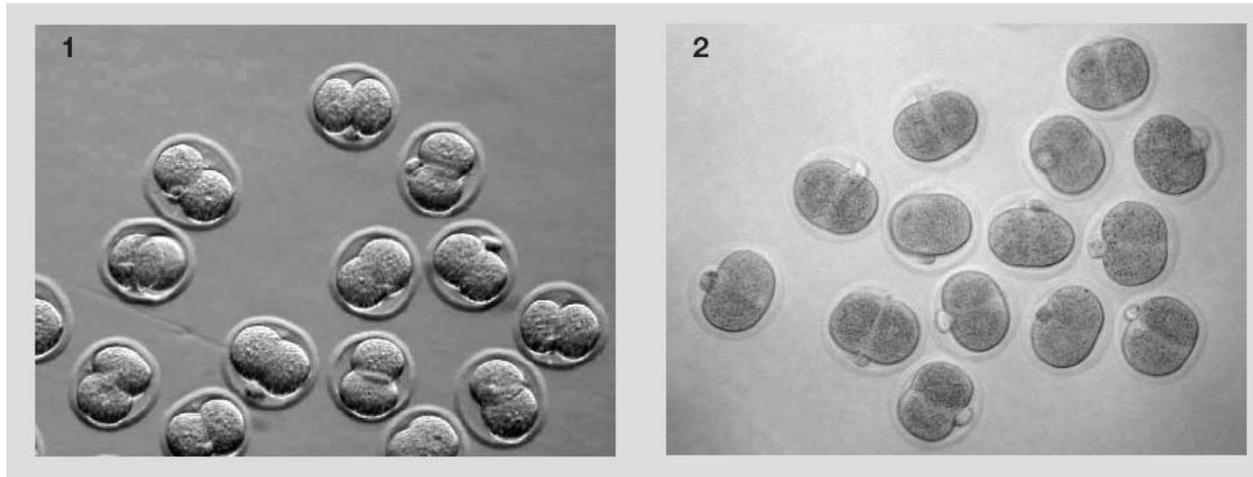
## Produzione di chimere: iniezione di Stem Cells in morule



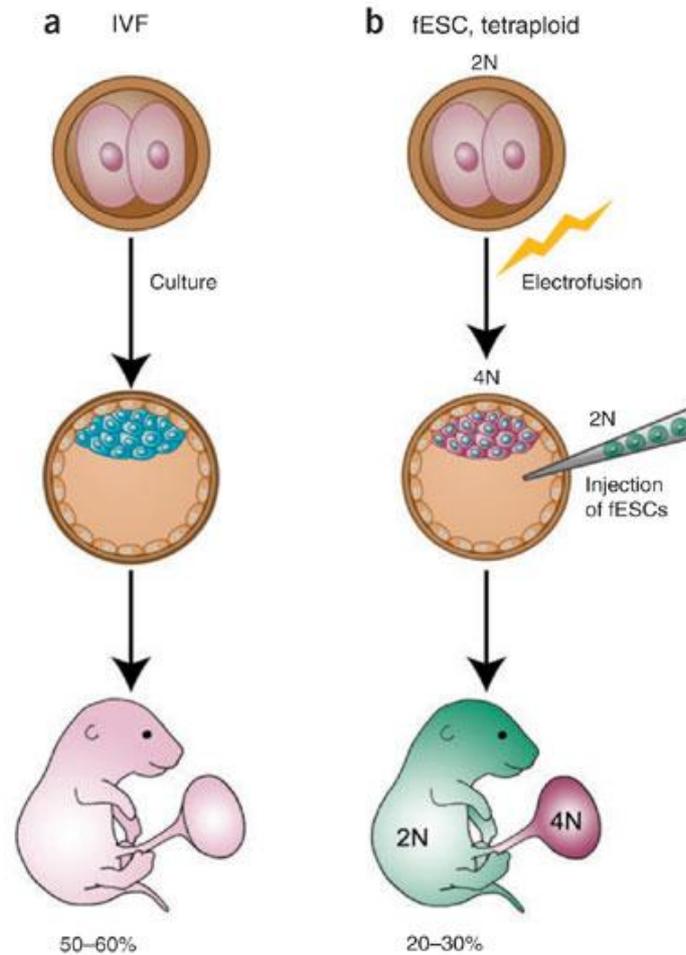
Produzione di chimere: aggregazione tra stem cells e morula  
-fitoemoagglutinina-



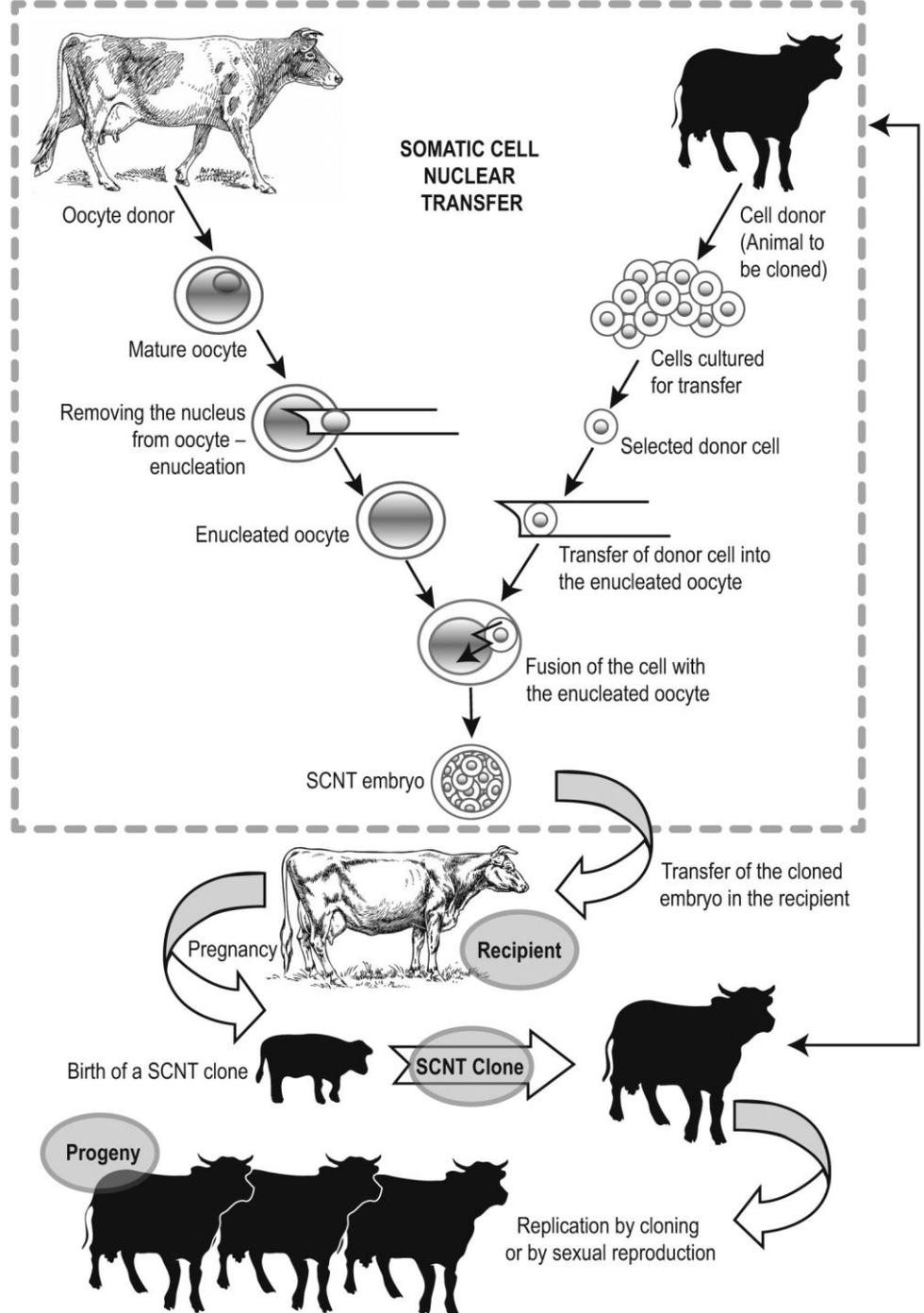
# Produzione di feti interamente da stem cells: Tetraploid Complementation



Cellule tetraploidi sono confinate nel trofoblasto (ricorda!)  
Le cellule staminali formano l'ICM e quindi il feto



**Produzione di chimere fondamentale per la produzione di animali transgenici**



[Nuclear transplantation in sheep embryos.](#)

Willadsen SM. Nature. 1986 Mar 6-12;320(6057):63-5.

