



Società Italiana di Embryo Transfer

Notiziario Settembre 2006

Cari Amici e Colleghi,

come certo saprete il ns Amico e Consigliere Riccardo Mosca non è più con noi. La sua perdita ci ha lasciati tutti costernati e profondamente addolorati. Riccardo amava la vita e questo suo amore, oltre che verso i suoi cari, lo trasmetteva nel lavoro e chi gli è stato vicino riconosce nel suo operato questa sua grande umanità. Il giorno dell'ultimo saluto abbiamo visto nelle persone presenti questa grande energia e passione che sapeva trasmettere. Abbiamo perso un Amico, che non dimenticheremo e che vivrà nei nostri affetti più profondi.

E' difficile a questo punto continuare questa comunicazione con argomenti che potrebbero risultare irrilevanti.

Dopo tre anni di lavoro il mandato di questo Consiglio volge al termine e nella prossima assemblea saranno eletti nuovi consiglieri che svilupperanno ulteriormente il lavoro già intrapreso e porteranno la ns Società verso gli obiettivi indicati dall'Assemblea.

Il lavoro svolto è stato notevole ed è stato possibile anche grazie al contributo di Soci come il Dott. Piero Boni, il Dott. Marcello Lora, il Dott. Pierluigi Guarneri, la Dott.ssa Daniela Golinelli che hanno contribuito a realizzare le varie iniziative. A loro va la ns gratitudine ed i ns complimenti per il lavoro svolto, per la sua alta qualità.

E' stato possibile realizzare grazie al Dott. Roberto Landriscina una giornata monotematica sull'embryotransfer in sede di congresso multisala SIVAR a Cremona. Grazie ai Professori Gaetano Mari e Raffaele Boni è stato possibile organizzare un workshop sulla riproduzione presso la facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna. Il Dott. Piero Boni ha mirabilmente organizzato in collaborazione con il Dott. Pierluigi Guarneri il Congresso di Assisi. Grazie all'intervento della Dott.ssa Daniela Golinelli abbiamo collaborato con la SIVE ad un corso di embryotransfer sugli equini.

Il Dott. Marcello Lora ed il suo gruppo hanno organizzato un indimenticabile congresso ad Asiago.

Alcune delle relazioni presentate sono riportate in questo Notiziario allo scopo di renderle note anche a coloro che non sono potuti intervenire in questo congresso e non sono in possesso del CD contenente gli atti. All'interno di questo Notiziario è inoltre riportata una relazione svolta dalla dott.ssa Giovanna Lazzari che descrive brevemente quanto accaduto nel corso delle giornate SIVE dedicate all'ET nella specie equina.

Attualmente il Dott. Pierluigi Guarneri si sta prodigando per realizzare il prossimo congresso che si terrà nei giorni 20 e 21 ottobre 2006 a Sondrio, in località Morbegno, presso l'Azienda agrituristica La Florida (<http://www.laflorida.com>). Il programma dettagliato di questa manifestazione è riportato nell'ultima pagina di questo Notiziario e sarà quanto prima presente sul sito web della società (http://www.unibas.it/centri/siet/Home_Page.htm) sottoforma di locandina.

Tutto quello che è stato fatto va a merito delle persone che si sono impegnate per realizzarle e che ho su menzionato. Tutto ciò che poteva essere fatto meglio o non è stato fatto ricade sotto la sola responsabilità del Presidente, il quale, per i suoi limiti ed incapacità, non è riuscito nel suo intento. Le cose da fare sono molte ed avremo modo di discuterne nel nostro prossimo incontro.

Vi ringrazio tutti della preziosa collaborazione, per l'amicizia e la benevolenza che ci avete dimostrato.

Vi auguro buon lavoro ed arrivederci a presto.

Gigi Silvestrelli

Corso base di embryo transfer della Società Italiana di Veterinari per Equini (SIVE) in collaborazione con SIET 16-17 settembre 2005, Palazzo Trecchi, Cremona San Daniele Po (CR), Studio Veterinario Cristella

Il corso si è svolto nell'arco di due giornate delle quali la prima dedicata alle relazioni dei docenti e la seconda alle dimostrazioni di raccolta, valutazione e trasferimento di embrioni equini. Ai cinque relatori e dodici partecipanti si sono affiancati i colleghi collaboratori dello Studio Veterinario Cristella soprattutto nella seconda giornata. Le relazioni orali hanno affrontato i seguenti argomenti: vantaggi e svantaggi dell'embryo transfer (Sandro Barbacini), Gestione riproduttiva della donatrice (Denis Necchi), Raccolta di embrioni equini e fattori che ne influenzano il successo e la successiva percentuale di gravidanza (Francesco Camillo), Classificazione degli embrioni e congelamento (Giovanna Lazzari), Refrigerazione, trasporto degli embrioni e trapianto embrionale (Denis Necchi), Cenni di riproduzione assistita (Cesare Galli). Nella seconda giornata tutti i partecipanti hanno assistito ad una dimostrazione di raccolta e trasferimento embrionale nel cavallo e, a turno, hanno potuto ripetere individualmente sia la raccolta che il trasferimento. Lo Studio Veterinario Cristella ha messo a disposizione anche i propri laboratori per la osservazione al microscopio e la valutazione degli embrioni. Alla perfetta organizzazione didattica e pratica del corso ha fatto da cornice la squisita ospitalità degli organizzatori e l'accoglienza delle sedi di Cremona e San Daniele Po.

Atti di alcune delle relazioni scientifiche presentate nel corso del 13° Congresso Annuale della Società Italiana di Embryo Transfer (SIET) Asiago 30 settembre - 1 ottobre 2005

INDICE

1. Barbato O., Malfatti A., Sousa M.N. , Beckers J.F. - IL DOSAGGIO DELLE PAGs (Pregnancy-Associated Glycoproteins): DIAGNOSI DI GRAVIDANZA E BENESSERE FETALE
2. Gioia Capelli, Marcello Lora, Mario Pietrobelli, Stefano Nardelli - LA NEOSPOROSI DEL BOVINO: QUALE RUOLO NELLA FERTILITÀ? PROGRAMMI DI CONTROLLO IN ALLEVAMENTI CHE PRATICANO L'EMBRYO-TRANSFER
3. Gianfranco Gabai, Mara Badan, Angela Tramontano - FATTORI IMPLICATI NELLA REGOLAZIONE DEL RAPPORTO UTERO-EMBRIONE DURANTE LA FASE DI ATTECCIMENTO.
4. Marcello Lora, Paolo Longhini, Martina Zuffellato - ESPERIENZE DI CAMPO CON L'UTILIZZO DI "FANS" NEL TRATTAMENTO DELLA RICEVENTE AL MOMENTO DEL TRAPIANTO.
5. Stefano Nardelli - MALATTIE INFETTIVE CHE INTERFERISCONO CON L'ATTECCIMENTO E LO SVILUPPO DELL'EMBRIONE BOVINO: PROGRAMMI AZIENDALI DI CONTROLLO PER BVD/MD E IBR IN ALLEVAMENTI CHE PRATICANO L'EMBRYO-TRANSFER.
6. D. Salvador - VALUTAZIONE DEI REQUISITI PIÙ IMPORTANTI PER MASSIMIZZARE LA FERTILITÀ DEL SEME UTILIZZATO IN EMBRIO TRANSFER

IL DOSAGGIO DELLE PAGs (Pregnancy-Associated Glycoproteins): DIAGNOSI DI GRAVIDANZA E BENESSERE FETALE

Barbato O.¹, Malfatti A.², Sousa M.N.³, Beckers J.F.³.

¹ *Dip. di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Prod. animali e alimentari, Università di Perugia*

² *Dip. di Scienze Veterinarie, Università di Camerino,*

³ *Fisiologia della Riproduzione, Facoltà di Medicina Veterinaria, Liegi (Belgio)*

Proteine specifiche (PSP) o associate alla gestazione (PAG) nella specie bovina

Le glicoproteine associate alla gestazione (PAG), anche conosciute come proteine specifiche (PSPB) o proteine seriche (PSP 60) della gestazione (Butler et al., 1982; Zoli et al., 1991; Mialon et al., 1993), costituiscono una grande famiglia di glicoproteine appartenenti alla sotto-classe delle proteasi aspartiche (Xie et al., 1991), enzimi proteolitici a pH acido (la pepsina, la catepsina D ed E, la renina, la memapsina e le beta-secretasi). La presenza di sostituzioni di amminoacidi a livello del sito attivo rende invece le PAGs enzimaticamente inattive (Xie et al., 1994).

L'esistenza di proteine specifiche (PSP) o associate alla gravidanza (PAG) presenti e rilevabili nella circolazione materna, è stata descritta per la prima volta negli anni '80. Nel 1982 Butler et al. isolarono dalla placenta bovina 2 proteine : la PSP-A e B. La A è stata identificata poi come la α -fetoproteina, non strettamente limitata alla gravidanza, la B, invece, è risultata essere specifica della gestazione (Sasser et al., 1986). Nel 1991 Zoli et al. purificarono, sempre da tessuto placentare bovino, una proteina associata alla gravidanza, identificata poi come bPAG-1 (Xie et al., 1995). Questi autori preferirono la denominazione "associata" rispetto a "specificità" perché fu ugualmente ritrovata negli estratti di gonadi di maschi e femmine non gestanti. Nel 1992 Linch e collaboratori determinarono la sequenza nucleotidica del DNAC della PSPB e dimostrarono la grande similitudine esistente tra la bPSPB e la bPAG-1.

Le PAGs meglio conosciute fino ad oggi (Gruppo I; Green et al., 2000) sono sintetizzate dalle cellule binucleate (BNCs) presenti nello strato superficiale del trofotoderma (Zoli et al., 1992). Tali cellule derivano da quelle mononucleate per divisione mitotica nucleare, ma non citoplasmatica. Le prime BNCs cominciano ad apparire all'inizio dell'impianto (Wango et al., 1990), possono essere individuate, nel bovino, a partire dal 16°-17° giorno dopo la fecondazione e costituiscono circa il 15-20% del totale delle cellule del trofotoderma. Di queste una su sette migra in direzione dell'epitelio uterino, si fonde con le cellule endoteliali e dà luogo alle cellule trinucleate (Wooding & Beckers, 1987), le quali hanno vita transitoria:

vengo riassorbite dallo stesso trofotoderma dopo aver rilasciato nel sangue materno (Zoli et al., 1992b) il contenuto dei granuli presenti nel loro citoplasma (PAGs, ma anche fattori di crescita, bPL, progesterone, prostaglandine).

La PAG-1 è dunque una glicoproteina acida e glicosilata di massa molecolare pari a 67 kDa, con 4 forme isoelettriche (4.4, 4.6, 5.2 e 5.4). La percentuale di acido sialico varia a seconda dell'isoforma e modifica l'immunoreattività della proteina: la forma basica mostra la immunoreattività maggiore (Zoli et al., 1992). Tecniche di biologia molecolare hanno permesso, fino ad oggi, il sequenziamento di 21 geni della PAG nella bovina (Xie et al., 1997), che identificano 21 PAG differenti, e hanno altresì messo in evidenza l'esistenza di una loro distribuzione temporale e spaziale (Green et al 2000; Patel et al., 2004): alcune si esprimono completamente nel trofotoderma a partire dallo stadio di allungamento della blastocisti, come è stato anche chiaramente dimostrato nella specie porcina (Do et al., 2001; Szafranska et al., 2002), mentre altre risultano prevalentemente localizzate nelle cellule binucleate; ne deriva che queste ultime (bPAG-1; bPAG-6; bPAG-7) sono presenti dalla metà fino alla fine della gravidanza, mentre altre (bPAG-4; bPAG-5; bPAG-9) compaiono già al 25° giorno, ma risultano assenti durante gli stadi avanzati. Dunque, nei ruminanti, o almeno in una buona parte di essi, sono presenti nella circolazione periferica dal primo mese della gestazione fino al parto (Zoli et al., 1992b). Dopodiché, queste proteine iniziano a scomparire dal sangue materno, perdurando però in concentrazione apprezzabile per 80-100 giorni nella bovina, mentre in pecore e capre alla 4° settimana post-partum i loro livelli sono paragonabili a quelli di femmine non gravide (Ranilla et al., 1997; Sousa et al., 1999).

La concentrazione delle PAGs nel latte appare dalle 10 alle 50 volte più bassa rispetto a quella nel plasma (Metelo et al., 2004), ma il loro profilo durante tutto il corso della gravidanza risulta essere sovrapponibile. Nel post-partum, invece, il comportamento differisce: nel colostro già al 30° giorno non sono più dosabili (Tainturier D. et al., 1996).

Nei bovini esiste anche una bPAG-2 (Beckers et al., 1988), sintetizzata, oltre che dalle cellule binucleate, anche da quelle mononucleate del trofotoderma (Xie et al., 1994), ciò si potrebbe tradurre in una espressione più precoce durante il corso di formazione della placenta. La PAG-2 possiede numerosi punti in comune con l'LH: legame con recettori del corpo luteo, parentela immunologica e stesso comportamento in corso di purificazione. Per queste sue caratteristiche Xie e coll. (1994) hanno avanzato l'ipotesi secondo la quale la PAG-2 può rappresentare uno dei fattori luteotropi della placenta dei ruminanti.

Nelle altre specie

Pecora- Nella pecora, le proteine associate alla gestazione sono state isolate essenzialmente da tre equipes e hanno preso il nome di PSPB (Zoli et al., 1990), PAG (Xie et al., 1991) e SBU-3 (Gogolin-Ewens et al., 1986). Le PSPB/PAG sono glicoproteine aventi PM che varia da 43 a 70 kDa ed un pI che va da 4 a 6.8 (Willard et al., 1995; Xie et al., 1997; El Amiri et al., 2003), sintetizzate dalle cellule binucleate del trofocotoderma a partire dal 18° gg dal concepimento e rilevabili nella circolazione materna già dal 22° (Ranilla et al., 1994; Karen et al., 2003) e a partire dal 32° giorno nel latte (El Amiri et al., 2003). Nel corso della gestazione il loro profilo è bifasico, caratterizzato da 2 livelli massimali. Contrariamente a quanto accade nei bovini, non si osserva un picco pre-parto, ed il loro valore nel sangue materno raggiunge livelli basali già dopo 4 settimane dal parto. La struttura della placenta potrebbe essere all'origine di questa differenza: nelle pecore, infatti, prima del parto si osserva una diminuzione del numero delle cellule binucleate (Wooding, 1992). La concentrazione di queste proteine risulta essere condizionata dalla razza, del sesso e del numero dei feti (Ranilla et al., 1994; Willard et al., 1995). La correlazione significativa tra le PSPB/PAG e la masse dei feti nelle pecore che abortiscono tardivamente, suggerisce che il loro dosaggio sequenziale può fornire un'indicazione affidabile sulla presenza di una sofferenza fetoplacentare.

Capre- Le ricerche intraprese nella specie caprina hanno portato all'isolamento e alla caratterizzazione di tre PAGs aventi massa molecolare di 55, 59 e 62 kDa e sequenze peptidiche differenti (Garbayo et al., 1997). Le PAGs caprine risultano essere rilevabili a partire dal 24° giorno dopo il concepimento nel plasma o siero, ma anche nel latte (Gonzales F. et al., 2001). La loro concentrazione nel sangue materno aumenta rapidamente tra la terza e la settimana di gestazione per raggiungere i 124 ng/mL nel caso di gestazioni semplici e i 169 ng/mL in gestazioni multiple, intorno al 54° giorno. In seguito, la sua concentrazione diminuisce per risalire intorno alla nona settimana (45 ng/mL gestazione semplice; 102 ng/mL gestazione multipla). Il livello della proteina non subisce variazioni significative prima del parto. Anche in questa specie, lo studio dell'andamento e dei livelli della PAG durante la gravidanza può indicare una sofferenza fetale o placentare (Zarrouk et al., 1999).

Bufala- Recenti ricerche hanno portato alla purificazione della PAG bufalina (Barbato et al., 2003; Singh et al., 2005). In attesa di poter sviluppare un metodo di dosaggio basato sull'utilizzo di anticorpi omologhi, perciò altamente sensibile, metodi di dosaggio eterologo sia RIA che ELISA (Debenedetti et al., 2001; Jeanguyot et al., 2004.) hanno fornito informazioni sull'andamento di tale proteina durante il corso della gestazione e ci consentono di

effettuare un test di gravidanza semplice ed estremamente affidabile.

Ruminanti selvatici- Antigeni sierologicamente simili alle PSPB-PAG sono state ritrovati nel sangue materno di numerosi ruminanti selvatici come il "mule deer" (Wood D. et al., 1986), il cervo dalla coda bianca (Osborn et al., 1996), il cervo rosso (Haigh et al., 1988), il bue muschiato (Rowell et al., 1989), il bisonte (Haigh et al., 1991), il cervo canadese (Haigh et al., 1993), il cervo giapponese (Willard et al., 1996), il wapiti (Willard et al., 1994), il daino (Willard et al., 1999) e la renna (Ropstad et al., 1999). Il recente isolamento e purificazione di nuove forme di PAG-PSPB della placenta di wapiti e di alce (Huang et al., 1999) ha consentito lo sviluppo di un sistema di dosaggio RIA più specifico, riservato alle specie selvatiche (Huang et al., 2000).

Altri...-L'esistenza di proteine associate alla gestazione e facenti parte delle proteasi aspartiche non è strettamente limitata ai ruminanti. Il ritrovamento dell'espressione di nuovi membri di PAGs nel maiale (Szafranska et al., 1999) e nella cavalla (Green et al., 1999) dimostrano che la produzione di tali glicoproteine non è esclusiva delle specie con placenta sinepiteliocoriale. Inoltre, recentemente Othmany-Mecif e coll. (2002) hanno isolato e parzialmente caratterizzato la PAG nel coniglio e studi sono in corso per evidenziare l'eventuale presenza di tali proteine nei camelidi.

Funzioni delle glicoproteina associate alle gestazione

Dal momento in cui PAGs e PSPB sono state scoperte, numerosi autori hanno cercato una relazione tra queste molecole (o il profilo della loro concentrazione) ed una funzione immunologica locale o sistemica. Caratteristica peculiare dell'andamento serico delle PAGs nella bovina è il loro aumento pressoché costante durante tutto il corso della gestazione. Ci pare assai ragionevole pensare che ciò possa essere legato alla loro funzione biologica. Xie e coll. (1994) hanno dimostrato, è vero, che tali glicoproteine, pur appartenendo alla famiglia delle proteasi aspartiche, non hanno mantenuto l'attività enzimatica, tuttavia hanno probabilmente conservato il sito di legame del substrato. In virtù della presenza di tale sito, secondo Robetr e coll. (1996) le PAGs sarebbero in grado di legare e sequestrare peptidi suscettibili di essere riconosciuti dal MHC e di esercitare un ruolo di immunomodulazione al livello dell'interfaccia materno-fetale: la locale immunosoppressione che si stabilisce all'inizio della gravidanza sappiamo bene essere necessaria affinché si instauri e si mantenga l'istocompatibilità dell'unità materno-fetale. Differenti pubblicazioni mettono in correlazione concentrazioni elevate di PAG e la diminuzione dell'attività dei neutrofili polimorfonucleati (Moreira da Silva et al., 1998; Dosogne et al., 2000),

suggerendo che la produzione di bPAG da parte del trofoblasto potrebbe essere un meccanismo per mezzo del quale il conceptus, influenzando lo stato immunologico materno, protegge se stesso dal rigetto.

Basandosi sulle caratteristiche del profilo del loro andamento e in particolare sull'osservazione di concentrazioni fortemente elevate durante le ultime settimane precedenti il parto, Dosogne e la sua équipe (2000) hanno indicato le PAGs come corresponsabili, insieme ad ormoni quali progesterone, estrogeni e cortisolo, di una caduta delle resistenze nelle vacche partorienti, nonché dell'incidenza di metriti associate a mastiti frequentemente osservate proprio nei giorni immediatamente successivi al parto in questa specie. Hoeben e coll. (2000) hanno mostrato che concentrazioni di PAG superiori a 1800 ng/mL modificano la capacità dei granulociti di formare colonie, la formazione di colonie mieloidi ed il tasso globale di clonaggio delle cellule mieloidi stesse.

Austin e coll. (1999) attribuiscono alle PAGs un ruolo ormonale nell'induzione del rilascio della GCP-2 (granulocyte chemotactic protein-2), un'alfa chemochina la cui sintesi è indotta dall'IFN-tau (interferon-tau) all'inizio della gravidanza. IFN-tau e PSPB condividerebbero, dunque, un ruolo comune nella stimolazione di tale chemochina, la quale parrebbe coinvolta nell'instaurarsi della gravidanza nei bovini. A sostegno di un possibile ruolo luteotropo della PAG-PSPB, gli studi di Del Vecchio e coll. (1996) e Weems e coll. (1998), che mostrano come questa glicoproteina riesca a indurre il rilascio di prostaglandina (PG)_{E2} e progesterone da cellule luteali e di prostaglandina (PG)_{E2} da cellule endometriali coltivate *in vitro*.

Il lavoro di molti ricercatori ha messo in evidenza la relazione tra sintesi di PAG/PSPB e benessere fetale (Kindhal et al., 2002; Kornmatitsku et al., 2002; Dobson et al., 1993; Patel et al., 1997; Beckers et al., 1999). D'altra parte, il collegamento tra PAG e fetal well-being si comprende chiaramente se si pensa che tale glicoproteina è secreta dalle cellule binucleate del trofotoderma, le quali migrano dal tessuto fetale a quello uterino dando vita alle cellule trinucleate, deputate queste al rilascio della glicoproteina stessa. Questo è un processo attivo, che presuppone la presenza di un tessuto trofoblastico sano, quindi di un embrione sano. Se questa condizione viene a mancare, manca la fonte di produzione della proteina stessa. Inoltre, in virtù di questa "migrazione attiva" le PAGs giocherebbero un ruolo importante nel rimodellamento delle membrane fetali durante il corso della gravidanza (Beckers et al., 1999).

Ormoni e diagnosi di gravidanza

Da oltre venti anni, i tests di diagnosi di gravidanza (DG) vengono stimati secondo i criteri abitualmente utilizzati in epidemiologia animale. La qualità di tali metodi viene valutata oggi in termini di sensibilità, specificità e valori predittivi (Laplanche et al., 1987). La sensibilità è la probabilità, per una femmina gestante, di avere un risultato positivo al test o all'esame clinico; la specificità è la probabilità di avere un risultato negativo, ed il valore predittivo viene definito come la probabilità per una femmina di essere gestante o no quando il risultato del test o dell'esame clinico è stato chiaramente positivo o negativo:

- Sensibilità: n° di DG positive esatte/ n° di animali realmente gestanti
- Specificità: n° di DG negative esatte/ n° di animali realmente non gestanti
- Valore predittivo positivo: n° di DG positive esatte/ n° totale di DG positive
- Valore predittivo negativo: n° di DG negative esatte/ n° totale di DG negative

Progesterone, estrogeni, lattogeno placentare sono tutti ormoni che possono essere utilizzati, nel bovino, per l'indagine di gravidanza, precoce o tardiva.

Abbastanza recentemente, negli Stati Uniti (Concepto Diagnostics, Knoxville, TN, USA) è stato sviluppato un nuovo test immunologico e colorimetrico (Early Conception Factor o ECF test) capace di evidenziare, nel sangue e nel latte, la presenza degli EPF (Early Pregnancy Factors). Questo test utilizza anticorpi monoclonali e policlonali prodotti contro gli EPF. Secondo le informazioni apprese dal sito internet, il test ECFTM sarebbe capace di identificare dal 94% al 95% di vacche non gestanti tra il 6° ed il 20° giorno di gestazione per il dosaggio effettuato su campioni di latte, e tra il 6° ed il 90° giorno per il dosaggio sul siero.

Tale test si basa sul principio secondo il quale i linfociti T formano delle rosette spontanee con i globuli rossi eterologhi. Se i linfociti sono incubati in un siero anti-linfocitario in presenza del complemento prima dell'aggiunta dei globuli rossi, viene inibita la formazione di rosette (rosetta: un linfocita circondato da almeno 4 globuli rossi).

Malgrado i risultati preliminari incoraggianti, le ricerche intraprese in vista di stabilire la reale attendibilità di un'indagine così precoce, non hanno portato a risultati soddisfacenti. Secondo Cordoba et al. (2001) la diagnosi di gestazione nelle vacche attraverso l'utilizzazione del test ECFTM presenta una sensibilità dell'86%, una specificità del 4%, una esattezza del 46% e dei valori predittivi positivi e negativi solamente del 49% e del 23%.

Lo stesso test è stato simultaneamente utilizzato dal gruppo di Scott Willard dell'Università del Missouri (Gandy et al., 2001), il quale ha valutato la rilevazione delle "non gestanti" in un periodo compreso tra il 1° ed il 3° giorno e tra il 7° ed il 9° giorno dopo inseminazione artificiale (IA) in giovenche di razza Holstein. Ebbene, è stato identificato solo il 44% di animali realmente non gestanti tra il 1° ed il 3° giorno, e il 56% tra il 7° ed il 9° giorno. Inoltre, tra il 3° ed il 30° giorno di gestazione, è stata identificata una grande incidenza di falsi positivi sia nel siero (47%) che nel latte (31.3%).

Sistemi di dosaggio radio-immunologico (RIA) ed immunoenzimatico (ELISA) utilizzati per il rilevamento delle PAGs

Le proteine specifiche o associate alla gestazione (PSPB, PSP60 o PAG) furono proposte per la diagnosi di gravidanza per la prima volta nei bovini (Butler et al., 1982; Zoli et al., 1991; Mialon et al., 1993). Rapidamente si dimostrò non solo che erano presenti nel sangue materno, ma che il loro dosaggio poteva permettere una diagnosi precoce di gravidanza, nonché lo studio della mortalità embrionale precoce o tardiva (Sasser et al., 1986; Humblot et al., 1988; Semambo et al., 1992; Zoli et al., 1992; Mialon et al., 1993; Szenci et al., 1988).

Le conoscenze acquisite dall'analisi del profilo della loro concentrazione nel corso del periodo gestazionale ed in caso di mortalità embrionale si sono fortemente e rapidamente evolute grazie allo sviluppo di differenti sistemi di dosaggio radio-immunologico omologhi (Sasser et al., 1986; Humblot et al., 1988; Zoli et al., 1992b) ed eterologhi (Perenyi et al., 2002).

I sistemi di dosaggio omologhi (RIA-PAG, -PSPB, -PSP60) sono stati i primi ad essere utilizzati nella vacca e sono stati sviluppati utilizzando la stessa molecola per l'immunizzazione, la iodinazione del tracciante e la preparazione dello standard. Tali dosaggi vengono effettuati nel siero, nel plasma e recentemente anche nel latte (Metelo et al., 2004).

Il dosaggio omologo bovino permette la realizzazione di una diagnosi di gestazione con il 100% di sensibilità a partire 35° giorno dopo l'IA, con una specificità superiore all'85% a partire dal 28° giorno e valori predittivi positivi e negativi superiori al 90% dal 30° giorno.

I sistemi eterologhi sono stati sviluppati più recentemente ed utilizzano differenti anticorpi prodotti contro tre forme distinte di PAG caprina. Queste nuove forme di PAG sono state caratterizzate come aventi masse molecolari di 55 kDa, 59 kDa e 62 kDa (caPAG₅₅, caPAG₅₉, caPAG₆₂) e sequenze amino

terminali distinte (Garbayo et al., 1998). I due anticorpi disponibili (AS 706: caPAG₅₅₊₆₂; AS 708: caPAG₅₅₊₅₉) vengono utilizzati con successo per la diagnosi di gravidanza e lo studio della mortalità embrionale nei bovini (Perenyi et al., 2002). Inoltre, è stata controllata la loro specificità contro le principali proteasi aspartiche suscettibili di essere ritrovate nel siero o nel plasma.

Metodi di dosaggio ELISA per la PAG-PSPB sono stati messi a punto in Europa dall'equipe diretta dal prof. Humblot (Jeanguyot et al., 2004) ed in America da quella del prof. Green (Green et al., 2005).

Dosaggio della PAG nel corso della gestazione normale

Nella vacca gestante le concentrazioni di tale glicoproteina sono rilevabili già dal 19°-22° giorno dopo il concepimento, per raggiungere concentrazioni di 3-6 ng/mL intorno al 33°-37° giorno di gestazione (Perenyi et al., 2002b). Tuttavia esiste un'ampia variabilità inter-individuale. Dal punto di vista pratico, ciò significa che questa proteina è rilevabile nella circolazione periferica materna, ai fini di una diagnosi di gestazione, a partire dal 30° giorno di gravidanza in circa il 98% delle femmine gestanti (Zoli et al., 1992b).

Durante la gestazione, la loro concentrazione si eleva al principio progressivamente tra la 6^a e la 35^a settimana (da 4 ng/mL a 159 ng/mL), per aumentare in seguito più rapidamente tra la 35^a e l'ultima settimana di gestazione (concentrazioni dell'ordine di 1.550 ± 590 ng/mL). I valori massimi sono attesi 1-5 giorni prima del parto (2.462 ± 1.018 ng/mL).

Dopo il parto, le concentrazioni seriche decrescono regolarmente per giungere ai valori al di sotto della soglia di rilevamento (< 0.2 ng/mL) tra l'80° ed il 100° giorno post-partum (Zoli et al., 1992b). Durante questo periodo, il dosaggio della PAG è affidabile a condizione che l'intervallo parto-inseminazione/concepimento sia superiore a 70 giorni. Il periodo necessario affinché la PAG divenga non più dosabile nella circolazione materna è dovuto alla sua lunga emivita, stimata intorno ai 7.0 - 8.8 giorni nelle vacche europee (Sasser et al., 1986; Kirakofe et al., 1993) e intorno ai 9.2 - 10.1 giorni nelle vacche zebu appartenenti alla razza africana Azawak (Sousa et al., 2002).

Fattori che possono influenzare le concentrazioni materne della PAG

Studi realizzati su riceventi Holstein (vacche e manze) e Hereford (vacche) alle quali sono stati trasferiti embrioni Holstein ha permesso la messa in evidenza

dell'influenza della razza e del sesso del feto sulla concentrazione periferica della PAG (Guilbault et al., 1991). Le concentrazioni medie peripartum (dal giorno -20 al giorno + 2; giorno 0: parto) sono state significativamente più elevate nelle vacche Hereford (3.500 ng/mL) rispetto alle manze (2.300 ng/mL) e le vacche Holstein (1.500 ng/mL). Allo stesso modo, le riceventi Holstein portatrici di feto maschi hanno presentato concentrazioni di PAG più elevate rispetto alle portatrici di feto femmina (Guilbault et al., 1991; Zoli et al., 1992°).

Esiste ugualmente una relazione tra le concentrazioni osservate in corso di gravidanze singole o multiple ed il peso dei vitelli alla nascita (Dobson et al., 1993; Mialon et al., 1993; Patel et al., 1997). Tuttavia, queste relazioni sono difficilmente utilizzabili nella pratica perché le variazioni individuali sono elevate e molteplici i parametri che possono influenzarle.

Dosaggio della PAG durante il corso di gestazioni anormali

Nella specie bovina, oltre che in quella caprina ed ovina, è ormai acclarato che le PAGs possano costituire un eccellente biomarker della funzione trofoblastica.

Gli esempi che seguono servono per dimostrare l'importanza dell'utilizzazione del dosaggio della PAG come strumento per seguire le caratteristiche ormonali delle femmine utilizzate nei programmi di inseminazione artificiale (IA), trasferimento d'embrioni (TE), di fecondazione in vitro (FIV), o ancora nel caso di femmine infette da agenti patogeni o sottoposte a condizioni estreme di carenza nutrizionale.

E' vero che i casi clinici fino ad ora studiati sono stati esaminati retrospettivamente ed ogni volta una lunga latenza è intercorsa tra l'esame clinico, con prelievo di campioni, ed il dosaggio della PAG. E' evidente che questo costituisce un handicap importante per chi lavora in campo e deve prendere una decisione rapida. E' auspicabile, per questo, che i dosaggi possano essere integrati in un sistema più interattivo, che includa l'analisi delle caratteristiche sanitarie e riproduttive, nonché un trattamento dei risultati in tempo reale.

Esempi di casi di mortalità embrionale dopo IA:

- Vacca 3129 (diapo. n°59): la gestazione si instaura normalmente dopo l'IA (giorno 0). Il corpo luteo si forma normalmente e la concentrazione di progesterone rimane elevata fino al 56° giorno, vale a dire dopo che è sopraggiunta la mortalità embrionale (dal 35° al 56° giorno), come è testimoniato dall'esame ecografico. La

concentrazione della PAG decresce in questo lasso di tempo. In questo esempio, il mantenimento dell'attività del corpo luteo almeno fino al giorno 56° spiega l'assenza del ritorno in calore dopo la mortalità embrionale.

- Vacca 3570 (diapo. n°60): l'evoluzione è simile a quella della vacca precedente, ma la mortalità embrionale è più precoce (tra il 30° e 38° giorno). La concentrazione di progesterone scema più rapidamente.
- Vacca 3369 (diapo. n°61): l'analisi retrospettiva del progesterone e della PAG mostra che l'IA realizzata al giorno 20 non si giustifica: la vacca era gestante già dalla prima inseminazione. E proprio questa seconda inseminazione, probabilmente, è stata la responsabile della mortalità embrionale tardiva sopraggiunta tra il 46° ed il 54° giorno di gestazione.

Aborto in seguito alla presenza di agenti infettanti

I primi studi riguardanti l'effetto dell'infezione da agenti abortivi sulla concentrazione delle proteine associate alla gestazione sono stati realizzati da Semambo e coll. nel 1992. Questi autori hanno dimostrato che le concentrazioni di PSPB-PAG cominciano a diminuire 1-3 giorni dopo l'infezione sperimentale da *Actinomyces pyogenes* per raggiungere valori al di sotto di 0.6 ng/mL in circa 30 giorni. Per contro, i tassi di progesterone rimangono elevati per almeno 20 giorni dopo l'infezione; la sua concentrazione diviene non rilevabile solamente dopo l'eliminazione del pus presente nell'utero.

Più recentemente, Zarrouk e coll (1999) hanno realizzato uno studio sulle variazioni plasmatiche della PAG in capre gestanti in seguito all'infezione da *Toxoplasma gondii* e *Listeria monocitogene*. Il profilo della concentrazione della PAG concorda con la cinetica d'azione dell'agente abortivo: nelle capre infettate da *L. monocitogene* la concentrazione cade brutalmente già all'indomani dell'inoculazione e 9 giorni prima dell'aborto; in quella infetta *T. gondii* la concentrazione della PAG diminuisce fino al giorno dell'espulsione del feto.

Concentrazioni di PAG anormalmente elevati in seguito a manipolazioni d'embrioni

Numerosi autori hanno dimostrato che in seguito a dei programmi di manipolazione d'embrioni (clonaggio, trasferimento nucleare, etc...), anche se la maggior parte non presenta alcuna anomalia particolare, una piccola parte può presentare un peso troppo elevato alla nascita, associato o no alla presenza di anomalia morfologiche come l'edema del cordone ombelicale e l'ipertrofia placentare. Queste alterazioni sembrano essere correlate all'aumento in proporzioni considerevoli della concentrazione delle PAGs al termine della gestazione (Dobson et al., 1993; Ectors et al., 1996). Similmente, la

presenza di uno *Schistosoma reflexus* (embrione malformato risultante da una alterazione genetica verificatasi in corso di sviluppo embrionale) può essere caratterizzata da concentrazioni eccessivamente elevate di PAG, le quali possono superare i 12.000 ng/mL (Ectors et al., 1996b).

Conclusioni

Oggi il medico veterinario ha a propria disposizione differenti metodiche di indagine che gli permettono di effettuare una diagnosi di gravidanza: sceglierà in funzione delle circostanze e dei bisogni particolari di ogni allevamento. Tra gli argomenti che intervengono a favore del dosaggio delle proteine associate alle gestazione, oltre ad affidabilità e relativa precocità, si può citare la possibilità di associare alla loro determinazione nel sangue o nel latte, un'altra siero diagnosi (test per la brucellosi, leucosi, IBR, BVD...), permessa anche dalla possibilità di effettuare il prelievo indipendentemente dal momento della fecondazione (purché oltre il 30° giorno). Da qui ne deriverebbe l'opportunità di svelare rapidamente la presenza di eventuali alterazioni placentari, che possono, a lungo termine se non individuate, tradursi in una cattiva performance riproduttiva dell'intero allevamento.

Bibliografia

1. Austin K.J. et al.- Pregnancy-specific protein B induced release of an alpha chemochina in bovine endometrium. *Endocrinology*, 1999; 140(1): 542-545.
2. Barbato O. et al.- Purification of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in buffalo (*Bubalus-bubalis*): preliminary results. 54th Meeting European Ass. Animal. Prod.- Proc. II Congresso Allevamento del buffalo, 2003; 279-283.
3. Butler J.E. et al.- Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol. Reprod.*, 1982; 26:925-933.
4. Cordoba M.C. et al.- Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 2001; 84: 1884-1889.
5. Debenedetti A. et al.- Pregnancy associated glycoproteins (PAG – PSPB) detection by RIA in pregnant buffalo cows (*Bubalus bubalis*). Comparison of three antisera. *Bioteh. Agron. Society and Environment*, 2001; 5:62.
6. Beckers J.F. et al.- Isolation of a bovine chorionic gonadotropin (bCG). *Theriogenology*, 1988; 29: 218.
7. Beckers J.F. et al.- Pregnancy-associated glycoproteins in ruminantes : inactive members of the aspartic proteinase family. *Acta Veterinaria Hungarica*, 1999; 47(2): 461-469.
8. Del Vecchio R.P. et al.- Bovin lutel cell production in vitro of prostaglandin E₂, oxytocin and progesterone in response to pregnancy-specific protein B and prostaglandin F_{2α}. *J. of Reproduction and Fertility*, 1996; 107:131-133.
9. Dobson H. et al.- Assessment of fetal number, and fetal and placenta viability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 1993; 40: 411-425.
10. Dosone H. et al.- Immunological aspects of pregnancy-associated glycoproteins. *Adv Exp. Med. Biol.*, 2000; 480: 295-305.
11. Do H.J. et al.- Expression of pregnancy-associated glycoprotein 1 and 2 genes in vivo, in vitro and parthenogenetically derived preimplantation pig embryos. *Zygote*, 2001; 9(3): 245-250.
12. Ectors F.J. et al.- bPAG profiles in recipient heifers after transfe on IVF and nuclear transfer embryos. *Theriogenology*, 1996. 45: 283.
13. Ectors F.J. et al.-Interestof pregnancy follow-up in cows after embryo transfer: special focusing onIVP and NT. 12° Colloque association Européenne de Transfert embryonnaire, 1996b; 95-103.
14. El Almiri B. et al- Isolation and partial characterization of three pregnancy-associated glycoproteins from the ewe placenta. *Molec. Reprod. And Develop.*, 2003; 64: 199-206.
15. El Almiri B. et al- Pregnancy-associated glycoproteins in plasma and milk samples for early pregnancy diagnosis in Lacaune dairy sheep. *Reprod. Domestic Animal*, 2003; 38(4): 322.
16. Gandy B. et al.- Evaluation of the early conception factor (ECF) test for the detection of non pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 2001; 56: 637-647.
17. Garbayo J.M. et al.- Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biology Reprod.*, 1998; 58: 109-115.
18. Gogolin-Ewens KJ et al.-Characterization of a sheep trophoblast-derived antigen first appearing at implantation. *Placenta*, 1986; 7:243-255.
19. Gonzalez F. et al.- Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) detection in milk samples for pregnancy diagnosis in dairy goats. *Theriogenology*, 2001; 56: 671-676.
20. Guilbault L.A. et al.- Peripartum concentrations of placental protein hormones (hPL and BPL) in Holstein and hereford recipients carrying purebred Holstein fetuses. *Theriogenology*, 1991; 35:208.
21. Green J.A. et al.- Identification of a new aspartic proteinase expressed by the outer chorionic cell layer of the equine placenta. *Biology Reprod.*, 1999; 60: 1069- 1077.
22. Green J.A., et al.- Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially ad temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biology of Reprod.*, 2000; 62: 1624-1631.
23. Green J.A. et al.- The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology*, 2005; 63(5):1481-1503.
24. Haigh J.C. et al.- Estrus synchronization and pregnancy diagnosis in red deer. *J. Zoo. Anim. Med.*, 1988; 19: 202-207.
25. Haigh J.C. et al.- Diagnosis of pregnancy in wood bison using a bovine assay for PSPB. *Theriogenology*, 1991; 36: 749-754.
26. Haigh J.C. et al.- Diagnosis of pregnancy in moose using a bovine assay for PSPB. *Theriogenology*, 1993; 40: 905-911.
27. Humblot P. et al.- pregnancy specific protein B, progesterone concentration and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. *J. Reprod. Science*, 1988; 83: 215-223.
28. Huang F. et al.- Isolation, purification and characterization of pregnancy-specific protein B in elk and moose placenta. *Biology Reprod.*, 1999; 61: 1056-1061.
29. Huang F. et al.- A serum pregnancy test with a specific radioimmunoassay for moose and elke pregnancy specific protein B. *J. Wild. Manag.*, 2000; 64:492-499.
30. Hoeben D. et al.- Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leukocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy associated glycoprotein. *J. Dairy Res.*, 2000; 67: 249-259.
31. Jeanguyot N. et al.- Use of a PSPB for the detection of pregnancy in cattle and buffaloes. 33rd Worl Buiatrics Congress, 2004; 44: 436.

32. Laplanche A. et al.- Méthodes de statistiques appliqués à la recherche clinique. Ed. Flammarion. Mèd. Sci., 1987.
33. Kindhal H. et al.- Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well being. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002; 23: 321-328.
34. Kirakofe G.H. et al.- Pregnancy-specific protein B in serum of post-partum beef cows. *J.Anim. Science*, 1993; 71: 2199- 2205.
35. Kornmatitsuk B. et al.- Hormonal measurement in late pregnancy and parturition in dairy cows-possible tools to monitor foetal well-being. *Animal Reprod. Science*, 2002; 72(3-4): 153-164.
36. Lynch K.A. et al.- The cloning and expression of the bovine pregnancy specific protein B (bPSPB) gene. *Biology Reprod.*, 1992; 46(1): 73.
37. Metelo R. et al.- Determination of pregnancy-associated glycoproteins (bPAG) in cow's milk. 23rd World Buiatrics Congress, Quebec, 2004; p. 98.
38. Mialon M.M. et al.- Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1993; 33:269-282.
39. Moreira da Silva J.F. et al.- Effect of bovine pregnancy-associated glycoprotein (bPAG) on the oxidative burst of polymorphonuclear leukocytes from cows. 10th International Congress of Endocrinology, 1996; p. 634.
40. Osborn D.A. et al.- Use of glycoprotein assay for pregnancy diagnosis in white-tailed deer. *J. Wildl. Manag.*, 1996 ; 60 : 388-393.
41. Othmani-Mecif K. et al.- Protéine associée à la gestation ou PAG de lapine. Isolement et purification partielle. Mise au point d'un dosage RIA. *Sciencee & Technologie*, 2002 ; D : 83-87.
42. Patel O.V. et al.- Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to foetal number in the cow. *European J. of Endocrin.*, 1997; 137: 423-428.
43. Patel O.V. et al.- Expression of trophoblast cell-specific pregnancy-related genes in somatic cell-cloned bovine pregnancy. *Biol. Reprod.*, 2004; 70: 1114-1120.
44. Perenyi Z. et al.- Comparison of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma. *Repr. Domest. Anim.*, 2002; 37: 100-104.
45. Ranilla M.J. et al.- Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in churra and merino sheep. *Theriogenology*, 1994; 42(3): 1145-1153.
46. Ranilla M.J. et al.- Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in postpartum ewes. *British Society of Animal Science*, 1997. p. 185.
47. Roberts R.M. et al.- Maternal recognition of pregnancy. *Biology Reprod.*, 1996; 54: 294-302.
48. Ropstad E. et al.- Comparison of plasma progesterone, transrectal ultrasound and pregnancy specific proteins (PSPB) used for pregnancy diagnosis in reindeer. *Acta Vet. Sca.*, 1999; 40:151-162.
49. Sasser R.G. et al.- Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel Pregnancy-Specific Protein in serum of cows and a profile of serum concentration during gestation. *Biology of Reprod.*, 1986; 35:936-942.
50. Semambo D.K.N. et al.- Pregnancy specific protein B and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with *Actinomyces pyogenes*. *Theriogenology*, 1992; 37: 741-748.
51. Singh SK. et al.- Purification and characterization of protein(s) from placenta extracts in buffalo. *Indian Journal of Animal Science*, 2005; 75(7): 769-772.
52. Sousa N.M. et al.- Pregnancy associated glycoprotein and progesterone profiles during pregnancy and post-partum in native goats from the north-east of Brasil. *Small Ruminant Research*, 1999; 32(2): 137-147.
53. Szafranska B. Panasiewicz G.- The placental expression of the porcine pregnancy-associated glycoproteins (bPAG) gene family examined in situ and in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 2002; 72:95-113.
54. Szenci O. et al.- Comparison of ultrasonographic diagnoses in cows by measuring plasma levels of bovine-associated glycoprotein I. *Vet. Rec.*, 1988 ; 142 :304-306.
55. Tainturier D. et al.- Cinétique de la bPAG dans le plasma et dans le lait au cours de trois semaines suivant le part chez la vache. *Actualité Scientifique : Reproduction et Production Laitière*, 1996 ; 129-133.
56. Wango E.O. et al.- The role of trophoblastic binucleate cells in implantation in the goat: a morphological study. *Journal of Anatomy*, 1990; 171: 241-257.
57. Weems Y.S. et al.- Effect of luteinizing hormone (LH), PGE₂, 8-Epi- PGE₁, 8-Epi-PGF_{2α}, trichosanthin and pregnancy-specific protein B (PSPB) on secretion of prostaglandin (PG) e (PGE) o F_{2α} (PGF_{2α}) in vitro by corpora lutea (CL) from nonpregnant and pregnant cow. *Prostaglandin & other Lipid Mediators*, 1998 ; 55 :27-42.
58. Willard JM et al.- Detection of fetal twins in sheep using a radioimmunoassay for pregnancy-specific protein B. *J. Anim. Sci.*, 1995; 73:960-966.
59. Willard S.T. et al.- Methods for pregnancy determination and the effects of body condition on pregnancy status in rocky mountain elk (*cervus elephus nelsoni*). *Theriogenology*, 1994. 1095-1102.
60. Willard S.T. et al.- Artificial insemination, hybridization and pregnancy detection in sika deer (*cervus nippon*). *Theriogenology*, 1996; 46:779-789.
61. Willard S.T. et al.- Pregnancy detection and the effects of age, body weight, and previous reproductive performance on pregnancy status and weaning rates of farmed fallow deer (*Dama dama*). *J.Anim. Science*, 1999; 77:32-38.
62. Wood A.K et al.- Serum assays for detecting pregnancy in mule and white-tailed deer. *J. Wild. Manag.*, 1986; 50: 684-687.
63. Wooding F.B.P & Beckers J.F.- Trinucleate cells and the ultrastructural localization of bovine placental lactogen. *Cell and Tissue Research*, 1987; 247: 667-673.
64. Xie S. et al.- Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive member of the aspartic proteinase family. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1991; 88:10247-10251.
65. Xie S. et al.- A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoctoderm. *Biology of Reprod.*, 1994; 51: 1145-1153.
66. Xie S. et al.- The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. *Gene*, 1995; 159(2): 193-197.
67. Xie S. et al.- The diversity of evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 1997; 12809-12816.
68. Zarrouk A. et al.- Pregnancy-associated glycoprotein levels in pregnant goats inoculated with *Toxoplasma gondii* or *Listeria monocytogenes*: a retrospective study. *Theriogenology*, 1999; 52: 1095-1104.
69. Zoli A.P. et al.- Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol. Reprod.*, 1991; 45:1-10.
70. Zoli A.P. et al.- Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancy-associated

- glycoprotein in the bovine placentoma. *Biology of Reprod.*, 1992; 46(4): 623-629.
71. Zoli A.P. et al.- radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application in pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.*, 1992B; 46:83-92.
 72. Zoli A.P. et al.-Isolation of a ovine pregnancy specific protein. *Theriogenology*, 1990; 33: 366.

**LA NEOSPOROSI DEL BOVINO:QUALE RUOLO
NELLA FERTILITÀ?
PROGRAMMI DI CONTROLLO IN ALLEVAMENTI
CHE PRATICANO L'EMBRYO-TRANSFER**

**Gioia Capelli^a, Marcello Lora^b, Mario Pietrobelli^c,
Stefano Nardelli^a**

^aIstituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie;
^bLibero professionista;

^cDipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie,
Università degli Studi di Padova

Introduzione

La neosporosi è una malattia parassitaria sostenuta da un protozoo, *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa), molto simile, ma geneticamente diverso, a *Toxoplasma gondii*, che riconosce come ospite definitivo il cane e il coyote e come ospiti intermedi vari animali domestici e selvatici, principalmente il bovino. La neosporosi è attualmente riconosciuta come una delle principali cause di aborto infettivo del bovino in tutto il mondo, Italia compresa.

Il cane si infetta ingerendo tessuti infetti (ad es. placente ed involucri fetali) di animali che contengono le cisti; segue all'ingestione un ciclo coccidio-simile intestinale che porta alla formazione di oocisti, eliminate tramite le feci nell'ambiente e che costituiscono una fonte di infezione (trasmissione orizzontale) per gli ospiti intermedi. Attualmente poco si sa sulla durata dell'escrezione oocistica nel cane, ma si presume che sia breve, anche in virtù del fatto che rare sono le segnalazioni di isolamento di oocisti nelle feci dei cani in natura.

Nell'ospite intermedio le oocisti liberano forme vitali che invadono il torrente circolatorio (parassitemia) e portano poi alla formazione di cisti tissutali, prevalentemente a carico del SNC, del cuore e del fegato. Una volta che la parassitosi è entrata in allevamento, questa viene mantenuta attraverso la trasmissione verticale da madre a feto, via che può raggiungere in certi casi un'efficacia del 100%. A differenza di *Toxoplasma*, la neosporosi sembra non indurre una efficace immunità e durante la gravidanza una nuova infezione o una riattivazione di un'infezione cronica porta alla mobilitazione dei tachizoiti contenuti nelle cisti tissutali con conseguente passaggio transplacentare ed infezione del feto. Nel bovino adulto l'unico sintomo d'infezione è l'aborto che avviene generalmente fra il 4° e il 6° mese di gravidanza. Altri possibili esiti dell'infezione nell'animale gravido sono la morte precoce con riassorbimento fetale e ritorno in calore della bovina, la nascita di vitelli disvitali con sintomatologia nervosa ed infine la nascita di vitelli perfettamente sani, ma infetti

cronici. Questi ultimi saranno in grado alla successiva gravidanza di trasmettere il protozoo alla prole, mantenendo l'infezione in allevamento senza alcuna reintroduzione dall'esterno.

La diagnosi di neosporosi nel bovino adulto si basa principalmente sull'esame sierologico (siero o latte); la positività sierologica significa che la bovina ha una probabilità da 3 a 12 volte superiore di una bovina sieronegativa di abortire e/o trasmettere il protozoo al vitello. Recentemente sono stati pubblicati studi sull'utilizzo di tecniche biomolecolari (real time PCR) che permetterebbero di individuare la presenza del parassita nel sangue, particolarmente importante nella bovina gravida. Per la diagnosi di neosporosi sul feto possiamo utilizzare: la ricerca del DNA del parassita nel cervello (PCR), la presenza di anticorpi nel sangue o liquidi fetali, la presenza di lesioni istopatologiche e l'immuno-istochimica. Nei vitelli infetti congeniti l'unica possibilità diagnostica è rappresentata dall'esame sierologico pre-colostro, per evitare l'interferenza con gli anticorpi materni.

La situazione in Veneto

Prevalenza dell'infezione nelle aziende e negli animali
Un'indagine preliminare retrospettiva svolta sui sieri bovini conferiti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie prima del 2000 aveva già messo in evidenza una prevalenza per neosporosi dell'11%.

La prima indagine sistematica si è svolta nel 2000 in provincia di Padova. Trentatré aziende da latte sono state incluse nello studio e 368 animali sono stati testati con metodica ELISA.

I risultati hanno messo in evidenza la presenza di almeno un animale positivo nel 54,5% delle aziende con una sieroprevalenza all'interno delle aziende variabile dal 6% al 61%. La sieroprevalenza nelle bovine è risultata del 16%. Dati più recenti sulla prevalenza della neosporosi a livello di allevamento utilizzando il latte di massa sono riportati da Nardelli e coll. nel presente convegno.

Nel 2003 una seconda indagine in provincia di Vicenza ha coinvolto 14 aziende selezionate in base al tasso di aborti annuali. Tutti gli animali presenti sono stati esaminati con metodica ELISA. Nella quasi totalità delle aziende (13/14) sono stati ritrovati animali positivi e solo in un'azienda non si è rilevata la presenza di animali positivi per *Neospora*.

In tutto sono stati esaminati 1925 sieri, di cui 421 sono risultati positivi per una prevalenza generale di circa il 22%.

La prevalenza all'interno delle aziende varia notevolmente da un minimo del 5,5% ad un massimo del 46,1%. In particolare, in 5 aziende più del 20% degli animali è venuto in contatto con il protozoo. Per quanto riguarda la correlazione fra lo stato sierologico ed il tasso di aborto annuale 3 aziende su 4 con prevalenza aziendale maggiore

del 20% presentano problemi di aborto. In una azienda con tasso di aborto > del 5% non si è rilevata la presenza di anticorpi anti-Neospora e quindi sicuramente i problemi riproduttivi sono da attribuirsi ad altre cause, infettive e non.

Impatto della neosporosi nelle patologie riproduttive del bovino

Oltre alle indagini sierologiche per stabilire il grado di positività nelle aziende, a partire dal 2002 la presenza e l'impatto del protozoo *Neospora caninum* sulle patologie riproduttive del bovino sono state monitorate attraverso il controllo sierologico delle bovine che abortiscono e attraverso la ricerca del DNA del parassita tramite PCR nei feti abortiti o nei vitelli nati disvitali e/o deceduti poco dopo il parto. Quando possibile è stata eseguita la serologia su liquidi fetali.

Dei 59 campioni conferiti 14 sono risultati positivi alla PCR per una prevalenza del 23,7%. Se aggiungiamo anche i 3 aborti risultati positivi alla serologia su liquido fetale la prevalenza si eleva al 28,8%.

La presenza del DNA a livello fetale permette sicuramente di individuare quelle bovine in grado di trasmettere il protozoo per via verticale, dato indispensabile in un'ottica di controllo dell'infezione in una azienda.

La prevalenza per neosporosi nelle vacche che hanno presentato aborto (22/51) è del 43,2%, significativamente più elevata della sieroprevalenza della popolazione bovina in generale.

I risultati delle successive analisi di ricerca routinaria di neospora nei feti abortiti ha confermato la presenza del DNA del parassita nel 32% dei casi.

Fattori di rischio

Nelle aziende del Veneto sono stati individuati i seguenti fattori di rischio correlati alla sieroprevalenza negli animali:

Fattori di rischio manageriali:

1. utilizzo della rimonta interna (nelle aziende sieropositive)
2. grosse aziende (=densità animale?)
3. numero crescente di cani

Fattori di rischio individuali:

1. bovine alla loro prima gravidanza (manze gravide)

Rapporto ospite-parassita nella bovina gravida

La neosporosi è essenzialmente una malattia della gravidanza. Studi in bovini non gravidi ed in modelli murini hanno dimostrato l'importanza della risposta immunitaria mediata da linfociti T-helper di tipo 1 e da alcune citochine infiammatorie (INF γ e IL-12) nel limitare la moltiplicazione di *N.caninum* a livello intracellulare. Durante la gravidanza tuttavia avvengono dei cambiamenti nel sistema immunitario atti a permettere alla madre di

“accettare” il feto, che altrimenti verrebbe riconosciuto come non-self. A livello dell'interfaccia materno-fetale i possibili danni causati dalla risposta immunitaria di tipo 1 sono modulati da un incremento del rilascio di citochine da parte di T-helper di tipo 2. Questo significa che la bovina diventa meno capace di combattere l'infezione da *N.caninum* durante la gravidanza ed aumentano le possibilità di un passaggio del protozoo al feto. Ma perché alcune bovine abortiscono ed altre invece partoriscono vitelli malati o più frequentemente sani, ma infetti cronici? La risposta a questa domanda sta probabilmente nella complessa interazione dei diversi fattori che possono influenzare l'esito dell'infezione da *Neospora* in gravidanza: il periodo di infezione, la quantità e la durata della parassitemia, l'efficacia della risposta immune materna, la maturità del sistema immunitario del feto e forse anche la diversa patogenicità di ceppi parassitari. In genere una nuova infezione o una riacutizzazione della neosporosi nel primo trimestre di gravidanza porta alla morte del feto con conseguente riassorbimento fetale o aborto. A metà gravidanza o più tardi ancora l'esito più atteso dell'infezione è la nascita di un vitello infetto congenito. In genere il feto bovino è in grado di rispondere ad un agente infettante con una risposta immunitaria rilevabile a partire dalla 24^o settimana.

Programmi di controllo

Linee generali

Attualmente non sono disponibili né una terapia né un vaccino efficaci contro la neosporosi. L'unico vaccino esistente, non in commercio in Italia, protegge in parte dall'evento aborto, ma non impedisce il passaggio transplacentare del protozoo. La profilassi si basa pertanto su misure di tipo diretto. Esistono alcune misure generali valide qualsiasi siano le condizioni di prevalenza sierologica e di tasso di aborto dell'azienda:

- impedire l'accesso dei cani alle stalle e alle fonti di stoccaggio alimenti
- utilizzare rimonta interna e/o esterna sieronegativa
- assicurare la diagnosi (PCR) sui feti abortiti. La presenza del DNA a livello fetale permette di individuare quelle bovine in grado di trasmettere il protozoo per via verticale, dato indispensabile in un'ottica di controllo in una azienda

Detto questo, il controllo della neosporosi in allevamento si basa sulla graduale eliminazione delle bovine infette utilizzando il seguente criterio di priorità:

1. bovine che hanno abortito per *Neospora* (sieropositività della madre associata a diagnosi di neosporosi nel feto con uno dei metodi visti sopra)
2. bovine che partoriscono vitelli infetti congeniti (svelabili tramite esame sierologico pre-colostrale)

3. bovine sieropositive senza o con scarsi problemi riproduttivi (sono comunque animali a maggior rischio)

Ovviamente il piano di risanamento va concordato con il proprio veterinario aziendale in base alla situazione generale dell'azienda anno per anno, tenendo conto della sieroprevalenza, dei tassi di fertilità, dei tassi di aborto, del numero di vitelli maschi e femmine, ecc.

Studi teorici e recentemente anche di campo hanno permesso di dimostrare che a breve termine le misure di controllo più efficaci sono rappresentate dall'eliminazione delle bovine sieropositive e dall'utilizzo di rimonta sieronegativa. A lungo termine è però necessario associare anche misure che proteggano l'allevamento dalla trasmissione orizzontale, per non vanificare gli sforzi economici compiuti.

A questo punto è necessario chiarire cosa si intende per eliminazione delle bovine: non è infatti necessario allontanare queste bovine dall'allevamento, poiché la neosporosi non si trasmette per contatto con un animale infetto. Occorre "eliminare" il contributo che queste bovine danno nel mantenimento dell'infezione in azienda, utilizzando ad esempio la fecondazione con toro da carne, in modo da mantenere la lattazione e non utilizzare il vitello per la rimonta. Se non si vuole rinunciare al contributo genetico che queste bovine apportano all'azienda si può utilizzare l'embryo-transfer.

Utilizzo dell'embryo-transfer nei programmi di controllo per la neosporosi bovina

Nei piani di risanamento aziendale nei confronti delle malattie infettive, oltre al danno economico dovuto all'eliminazione fisica dell'animale dalla stalla, va associato il danno economico che deriva dalla perdita di un patrimonio genetico di alto pregio, a volte frutto di anni di selezioni. Fortunatamente nel caso della neosporosi, malattia non contagiosa, possiamo permetterci di utilizzare la tecnica dell'embryo-transfer a salvaguardia del patrimonio genetico di allevamento.

Studi di infezione sperimentale nel bovino hanno evidenziato, dopo inoculazione di tachizoiti di *Neospora* in vari momenti della gravidanza, che il passaggio tranplacentare del protozoo avviene al 14°, 21° e 28° giorno rispettivamente nei vari studi. Poiché l'espianto dell'embrione dalla donatrice avviene in genere al 7-8° giorno dalla fecondazione, già a livello teorico l'embryo-transfer era stato proposto come pratica sicura ai fini della prevenzione della neosporosi.

Nel 2001 e 2002 studi canadesi e australiani hanno poi dimostrato sul campo la validità di tale ipotesi. In particolare nello studio canadese sono state utilizzate 22 bovine donatrici, sia sieropositive sia sieronegative, provenienti da 9 aziende diverse e i cui embrioni sono stati

impiantati in 87 bovine riceventi. Queste ultime erano organizzate nel seguente modo: gruppo A) formato da 50 bovine sieronegative che hanno ricevuto embrioni da donatrici sieropositive; gruppo B) 29 bovine sieronegative e embrioni da donatrici sieropositive; gruppo C) 8 bovine riceventi sieropositive e embrioni da donatrici sieropositive e sieronegative.

Le modalità di espianto hanno seguito le raccomandazioni della Società Internazionale di Embryo Transfer (IETS) a cui si rimanda. In sintesi i risultati hanno evidenziato un tasso di trasmissione verticale nelle bovine riceventi sieronegative dello 0%, anche quando le donatrici erano sieropositive, ed un tasso di trasmissione verticale del 75% (5 su 6) nel gruppo delle bovine riceventi sieropositive indipendentemente dallo stato sierologico delle donatrici. Altri studi hanno poi evidenziato come buoni risultati si ottengano anche utilizzando procedure di lavaggio dell'embrione routinarie, meno rigorose di quelle consigliate dall'IETS.

In conclusione possiamo affermare che l'utilizzo dell'embryo-transfer in riceventi rigorosamente sieronegative è una procedura efficace per prevenire la trasmissione verticale di *N.caninum*.

FATTORI IMPLICATI NELLA REGOLAZIONE DEL RAPPORTO UTERO-EMBRIONE DURANTE LA FASE DI ATTECCIMENTO

Gianfranco Gabai¹, Mara Badan², Angela Tramontano¹

¹ Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, Università di Padova, Agripolis, Legnaro

² Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Padova, Agripolis, Legnaro

Introduzione

L'esito positivo della gravidanza dipende da una serie di interazioni reciproche tra utero ed embrione. Questa sorta di dialogo materno-embriale parla con dialetti differenti a seconda della specie, ma è possibile trovare alcuni aspetti comuni (vedere: Day et al., 2004).

Una volta che l'oocita è stato fecondato dallo spermatozoo, inizia la cosiddetta "fase dell'embrione", che risulta estremamente critica per il proseguimento della gravidanza. Problemi legati ai meccanismi di segnalamento tra la madre e l'embrione sono ritenuti essere alla base della mortalità embrionale precoce. Si stima che nella bovina circa il 40 % delle gravidanze cessino tra l'ottavo e il diciassettesimo giorno. Nei ruminanti, il più noto tra i meccanismi di comunicazione materno-embriale è l'inibizione della luteolisi indotta dalla secrezione di interferone *tau* (IFN- τ) da parte delle cellule del trofoectoderma.

La capacità di mantenere la gravidanza può dipendere sia da fattori legati alla madre che all'embrione; tuttavia, alcuni risultati ottenuti trapiantando embrioni provenienti da animali di provata fertilità in bovine storicamente "repeat breeders" ed embrioni provenienti da "repaet breeders" in bovine di provata fertilità sembrano indicare un peso maggiore dei fattori di origine materna. Tra i fattori di origine materna, un ruolo importante per lo sviluppo embrionale viene svolto dal sistema GH-IGF-IGFBP, anche se numerosi altri fattori sono presenti nelle secrezioni uterine e potrebbero avere un ruolo importante nell'instaurazione della gravidanza. Infine, è necessario menzionare anche l'importanza di alcune caratteristiche chimico-fisiche delle secrezioni uterine, quali le variazioni di pH. Nella presente dissertazione verranno esaminati alcuni fattori coinvolti nell'attecchimento dell'embrione e nell'instaurazione della gravidanza, e alcune potenziali cause ambientali e/o manageriali di possibile alterazione di tali fattori.

Funzionalità del corpo luteo (CL) e riconoscimento materno della gravidanza

Nella bovina, l'instaurazione della gravidanza dipende innanzitutto dalla realizzazione di un fine equilibrio tra lo sviluppo di segnali luteolitici da parte della madre e la

produzione da parte dell'embrione di un segnale anti-luteolitico, l'interferone *tau* (IFN- τ), che previene la luteolisi e garantisce il mantenimento di un'adeguata secrezione di progesterone (P4). L'adeguata secrezione di IFN- τ dipende dallo sviluppo dell'embrione durante le primissime fasi della gravidanza; a sua volta, lo sviluppo dell'embrione dipende sia da una sua propria potenzialità (definibile come "qualità dell'embrione") che dalle condizioni dell'ambiente uterino. Il principale ormone responsabile del controllo dell'ambiente uterino è il P4, e le concentrazioni del P4 sono strettamente legate allo sviluppo embrionale nelle fasi precoci della gravidanza (Mann et al., 2003). Condizioni quali eccessive concentrazioni di P4 al momento della IA (Bage, 2003) o un ritardo nell'incremento dei livelli circolanti dell'ormone (Mann and Lamming, 2001) sono stati indicati come probabili cause del mancato concepimento.

Il progesterone recita un ruolo chiave ed indiscusso nell'instaurazione e nel mantenimento della gravidanza nei mammiferi (Goff, 2002). I recettori del progesterone (PR) sono presenti nell'epitelio e nello stroma dell'endometrio e nel miometrio e sono alla base della regolazione di un grandissimo numero di geni. Tuttavia, la continua esposizione all'ormone provoca un fenomeno di *down regulation* dei PR presenti sull'epitelio endometriale, che scompaiono immediatamente prima dell'impianto dell'embrione nei ruminanti (Spencer et al., 2004a,b). Pertanto, è plausibile che la regolazione delle funzioni dell'endometrio operata dal P4 avvenga indirettamente, attraverso fattori prodotti nel miometrio o nello stroma endometriale a seguito dell'azione del P4. A questo proposito, è interessante evidenziare che le cellule dello stroma endometriale esprimono diversi fattori di crescita, quali FGF (*Fibroblast Growth Factor*) 10 e HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), mentre l'epitelio endometriale ed il trofoectoderma esprimono i rispettivi recettori. Inoltre, numerose esperienze hanno messo in luce che il P4 regola l'espressione di numerosi fattori di crescita nell'utero di specie non-ruminanti, quali ad esempio EGF e IGF-BP1 (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1*). Quest'ultimo aspetto è ancora poco indagato negli animali domestici.

Ruolo dell'embrione

Apparentemente, i fattori di origine materna hanno un peso maggiore nel determinare l'esito della gravidanza; tuttavia, l'embrione mostra una certa capacità di dirigere il controllo materno dell'ambiente uterino e a limitare e, in parte, correggere gli effetti avversi dell'ambiente uterino. Ciò accade soprattutto a partire attorno al 15-17° giorno di gravidanza, quando l'embrione libera grandi quantità di IFN- τ , modificando quindi le funzioni endocrine ed endometriali della madre. Tuttavia, sappiamo molto poco

dell'importanza degli effetti dell'embrione sull'esito della gravidanza (Hansen, 2002). Qui di seguito, si vuole dare qualche breve cenno sui fattori che nel complesso possono essere definiti come "qualità dell'embrione".

Il neo-formato zigote è composto da materiale genetico (acidi nucleici) e non genetico (citoplasma e organelli cellulari) che deriva sia dallo spermatozoo che dall'ovocita. In particolare, il citoplasma dello zigote è formato quasi interamente dal citoplasma dell'ovocita, e i suoi mitocondri sono esclusivamente quelli di origine materna. Fino alla tarda fase a 4 cellule o all'inizio della fase a 8 cellule, la trascrizione di mRNA embrionale è molto limitata, e l'embrione è in gran parte dipendente dalle proteine e dal trascritto di origine materna. Date queste premesse, non deve sorprendere che difetti nella formazione o nel funzionamento dell'ovocita o dello spermatozoo si traducano in una riduzione della probabilità di sopravvivenza dell'embrione (Hansen, 2002). In tal senso, il ruolo più importante è giocato dall'ovocita.

Il termine "competenza" dell'ovocita sta ad indicare il potenziale di una cellula uovo nel dare origine ad un embrione vitale, e si stanno accumulando un gran numero di riscontri sperimentali che mettono in luce come stress di origine ambientale o nutrizionale possono compromettere la "competenza" degli oociti (che viene misurata come la riduzione della percentuale di oociti che danno origine con successo ad una blastocisti). Tra i fattori in grado di compromettere tale sviluppo possiamo ricordare le diete ad alto contenuto di proteina fermentescibile, un ridotto BCS e un elevato merito genetico per la produzione di latte (ma non l'elevata produzione di latte). Inoltre, la "competenza" è ridotta negli animali prepuberi o nelle primipare e negli oociti che derivano da follicoli di piccole dimensioni. Infine, cambiamenti della dinamica follicolare e lo stress da caldo sono due fattori che, notoriamente, compromettono la competenza degli oociti (Hansen, 2002).

La complessità dei fenomeni coinvolti nelle fasi dello sviluppo dell'embrione (nella bovina: dal concepimento fino a circa 42 giorni di gravidanza) può essere compresa utilizzando le moderne metodiche di biologia molecolare (Ushizawa et al., 2004; Wolf et al., 2003). Per esempio, in un esperimento di *cDNA microarray* eseguito su embrioni bovini raccolti a 7, 14, 21 e 28 giorni dalla fertilizzazione è stato possibile studiare contemporaneamente il comportamento di 1707 geni, che sono stati raggruppati in 12 *clusters* a seconda delle variazioni nel tempo del loro livello di espressione (Ushizawa et al., 2004). Questo studio ha messo in evidenza un ruolo potenzialmente nuovo, correlato alla fase di impianto dell'embrione, di numerosi geni già noti, ma ha soprattutto evidenziato nuovi geni potenzialmente coinvolti nella regolazione delle fasi di impianto dell'embrione. Tra i geni già noti, in questa sede ci preme sottolineare il notevole incremento

dell'espressione di alcune citochine, quali le PAG (*Pregnancy Associated Glycoproteins*), dei lattogeni placentari, di INF- α di IGF-I e del recettore per EGF (*Epidermal Growth Factor*).

Dal 15° giorno di gravidanza, quindi, l'embrione è in grado di influenzare l'endocrinologia e la funzionalità dell'utero della madre grazie soprattutto alla secrezione di INF- α . Ma nel periodo che precede questa fase della gravidanza che cosa succede? Può l'embrione influenzare la fisiologia materna? Oppure è totalmente dipendente dalle condizioni dell'utero che lo ospita?

Se si rimuove l'embrione dall'utero gravido di una bovina prima del giorno 13 di gravidanza, non si osserva alcun aumento della vita del CL (Bowen e Burghardt, 2000). Inoltre, è possibile l'instaurarsi della gravidanza quando l'embrione viene trapiantato nella ricevente entro il 16° giorno di gravidanza (Hansen, 2002). Queste osservazioni suggeriscono che l'embrione ha poche possibilità di modulare la fisiologia materna prima del 14-15° di gravidanza. Al contrario, si è osservato che la capacità di liberare INF- α alla fine della fase di allungamento è strettamente dipendente dal grado di sviluppo dell'embrione (Goff, 2002). Inoltre, l'embrione coltivato *in vitro* non è in grado di allungarsi, ma riacquista questa sua proprietà una volta trapiantato in un utero. Ciò porta a concludere che l'embrione è dipendente dalla madre per la primissima parte della gravidanza (Goff, 2002).

Sviluppo ed omeostasi dell'utero

L'istotrofo, cioè il complesso sistema di secrezioni che bagna e nutre l'embrione, deriva in prima istanza dalle ghiandole endometriali. Negli animali domestici, l'istotrofo rimane fondamentale per la sopravvivenza del conceptus anche a placentazione ultimata. L'importanza dell'istotrofo per il buon esito della gravidanza è noto in pratica sin dai tempi di Aristotele.

Recentemente, sono stati svolti degli studi utilizzando delle pecore nelle quali lo sviluppo delle ghiandole endometriali è stato bloccato (pecore UGKO: *Uterine Gland Knock Out*). Questi animali ovulano normalmente, rispondono a somministrazioni di PGF2 α esogena ovulando ed esibendo un calore, ma non sono in grado di mantenere una gravidanza. In questi animali, lo sviluppo della blastocisti avviene normalmente fino a 6-9 giorni di gravidanza, ma al 14 giorno di gravidanza il conceptus muore o presenta un notevole ritardo dello sviluppo. Queste blastocisti possiedono una scarsa capacità di liberare INF- α . I soggetti UGKO dai quali sono state recuperate le blastocisti ipofunzionali, al giorno 14 di gravidanza presentavano livelli molto bassi delle proteine coinvolte nell'adesione dell'embrione: osteopontina e molecola glicosilata dell'adesione 1 (Spencer e Bazer, 2004).

Al di là degli esiti degli esperimenti estremi con le pecore UGKO, esiste il forte sospetto che un inadeguato sviluppo delle ghiandole endometriali nel corso delle prime fasi di vita delle femmine di ruminante possa compromettere la fertilità di questi animali.

In questa sede, è opportuno sottolineare che il ciclo vitale dell'utero è molto simile a quello della ghiandola mammaria, e come quest'ultima, la sua funzionalità è probabilmente influenzata dal tipo di vita che un animale conduce durante la vita pre-puberale. Numerosi fattori, quindi, sono in grado di alterarne la funzionalità, tra i quali, se il parallelo con la ghiandola mammaria è valido, il livello nutritivo gioca un ruolo importante.

Durante il periodo precedente l'impianto dell'embrione, l'utero va incontro a cambiamenti morfologici, e le sue secrezioni mostrano modificazioni biochimiche sostanziali, che sono fondamentali per assicurare un corretto sviluppo embrionale. La maggior parte delle perdite di embrioni si riscontra tra l'ottavo ed il sedicesimo giorno di gravidanza, quando l'embrione possiede substrati energetici e metabolici endogeni molto contenuti e quindi dipende dalle secrezioni dell'ovidotto e dell'utero per il proprio sviluppo (Leese, 1988).

In particolare, lo zigote del bovino può dividersi solo a livello di ovidotto e alterazioni della composizione delle secrezioni oviduttali, possono risultare in un ritardo dello sviluppo e in una riduzione della motilità dell'embrione (Ashworth, 1994; Bazar, 1994; Zavy, 1994). Il secreto dell'ovidotto è il mezzo in cui vengono trasportati i gameti ed in cui gli spermatozoi vanno incontro a capacitazione, gli oociti vengono fertilizzati e l'embrione inizia a svilupparsi. Durante le prime ore dopo la fertilizzazione questo liquido è fondamentale per lo sviluppo e per il sostentamento embrionale, prima che il citoplasma dell'oocita sia completamente organizzato e i meccanismi omeostatici siano attivati (Bavister, 2000).

Ci sono pochissime informazioni riguardanti la fisiologia e la biochimica delle secrezioni dell'ovidotto e dell'utero a causa della difficoltà di accesso e di raccolta (Kenny et al., 2002; Hugentobler, 2004). Finora i dati derivano dalla raccolta per aspirazione post-mortem o coltura di cellule oviduttali *in vitro* (Cox and Leese, 1997; Binelli et al., 1999), o (nel caso dell'ovidotto) tramite cateterizzazione delle tube per giorni o settimane (Grippio et al., 2001). La maggior parte dei lavori analizza i fluidi tramite cateterizzazione permanente dell'ovidotto (Grippio et al., 2002; Kenny et al., 2002) o tramite flushing uterini (Jordan et al., 1983).

Queste metodiche presentano però degli svantaggi in quanto possono alterare la composizione dei secreti. Cambiamenti della composizione possono verificarsi *post mortem*, come esito di morte cellulare, determinando perdita di ioni e altre molecole. La cateterizzazione può

determinare infiammazione e quindi alterare il volume e la composizione delle secrezioni. Anche lo stress derivante dalle varie manipolazioni, tra le quali l'anestesia, può determinare alterazione dei costituenti.

La quantità e la composizione dei secreti varia durante il ciclo estrale, probabilmente come risultato di cambiamenti endocrini. Gli steroidi influenzano il flusso sanguigno e l'attività delle cellule dell'epitelio oviduttale. Il volume del liquido aumenta sotto l'influsso dell'estradiolo e diminuisce con l'aumento della concentrazione del progesterone (Killian et al., 1989).

Le secrezioni dell'ovidotto sono guidate dalla secrezione di ioni, con conseguente formazione di un gradiente osmotico creatosi sulla superficie apicale dell'epitelio, che risulta in uno spostamento di acqua dall'epitelio cellulare al lume (Leese, 1988). Questo avviene soprattutto durante la fase estrale quando si ha aumento di volume delle cellule dell'epitelio con conseguente aumento dello spazio intracellulare necessario per l'accumulo di ioni (Gott et al., 1988). Inoltre, il liquido del follicolo ovulatorio, il liquido peritoneale e quello uterino contribuiscono alla formazione di quello oviduttale (Cox and Leese, 1997). Poche sono invece le informazioni sulla formazione del liquido uterino; in parte deriva dal comparto ematico in parte da secrezione delle ghiandole uterine (Gray et al., 2001).

Il movimento degli ioni risulta importante per l'embrione, non solo per la regolazione del pH, ma anche per la regolazione del volume delle secrezioni e per l'attività enzimatica (Hugentobler et al., 2004).

I principali cationi presenti nelle secrezioni a livello di ovidotto e di utero sono sodio, potassio, calcio, magnesio. I principali anioni sono cloro, zolfo, fosforo, bicarbonato (Leese et al., 2001). Le concentrazioni di potassio sono più elevate, mentre quelle di calcio sono inferiori rispetto alle rispettive concentrazioni sieriche. La maggior parte degli ioni sono presenti in minor quantità nel periodo estrale, eccezion fatta per il calcio che è più elevato attorno all'estro, probabilmente per il suo ruolo nella sopravvivenza degli spermatozoi (Leese et al., 2001; Kenny et al., 2002). Tuttavia, è stato riportato un aumento delle concentrazioni di calcio e potassio dall'estro alla fase luteale (Jordan et al., 1983).

Il bicarbonato è di estrema importanza, particolarmente a livello di ovidotto, per la regolazione del pH.

È possibile che alterazioni del pH delle secrezioni dell'ovidotto e dell'utero compromettano lo sviluppo embrionale. Studi *in vitro* hanno dimostrato che la riduzione di pH, derivante da elevati livelli di urea plasmatica (Elrod and Butler, 1993; Elrod et al., 1993), può influenzare negativamente lo sviluppo dell'embrione. Esposizioni a valori di pH pari a 6.8 e 7 arrestano lo sviluppo prima che l'embrione possa raggiungere lo stadio di blastocisti.

Un aspetto importante da considerare nella relazione alimentazione (eccesso del contenuto di proteina) e fertilità risulta essere la possibile alterazione della composizione delle secrezioni uterine o del pH uterino in seguito ad elevati livelli di urea plasmatica che risulterebbe in un ambiente non idoneo per lo sviluppo e la sopravvivenza embrionale (Jordan et al., 1983; Canfield et al., 1990; Elrod and Butler, 1993).

Non ci sono pubblicazioni sulla relazione tra pH nell'ovidotto o nell'utero e sopravvivenza embrionale nel bovino. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il pH ottimale per la coltura degli embrioni dallo stadio di zigote a quello di blastocisti è compreso nel range di 7.1-7.4. (Barnett and Bavister 1996).

La misurazione *in situ*, a livello uterino, del pH al momento dell'estro è compresa tra 6.83 e 6.87. Tali valori sono necessari per garantire una certa sopravvivenza degli spermatozoi in quanto corrispondono con i valori del seme del toro (Elrod and Butler, 1993). Il pH uterino tende poi a raggiungere valori di 7.09-7.13 durante la fase luteale (misurazioni effettuate al giorno 7 del ciclo) (Elrod and Butler, 1993), in corrispondenza di un aumento delle concentrazioni uterine di magnesio, potassio e fosforo (Jordan et al., 1983).

Tra 2 e 4 giorni dopo l'estro, il valore *in situ* del pH a livello di ovidotto è pari a 7.60 (0.64 unità maggiore di quello uterino e 0.18 maggiore di quello del sangue) (Hugentobler et al., 2004).

In questa sede, non si ritiene utile una trattazione approfondita dei costituenti principali delle secrezioni di ovidotto ed utero, che sono principalmente composte da acqua, ossigeno, aminoacidi, carboidrati, elettroliti, ormoni, fattori di crescita (Fischer and Beier, 1986). Brevemente, le maggiori fonti energetiche studiate includono glucosio, lattato e piruvato (Kenny et al., 2002; Bavister, 2000).

Ci sono indicazioni contrastanti sulla composizione in aminoacidi dei liquidi dell'ovidotto e dell'utero, probabilmente anche a causa delle differenti tecniche analitiche impiegate dai diversi Autori. Le proteine presenti nei due secreti derivano in parte dal sangue e in parte vengono sintetizzate e secrete dall'epitelio oviduttale e uterino (Leese, 1988) e rivestono numerosi ruoli biologici. Oltre all'albumina, che è la principale proteina a livello oviduttale e uterino, presente in concentrazioni simili a quelle del plasma, esistono numerose altre proteine. Tra queste, possiamo ricordare: l'uteroferrina, e il retinol binding protein (RBP), che giocano un ruolo importante nel trasporto di vitamine e minerali dall'endometrio all'embrione; inoltre, si ricordano le proteine del latte uterino (UTMP), che possono inibire la trasformazione linfocitaria e quindi prevenire rigetto immunitario dell'embrione e immunoglobuline G e A. Le secrezioni

uterine contengono, inoltre, fattori di crescita, *binding proteins*, e citochine. Tali sostanze sono importanti per sostenere la proliferazione cellulare, la morfogenesi e la differenziazione.

Fattori endocrini

Per maggior precisione e correttezza, si deve puntualizzare che i messaggeri chimici coinvolti nello sviluppo embrionale possono arrivare attraverso il circolo ematico (via endocrina), ma possono essere prodotti localmente dalle strutture uterine e/o embrionali e, più tardi, placentari ed agire su popolazioni cellulari prossime al loro luogo di produzione (via paracrina), oppure agire proprio sulle stesse cellule che li producono (via autocrina) (Kaye, 1997).

Un primo esempio di influenza endocrina sulla fertilità è rappresentato dall'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrenali causato da *stressor* di diversa natura ed origine. L'effetto è legato alla forte perturbazione operata dai glicocorticoidi sugli eventi endocrini che portano all'ovulazione, con probabili conseguenze sullo sviluppo dell'oocita, sulla sincronizzazione tra sviluppo dell'embrione e dell'endometrio e sullo sviluppo del CL (Dobson e Smith, 2000).

Contrariamente a quanto si riteneva in passato, il GH sembra essere un fattore importante per lo sviluppo dell'embrione. L'azione di questo ormone sull'embrione è documentata da numerosi studi eseguiti *in vitro* e *in vivo*, che hanno messo in evidenza come esso sia importante nel controllo sia del metabolismo che dell'accrescimento embrionali. È interessante notare che il recettore per il GH (GHR) viene espresso dall'embrione bovino già al secondo giorno di gravidanza, mentre il GH viene espresso più tardi, a circa 6 giorni di gravidanza. Ciò implica che durante i primi giorni dell'embriogenesi, l'embrione è dipendente dal GH materno (Wolf et al., 2003).

Altre componenti dell'asse somatotropico sono rappresentate dalle somatomedine (IGF-I e IGF-II), dai recettori (IGFR1 e IGFR2) e dalle loro proteine leganti (IGF-BP1 - BP6). Queste sostanze sono largamente espresse nell'apparato riproduttivo femminile e, in particolare, si ha la massima espressione di IGF-I, IGF-II, IGFR1 e IGF-BP3 nell'ovidotto nel momento in cui i gameti e l'embrione vi transitano. Inoltre, in numerose specie, tra le quali quella bovina, è stata osservata l'espressione di componenti del sistema delle somatomedine in embrioni durante le fasi pre-impianto. Tuttavia, i risultati di esperimenti condotti su embrioni di topi transgenici hanno portato a ritenere che queste sostanze siano necessarie per lo sviluppo embrionale solamente nelle fasi più avanzate della gravidanza (Wolf et al., 2003).

A questo proposito, si deve ricordare che il sistema delle somatomedine è sensibile alle variazioni del livello alimentare, e che nelle pecore gravide iponutrite lo sviluppo della placenta è assai ridotto. E' stato osservato un'alterata espressione di IGFBP-6 negli animali sottonutriti, e si sospetta quindi che il sistema delle somatomedine sia responsabile, almeno in parte, del ridotto sviluppo placentare (Osgerby et al., 2004).

Le azioni delle componenti dell'asse somatotropico sull'embrione durante le primissime fasi di gravidanza sono, dunque, assai controverse. Il loro ruolo sull'embrione potrebbe essere indiretto, in quanto attori fondamentali nello stimolare e dirigere lo sviluppo delle ghiandole endometriali.

L'importanza dell'insulina nello sviluppo dell'embrione nelle fasi precedenti all'impianto è stata documentata a partire dagli anni 1980-1990. L'insulina agisce attraverso i propri recettori sia a livello di trofoectoderma che di massa cellulare interna, sebbene le azioni nei due siti siano leggermente differenti. Infatti, l'insulina non stimola la proliferazione cellulare a livello di trofoectoderma, mentre lo fa a livello di massa cellulare interna; al contrario, in entrambi i siti d'azione l'ormone stimola la sintesi proteica (Kaye, 1997).

Nella specie bovina, è possibile modificare la secrezione di insulina e glucagone (e di conseguenza il rapporto molare tra i due ormoni) attraverso una dieta in grado di incrementare la percentuale di propionato. Nelle bovine da carne, è stato dimostrato che la somministrazione di diete in grado di aumentare il rapporto insulina:glucagone induce una maggiore percentuale di blastocisti ben sviluppate al giorno 16 di gravidanza. Tale risultato è stato associato ad un più rapido sviluppo funzionale del CL successivamente alla IA osservato negli animali con più elevato rapporto insulina:glucagone. Tuttavia, le concentrazioni medie di P4 non differivano da quelle degli animali con basso rapporto insulina:glucagone (Mann et al., 2003). La situazione riportata da Mann et al. (2003), si riferisce, tuttavia, a soggetti da carne in buone condizioni corporee; la situazione delle bovine da latte ad elevata produzione sono assai differenti, e le diverse condizioni endocrine generate dalle diverse diete sono associabili in modo più stretto alla funzionalità del corpo luteo.

Infine, Selvaraju et al. (2002) hanno osservato un tendenziale miglioramento della fertilità in soggetti classificati come *repeat breeder* in seguito alla somministrazione di insulina, anche se non sono stati in grado di valutare esattamente a quale livello il trattamento abbia sortito il suo effetto.

Il sistema *Epidermal Growth Factor* (EGF) - *Transforming Growth Factor* (TGF- β) rappresenta un'altra famiglia di fattori di crescita, che nel topo è stata associata con la fisiologia del trofoectoderma, l'espansione della blastocisti

e l'impianto dell'embrione (Kaye, 1997). In particolare, si è osservato che EGF non viene prodotto dall'embrione (e quindi è di origine materna), mentre TGF- β viene prodotto dall'embrione ed è un probabile regolatore intrinseco. Anche nella specie bovina, l'EGF possiede un'azione critica nell'instaurarsi della gravidanza, che tuttavia non è ancora completamente chiarita. Si è osservato, ad esempio, che le concentrazioni di EGF nel tessuto endometriale di animali *repeat breeder* è drasticamente differente da quello di animali normali (Katagiri e Takahashi, 2004).

Altri fattori endocrini molto importanti per lo sviluppo delle ghiandole endometriali sono la prolattina ed il lattogeno placentare. In particolare, l'esposizione a questo ormone durante le prime fasi di vita post-natale delle giovani femmine. Inoltre, è stato proposto un trattamento a base di prolattina entro i primi 50 giorni di vita degli animali, al fine di aumentare il numero delle ghiandole endometriali (Spencer e Bazer, 2004).

Fattori metabolici

E' noto che i problemi riproduttivi nella specie bovina sono da imputare, almeno nel 50% dei casi, ad errori alimentari riconducibili ad eccessi o difetti nell'apporto dei diversi principi nutritivi, nonché ad un'errata somministrazione di alimenti o all'impiego di prodotti non idonei dal punto di vista igienico-sanitario (Bonomi, 1990), e che la "fase di transizione" rappresenta il momento più critico per la bovina sotto il profilo metabolico e nutrizionale.

In questa sede, non prenderemo in considerazione gli aspetti che legano le alterazioni metaboliche al ritardo della ripresa dell'attività ciclica o all'ovulazione, per le quali esistono aggiornate review (Lucy et al., 1992; Butler, 2001; Butler, 2000; Lucy, 2001), ma concentreremo l'attenzione sulle relazioni esistenti tra alterazioni del metabolismo e il concepimento.

Il bilancio energetico negativo (BEN) influenza negativamente la corretta funzionalità dei tessuti e delle strutture coinvolti nel delicato e complesso equilibrio riproduttivo: il fegato, l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio e l'utero. La conseguenza è un rallentamento della ripresa dell'attività ovarica nel postpartum, un ritardo nel ritorno in calore e di conseguenza un prolungamento dell'intervallo parto-concepimento (Butler, 2000; Butler, 2001). Tuttavia, queste alterazioni, soprattutto quelle rilevabili a livello ovarico, si ripercuotono sul concepimento. Infatti, la diminuzione o il ritardo nella secrezione di steroidi ovarici compromettono la fertilità anche attraverso l'alterazione della funzionalità uterina con decise ripercussioni sulla vitalità embrionale.

Per far fronte ai fabbisogni nutrizionali, nell'intento di ammorbidire il deficit energetico e le ripercussioni sulla fertilità ad esso dovute, sono state messe a punto diverse strategie alimentari. Tra queste, l'incorporazione nella dieta

di una certa quantità di grassi (circa il 3 % sulla s.s.), è in grado di ridurre la differenza tra l'apporto nutrizionale e le spese energetiche. Tale pratica sembra apportare effetti positivi sulle *performance* riproduttive, quali un precoce ritorno in calore delle bovine nel postparto (Lucy et al., 1992), un incremento della steroidogenesi (Spicer et al., 1993) e delle concentrazioni ematiche di insulina così da incrementare numero e dimensioni dei follicoli (Beam e Butler, 1997). Per quanto riguarda gli effetti sull'attecchimento dell'embrione, l'apporto di grasso nella razione induce una diminuzione nella secrezione e nel rilascio di PGF2 α favorendo la sopravvivenza del CL (Williams, 1989) ed indirettamente quella dell'embrione.

Un aspetto particolarmente interessante riguarda l'apporto eccessivo di proteine alimentari durante le prime fasi di lattazione, che è associato ad una generalizzata riduzione delle *performance* riproduttive (Butler, 1998). Tuttavia, gli effetti di un eccesso proteico della razione non sembrano essere importanti per la ripresa dell'attività ovarica nel postparto (Butler, 1998; Westwood et al., 1998), lasciando quindi spazio nell'ipotizzare altri meccanismi d'azione.

La quota proteica nelle diete comprende 2 frazioni: RDP (*ruminally degradable protein*) e RUP (*ruminally undegradable protein*). Attraverso le normali fermentazioni ruminali, la RDP fornisce una fonte di ammoniaca per le sintesi proteiche ad opera dei batteri ruminali. Parte di questo metabolita, soprattutto se in eccesso, può sfuggire all'incorporazione microbica e raggiungere il circolo attraverso le pareti ruminali, per essere convertito ad urea nel fegato. Una seconda e non meno importante fonte di urea deriva dalla deaminazione e metabolismo degli aminoacidi, a loro volta provenienti dalla quota proteica indegradabile, da proteine microbiche e riserve corporee.

Un eccesso di RDP, soprattutto, è responsabile dell'alterazione della fisiologia ovarica ed uterina a causa dell'elevata presenza in circolo di metaboliti tossici, quali ammoniaca ed urea. Sembra che i danni più evidenti sulla sfera riproduttiva siano imputabili a concentrazioni plasmatiche di urea superiori a 190 mg/L (Ferguson et al., 1993; Butler et al., 1996; Garcia-Bojalil et al., 1998). Tuttavia, i risultati presenti in bibliografia sono spesso discordanti; infatti sono stati riportate modificazioni delle *performance* riproduttive con valori di urea inferiori a 190 mg/L (Folman et al., 1981; Kaim et al., 1983). Probabilmente, tali discrepanze possono essere riconducibili al diverso stadio di lattazione ed energetico delle bovine utilizzate nelle sperimentazioni. Animali in lattazione con BEN mostrano una minor tolleranza alle elevate concentrazioni plasmatiche di ammoniaca ed urea, in termini di fertilità, piuttosto che bovine in mantenimento o in bilancio energetico positivo. In parte, questo potrebbe essere spiegato con la scarsa efficienza degli animali in deficit energetico nell'utilizzare fonti proteiche molto

fermentescibili e/o alle ripercussioni che ammoniaca e urea in eccesso hanno su alcuni regolatori del metabolismo, tra cui l'insulina (Sinclair et al., 2000).

E' stato osservato, infatti, che elevate concentrazioni di ioni ammonio nel sangue inibiscono la produzione di insulina, sia tramite l'azione diretta sulle cellule β del pancreas, sia per stimolazione e liberazione di catecolamine dal nn. pancreatico (Felman e Lebovitz, 1971).

E' stata avanzata l'ipotesi che, l'ulteriore aggravamento del BEN possa anche derivare dall'inibizione dello stimolo dell'appetito, per azione dell'ammoniaca ed urea su alcune aree del sistema nervoso centrale, una volta che questi metaboliti abbiano superato la barriera emato-encefalica. Sempre a livello centrale, l'eccesso di ammoniaca ed urea, sembra interferire con la neuromodulazione nella secrezione e rilascio pulsatile di LH nel postparto (Jordan e Swanson, 1979; Sinclair et al., 1995).

Il successo dello sviluppo embrionale è strettamente correlato alla qualità ed idoneità del microambiente uterino sotto l'influenza del progesterone. La presenza di elevati tassi plasmatici di ammoniaca ed urea sono associati ad un'alterazione del pH uterino e della composizione ionica delle secrezioni uterine nella fase luteale, ma non in fase estrale. La concentrazione plasmatica di urea risulta inversamente proporzionale al pH del lume uterino (Elrod et al., 1993). Come già ricordato, al momento dell'estro il pH è compreso tra 6.83 e 6.87. Tali valori sono necessari per la sopravvivenza dei gameti maschili lungo le vie genitali femminili. In corrispondenza del settimo giorno del ciclo, nelle fase luteale, il pH tende a raggiungere valori compresi tra 7.09 e 7.13 (Elrod e Butler, 1993), in corrispondenza dell'aumento delle concentrazioni di magnesio, potassio e fosforo nelle secrezioni uterine. Questo aumento viene a mancare in bovine in lattazione che presentano eccessi di metaboliti azotati nel plasma.

Il calcio che normalmente è più alto al momento dell'estro, piuttosto che nella fase luteale (è risaputo che questo ione gioca un ruolo fondamentale nella sopravvivenza e capacitazione degli spermatozoi), appare negativamente correlato a livelli eccessivi di ammoniaca ed urea registrati nelle secrezioni uterine.

In conclusione, gli effetti negativi dei metaboliti azotati sulla fertilità potrebbero dipendere da un loro effetto tossico diretto sui gameti, come dimostrato sia "in vitro" che "in vivo". Inoltre, alcuni studi "in vitro" documentano l'esistenza di un gradiente di pH tra il compartimento basale ed apicale delle cellule endometriali, sensibile all'azione dell'estradiolo e del progesterone. Livelli significativi di urea diminuiscono l'attività del P4 nel mantenere questo gradiente e parallelamente inducono un incremento nella secrezione di PGF2 α dalle cellule endometriali, interferendo così con lo sviluppo e sopravvivenza dell'embrione (Butler, 1998; Butler, 2000).

Tuttavia, secondo quanto riportato nel presente lavoro, è assai probabile che il declino della fertilità debba essere considerato un fenomeno multifattoriale. Il bilancio energetico negativo esacerbato dall'eccessivo livello di ammoniaca ed urea, risultanti da una dieta troppo ricca in proteina, in particolare di frazioni fermentescibile, gioca un ruolo importante ma non ancora chiarito nelle prime fasi di sviluppo dell'embrione.

Riferimenti bibliografici

- Ashworth C. J., 1994. Nutritional factors related to embryonic mortality in domestic species. *Embryonic Mortality in Domestic Species*: 179-194.
- Bage R. 2003. Conception rates after AI in Swedish Red and White dairy heifers: relationship with progesterone concentration at AI. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 199-203.
- Barnett D. K and Bavister B. D. 1996. what is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their development in vitro? *Molecular Reprod. Develop.*, 43:105-133.
- Bazar F. W., 1994. New frontiers and approaches in the study of embryonic mortality in domestic species. *Embryonic Mortality in Domestic Species*: 195-210.
- Bavister B. D., 2000. Interactions between embryos and culture milieu. *Theriogenology* 53: 619-626.
- Bonomi A., 1990. I rapporti fra alimentazione ed efficienza produttiva e riproduttiva nelle bovine da latte. *Riv. Sci. Alim.*, 23, 1, 87.
- Bowen J.A., Burghardt R.C. 2000. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. *Cell Develop. Biol.*, 11: 93-104.
- Butler W.R., 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81:2533-2539.
- Butler W.R., 2000. Nutritional interaction with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 449-457.
- Butler W.R., 2001. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. *Animal Science, Occasional Publication No. 26*: 133-145.
- Canfield R. W. Sniffen C. J. and Butler W. R. 1990. Effects of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 73:2342-2349.
- Cox C. I. and Leese H. J., 1997. retention of functional characteristics by bovine oviduct and uterine epithelia in vitro. *Animal Reprod. Sci.* 46: 169-178.
- Dey S.K., Lim H., Das S.K., Reese J., Paria B.C., Daikoku T., Wang H. 2004. Molecular cues to implantation. *Endocrine Rev.*, 25: 341-373.
- Dobson, H., Smith, R.F., 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 743-752.
- Elrod C. C. and Butler W. R. 1993. Reduction of fertility and alterations of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J.Anim.Sci.* 71: 313-328.
- Elrod C. C., Van Amburgh M. and Butler W. R. 1993. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J.Anim.Sci.* 71: 702-706.
- Feldman J.M., Lebivitz H.E., 1971. Ammonium ion, a modulator of insulin secretion. *Am. J., Physiol.* 221:1027-1032.
- Ferguson J.D., Galligan D.T., Blanchard T., Reeves M., 1993. Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. *J. Dairy Sci.* 76: 3742-3746.
- Fischer B and Beier H. M. 1986. Uterine environment in early pregnancy. In "Embryonic mortality in farm animals" (D. M. Sreenan J. M.,Ed). Martinus Nijhoff, Dordrecht, 93-108.
- Folman Y., Neumark H., Kaim M., Kaufmann W., 1981. Performance, rumen and blood metabolites in high yielding cows fed varying protein percents and protected soybean. *J. Dairy Sci.* 64: 759-768.
- García-Bojalil C.M., Staples C.R., Risco C.A., Savio J.D., Thatcher W.W., 1998. Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acid in the diets of lactating dairy cows: Reproduction responses. *J. Dairy Sci.* 81:1385-1395.
- Gray A.C., Taylor K.M., Ramsey W.S., Hill J.R., Bazer F.W., Bartol F.F., Spencer T.E. 2001. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. *Biol. Reprod.*, 64: 1608-1613.
- Goff A.K. 2002. Embryonic signal and survival. *Reprod. Dom. Anim.*, 37: 133-139.
- Gott A. L., Gray S. M., James A. F. and Leese H. J. 1988. The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. *Biol. Reprod.* 39:758-763.
- Grippe A. A., Henault M. A., Anderson S. H. and Killian G. J. 1992. Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J Dairy Sci.* 75:58-65.
- Hansen P.J. 2002. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *J. Anim. Sci.*, 80 (E Suppl. 2): E33-E44.
- Hugentobler S., Morris D. G., Kane M. T. and Sreenan J. M. 2004. In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology* 61: 1419-1427.
- Jordan E.R., Swanson L.V., 1979. Serum progesterone and luteinizing hormone in dairy cattle fed varying levels of crude protein. *J. Anim. Sci.* 48:1154-1158.
- Jordan E. R., Chapman T. E. Holtan D. W. and Swanson L. V. 1983 Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *J Dairy Sci.* 66:1854-1862.
- Kaim M.Y., Folman Y., Neumark H., 1983. The effect of protein intake and lactation number on postpartum body weight loss and reproductive performance in dairy cows. *Anim. Prod.* 37:229-235.
- Katagiri S., Takahashi Y. 2004. Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. *Theriogenology*, 62:103-112.
- Kaye P.L. 1997. Preimplantation growth factor physiology. *Rev. Reprod.*, 2: 121-127.
- Kenny D.A., Humpherson P.G., Leese H.J., Morris D.G., Tomos A.D., Diskin M.G., Sreenan J.M. 2002. Effect of elevated systemic concentration of ammonia and urea on the metabolite and ionic composition of oviductal fluid in cattle. *Biol. Reprod.*, 66: 1797-1804.
- Killian G. J. Chapman C. A. Kavanaugh j. F., Deaver D. R. and Wiggling H. B. 1989 Changes in phospholipid, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrus cycle. *J. Reprod. Fertil.* 86:419-426
- Leese H. J. 1988 The formation and function of oviduct fluid. *J.Reprod.Fertil.* 82: 843-856
- Lucy M.C., 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of dairy Sci.* 84: 1277-1295.
- Lucy M.C., Savio J.D., Badinga L., De La Sota R.L., Thatcher W.W., 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 3615-3626.
- Mann G.E., Lammin G.E. 2001. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. *Reproduction*, 121: 175-180.

39. Mann G.E., Green M.P., Sinclair K.D., Demmers K.J., Fray M.D., Gutierrez C.G., Garnsworthy P.C., Webb R. 2003. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 79: 71-79.
40. Osgerby J.C., Wathes D.C., Howard D., Gadd T.S. 2004. The effect of maternal undernutrition on the placental growth trajectory and the uterine insulin-like growth factor axis in the pregnant ewe. *J. Endocrinol.*, 182:89-103.
41. Selvaraju S., Agarwal S.K., Karche S.D., Srivastava S.K., Majumdar A.C., Shanker U. 2002. Fertility responses and hormonal profiles in repeat breeding cows treated with insulin. *Anim. Reprod. Sci.*, 73:141-149.
42. Spencer T.E., Johnson G.A., Burghardt R.C., Bazer F.W. 2004a. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol. Reprod.*, 71: 2-10.
43. Spencer T.E., Johnson G.A., Bazer F.W., Burghardt R.C. 2004b. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*, 128:657-668.
44. Spencer T.E., Bazer F.W. 2004. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J. Anim. Sci.*, 82 (E. Suppl.):E4-E13.
45. Sinclair K.D., Broadbent P.J., Hutchinson S.M., 1995. Naloxone evokes a nutritionally dependent LH response in post partum beef but not in mid luteal maiden heifers. *Anim. Sci.* 62:219-230.
46. Sinclair K.D., Kuran M., Gebbie F.E., Webb R., McEvoy T.G., 2000. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J. Anim. Sci.* 78: 2678-2680.
47. Spicer L.J., Vernon R.K., Tucker W.B., Wetteman R.P., Hogue J.F., Adams G.D., 1993. Effects of inert fat on energy balance, plasma concentrations of hormones and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76: 2664-2673.
48. Ushizawa K., Herath C.B., Kaneyama K., Shiojima S., Hirasawa A., Takahashi T., Imai K., Ochiai K., Tokunaga T., Tsunoda Y., Tsujimoto G., Hashizume K. 2004. cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2:77-93.
49. Vanroose G., de Kruif A., Van Soom A. 2000. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:131-143.
50. Wolf E., Arnold G.J., Bauersachs S, Beier H.M., Blum H., Einspaner R., Frohlich T., Herrler A., Hiendleder S., Kolle S., Prella K, Reichenbach H-D., Stoickovic M., Wenigerkind H., Sinowatz F. 2003. Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod. Dom. Anim.*, 38:276-289.
51. Westwood C.T., Lean I.J., Kellaway R.C., 1998. Indications and Implications for Testing of Milk Urea in Dairy Cattle: A Quantative Review. Part 2. Effect of dietary protein on reproductive performance. *New Zeland J.* 46: 123-130.
52. Williams G.L., 1989. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. *J. Anim. Sci.* 67: 785-793.
53. Zavy M. T.1994 Embryonic mortality in cattle. *Embryonic Mortality in Domestic Species*: 99-140.

ESPERIENZE DI CAMPO CON L'UTILIZZO DI "FANS" NEL TRATTAMENTO DELLA RICEVENTE AL MOMENTO DEL TRAPIANTO

*Lora Marcello, Longhini Paolo, Zuffellato Martina.
Liberi Professionisti*

Riassunto

I fattori legati alla ricevente sono fra i più importanti per ottenere livelli ottimali di attecchimento degli embrioni. Premesso quindi che la scelta della ricevente non deve essere di sicuro sottovalutata, una delle possibilità concrete per migliorare la percentuale di attecchimento sembra essere il trattamento della stessa con FANS. In questo studio sono riportati i risultati di campo ottenuti nella normale pratica di E. T. trattando alcune riceventi scelte casualmente con diversi tipi di FANS. I risultati ottenuti sembrano evidenziare un miglioramento del tasso di gravidanza più evidente quando la ricevente è una vacca anziché una manza.

Introduzione

La mortalità embrionale (EM) contribuisce in larga misura al fallimento dell'embryo transfer, più che l'insuccesso della fecondazione. La maggior parte delle morti embrionali si verifica nelle prime fasi della gravidanza (meno di 25 giorni) specialmente in quello che viene chiamato il "periodo critico". Durante il "periodo critico" (dal giorno 15 al 17) si ha il riconoscimento materno di gravidanza e la conseguente prevenzione della luteolisi ed il mantenimento del corpo luteo. Questo periodo in cui si ha un'alta mortalità embrionale coincide anche con il periodo del trapianto embrionale. Vi è una grande varietà di cause che potenzialmente possono causare la morte dell'embrione: anomalie cromosomiche, fallimento del riconoscimento materno, stress ambientali come caldo e tossine, patologie infettive. Il trasferimento embrionale viene generalmente eseguito intorno al giorno 7 dall'estro e prevede la palpazione transrettale dell'utero per posizionare l'embrione nel corno ipsilaterale del corpo luteo. Questa manipolazione uterina può causare il rilascio di prostaglandine (PGF_{2α}) dall'utero. Questo effetto è conosciuto anche come il riflesso di Ferguson, il quale per primo l'ha descritto nel 1941. Le prostaglandine sono implicate nell'interruzione della gravidanza poiché causano la luteolisi ed hanno un effetto diretto sullo sviluppo embrionale. Il rilascio di prostaglandine con la manipolazione uterina può avere effetti potenzialmente negativi anche durante l'inseminazione artificiale oltre che a seguito del trapianto embrionale. Un'altra possibile causa di rilascio delle PGF_{2α} durante l'ET può essere l'irritazione provocata dal catetere al suo passaggio sul tratto riproduttivo e la seguente infiammazione (Odensvik et al.

1993). La prevenzione del rilascio di PGF_{2α} attraverso la somministrazione di molecole come i FANS (antiinfiammatori non steroidei) che possano ostacolarne la sintesi è uno dei metodi antiluteolitici studiati da diversi autori per cercare di incrementare il tasso di gravidanza nelle riceventi. A riguardo Binelli et al (2001) hanno identificato sei strategie antiluteolitiche: incrementare la grandezza del follicolo preovulatorio per generare un CL grande; incrementare la crescita del CL; incrementare la fase progesteronica luteinica; far decrescere l'effetto del follicolo dominante durante il periodo critico; incrementare la stimolazione antiluteolitica del conceptus; e far diminuire la risposta luteolitica della madre.

Odensvik et al. (1998) hanno studiato l'effetto della somministrazione di granuli di Flunixin meglumine (2.2 mg/kg), appartenente alla famiglia dei fans ed avente attività inibitoria nei confronti della cicloossigenasi, sulla durata del ciclo estrale ed il mantenimento del corpo luteo. Alle manze è stato somministrato tale fans oralmente per due, tre o quattro volte al giorno per un periodo di 9 giorni a partire dal 14 giorno del ciclo estrale. La durata del ciclo estrale ha subito un incremento da 1.8 a 22.5 giorni nelle manze in cui è stato somministrato il Flunixin meglumine per tre volte al giorno, da 19.5 a 26 giorni nelle manze in cui è stato somministrato per quattro volte al giorno. Lo stesso gruppo inoltre ha rilevato gli effetti del Flunixin meglumine sempre con quattro somministrazioni giornaliere (2.2 mg/kg) nel primo periodo del post - partum. Nelle bovine così trattate vi è stato una significativa diminuzione delle prostaglandine materne. Il Flunixin meglumine come probabilmente altri fans può quindi essere d'aiuto nell'incrementare il tasso di gravidanza delle riceventi degli embrioni. Schrick et al. (2001) in uno studio su 737 bovine da carne dopo iniezione di 10 ml di Flunixin meglumine dai 2 ai 5 minuti prima del trapianto di embrioni sia freschi sia congelati hanno rilevato un tasso di gravidanza più elevato nelle bovine trattate (63.8%) rispetto alle non trattate (51.1%). È stata evidenziata anche l'interazione tra il trattamento con fans e qualità dell'embrione. La percentuale di gravidanza ha subito un notevole incremento nelle riceventi in cui è stato trapiantato un embrione di grado 1 o 2 ma non se l'embrione era di grado 3. L'effetto del Flunixin meglumine sembra dipendere anche dallo stadio di sviluppo. L'aumento del tasso di gravidanza è stato infatti del 14.6% nelle riceventi che hanno ricevuto embrioni di stadio di sviluppo 4 e del 11.4% in quelle in cui l'embrione era di stadio 5. Anche Purcell (2004) ha rilevato un tasso di gravidanza più elevato nelle bovine trattate al momento del trapianto con 500 mg di Flunixin meglumine subito prima del trapianto (72.3%, p<0.01) rispetto alle bovine controllo non trattate (63%).

Un'altra strategia per cercare di aumentare il tasso di gravidanza è quella, considerata la fondamentale importanza del progesterone per il mantenimento della gravidanza, di somministrare progestinici nella prima parte della gravidanza. Sembra che il progesterone abbia effetti positivi sia sulla sopravvivenza dell'embrione sia sul suo sviluppo.

In uno studio condotto da Purcell (2004), a 225 riceventi è stata inserita, subito dopo il trapianto embrionale, una spirale vaginale rilasciante progesterone, contenente 1.38 g di P₄. Il tasso di gravidanza ottenuto nelle bovine in cui è stata usata il supporto di progesterone è stato più basso (65.3%, p<0.11) rispetto all'bovine controllo (69.6%). Il risultato è stato spiegato o con una possibile irritazione locale e/o vaginite, data dalla prolungata permanenza della spirale in vagina o con l'ipotesi di Van Cleef et al. che nel 1996 hanno pubblicato un lavoro sulla relazione tra alti livelli di progesterone nella prima parte del ciclo estrale e il prematuro rilascio di prostaglandine dall'utero. Altri autori riportano invece risultati contrastanti a riguardo (Purcell 2004).

Scopo del lavoro

Questo lavoro ha l'obiettivo di valutare, attraverso una indagine retrospettiva su risultati di campo, gli effetti indotti sul tasso di gravidanza da un unico trattamento con FANS poco prima del trapianto, sulla ricevente.

Materiali e metodi

Questo studio analizza i dati raccolti da un Gruppo di Raccolta Embrioni composto dal dr. Lora M. e dr. Longhini Paolo in un territorio comprendente la provincia di Vicenza e parte delle province di TN e BL.

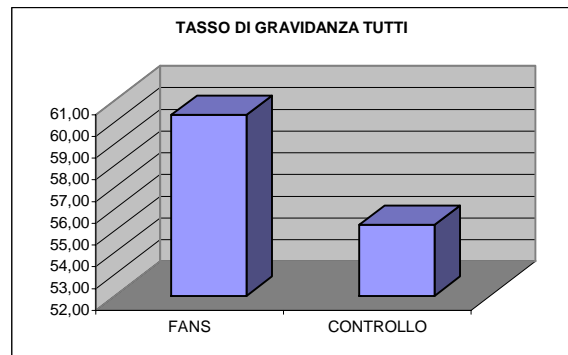
I dati sono stati raccolti su supporto informatico e poi trasferiti su file Excel per l'analisi statistica.

Il lavoro inizia in novembre 2003 e si protrae fino a giugno 2005. Le bovine trattate sono state scelte casualmente e veniva loro somministrato per via intramuscolare almeno 5 minuti prima del trapianto una dose di 1,25 g di flunixin meglumine (25cc), oppure 1,5 g di ketoprofene (15cc), oppure 1,2 g di acido tolfenamico (30cc). Sono state utilizzate soltanto riceventi ritenute idonee al trapianto.

Durante questo periodo di tempo sono state trapiantate e trattate 189 bovine, e sono state trapiantate non trattate 362 bovine. Sono stati utilizzati embrioni provenienti da 152 flusing diversi per un totale di 551 embrioni trasferiti. Dei totali trasferiti 350 erano embrioni congelati mentre 201 erano freschi.

Risultati e discussione

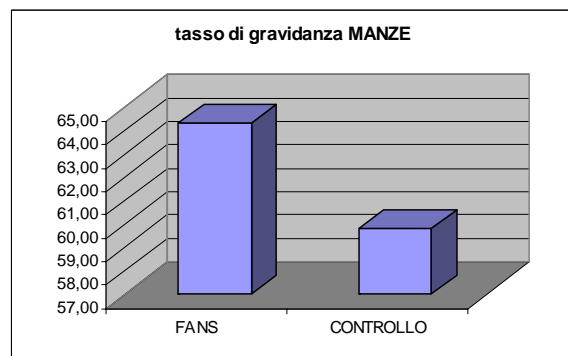
Tabella 1



	FANS	CONTROLLO
TOT	189	362
NEG	75	162
POS	114	200
%POS	60,32	55,25

Dalla tabella 1 si può vedere come dall'insieme generale dei dati vi sia una differenza fra il gruppo delle bovine trattate rispetto al gruppo di controllo del 5,07%.

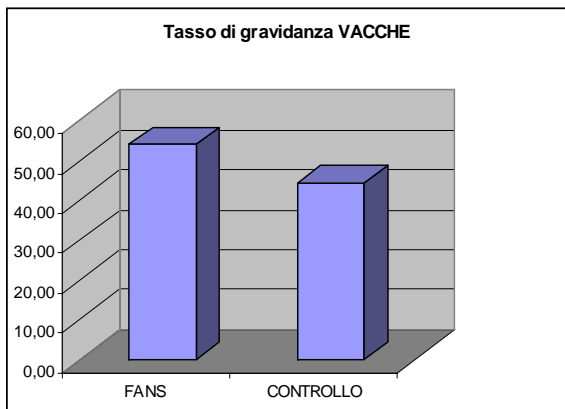
Tabella 2



MANZE	FANS	CONTROLLO
TOT	115	254
NEG	41	102
POS	74	152
%POS	64,35	59,84

Anche da questo grafico si può vedere che esiste una differenza a favore delle bovine trattate del **4,51** % nel caso si tratti di **manze**.

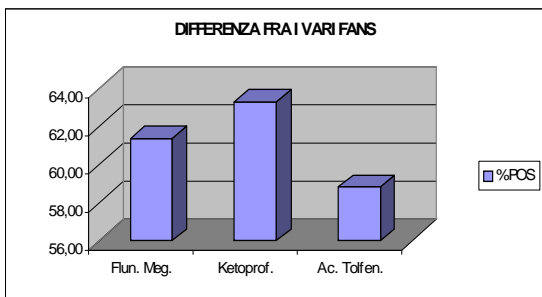
Tabella 3



VACCHE	FANS	CONTROLLO
TOT	74	108
NEG	34	60
POS	40	48
%POS	54,05	44,44

Nel caso si utilizzino delle **vacche** come riceventi la differenza aumenta fino al **9,61%**

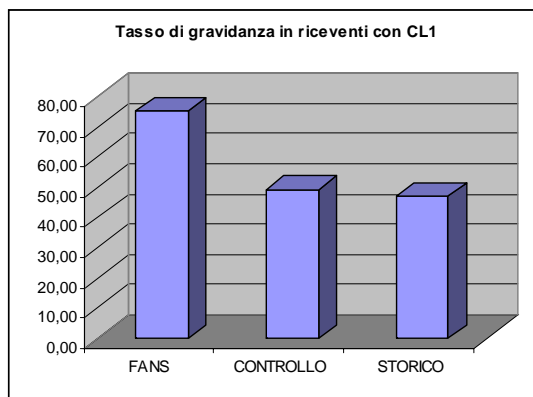
Tabella 4



TUTTI	Flun. Meg.	Ketoprof.	Ac. Tolfen.
TOT	119	49	17
NEG	46	18	7
POS	73	31	10
%POS	61,34	63,27	58,82

Le **differenze fra i vari FANS** sono lievi e non significative dal punto di vista statistico.

Tabella 5



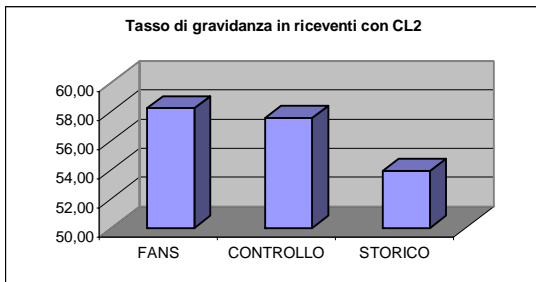
CL1	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	32	63	272
NEG	8	32	144
POS	24	31	128
%POS	75,00	49,21	47,06

Una **marcata differenza**, fra trattati e non, si evidenzia quando la ricevente possiede un corpo luteo di piccole dimensioni **CL1**, differenza pari al **25,79%**

Questo dato è piuttosto curioso soprattutto se si tiene conto che il risultato di 49,21% di gravidanza nei non trattati è molto simile a quello ottenuto guardando la media del tasso di concepimento "storico" dei "CL1" di questo gruppo di raccolta che è pari a 47,6% e le riceventi trattate erano in **19 aziende** diverse e gli embrioni provenivano da **28 flushing** diversi, le **manze sono 23** e le **vacche 9**.

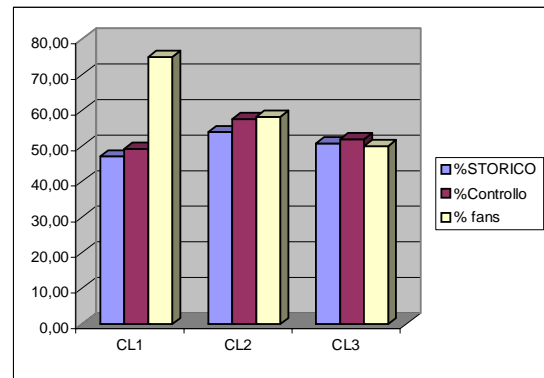
Molto più lieve invece è la differenza nelle riceventi con corpo luteo normale (**CL2=0,66%**) oppure grande (**CL3=-1,92%**) come si vede dalla tabella 6 e 7

Tabella 6



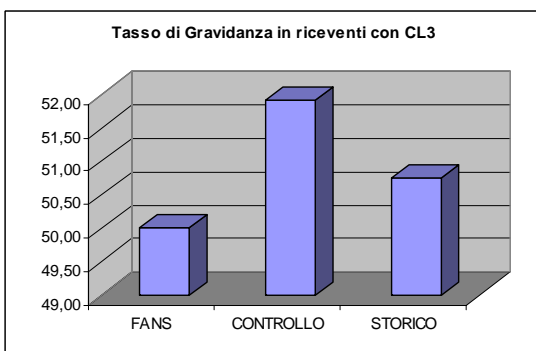
CL2	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	134	245	1497
NEG	56	104	690
POS	78	141	807
%POS	58,21	57,55	53,91

Tabella 8



	CL1	CL2	CL3
%STORICO	47,06	53,91	50,76
%Controllo	49,21	57,55	51,92
% fans	75,00	58,21	50,00

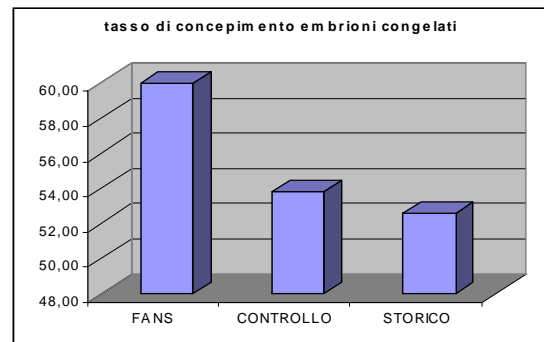
Tabella 7



CL3	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	24	52	329
NEG	12	25	162
POS	12	27	167
%POS	50,00	51,92	50,76

Dalla tabella 8 si vede come nei 3 gruppi di dati (CL1, CL2, CL3) la distribuzione sia molto equilibrata tranne che per il sottogruppo CL 1 trattato con fans.

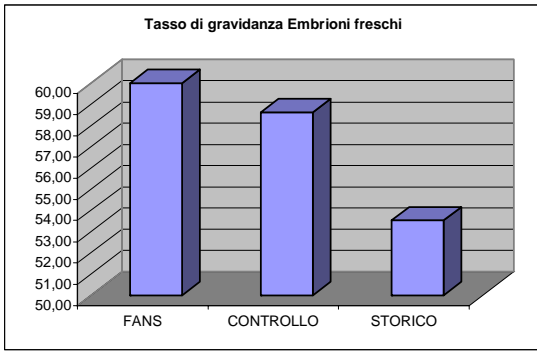
Tabella 9



congelati	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	105	247	1419
NEG	42	114	673
POS	63	133	746
%POS	60,00	53,85	52,57

Il trattamento della ricevente con FANS sembra influire positivamente anche considerando il fatto di trasferire embrioni **congelati** la differenza con il gruppo di controllo non trattato è del **6,15%**.

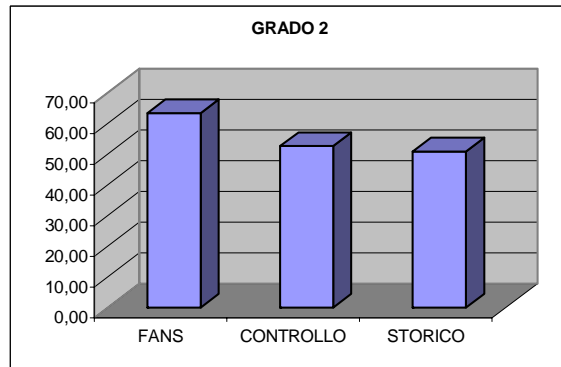
Tabella 10



Freschi	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	85	116	723
NEG	34	48	336
POS	51	68	387
%POS	60,00	58,62	53,53

Dalla tabella 10 possiamo vedere che l'influenza dei FANS sulla ricevente dove si trasferisce un embrione fresco è molto minore pari all' **1,38%**

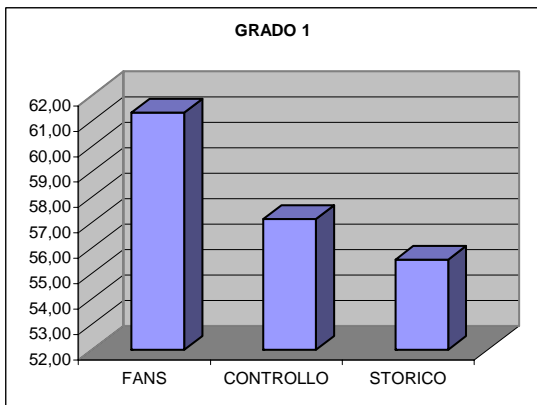
Tabella 12



GRADO 2	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	30	59	301
NEG	11	28	148
POS	19	31	153
%POS	63,33	52,54	50,83

Nel gruppo composto da embrioni di **classe qualità II** la percentuale di attecchimento si differenzia a favore del gruppo trattato del **10,79%**.

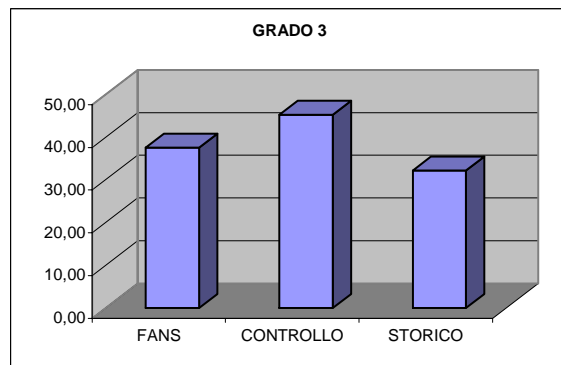
Tabella 11



GRADO 1	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	150	273	1649
NEG	58	117	733
POS	92	156	916
%POS	61,33	57,14	55,55

Utilizzando embrioni di **grado 1** di qualità la differenza è del **4,19 %** a favore del gruppo trattati.

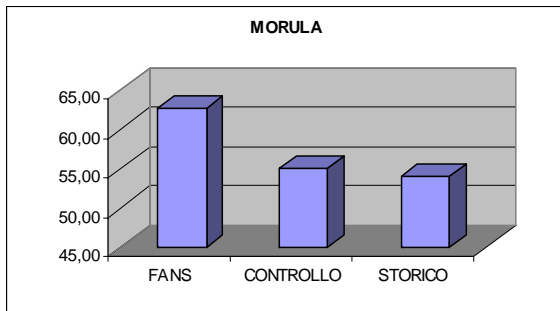
Tabella 13



GRADO 3	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	8	31	165
NEG	5	17	112
POS	3	14	53
%POS	37,50	45,16	32,12

In questo gruppo grado 3 di qualità la differenza è negativa **-7,66**, si tratta comunque di un numero esiguo di osservazioni.

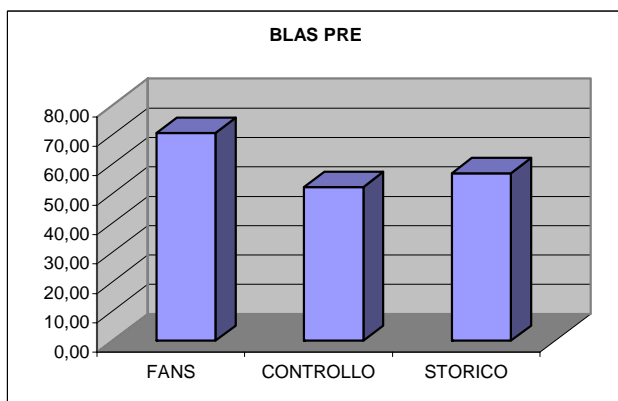
Tabella 14



MORULA	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	102	191	1097
NEG	38	86	505
POS	64	105	592
%POS	62,75	54,97	53,97

Embrioni allo stadio di morula : la differenza a favore dei trattati è del 7,78%

Tabella 15

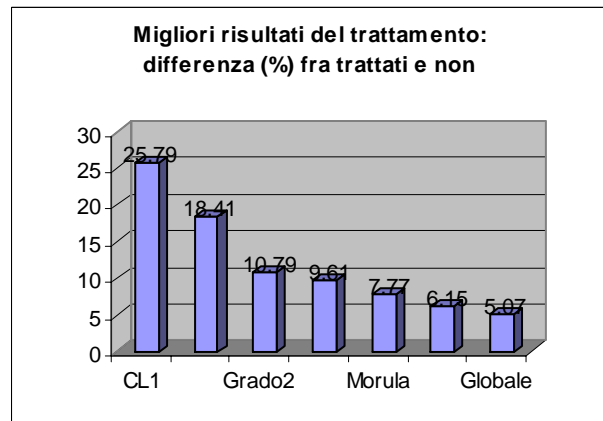


BLAS PRE	FANS	CONTROLLO	STORICO
TOT	17	23	230
NEG	5	11	99
POS	12	12	131
%POS	70,59	52,17	56,96

Embrioni allo stadio di **blastocisti precoce** : la differenza a favore dei trattati è del **18,42%** per gli altri stadi di sviluppo

invece la differenza è minima: **blastocisti 1,35%**;
blastocisti espanse 0.00%

Tabella 16



In questa tabella sono riportati i gruppi di trattate che hanno dato la differenza percentuale maggiore.

Costo del trattamento: nel caso di ketoprofene è di circa € 5,30 per singolo trattamento, mentre con flunixin-meglumine è di € 8,5 per trattamento. Calcolando un incremento dell'attecchimento del 10% il costo di ogni gravidanza aggiunta è rispettivamente di € 53 per il ketoprofene e di € 85 per il flunixin-meglumine.

Conclusioni

I risultati ottenuti sembrano essere a favore del trattamento delle riceventi con "FANS". Tuttavia, a nostro avviso sembra più conveniente trattare in modo selettivo le riceventi. I migliori risultati infatti si ottengono nei seguenti casi: quando le riceventi sono vacche (che hanno già partorito); quando si trasferiscono embrioni di grado 2 (qualità); infine quando le riceventi hanno un CL1 (corpo luteo di piccole dimensioni).

**MALATTIE INFETTIVE CHE INTERFERISCONO
CON L'ATTECCIMENTO E LO SVILUPPO
DELL'EMBRIONE BOVINO: PROGRAMMI
AZIENDALI DI CONTROLLO PER BVD/MD E IBR
IN ALLEVAMENTI CHE PRATICANO L'EMBRYO-
TRANSFER**

Stefano Nardelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

SINTESI DELL'INTERVENTO

INFEZIONE DA VIRUS BVD

1) EZIOLOGIA

Gli aspetti fondamentali da tenere presente sono i seguenti:

- la presenza dei due biotipi, citopatogeno e non, dove il citopatogeno causa la malattia delle mucose nei soggetti immunotolleranti (PI), mentre il non citopatogeno è il responsabile del fenomeno dell'immunotolleranza e di fatto il virus normalmente circolante nella popolazione bovina
- la presenza dei due genotipi (1 – 2) e, all'interno di essi, di ceppi significativamente diversi a livello antigenico, che comportano una protezione crociata fra diversi ceppi talvolta alquanto ridotta e parallelamente una significativa variabilità del titolo anticorpale in funzione del ceppo virale impiegato nel test
- la presenza di una proteina non strutturale (NS2-3), altamente conservata fra tutti i ceppi noti di virus BVD

2) PATOGENESI

Fra le azioni patogene del virus BVD, per la loro importanza una particolare attenzione va rivolta:

- alla sfera genitale: ritenzione placentare, ovarite, endometrite,
- al sistema immunitario: immunodepressione
- al feto / embrione: aborto, malformazioni, immunotolleranza (infezione nei primi 4 mesi di gravidanza da parte di ceppi non citopatogeni)

3) EPIDEMIOLOGIA

- Il serbatoio dell'infezione è rappresentato dal bovino immunotollerante; in sua assenza il virus può infettare gli animali recettivi, ma la sua circolazione all'interno del gruppo è torpida; in

sua presenza invece, data la costante e massiccia eliminazione virale garantita da tale animale, l'infezione si espande alla totalità del gruppo recettivo

- Peraltro la presenza di barriere che impediscano il contatto diretto tra gli animali (ad es. corsia di servizio) possono bloccare, ridurre o comunque rallentare il passaggio del virus dal gruppo con capi PI all'altro gruppo
- Le vie di ingresso del virus in stalla, in ordine di importanza decrescente, sono qui di seguito elencate:
 - √ Acquisto di animali: bovini PI – bovini gravidi con feto PI – bovini con infezione acuta in atto (purchè questa riesca poi ad estendersi ad altre vacche gravide, in modo da portare alla nascita di vitelli PI)
 - √ Alpeggio: quando in malga vengono inviati capi gravidi, che vivono in promiscuità con bovini di altre stalle
 - √ Contagio indiretto: con particolare attenzione al veterinario ed al commerciante che preleva i vitelli a carne bianca o le vacche a fine carriera
 - √ Uso di vaccini attenuati contaminati: nessun controllo può garantire l'assenza di virus BVD nel prodotto, ma solo la sua presenza AL DI SOTTO di una data concentrazione

NB L'Embryo-Transfer non appare fra i momenti di rischio più importanti, per quanto la contraddittorietà dei dati scientifici a disposizione non consenta di escludere al 100% la possibilità di trasmissione

4) RISANAMENTO DA BVD = ELIMINAZIONE DEL SERBATOIO (BOVINI PI)

- Il sospetto della presenza di capi PI in stalla nasce allorché nella stalla
 - √ sono già stati identificati bovini PI: è possibile che ve ne siano altri, quantomeno fra i feti che giungeranno a nascita nei mesi futuri
 - √ vi è un quadro di ipofertilità caratterizzato da turbe relative alla primissima fase di gravidanza (ritorno in calore)
 - √ vi è un quadro di immunodepressione, che porta al persistere di forme cliniche non specifiche (ad es. patologia respiratoria) in particolar modo fra i giovani animali (dove vi è un costante ciclo di infezione a carico dei soggetti che perdono l'immunità materna)
- Il primo passo diagnostico consiste nell'esame sierologico di un campione qualificato (animali di 6 – 12 mesi nati in stalla), finalizzato alla ricerca

degli anticorpi BVD; si ricorre ad un test per anticorpi NS2-3, in quanto rivolti verso una proteina altamente conservata nei diversi ceppi del virus selvaggio e scarsamente rappresentata in molti preparati vaccinali (specie se inattivati)

- Se dall'esame sierologico del campione qualificato emerge un chiaro segnale di positività, si rende necessario procedere all'esame virologico a tappeto sull'intero allevamento, al fine di identificare al suo interno i capi PI, prelevando il sangue da ogni animale; per ridurre i costi, è possibile in questi casi ricorrere al test PCR su latte di massa, il cui esito negativo consente di affermare che nessuna delle vacche in lattazione è escretrice di virus
- Gli animali virologicamente positivi vanno confermati dopo almeno tre settimane per verificare lo stato di immunotolleranza
- Gli animali immunotolleranti vanno eliminati e quindi si deve procedere al controllo virologico sistematico di tutti i nuovi nati in stalla per almeno nove mesi dall'allontanamento dell'ultimo capo PI
- Va ricordato che nei primi due mesi di vita i vitelli PI possono sfuggire ai test diagnostici a causa delle elevate concentrazioni di anticorpi BVD che si raggiungono nel sangue a seguito dell'assunzione del colostro; esistono indicazioni sperimentali (da estendere) che suggeriscono un'affidabilità superiore, in questi due primi mesi, del test ELISA su derma auricolare e ovviamente della PCR

5) SIEROLOGIA BVD A LIVELLO AZIENDALE

La presenza di animali sieropositivi all'interno dell'azienda NON costituisce fattore di rischio; in pratica tutte le aziende ospitano al loro interno dei capi sieropositivi. Va inoltre ricordato che la sieropositività di fatto si mantiene per tutta la vita dell'animale.

La stratificazione per età del livello di sieropositività fornisce peraltro interessanti elementi interpretativi, che consentono di ricostruire la storia infettiva all'interno della stalla.

Infine, i riscontri sierologici su animali vaccinati evidenziano come, con molte delle preparazioni commerciali attualmente disponibili, sia necessario uno scrupoloso rispetto dei tempi di vaccinazione / richiamo per assicurare adeguati livelli anticorpali.

6) SIEROLOGIA BVD A LIVELLO DEL LATTE DI MASSA

Tale approccio diagnostico, che si basa sull'impiego di un test specifico per anticorpi NS2-3 e caratterizzato da un bassa sensibilità, offre delle interessanti prospettive:

- La reattività del latte assente o scarsa è strettamente correlata ad una prevalenza, fra le vacche in lattazione, tale da non suggerire la presenza di soggetti PI
- La reattività del latte assente o scarsa è ancor più strettamente correlata all'assenza di anticorpi BVD fra i giovani animali
- La reattività del latte a livelli significativi invece NON è strettamente correlata alla presenza di capi PI né, a maggior ragione, a parametri di fertilità sfavorevoli (come invece succede con *Neospora caninum*)
- Di fatto, nella realtà veneta, poco meno della metà delle aziende presenta nel latte una reattività assente o scarsa e quindi già oggi potrebbe ricorrere a tale strumento diagnostico per un controllo routinario ed a basso costo della propria situazione anticorpale

7) NOVITA' LEGISLATIVA RELATIVE AL VIRUS BVD

Sono fondamentalmente due

- L'avvio nel 2004 di un piano di profilassi contro il virus BVD sul territorio della repubblica austriaca
- L'obbligo di applicazione, relativamente ai centri di produzione sperma, della direttiva 2003/43 CE (recepita quest'anno), la quale comporta delle gravi ripercussioni operative in caso di sieroconversione verso il virus BVD all'interno di tali centri.

INFEZIONE DA VIRUS IBR

1) EZIOLOGIA

Gli aspetti fondamentali da tenere presente sono i seguenti:

- la presenza, all'interno degli Herpesvirus bovini, di cinque diversi sierotipi, dove l'IBR corrisponde al sierotipo 1
- la presenza, all'interno del sierotipo 1, di due sottotipi (1.1 – 1.2), con un diverso tropismo, che

può essere schematizzato con una certa semplificazione nel modo seguente

- √ 1.1 → apparato respiratorio + feto (rinotracheite / aborto)
- √ 1.2 → apparato genitale (vulvovaginite / balanopostite)
- la crossreattività antigenica tra IBR ed Herpesvirus di altri ruminanti (con conseguenti problemi nell'interpretazione dei dati sierologici in queste ultime specie)

2) EPIDEMIOLOGIA

- Il serbatoio dell'infezione è rappresentato dal bovino infetto in modo latente, a livello di specifici gangli nervosi dai quali il virus stesso può riattivare l'infezione in presenza di stress
- Le vie di ingresso del virus in stalla, in ordine di importanza decrescente, sono qui di seguito elencate:
 - √ Acquisto di animali: bovini infetti in modo latente (possibile presenza di latenti sieronegativi in seguito ad infezione in presenza di anticorpi materni) – bovini con infezione acuta in atto (stalle di sosta!)
 - √ Contagio indiretto: con particolare attenzione al veterinario ed al commerciante che preleva i vitelli a carne bianca o le vacche a fine carriera
- A differenza della BVD
 - √ La presenza di capi sieropositivi in stalla costituisce un grave fattore di rischio, perché potrebbe trattarsi di capi infetti in modo latente
 - √ L'alpeggio NON è un fattore di rischio
 - √ L'Embryo-Transfer è considerato sicuro, purché gli embrioni siano trattati con tripsina
 - √ L'ingresso del virus in una stalla di bovini recettivi (sieronegativi) porta ad infezione e conseguente sieropositivizzazione dell'intero effettivo nel giro di poche settimane

3) RISANAMENTO DA IBR = ELIMINAZIONE DEL SERBATOIO (BOVINI INFETTI IN MODO LATENTE)

Il piano ha come scopo l'identificazione e l'eliminazione dei capi sieropositivi, in quanto potenzialmente infetti in modo latente.

- Il piano è necessariamente basato su uno screening sierologico di massa (a livello di regione / azienda), ricorrendo a test ELISA
- I test ELISA, come qualsiasi altro test diagnostico, sono affetti da errore, le cui cause sono ben note

ed identificate: fra esse la più importante risulta essere l'errata classificazione (su base anamnestica) dello stato vaccinale dei capi esaminati, seguita dai limiti di specificità legati all'impiego di test specifici per anticorpi gE

- Considerata la specificità del test a livello individuale, appare necessario il ricorso a prove in serie per evitare un'elevata frequenza di errata classificazione dello stato sierologico dell'azienda.
-

4) SIEROLOGIA IBR A LIVELLO AZIENDALE

Come per BVD, la stratificazione per età del livello di sieropositività fornisce interessanti elementi interpretativi, che consentono di ricostruire la storia infettiva all'interno della stalla nonché del progredire dell'eradicazione a livello aziendale.

Sono peraltro possibili situazioni anomale dovute a barriere fisiche che hanno difatto bloccato la diffusione del virus fra i diversi gruppi di bovini all'interno della stalla.

5) SIEROLOGIA IBR A LIVELLO DEL LATTE DI MASSA

Nelle aziende sieronegative, il latte di massa appare un ottimo strumento di monitoraggio dello stato sanitario per IBR in virtù

- Della velocità di diffusione dell'infezione all'interno del gruppo
- Della buona sensibilità dei test disponibili, in grado di rilevare una prevalenza di positività del 2 – 5%

Il latte di massa non è utilizzabile in gruppi di bovini immunizzati col vaccino delecto, per i pesanti limiti di sensibilità e di specificità del test per anticorpi gE.

VALUTAZIONE DEI REQUISITI PIÙ IMPORTANTI PER MASSIMIZZARE LA FERTILITÀ DEL SEME UTILIZZATO IN EMBRIO TRANSFER

D. Salvador

*Medico Veterinario; Responsabile sanitario Intermizoo
S.p.A.*

Questo argomento è molto complesso, in quanto la fertilità del seme è data da una molteplicità di fattori, molti dei quali non riguardano per niente le potenzialità del seme stesso.

Si può affermare che l'efficienza del seme ai fini della capacità di fecondare è di natura poli-fattoriale.

I fattori coinvolti sono: ANIMALE, AMBIENTE, UOMO.

Lo scopo di quest'intervento vuole essere quello di focalizzare l'attenzione sui fattori condizionanti la potenziale fertilità del seme, l'impostazione prettamente pratica è voluta per cercare di dare un contributo a chi nella pratica esercita, inoltre per accentuare l'importanza della corretta gestione del seme da parte degli operatori, ai fini della fertilità.

Vi sono numerosi parametri per valutare o meglio cercare di valutare la potenziale fertilità del seme, su questi, i fattori prima menzionati possono influire in maniera determinante.

Perché dico cercare di valutare, perché il grosso problema che hanno tutti i centri di produzione seme, specie qui in Italia, è quello di non avere dati sull'effettiva capacità di quel seme, di quel soggetto di fecondare. Succede perché non abbiamo dati di ritorno dal campo, o meglio i dati sono pochi, spesso imprecisi, non epurati dalla variabilità.

Questo limita molto la ricerca, dobbiamo infatti tenere sempre presente che l'unica prova che ci permette di determinare la reale fertilità è quella **BIOLOGICA**.

Abbiamo parlato di parametri di valutazione del seme, vediamo ora quali sono:

- **MACROSCOPICI:** Volume, Colore, PH.
- **MICROSCOPICI:** Concentrazione, Motilità, Vitalità, Morfologia.

- **Volume:** viene espresso in cc. È variabile da soggetto a soggetto normalmente va dai 2 ai 18 cc. nel toro e dai 15 ai 100 nel cavallo;
- **Colore:** bianco lattescente, o variamente pigmentato per la presenza di: sangue, pus, urina;
- **PH:** in condizioni fisiologiche il range è di 7+/- 0,2;
- **Concentrazione:** si esprime in milioni per ml. Possibilità di conta automatica (citofluorimetro, spettrofotometro, couter caunter), oppure conta con microscopio ottico, previa diluizione 1/50-1/100 a 100-400 ingrandimenti con camera contaglobuli (Thomas, Makler, Bürker);
- **Motilità:** si deve distinguere in totale, progressiva, lineare, circolare, a zig-zag. Si può evidenziare con l'ausilio di un microscopio ottico a contrasto di fase, si ottiene però una valutazione soggettiva da operatore ad operatore. Una valutazione oggettiva la si può avere con l'uso d'attrezzature sofisticate, es. (CASA) Computed Assisted Sperm Analysis (Cell-soft, Hamilton-Thorne);
- **Vitalità:** per determinare la vitalità si fa uso di coloranti intravitali tipo Eosina-Nigrosina, Eosina-anilina blu, oppure di coloranti tipo Diff-Quik, Wright, Giemsa, etc.
- **Morfologia:** le anomalie si riferiscono ai vari segmenti che compongono lo spermatozoo, quindi alla testa, al tratto intermedio, alla coda. Per ogni parte possiamo inoltre riscontrare delle anomalie primarie e delle anomalie secondarie.

Vi sono inoltre una serie di parametri di valutazione di tipo biochimico i quali prendono in considerazione per es. la determinazione dell'attività della SOD (superossido-dismutasi), la quale protegge la membrana plasmatica dagli esiti dei processi ossidativi.

La determinazione del contenuto d'ATP, principale fonte energetica per lo spermatozoo.

La determinazione dell'attività mitocondriale.

Ognuno di questi parametri ha una sua correlazione con la potenziale fertilità del seme ed alcuni di questi vengono da tempo ritenuti essenziali (vedi tavola)

anche a livello degli altri: muscolare, scheletrico, digerente, tegumentario, endocrino, nervoso, etc.

Dal punto di vista culturale noi siamo portati a considerare l'animale per apparati, ed a fare delle valutazioni tipo causa- effetto.

Questo tipo di approccio applicato alle problematiche della

Table 1. A Partial List of Attributes of Sperm Essential for Fertility*

"Acceptable" morphology
Metabolism for production of energy
Progressive motility
Capacity for hyperactivated motility
Membrane lipids
Stabilize plasma and acrosomal membranes
Flippase enzyme activity
Facilitate timely fusion, but not premature fusion of membranes
Membrane proteins
Immunosuppressive factors
Attachment ligands available but masked to prevent premature binding
Acrosome reaction-inhibiting factor
Integral enzymes associated with fertilization
Enzymes modifying membrane glycoproteins
Acrosomal enzymes

*In addition, the genome of the fertilizing spermatozoon may affect embryo development and apparent fertility. The genome package must contain genes needed for development, and lack lethal mutations or extra genetic material altering or inhibiting development.

Reprinted with permission from the *Journal of Andrology* 14:397-406, 1993.

Si parla sempre di correlazioni positive o negative con la fertilità del seme in quanto ad oggi non siamo in grado di determinare con esattezza il peso dei singoli parametri, ed in misura ancora inferiore il loro effetto associativo.

I fattori condizionanti questi parametri abbiamo detto essere: **ANIMALE, AMBIENTE, UOMO.**

Parlando del fattore animale e tralasciando tutte le cause congenite, dobbiamo considerare le patologie che possono interessarlo non solo a livello d'apparato riproduttore ma

fertilità è estremamente fuorviante vista la natura polifattoriale.

Bisogna invece considerare il soggetto nel suo complesso, guardarlo a 360° in modo da trovare le soluzioni per metterlo nelle migliori condizioni fisiche ma non solo fisiche, in modo che possa estrinsecare le proprie attitudini e potenzialità.

Possiamo quindi affermare che per massimizzare la fertilità del seme di un soggetto dobbiamo **massimizzarne il benessere.**

Il concetto di Benessere Animale si lega immediatamente al secondo fattore d'influenza.

L'AMBIENTE, il quale è in grado di modificare sostanzialmente la fertilità del seme di un soggetto sia in positivo sia in negativo.

Per ambiente si deve intendere tutto quello che circonda l'animale ed è in grado di influenzarne il benessere psico-fisico

ALIMENTAZIONE, STABULAZIONE, INTERAZIONE CON GLI UOMINI E CON I PROPRI SIMILI, CLIMA.

Tutto quello che genera stress è negativo analogamente tutto quello che genera benessere è positivo.

Togliere gli agenti stressori non significa creare benessere. **Significa recuperare benessere.**

Noi per massimizzare la fertilità, ma per meglio dire per massimizzare le performance, dobbiamo **creare benessere** e questo si fa:

- controllando il microclima (molti riproduttori specie nei paesi d'oltre Oceano vivono in ambienti condizionati);
- stabulazione (qualità e quantità degli spazi);
- alimentazione specifica anche individualizzata;
- personale addestrato e competente in grado di interagire positivamente con l'animale.

Bisogna cercare di capire il soggetto, parlargli, farlo sentire a proprio agio.

Non dimentichiamoci mai che il processo della riproduzione è fortemente influenzato da stimoli emozionali. E' dimostrato che alcuni operatori influiscono positivamente su alcuni soggetti, mentre ne inibiscono altri.

Discorso analogo vale per i "ruffiani", nei centri è prassi comune cambiare sia gli uni che gli altri per cercar di trovare chi permette al soggetto la massima espressione (le differenze sono apprezzabili).

FATTORE UMANO

L' uomo è anch'esso un fattore determinante, agisce su più livelli:

- 1) sull'animale: inibendo o promuovendo la fertilità intrinseca di un soggetto;
- 2) sull'ambiente: creando o meno benessere;
- 3) sul seme: su due livelli fondamentali della filiera dello stesso: Preparazione, Utilizzo.

Parametri direttamente dipendenti dall' uomo

PREPARAZIONE	PRELIEVO	(pulizia igiene del prelievo)
	LAVORAZIONE	TEMPERATURA
		TEMPI DI LAVORAZIONE
		SCELTA ED USO DEI MESTRUI
		SCELTA DEGLI ANTIBIOTICI DA ADDIZIONARE
		RISPETTO TEMPI DI STABILIZZAZIONE
		PREPARAZIONE DELLA PAILETTE
		CONGELAMENTO (CURVE DI CONGELAMENTO)
STOCCAGGIO (MANTENIMENTO DELLO STATO)		
TRASPORTO	MANTENIMENTO DELLA CATENA DEL FREDDO	
	STOCCAGGIO IN	Pulizia igiene Mantenimento temperatura
UTILIZZO	PRELIEVO DA BIDONE	Uso di pinze
	SCONGELAMENTO O 35°C PER 40 sec.	In acqua
	PULIZIA DELLO STRUMENTARIO	guaine, camice, pistolette)
	PULIZIA DELLA FECONDAZIONE	

Come si può vedere dalla tabella i parametri direttamente dipendenti dall'attività dell'uomo e correlati alla fertilità del seme sono molti e possiamo affermare che preservarlo quanto più possibile significa massimizzarne la fertilità.

Dobbiamo di conseguenza limitare al massimo gli effetti negativi di tipo chimico, fisico e biologico derivanti dalla manipolazione di un liquido che contiene in sé degli elementi morfologici vivi e vitali.

Pulizia ed igiene sono requisiti indispensabili quando si lavora e si utilizza il seme, teniamo presente che i diluitori anche se antibiotati sono degli ottimi terreni di cultura per i batteri.

D'altro canto gli antibiotici che vengono utilizzati per preservare il materiale seminale hanno per contro una componente spermiotossica.

La temperatura ed il tempo sono probabilmente i due parametri che più incidono sulla fertilità del seme, il loro rapporto varia a seconda delle fasi:

- a) lavorazione 37 C° nel più breve tempo possibile (maggiore è il tempo maggiore è il consumo di ATP);
- b) stabilizzazione, 4 C° per tempi che variano a seconda del tipo di extender;
- c) congelamento, vi sono numerose curve di congelamento, cioè rapporti di abbassamento della temperatura nell'unità di tempo; la migliore non esiste. Si deve cercare quella che meglio si adatta al centro di produzione minimizzando i danni fisici della crioconservazione;
- d) stoccaggio, la temperatura deve essere mantenuta costante nel tempo;
- e) scongelamento, 35-37 C° per 40 sec. sono i tempi consigliati, a 35 C° in 40 sec. la paillette (media) arriva a 20 C°, a 37 C° la stessa temperatura viene raggiunta in 16 sec.

Dato l'elevato rapporto superficie/volume la velocità di scongelamento è sempre molto alta, generalmente più veloce è lo scongelamento minori sono i danni agli spermatozoi.

E' imperativo sottolineare che una volta iniziato l'abbassamento o l'innalzamento della temperatura il percorso deve essere unidirezionale.

Concludendo possiamo dire che il rapporto temperatura/tempo è uno dei più semplici ed importanti fattori in mano all'uomo per massimizzare la fertilità del seme.

4. Bellin, M.E., Hawkins, H.E., Ax, R.L., 1994. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J. Anim. Sci.* 72, 2441-2448.
5. Bottarelli F.; (1989) – Lo stress: problematiche nei bovini da riproduzione. *Atti Soc. It. di Buiatria XXI congresso.*
6. Coleman, D.A., Dailey, R.E., Leffel, R.E., Baker, R.D., 1987. Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *J. Dairy Sci.* 70, 858-866.
7. Coulter, G.H., Oko, R.J., Costerton, J.W., 1986. Ultrastructure of "crater" defect of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 9, 165-168.
8. Courot, M., Colas, G., 1986. The role of the male in embryonic mortality cattle and sheep. In: Greenan, J.M., Diskin, M.G. Eds., *Embryonic Mortality in Farm Animals*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 95-203.
9. Dalton, J.C., Nadir, S., Degelos, S., Bame, J.H., Saacke, R.G., 1994. Effect of cream added to the inseminate on accessory sperm number in cattle. *J. Anim. Sci.* 72, 172, Suppl. 1.
10. Kilgour R.; (1969) – Social behaviour in the dairy herd. *New Zeal. vol. 119 J. Agric.*
11. Levine S.A.; (1985) – Definition of stress. In: *Animal stress*. Editore Gary P. Moberg. American Physiological Society-Bethesda, Maryland USA.
12. Locatelli A.; (1989) – Lo Stress: aspetti generali e riflessi metabolici nei bovini trasportati. *Atti Soc. It. di Buiatria XXI congresso.*
13. Monty D.E. et al.; (1974) – Summer heat stress and reduced fertility in Holstein Friesian cows in Arizona. vol 35 *J. Vet. Res.*
14. Siegel H.S.; (1987) – Effects of behavioural and physical stressors on immune responses. In: *Biology of stress in Farm Animal*. vol 42 Editori P.R. Wiepkema e P.W.M. van Adrichem, *Curr. Top J. Vet. An. Sci.*

BIBLIOGRAFIA

1. Ax, R.L., Bellin, M.E., Hawkins, H.E., 1996. Utility of measuring seminal heparin binding protein to predict fertility of cattle. In: *Proc. 16th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod.* Nat'l Assoc. Animal Breeders, Columbia, MO. pp. 61-64.
2. Ballachey, B.E., Evenson, D.P., Saacke, R.G., 1988. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.* 9, 109-115.
3. Barth, A.D., 1992. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: *Proc. 14th Tech. Conf. on*

Programma Siet 2006

*20 e 21 ottobre 2006 a Sondrio, in località Morbegno,
presso l'Azienda agrituristica La Florida (<http://www.laflorida.com>).*

Venerdì 20/10/06

ore 8,30 iscrizione congresso

ore 9,30 Gestione della ricevente nel trapianto embrionale: varie metodiche nella sincronizzazione del calore
R. Mapletoft

ore 11,00 Coffee break

ore 11,30 Sincronizzazione delle ondate follicolari allo scopo di ottimizzare la risposta superovulatoria nella vacca da latte
R. Mapletoft

ore 13,00 Pausa Pranzo

ore 14,30 Attività biologica delle gonadotropine usate nella superovulazione della vacca da latte.
R. Mapletoft

ore 16,00 Coffee break

ore 16,30 La valutazione/classificazione IETS degli embrioni: questionario su 50 immagini di embrioni bovini
G. Lazzari

ore 18,00 Assemblea soci

ore 20,30 Cena sociale

Sabato 21/10/06

ore 9,00 Riassorbimenti embrionali precoci: diagnosi ecografica
G.Gnemmi

ore 10,30 Coffee break

ore 11,00 Correlazione tra parametri metabolici e riassorbimenti embrionali precoci
G.Gabai - O.Barbato

ore 13,00 Pausa Pranzo

ore 14,30 **Comunicazioni libere**

ore 17,00 Chiusura lavori