UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in

Medicina Veterinaria

# Studio sulla fertilità bovina: individuazione del background genetico di caratteri rilevati mediante metodiche ET e OPU

## Bovine fertility study: identification of the genetic background of characters detected by embryo transfer and ovum pick up methods

Relatore:

Prof. Alberto Sabbioni

Correlatori:

Dott.ssa Michela Ablondi

Dott. Pierluigi Guarneri

Laureando:

Sandro Pelosi

**Anno accademico 2020/2021**

# Sommario

ABSTRACT ..... 3
ABSTRACT IN INGLESE ..... 4
INTRODUZIONE ..... 5
MATERIALI E METODI ..... 12
Elaborazione del database per la raccolta dati e descrizione degli aspetti presi in considerazione ..... 12
Embryo Transfer: metodologia operativa ..... 14
Esame ecografico: controllo della dominanza follicolare ..... 16
Trattamento Super Ovulatorio: schema generale utilizzato ..... 17
Operazione di Flushing ..... 21
Valutazione degli embrioni ..... 22
Ovum Pick Up Metodo operativo ..... 25
Analisi statistica dei dati ..... 29
Statistica descrittiva e rappresentazione grafica delle possibili differenze fra gruppi di animali. 29
Stima dei parametri genetici ..... 29
Genome Wide Association Study (GWAS) ..... 30
RISULTATI E DISCUSSIONE ..... 31
CONCLUSIONI ..... 43
BIBLIOGRAFIA ..... 44

# ABSTRACT

La fertilità è un carattere di fondamentale importanza per l'economia aziendale dell'allevamento bovino da latte. Si hanno risvolti negativi quando performance riproduttive sono inefficienti o non rispondenti alle esigenze attese, a fronte degli ingenti sforzi economici messi in atto, i quali difficilmente potranno essere ammortizzati con una gestione non ottimale della riproduzione. L'industria zootecnica usa sempre più frequentemente tecniche di riproduzione assistita per la produzione di embrioni *in vivo* tramite *Multiple Ovulation Embryo Transfer* (MOET) per effettuare *Embryo Transfer* (ET) o produzioni embrionali *in vitro* tramite di *In Vitro Fertilization* (IVF) per l'attività di *Ovum Pick Up* (OPU). Lo studio tramite approcci *genome-wide association studies* (GWAS) dei caratteri rilevati tramite tecnica ET e OPU è stata utilizzata in questo elaborato di tesi per determinare quali regioni del genoma bovino potessero essere associate a questi caratteri di fertilità. Tramite lo sviluppo di un modello statistico è stato inoltre possibile valutare quali aspetti ambientali e dell'animale avessero un effetto statisticamente significativo durante la raccolta delle osservazioni in campo e quindi durante l'attività di produzione e trapianto embrionale. Lo studio, durato 3 anni, ha messo in mostra come le pluripare determinano una produzione embrionale quantitativamente maggiore delle manze, ma qualitativamente inferiore a quest'ultime, mentre la qualità oocitaria per l'aspirazione follicolare potrebbe essere influenzata dallo status in cui si effettua l'operazione. Inoltre, i risultati preliminari dello studio GWAS hanno identificato una regione nel cromosoma 11 come potenzialmente associata alla maturazione embrionale; probabilmente per una regione sul cromosoma 10 si potrebbe avanzare un ipotetico ruolo regolatore sulla qualità del materiale embrionale, mentre due regioni sul cromosoma 1 e 4 sembrerebbero svolgere attività di maturazione follicolare. Ulteriori approfondimenti sono necessari per valutare il potenziale utilizzo della selezione genomica su questi nuovi caratteri di fertilità identificati grazie a queste tecniche di riproduzione assistita.

# ABSTRACT IN INGLESE

Fertility is a trait of fundamental importance for the business economy of dairy cattle breeding. There are negative implications when reproductive performance is inefficient or does not meet expectations, in the face of the enormous economic efforts put in place, which can hardly be amortized with a non-optimal management of reproduction. The livestock industry increasingly uses assisted reproduction techniques to produce embryos in Vivo through Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET) to carry out Embryo Transfer (ET) or embryonic productions in Vitro through In Vitro Fertilization (IVF) for the Ovum Pick Up (OPU) activity. The application of genome-wide association studies (GWAS) on those new phenotypes collected with ET and OPU techniques was considered to determine which region of the bovine genome could be associated to fertility. Via the development of a statistical model, it was also possible to evaluate which animal and environmental factors influenced the traits during the collection of observations in the field and during the activity of production and embryonic transplantation. The study, which lasted 3 years, has shown how the multiparous cows produce a quantitatively greater embryonic production than the heifers, but qualitatively lower than the latter, while the oocyte quality for follicular aspiration could be influenced by the status in which the operation was performed. Furthermore, the results could indicate that a region on BTA11 is potentially responsible for embryonic maturation, and probably for a region on BTA10 a hypothetical regulatory role on the quality of the embryonic material could be advanced, while two regions on BTA1 and BTA4 seem to carry out follicular maturation activity. Further studies are needed to evaluate the potential application of genomic selection for those novel phenotypes associated to fertility.

# INTRODUZIONE

In ambito zootecnico, uno dei fattori che maggiormente condiziona la produttività aziendale è la fertilità della mandria. Quest'ultima è uno dei caratteri funzionali più importanti della selezione nella specie bovina, in quanto da essa ne deriva una consapevole gestione dei costi e dei ricavi aziendali. Per esemplificare quanto detto si pensi all'effetto di una drastica riduzione di questo carattere sulle tempistiche e sul controllo programmato della riproduzione degli animali governati: minor fertilità significa tempi di inter-parto più lunghi, che possono portare ad un maggior tasso di riforma ed un aumento dei costi per la rimonta stessa dell'azienda (*Canavesi, Frigo, Samorè, Bagnato, 2013*).

La fertilità è un carattere complesso, in quanto formato dall'insieme delle misure direttamente legate alla fertilità stessa e da caratteri indiretti non legati ad essa, ma geneticamente correlati. La fertilità è un carattere che risente di quella che viene chiamata depressione da consanguineità. La consanguineità aumenta l'omozigosi genomica e può portare a depressione per quei caratteri di fitness, chiamati anche a bassa ereditabilità, che più risentono della riduzione della varianza genetica non additiva (*Falconer e Mackay, 1996*). Oltre ad aspetti puramente genetici sappiamo anche che la fertilità è influenzata da aspetti prettamente gestionali e manageriali dell'azienda. Possiamo dunque affermare che la gestione della fertilità richiede un approccio sistematico su più fronti, la quale deve necessariamente convogliare gli sforzi messi in atto verso un unico obiettivo: migliorare le performance riproduttive. In questo quadro si capisce che è necessario l'intervento coordinato di più specialisti e di un management che possa garantire una solida gestione e stabilizzazione dei risultati sulla mandria, il tutto per garantire che uno dei caratteri più

difficilmente gestibili in azienda possa essere il più possibile costante nel tempo, a beneficio degli interessi di tutti i compartecipanti che operano al suo miglioramento.

Una delle sfide, cui è chiamato il medico veterinario che si occupa di buiatria, è quella di continua ricerca ed innovazione della pratica clinica ginecologica, ma soprattutto di trasferire conoscenze sempre aggiornate all'allevatore per far sì che si possano introdurre strumenti alternativi alla consueta gestione riproduttiva, sistemi quest'ultimi che dovranno dimostrarsi efficaci in campo e particolarmente affidabili ed adattabili alla mandria in questione: il risultato sperato sarà quello di migliorare gli aspetti riproduttivi e di conseguenza le prospettive produttive che ne derivano. D'altro canto, la genomica ha un ruolo di primaria importanza per la valutazione e selezione dei caratteri che maggiormente corrispondono agli interessi degli allevatori.

La rivoluzione della selezione genomica è iniziata con l'avvento di due principali eventi. Il primo è stato il sequenziamento del genoma bovino avvenuto per la prima volta nel 2009, e che ha portato alla scoperta di molte migliaia di marcatori del DNA, sotto forma di SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). In concomitanza con la scoperta di numerosi marcatori SNPs, si è verificata una drastica riduzione del costo della genotipizzazione che ha portato oggigiorno all'introduzione di questa tecnica a livello di routine in allevamento. Il secondo evento è stato l'utilizzo di informazioni genomiche nello sviluppo degli indici di selezione e quindi lo sviluppo di una selezione basata anche sulle informazioni genomiche (*Meuwissen et al., 2001*). La selezione genomica si riferisce alle decisioni di selezione basate su indici genetici genomici (GEBV). I GEBV sono calcolati come la somma degli effetti di marcatori genetici densi, o aplotipi di questi marcatori, sull'intero genoma, catturando così potenzialmente tutti i loci associati ai caratteri quantitativi (QTL) che contribuiscono alla variazione di un fenotipo di interesse (*Hayes, Bowman, Chamberlain, Goddard, 2008*). Ne deriva che l'importanza dei miglioramenti in campo genomico

e l'accuratezza degli indici riferibili alla fertilità derivati dalla selezione genomica debbano passare da nuovi approcci metodologici per la quantificazione, gestione e selezione del carattere in questione.

Questo studio si propone di utilizzare l'analisi congiunta di dati genetici con due delle tecniche di produzione embrionale: IVD (*in vivo derived*) per quanto concerne la metodologia tramite l'utilizzo della *Multiple Ovulation Embryo Transfer* (MOET) e IVP (*in vitro production*) per *Ovum Pick Up* (OPU), cercando di andare a comprendere quali regioni genomiche siano associate a nuovi caratteri di fertilità, con l'obiettivo a lungo termine di sopperire ai problemi riproduttivi che hanno caratterizzato realtà economiche ad elevata intensità produttiva con una selezione genetica embrionale mirata.

Il presupposto da cui è partito questo lavoro è riferibile alla pratica di trapianto embrionale, durata tre anni, durante i quali è stata effettuata attività di ricerca e raccolta dati in campo nel corso di operazioni di ET e OPU su bovine da latte allevate in condizioni ambientali e gestionali molto simili. Il lavoro di raccolta dati si è concentrato esclusivamente su animali definiti *"Donatrici",* capi cioè sottoposti a protocolli terapeutici per la pratica ET che ne permettono la massima espressione dell'attività ovarica, potenziando il rilascio di un maggior numero di oociti durante il periodo estrale rispetto al normale ciclo ovarico, per poi essere fertilizzati ottenendo un numero notevole di nuovi embrioni. Per quanto concerne gli animali sottoposti a OPU, invece, le aspirazioni follicolari si sono applicate su un'ampia gamma di situazioni fisiologiche e/o patologiche, senza l'impiego di terapie super ovulatorie, con una maggior versatilità di impiego. L'ampia variabilità di risposta dei singoli soggetti sottoposti alle medesime pratiche di governo, e agli stessi trattamenti farmacologici di super ovulazione (SO) o di andamento delle ondate follicolari per OPU ci hanno portato ad ipotizzare una possibile componente genetica in quanto gli

esiti individuali si sono rilevati estremamente variabili quando comparati fra di loro durante le diverse attività di campionamento. A titolo di esempio, abbiamo notato bovine scelte per queste ultime pratiche con quadri ovarici ideali per entrambe le procedure ed allevate nei medesimi vincoli gestionali con esiti eccezionali (25-30 embrioni a sessione per ET e 5 embrioni di media dopo procedure di IVF) accanto ad altre, con risvolti di scarsa risposta ovarica, e di conseguenza con una produzione embrionale insufficiente per soddisfare i presupposti di coloro i quali si rivolgono all'utilizzo del trapianto embrionale per incrementare positivamente i parametri riproduttivi aziendali. Questa situazione ci ha permesso di supporre l'esistenza di fenomeni non ancora noti probabilmente di natura genetica che condiziona la fertilità bovina e la determinazione dell'entità riproduttiva, portando ad una risposta estremamente variabile per ora non quantificabile. Dunque, l'obiettivo principale del lavoro è stato quello di comprendere meglio il background genetico di nuovi fenotipi raccolti tramite tecniche ET e OPU. A questo proposito, sono stati stimati parametri genetici e si sono individuate regioni genomiche attraverso studi di *Genome wide Association Analysis* (GWAS) potenzialmente associate a questi nuovi caratteri.

Segue ora una breve descrizione delle innovative metodiche utilizzate per la raccolta dati di questo studio. La prima tecnica che prendiamo in considerazione e che viene spesso utilizzata è *l'Embryo Transfer* (ET) pratica utilizzata nelle aziende zootecniche da più di quarant'anni *(Atti congressi annuali S.I.E.T Società Italiana Embryo Transfer 2008)*. Il ricorso all'utilizzo di questa procedura biotecnologica deriva essenzialmente dai programmi di selezione spinti dalla genomica, anche se l'impiego del seme sessato e *l'Embryo Therapy*, cioè il trasferimento embrionale per incrementare la fertilità aziendale ha reso ET un punto fondamentale nella gestione della riproduzione. Procedure affinate con il tempo e i materiali monouso hanno reso questa operazione veloce, sicura sotto il profilo sanitario rispetto alle tecniche invasive utilizzate a partire dalla metà degli anni

Sessanta, e soprattutto competitive nei confronti delle procedure standard di fecondazione artificiale (FA) tradizionali. A conferma di quanto esposto, è sufficiente valutare come questa pratica sia sempre più diffusa e in aumento a livello continentale. Dati ufficiali dell'Association of Embryo Technology in Europe (AETE) riferibili all'anno 2020 riportano un numero di *flushing* eseguiti a livello continentale di 20236, con 126491 embrioni trasferibili e con una media di 6.2 materiale embrionale trasferibile per *flushing*. Qui ci si riferisce ad un quadro della comunità europea, che se riportato al solo territorio nazionale porta l'Italia ad essere tra le prime posizioni per numero di embrioni trasferiti per operazione di flushing: in media 7.1 embrioni classificati come trasferibili per ogni operazione di flushing *(1.https://www.aete.eu/publications/statistics/).*

A controprova di quanto esplicitato, basti pensare che nel 2010 la stessa associazione europea dichiarava una media di 6.2 embrioni trasferibili in Italia, e se a distanza di dieci anni un incremento migliorativo di un embrione a flushing possa avere connotati poco incoraggianti rapportato al tempo intercorso, si invita ad un ragionamento su due fronti. Il primo è quello che c'è un forte segnale che l'insieme delle tecniche e delle procedure operative per effettuare un buon ET sono più che mai consolidate, diventando sempre più affidabili anche a fronte delle diverse condizioni fisiologiche dell'animale su cui si sta operando (*Gnemmi 2010*). La seconda riguarda una valutazione non prettamente quantitativa del numero di embrioni prodotti, ma in termini qualitativi, dove questo miglioramento dilazionato sul lavoro di ET continentale ha portato ad un miglioramento significativo del *conception rate* (CR) totale, soprattutto se utilizzato come prima scelta su vacche fresche. (*AA.VV.; Atti congressi annuali S.I.E.T Società Italiana Embryo Transfer 2008*)

Per quanto riguarda la seconda procedura di produzione embrionale ci riferiamo alla *In Vitro Pruduction* (IVF) da cui deriva l'operazione di prelevamento oocitario *Ovum Pick Up* (OPU) dove

il vantaggio significativo è sicuramente la versatilità di intervento su animali in situazioni produttive differenti. La IVF non prevede la somministrazione di terapie ormonali, ma dove queste vengono espressamente richieste, si determinano al rialzo le performance individuali e il recupero di un maggior numero di oociti senza determinare alterazioni al ciclo estrale della donatrice (*Galli 2010).*

Si può operare su bovine di 6 mesi, addirittura in letteratura sono riportati lavori eseguiti in laparoscopia a 2 mesi di vita (*Baldassarre, Vilceu, Bordignon 2018),* con un aumento della pressione selettiva di mandria (*Ferré et al.,* 2019), fino a bovine di 9 anni di età ed oltre. Gli animali possono trovarsi in fasi di lattazione o di asciutta, ma anche in stato di gravidanza che ricade nel primo trimestre di gestazione. Un'altra possibilità di intervento dove la procedura di OPU si rileva un'alternativa essenziale all'incremento della produzione embrionale è la possibilità di recuperare animali con determinati stati patologici ovarici come in casi di degenerazione cistica, rivalutando in positivo il destino produttivo della bovina scelta per la donazione di oociti. L'estrema flessibilità della tecnica ha sovvertito le dinamiche di produzione mondiale di embrioni, dove il sistema in vitro è il metodo che quantitativamente domina il settore a partire dal 2016. (*João Henrique Moreira Viana et al. 2017*)

Dunque il lavoro parte con una chiara consapevolezza che fenomeni di varia natura influiscono sulla fertilità, in quanto le tecniche sopradescritte hanno una notevole capacità di esaltazione delle potenzialità riproduttive delle bovine sottoposte a tali pratiche, ma ne determinano anche i limiti riconducibili a scarse risposte ovariche indotte da risentimenti fisiologici non ottimali per la produzione embrionale, dove i fattori specifici di queste situazioni devono necessariamente passare al vaglio degli operatori per ottimizzare le produzioni. È presupponibile che la diminuzione di questa variabilità porti ad una armonizzazione dei risultati quali/quantitativi delle pratiche ET e

OPU, ma soprattutto consolidino il fattore costanza nell'utilizzo quotidiano delle pratiche stesse. È comunque imprescindibile l'utilizzo e il contributo di un'analisi genetica accurata, da utilizzare come elemento di predilezione per la scelta dell'animale su cui si possono ponderare le aspettative migliori in termini di produzioni embrionali. In conclusione, l'utilità pratica dello studio ricade nel realistico utilizzo delle tecniche biotecnologiche oggetto di studio supportate da studi genomici per incentivare una selezione più mirata ed attenta ad aspetti di fertilità.

# MATERIALI E METODI

*Elaborazione del database per la raccolta dati e descrizione degli aspetti presi in considerazione*

Per lo studio in questione sono stati creati due database per la raccolta dei dati di campo: uno per gli animali sottoposti a Embryo Transfer (ET) ed uno per i capi impiegati per la pratica di Ovum Pick Up (OPU). Le parti comuni ad entrambi i sistemi di classificazione sono la data di esecuzione delle rispettive operazioni, la razza di appartenenza dell'animale, il numero complessivo di animali allevati nell'allevamento e le relative matricole sanitarie per l'individuazione degli animali sottoposti a genotipizzazione con relativa analisi disponibile in banca dati ANAFIBJ. Inoltre, alcuni aspetti che riportano alle caratteristiche ambientali delle strutture sono stati presi in considerazione quali il tipo di raffrescamento, numero di operatori impiegati nelle mansioni e, dove sia stato possibile, il tenore di proteine contenuto nella razione animale. Quest'ultimo dato è stato comunque complicato da registrare, in quanto la variazione di dieta durante l'arco di tempo a cui questo studio fa riferimento è stata estremamente variabile e adattata a quelle esigenze di varia natura che irrompevano nel corso del periodo di produzione degli animali.

Per quanto riguarda il database di *Embryo Transfer* sono state aggiunte le seguenti informazioni:

- Numero complessivo di embrioni dopo *flushing*
- Numero di embrioni effettivamente utilizzabili sia per trapianti in fresco, sia per le procedure di congelamento
- Rapporto percentuale Embrioni Totali / Embrioni Utilizzabili

- Classificazione degli embrioni secondo le modalità della International Embryo Technology Society (IETS) riportando inoltre nella sezione "commenti" il quantitativo di embrioni degenerati e oociti non fecondi.
- Il seme del toro utilizzato per le fecondazioni
- Tipo di seme: convenzionale o sessato e relativo nominativo del toro

Per le operazioni di Ovum Pick Up il database è articolato in maniera simile al precedente, ma essendo quest'ultima un'operazione prettamente di estrazione oocitaria, la classificazione si è concentrata molto sull'aspetto morfologico dei follicoli aspirati e dei risultati finali dopo fertilizzazione *in vitro* (IVF). La qualità è uno dei fattori presi maggiormente in considerazione per procedere con le procedure di IVF, in quanto diverse variabili hanno la capacità di determinare la performance della tecnica: razza, età della donatrice, stato fisiologico, riproduttivo, metabolico, nutrizionale, condizione del follicolo, diametro dell'oocita, ambiente esterno *(Camargo et al 2006).* Quindi i dati presi in considerazione seguono una classificazione arbitraria dettata dall'esperienza del gruppo che ha effettuato la raccolta, dove questo aspetto gioca un ruolo di cruciale importanza per la conferma dell'affidabilità delle procedure messe in atto e dei risultati ottenuti. Dunque, il database per OPU si articola con i seguenti parametri:

- Lo stato produttivo dell'animale: se in stato di gravidanza/asciutta o in fase anaestrale.
- Numero totale di follicoli prelevati mediante aspirazione
- Numero di follicoli con cumulo oocitario compatto (COCS)
- Numero di follicoli con corona presente (COR)
- Numero di follicoli denaturati (DEN)
- Numero di follicoli degenerati (DEG)

- Numero di embrioni totali prodotti dopo fertilizzazione in vitro e relativa qualità secondo le regole IETS
- Rapporto totale tra follicoli recuperati ed embrioni prodotti
- Tipo di seme utilizzato: convenzionale o sessato e relativo nominativo del toro.

*Embryo Transfer: metodologia operativa*

Il punto nevralgico dell'operazione di ET è la scelta della donatrice, dove queste ultime sono state sottoposte ad un'accurata analisi ecografica della situazione ovarica prima di cominciare il piano terapeutico di super ovulazione (SO). Fisiologicamente il metaestro è il periodo migliore per la scelta di una buona donatrice, in quanto l'influenza negativa di un follicolo/i dominante/i (FD) secernente inibina non grava sul quadro ovarico, ed ecograficamente si trovano solo follicoli coortali, target del trattamento di SO, e corpo emorragico (CE) o corpo luteo (CL) in fase di formazione. Inoltre, il management gioca un ruolo cruciale: la gestione della donatrice deve essere effettuata in modo ottimale, in quanto quest'ultima potrebbe risentire di fattori condizionanti tali da inficiare una corretta risposta super-ovulatoria (soprattutto se l'animale dovesse restare in mandria), è dunque più che necessario avere un occhio di riguardo da parte dell'allevatore nella gestione dell'animale scelto. Fare ricadere la scelta su animali che abbiano caratteristiche corrispondenti alle esigenze aziendali ricercate determina la motivazione principale per cui ci si affida a ET, dove il merito genetico di questi soggetti giustifica l'impiego della pratica su animali ad alto valore genetico volti ad aumentare quella che è la pressione selettiva della mandria. Quindi la prima categoria di animali valutati da questo studio e sottoposti a ET sono proprio i sopraccitati soggetti ad alto valore genetico, di età dai 9 ai 13-14 mesi. Spesso le si sono ritrovate separate dal

resto del gruppo per motivi prettamente pratici e di facilitazione operativa dell'intervento, oltre a migliorare tutti gli aspetti ambientali che potrebbero determinare negativamente il risultato dell'operazione. L'alimentazione somministrata è stata prevalentemente ricca di fibra e non eccessivamente carica di concentrati: questa formulazione garantisce un'azione mitigante per la durata del trattamento, favorendo una digestione ottimale senza sovraccaricare i processi metabolici impegnati all'equilibrio fisiologico ovarico, comunque già in stato di "*overloading*" indotto dal trattamento SO.

La seconda categoria presa in analisi è caratterizzata dalle bovine esclusivamente indicate dall'allevatore per incrementare e/o migliorare la situazione del *Conception Rate* (CR) aziendale. L'obiettivo in questo caso è stato esclusivamente quello di aumentare i tassi di concepimento; dunque, la scelta della donatrice non ha seguito particolari accorgimenti. Fermo restando che gli animali sottoposti all'operazione devono avere obbligatoriamente un'adeguata situazione ovarica per l'inizio della pratica, l'animale opzionato deve avere un body condition score (BCS) ottimale, attorno al 2.5-3. Inoltre si è resa necessaria un'ulteriore valutazione del tempo intercorso dall'ultimo parto dove si è cercato il più possibile di evitare situazioni compromettenti che potessero influenzare negativamente la scelta della donatrice, evitando di far ricadere l'opzione di utilizzo di quei soggetti che hanno presentato uno stato metabolico fortemente influenzato dai 90-120 gg giorni *post partum*, i quali risentono fortemente del periodo di transizione e influenzando negativamente l'ottimizzazione degli effetti ormonali indotti dalla SO *(Guarneri 2010).*

*Esame ecografico: controllo della dominanza follicolare*

Passiamo in rassegna ciò che all'esame ecografico è stato fondamentale valutare. Dopo l'estro, la conta follicolare delle strutture oocitarie maggiori di 2-3 mm hanno rappresentato un'ottima coorte di follicoli da stimolare sotto effetto del FSH esogeno. Il periodo preso per questa valutazione è la fase di metaestro: quindi si avrà l'effetto negativo del follicolo dominante (FD) ma il quadro ecografico sarà riportabile esclusivamente alla presenza di follicoli coortali sopra citati e dal corpo luteo (CL) o eventualmente al corpo emorragico. Segue dunque una fase di controllo della dominanza follicolare da parte della donatrice. Quanto è stato fatto durante le operazioni di ET segue i meccanismi fisiologici della dinamica ovarica bovina, e di conseguenza possiamo esemplificare questi eventi e gli interventi associati ad essi come segue: nelle bovine a due ondate follicolari, ogni singola ondata è preceduta da un picco di FSH , necessario per il reclutamento follicolare. Un paio di follicoli si presume diventino dominanti, svilupperanno recettori per LH e secerneranno inibina ed estradiolo, questi ultimi elementi ormonali indispensabili per produrre un feed back negativo sulla secrezione ipofisaria di FSH. Dunque, i restanti follicoli del pool andranno incontro ad atresia. Quindi si è proceduto con un controllo sistemico del/dei FD tramite due metodiche: la prima è stata l'aspirazione meccanica tramite un aspira cisti dei FD. Questi dovranno necessariamente avere una dimensione superiore ai 5-8 mm, in modo che nelle 48 ore successive si possa avere un picco endogeno di FSH, il quale lavorerà alla crescita dei follicoli di piccole dimensioni. La seconda ha previsto un trattamento farmacologico con *GnRH,* dove il ruolo primario di questo ormone è quello di agire attraverso meccanismo recettoriale su follicoli maggiori di 8 mm; la seconda ondata ovulatoria si ripresenterà indicativamente dopo 48h. Chiaro dunque che dopo l'avvenuta ovulazione del FD si formerà un corpo luteo (CL) il quale secernerà

progesterone, fondamentale ed indispensabile per l'emergenza della nuova ondata su cui si andrà a lavorare con il trattamento farmacologico di Super Ovulazione (SO). Nel caso si sia un utilizzato il dispositivo PRID® DELTA a lento rilascio di progesterone è stato possibile ovviare al problema di animali che hanno discrepanze temporali con il ciclo ovarico e il periodo di osservazione tramite ecografia (animali fuori ruota). Migliore sarà il controllo della dinamica follicolare, migliori saranno le performance attese, e meglio ancora una gestione ottimale di più donatrici nel medesimo periodo. (*Guarneri, 2013*). Si parte quindi con uno schema di super ovulazione da sottoporre alla donatrice. La valutazione ecografica della situazione ovarica di quest'ultima è stata effettua dai 7 ai 10 giorni dopo le manifestazioni estrali, essenzialmente per due motivi: verifica di assenza di patologie all'apparato riproduttore e impostazione adeguata della Superovulazione (SO). Il quadro fisiologico riscontrato più frequentemente è quello di una bovina che presenta la seguente situazione: presenza di CL cavitario o compatto, FD della prima ondata ovulatoria, generalmente in una situazione di plateau e il secondo FD in fase iniziale di crescita. In alcuni casi è riportabile casi di co-dominanza. Molto accurata è stata l'analisi della cosiddetta "mappa follicolare", perché su questa si prognostica l'efficacia della risposta ormonale indotta dal trattamento SO.

*Trattamento Super Ovulatorio: schema generale utilizzato*

Lo schema di somministrazione dei farmaci utilizzati per SO segue il seguente procedimento: le molecole sono gonadotropine FSH-LH di estrazione suina, iniettate per via intra muscolare a dosi decrescenti per 8-10 iniezioni ogni 12 ore (si parte da 3 ml fino ad arrivare a 0.5 ml dell'ultima inoculazione). Il trattamento della donatrice inizia dal nono al 13° giorno dopo il ciclo estrale. Successivamente, alla settima iniezione di FSH-LH si somministra una prostaglandina. Questa inoculazione è giustificata dal raggiungimento dell'obiettivo che pone la somministrazione del

piano terapeutico, e cioè quello di un ritorno in estro della donatrice dopo 48 h dalla PGF2alfa con conseguente fecondazione che opera direttamente l'allevatore. Dunque, a ***sette giorni*** dal calore indotto dalla SO si può eseguire l'operazione di flushing e valutazione degli embrioni prodotti.

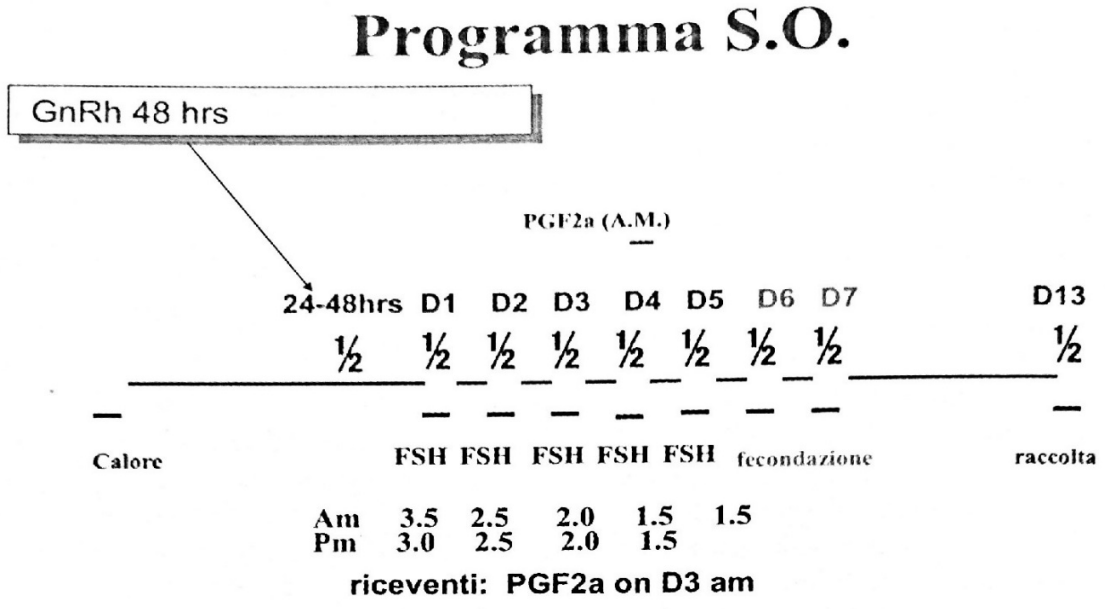


**Figura 15.14** - Protocollo di superovulazione con l'utilizzo del GnRH.

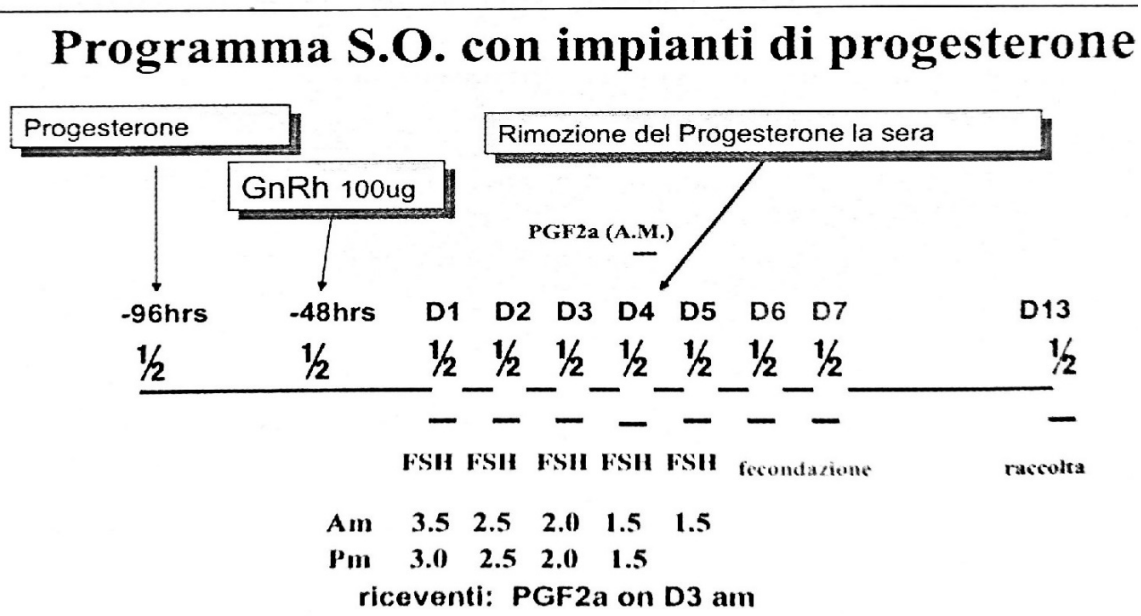


Figura 1: schema trattamento super ovulatorio utilizzo di dispositivo a lento rilascio di progesterone + GnRH, *per gentile concessione da parte del Dott. G. Guarneri "Gestione clinica della riproduzione bovina" pagina 486*

La scelta del seme per la fecondazione delle bovine ha seguito le logiche delle necessità aziendali, prettamente dettate da esigenze riguardanti questioni organizzative e dei tempi lavorativi. Analizzando brevemente le motivazioni della scelta di seme convenzionale o sessato, durante le operazioni di flushing eseguite possiamo dire che l'utilizzo del convenzionale (20-25 milioni di spermatozoi) con due fecondazioni ripetute a distanza di 12-14 ore l'una dall'altra sono state più che sufficienti a determinare risultati soddisfacenti, con 4-5 embrioni per donatrice. Fondamentale è stato il rispetto del tempo di attesa di 12 ore dalle manifestazioni estrali alla prima FA per potenziare i processi di capacitazione, favorendo le migliori condizioni per la corretta avvenuta delle reazioni acrosomiali degli spermatozoi e dunque aumentare quelle che sono le possibilità di concepimento di un numero maggiore di embrioni. Con l'utilizzo di seme sessato (2-3 milioni di spermatozoi manipolati) è stata necessaria un'attenzione maggiore alle tempistiche, giustificando questo aspetto per due motivi principali. Il primo è che il processo di sessaggio degli spermatozoi non necessita di tempi di attesa per l'avvento di reazioni acrosomiali da parte di quest'ultimi, essendo già pre-capacitati, dunque la FA può avvenire anche a 18 ore dall'inizio di manifestazioni estrali, ma il secondo motivo costringe un'operazione più vincolata al tempo , in quanto il numero esiguo di spermatozoi del seme sessato impone che le successive FA siano eseguite a 5-6 ore dalla prima per aumentare la concentrazione dei pochi spermatozoi disponibili nel momento dell'ovulazione. I risultati ottenuti in letteratura sono molto confortanti: 7.8 embrioni trasferibili con seme convenzionale rispetto ai 4.6 del seme sessato *(Guarneri, 2013)*. D'altro canto, il guadagno di una femmina per flushing con seme sessato è stato evidente, in quanto quest'ultimo è in grado di garantire un 90% di spermatozoi che portano un cromosoma X, determinando scelte quantitative sulla mandria di rimonta.

*Operazione di Flushing*

L'operazione di lavaggio uterino, o *Flushing,* è stato eseguito di norma in postazione abituale, in alcuni casi l'animale è stato sistemato in un travaglio per bovini facilitando il contenimento dello stesso e garantendo la sicurezza dell'operatore durante le manovre. La prima operazione effettuata è la somministrazione di anestesia epidurale utilizzando Procaina ad una dose di 5 ml. Questo ha permesso di ridurre il disagio all'animale durante le manovre strumentali, e di fatto si evitano eventuali contrazioni involontarie delle corna uterine che potrebbero ostacolare il recupero embrionale. Non sono stati riportati effetti avversi al principio attivo né tantomeno alterazioni morfologiche al materiale embrionale indotte dal farmaco. Il materiale utilizzato si compone di una sonda Foley Rush a due vie aria/liquido mandrinabile e come liquido di recupero del tampone fosfato salino o PBS (Phosphate-buffered saline) ad una temperatura di 28-30 gradi centigradi: valore che permette un'ottimale conservazione degli embrioni senza innescare processi di danneggiamento. La pulizia e la disinfezione della rima vulvare è di fondamentale importanza prima dell'inserimento della sonda Foley nell'apparato riproduttore, in quanto una possibile contaminazione di origine fecale potrebbe instaurare processi flogistici a carico dell'endometrio con ripercussioni negative per futuri impianti embrionali, sia sul materiale di recupero, dove a causa dell'inquinamento, il PBS potrebbe perdere le caratteristiche di isotonicità e pH fisiologico determinando danni strutturali agli embrioni.

Per ogni *flushing* eseguito è stata utilizzata la tecnica a *"piccoli volumi*". L'operazione consiste in un posizionamento più craniale della sonda a livello di corna uterine, appena dopo la grande curvatura e fissato tramite gonfiaggio con l'ausilio di una siringa inserita nella via per l'aria. Una volta ancorato al corno uterino si procede con eiezione di PBS per il lavaggio, utilizzando 35-40 ml di liquido spinti da siringhe da 50 ml e recuperati tramite movimenti alterni di rilascio e

recupero dello stantuffo, atti volti a garantire ad un'azione di lavaggio più accurata e di massimo recupero embrionale. Il vantaggio della tecnica a piccoli volumi è quella di avere un controllo più preciso della quantità di liquido utilizzato, in quanto il rischio di lasciare più embrioni in utero può determinare gravidanze plurigemellari, che se non prontamente soppresse mediante utilizzo di prostaglandine potrebbero avanzare e creare situazioni poco gradite per l'operatore. Entrambe le corna, dunque, sono state sottoposte a trattamento di lavaggio per 6-7 volte: la regola generale seguita è quella di avere un riscontro tra corpi lutei formati dal trattamento SO e embrioni effettivamente recuperati, determinando con approssimazione il risultato finale dell'operazione. Una volta che il liquido è stato recuperato in un Becher graduato da 500 ml viene successivamente filtrato. Embrioni di 7 giorni hanno una dimensione che si aggira attorno ai 120 micron, utilizzando per il recupero filtri da 50 micron si ha la certezza che gli embrioni non vengano trattenuti o persi nel liquido precedentemente utilizzato per il flushing. Ciò che rimane è il cosiddetto *filtrato* che viene messo in una piastra Petri per la valutazione quantitativa e qualitativa.

### *Valutazione degli embrioni*

La disamina degli embrioni in piastra Petri avviene con l'ausilio di stereomicroscopio con una capacità da 50 a 100x di ingrandimento. Le linee giuda per la classificazione sono dettate dalle regole della IETS inserite in manuali di comune consultazione a livello globale. La valutazione dell'embrione è una delle fasi più critiche della procedura di trasferimento embrionale, e da qui partono le decisioni che si prendono per pronosticare il successo del successivo trapianto su riceventi opportunamente sincronizzate, oppure per un eventuale congelamento in prospettiva di trapianti a distanza di tempo o commerci internazionali.

Quanto segue è l'estratto dalla classificazione ufficiale IETS riportata sul sito ufficiale e disaminata da *Bò (2013)* utilizzata dunque come riferimento per lo sviluppo dello studio in questione.

- *Codice 1*: Eccellente o Buono. Gli embrioni hanno a massa simmetrica e sferica con blastomeri uniformi per dimensione, colore e densità. Questo embrione è coerente con la fase di sviluppo a 7 giorni dal calore. Le irregolarità dovrebbero essere relativamente basse con almeno l'85% del materiale cellulare intatto. Tale giudizio si basa sulla percentuale di cellule embrionali rappresentata dal materiale estruso nello spazio perivitellino. La zona pellucida dovrebbe essere liscia e non avere superfici concave o piatte che potrebbero causare l'aderenza dell'embrione a una capsula di Petri o una cannuccia. Gli embrioni sopravvivono bene al congelamento/scongelamento facilitandone una maggiore applicabilità al commercio.
- *Codice 2*: Discreto. Questi embrioni hanno moderata irregolarità nella loro forma complessiva, sia in termini di massa che di dimensioni, colore e densità. Almeno il 50% della massa embrionale dovrebbe essere intatta. La sopravvivenza di questi embrioni alla procedura di congelamento/scongelamento è inferiore rispetto a quelli di grado 1, ma i tassi di gravidanza sono adeguati alle aspettative se vengono trasferiti come freschi in riceventi ritenute idonee. Pertanto, questi embrioni sono spesso dichiarati come non "congelabili" e preferibilmente utilizzati tramite trapianto a fresco.
- *Codice 3*: Scarso. Questi embrioni hanno maggiore irregolarità nella forma della massa embrionale o nella dimensione colore e densità delle singole cellule. Almeno Il 25% della massa embrionale dovrebbe essere intatta. Questi gli embrioni non sopravvivono al

congelamento/scongelamento e determinano tassi di gravidanza inferiori a quelli ottenuti con embrioni di discreta qualità se trasferiti a fresco.

- Codice 4: Morto o degenerato. Questi potrebbero essere oociti o embrioni a 1 cellula. Non sono vitali e dovrebbero essere scartati, e comunque mai utilizzati per il completamento del database, ma solamente riportati come fenomeno fisiologico a seguito di SO.

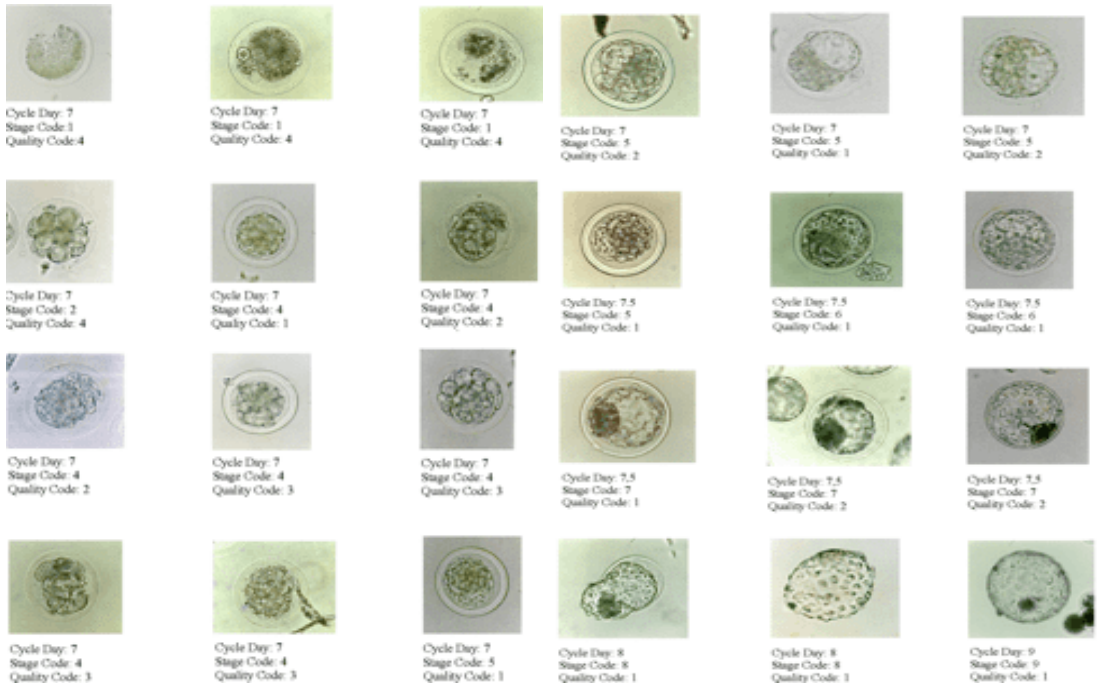


Figura 2: classificazione morfologica degli embrioni secondo criteri IETS (*G.Bò et al. 2013*)

Per completezza di informazione ci riferiamo ora ad una comparazione tra embrioni di prima e di seconda qualità riportando l'esito osservato in campo riguardo al successo di attecchimento tra materiale trapiantato a "fresco", cioè recuperato dopo le conclusioni delle operazioni di flushing, e tra congelato in azoto liquido ed utilizzato in tempistiche diverse. Se per i "freschi" tra prima e

seconda qualità esiste uno scarto percentuale di appena 4 punti percentuali di attecchimento a favore dei primi, lo stesso non si può dire per gli embrioni congelati, dove morule o blastocisti di seconda qualità determinano tassi di attecchimento inferiori del 15 % sul totale delle riceventi utilizzate *(Guarneri 2010).*

*Ovum Pick Up Metodo operativo*

Per l'OPU la procedura inizia con un'iniezione epidurale di 5ml di Procaina per sedare la zona di interesse anatomico. L'effetto è quello di evocare un'azione anestetica nella zona perineale, coinvolgendo le componenti sensitive e motorie dell'ano, vulva e vagina, effetti del tutto simili a quelli ricercati per l'operazione di ET. Il sito di inoculo di riferimento per un'azione anestetizzante efficace è il primo spazio intercoccigeo (C1 - C2) o più cranialmente lo spazio sacro coccigeo (S5 - C1) con il blocco dei nervi coccigei e sacrali caudali. L'operazione che precede l'introduzione della sonda di aspirazione è quella di svuotare il retto dal materiale fecale evitando un'eccessiva introduzione di aria e cercare di migliorare l'adesione del braccio e della mano dell'operatore alla mucosa rettale: si procede dunque con la manovra di prensione dell'ovaio, maneggiando direttamente dal retto la gonade in maniera molto delicata permettendo una primissima valutazione tattile delle strutture presenti. Segue l'introduzione della sonda ecografica in vagina, dove sullo strumento in questione viene precedentemente montato un ago da 18 Gauge per il recupero follicolare. Questo è posizionato su un'apposita guida e manovrata dall'operatore tramite un mandrino regolabile all'impugnatura esterna della sonda stessa, e i movimenti di manovra di tale meccanismo sono quelli di permettere all'ago di fuoriuscire dalla testa e di rientrare immediatamente dopo aspirazione, evitando che si creino condizioni pericolose di danneggiamento della gonade nel caso in cui l'ago dovesse restare esterno alla testa della sonda.

In queste situazioni è necessario interrompere l'operazione ed effettuare una verifica accurata dello strumentario. Inoltre, la sonda è sempre ricoperta da una guaina sanitaria, e il cambio di questo dispositivo di protezione si è reso necessario per ogni diversa donatrice sottoposta a medesima operazione. È d'obbligo mantenere un adeguato livello di igiene per evitare contaminazioni, senza comunque usare alcool etilico per la disinfezione della zona perineale, il quale potrebbe avere effetti nocivi indiretti, determinando potenziali denaturazioni ai follicoli aspirati. La guaina è sempre stata ricoperta da gel lubrificante specifico per esami ecografici per due motivi principali: il primo è quello di favorire l'accoppiamento fisico tra la sonda e la mucosa vaginale, il secondo e quello di permettere di aumentare la conduttività degli ultrasuoni (US) attraverso la diversa stratigrafia anatomica della sede di aspirazione. In sostanza grazie al gel gli US possono essere trasmessi in maniera più efficace neutralizzando la resistenza che l'aria oppone alla loro propagazione e di ricevere al corpo macchina ecografico un'immagine più nitida possibile dell'ovaio e determinare con più accuratezza le caratteristiche qualitative e dimensionali del follicolo in fase di pre-aspirazione. Si è proceduto dunque con la manovra di adesione dell'ovaio alla parete vaginale cercando di rapportare quest'ultima in massima apposizione alla testa della sonda evitando che si crei eccessivo distanziamento tra il follicolo e la sede di emersione dell'ago di aspirazione verificando questa situazione al monitor prima di procedere. Si è effettuato un esame ecografico completo ed approfondito della situazione generale dell'ovaio per verificare soprattutto l'assenza di stati patologici che rendano impossibile l'estrazione oocitaria. Inizia quindi la fase di recupero dei follicoli e relativi oociti. L'ovaio è manipolato in maniera tale da fargli compiere movimenti rotazionali nelle tre dimensioni in modo da rendere il follicolo sempre ben visibile al monitor e mantenendo la massima adesione alla zona di emersione dell'ago. Dunque, inizia la penetrazione dell'ago nell'ovaio, dove questa operazione è necessariamente ecoguidata per

garantire la massima precisione dei punti di recupero. Si posiziona medialmente il follicolo nel cono di guida indicato dallo strumento ecografico e con repentino movimento si fa emergere l'ago alla base della zona di interesse e si aspira ad una pressione di 15-20 ml/min. In questo modo è possibile rimuovere il liquido follicolare assieme all'oocita che verrà poi fecondato. Più velocemente ed accuratamente l'ago va a penetrare il follicolo più saranno le possibilità di rimuovere correttamente il liquido follicolare con l'oocita . Alla fine dell'aspirazione gli oociti sono recuperati all'interno di medium di contenimento, prevalentemente PBS (dall'acronimo inglese di *Phosphate Buffered Saline*) dove la temperatura è costante a 38 gradi, la più possibile vicina a quella fisiologica. Dove è stato possibile l'operazione è stata effettuata in strutture in cui la temperatura fosse la più controllata possibile, in quanto gli oociti sono estremamente sensibili alle variazioni di temperatura ambientale, e dunque è facilmente intuibile che l'insorgenza di modificazioni qualitative del materiale recuperato si presentino con maggior frequenza nel periodo autunno/invernale. In questi periodi è stato necessario ricoprire la cannula di recupero con una resistenza elettrica che offrisse calore costante per l'intera lunghezza del percorso dall'ago di aspirazione alla Falcon® di recupero materiale. Una rappresentazione fotografica della strumentazione necessaria per questa tecnica è presentata in Figura 3.

Figura 3: Strumentazione utilizzata in campo per la tecnica OPU: si può notare dall'immagine di sinistra, partendo dall'alto verso il basso, il corpo macchina, pompa di aspirazione con le Falcon® per il recupero oocitario, tubazioni di connessione alla sonda ecografica da 9 Mhz. Sull'immagine di destra si nota come la sonda venga avvolta da un guanto da esplorazione rettale per garantire un livello igienico adeguato per l'operazione di aspirazione

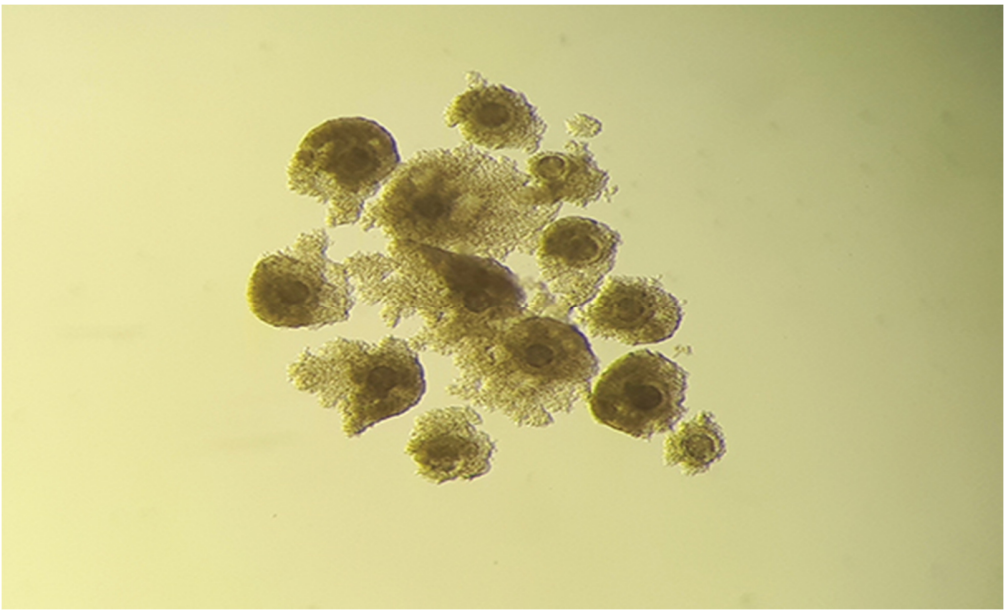

Figura 4: oociti recuperati dopo OPU *( foto Dott.ssa Ana Sanchez)*

*Analisi statistica dei dati*

***Statistica descrittiva e rappresentazione grafica delle possibili differenze fra gruppi di animali***

La statistica descrittiva è un insieme di tecniche usate per descrivere le caratteristiche di base dei dati raccolti in un certo esperimento. Queste tecniche forniscono una sintesi del campione e delle misure raccolte e costituiscono la base iniziale per la successiva analisi quantitativa dei dati. A titolo di esempio, possiamo utilizzare la statistica descrittiva per valutare la distribuzione e variabilità del nostro campione e verificare quante osservazioni abbiamo per ciascuna variabile dipendente. Tramite la statistica descrittiva possiamo anche valutare la presenza o meno di differenze, da un punto di vista grafico, della distribuzione delle variabili dipendenti fra le classi delle variabili indipendenti. Nello specifico di questo studio, diversi fattori sono stati presi in considerazione per valutare il loro potenziale effetto sulle variabili in esame. Le variabili indipendenti valutate sono le seguenti:

- stagione in cui è avvenuto il campionamento (inverno, primavera, estate, autunno)

- ordine di parto al momento del campionamento (manze, primipare e pluripare)

- anno in cui è avvenuto il campionamento (2019, 2020, 2021 e parte del 2022)

- nel caso specifico della tecnica OPU anche lo status dell'animale al momento dell'intervento, ovvero manza, cistica, gravida, vuota, è stato valutato.

***Stima dei parametri genetici***

L'ereditabilità e la ripetibilità sono state stimate tramite il software Asreml 4 (*Gilmour et al., 2015*) tramite lo sviluppo di un modello animale con l'inserimento dei seguenti fattori di correzione:

stagione, ordine di parto e anno in cui è avvenuto il campionamento. Per la tecnica OPU, anche lo status dell'animale al momento dell'intervento è stato inserito nel modello statistico.

***Genome Wide Association Study (GWAS)***

Il controllo del dato genomico (QC) è stato eseguito in Plink v.1.9 applicando i seguenti parametri: MIND: 0.10 (esclude gli animali con più del 10% di informazioni mancanti), GENO: 0.10 (esclude gli SNPs che sono mancanti in più del 10% degli animali campionati), MAF: 0.05 (esclude gli SNPs che hanno una "Minor allele Frequency" <= 0.05). L'analisi GWAS è stata eseguita tramite l'utilizzo del pacchetto GENABEL in R software. Come per la stima dei parametri genetici, anche per questo tipo di analisi servirebbero almeno 500 osservazioni per poter raggiungere risultati significativi, perciò i risultati ottenuti in questa tesi sono da considerarsi preliminari e come punto di partenza per eventuali approfondimenti. Questo giustifica anche il fatto che si siano presi in considerazione come possibili marcatori di interesse gli SNPs che avevano un valore di significatività di $5x10^{-5}$ e non solo quelli che superavano il valore di significatività di Bonferroni (ovvero 0.05/il numero di marcatori).

# RISULTATI E DISCUSSIONE

La ricerca di nuovi caratteri, per definire in maniera esaustiva quali fenomeni influenzano la fertilità bovina, passa attraverso la valenza statistica di un modello elaborato prendendo in esame le variabili dipendenti per le tecniche valutate, ovvero ET e OPU. Le Tabelle 1 e 2 riportano parametri di statistica descrittiva per i fenotipi raccolti duranti il campionamento. Per i fenotipi riconducibili alla tecnica ET un totale di 310 osservazioni sono state analizzate. La media di embrioni totali è risultata uguale a 11.56 con una deviazione standard di 6.94. Per quanto riguarda invece gli embrioni disponibili questi sono risultati in media essere uguali a 8.17 (70%) con una deviazione standard di 5.48.

Tabella 1: Statistica Descrittiva delle tre variabili ET

| Fenotipo | n. | Media | SD | min | max |
|---|---|---|---|---|---|
| Numero complessivo di embrioni | 310 | 11.56 | 6.94 | 0 | 48 |
| Numero embrioni disponibili | 310 | 8.17 | 5.48 | 0 | 37 |
| Rapporto tra numero di embrioni disponibili e numero totale | 310 | 0.70 | 0.27 | 0 | 1 |

Per i fenotipi riconducibili alla tecnica OPU, abbiamo analizzato 235 osservazioni. Il numero di follicoli totali è risultato in media uguale a 4.61 (SD=4.14), con un rapporto fra embrioni e follicoli disponibili in media del 24% (SD=0.20).

Tabella 2: Statistica Descrittiva delle variabili OPU

| Fenotipo | n. | Media | SD | min | max |
|---|---|---|---|---|---|
| Numero follicoli totali | 235 | 4.61 | 4.14 | 0 | 30 |
| Numero follicoli con corona | 235 | 4.11 | 3.38 | 0 | 20 |
| Numero follicoli denaturati | 235 | 3.48 | 3.32 | 0 | 20 |
| Numero follicoli degenerati | 235 | 0.60 | 1.43 | 0 | 13 |
| Numero di embrioni | 235 | 3.33 | 3.25 | 0 | 18 |
| Rapporto fra embrioni e follicoli disponibili | 235 | 0.24 | 0.20 | 0 | 1 |

Il modello statistico ha evidenziato alcuni aspetti ambientali e legati all'animale che incidono significativamente su alcuni dei fenotipi analizzati.

In particolare:

1) L'anno in cui è avvenuto il campionamento è risultato essere un effetto significativo per il rapporto tra numero di embrioni disponibili e numero totale (tecnica ET) come presentato in Tabella 3 e per il numero di follicoli totali (tecnica OPU) (Tabella 5)
2) L'ordine di parto per il numero di embrioni totali e il rapporto tra numero di embrioni disponibili e numero totale (tecnica ET) (Tabella 3)

Tabella 3: Risultati ANOVA per la metodica ET

| | ANOVA ET | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N. embrioni totali | | | N. embrioni disponibili | | | Rapporto disponibili su totale | | |
| Fattore | DF | F | P.value | DF | F | P.value | DF | F | P.value |
| Anno | 3 | 0.29 | NS | 3 | 1.22 | NS | 3 | 3.32 | ** |
| Ordine di parto | 2 | 3.01 | * | 2 | 0.94 | NS | 2 | 4.10 | ** |
| Stagione | 3 | 1.10 | NS | 3 | 1.06 | NS | 3 | 0.43 | NS |

NS= Non significativo, * P=0.05, ** 0.01<P<0.05 e *** P≤0.01

In particolare, per il numero di embrioni totale e l'ordine di parto sembra esserci una tendenza positiva, ovvero all'aumentare dell'ordine di parto, il numero di embrioni sembra aumentare (Figura 5 e Tabella 4).

Tabella 4: Medie Corrette per i fattori: Ordine in classi, Anno e stagione di campionamento per tecnica ET

| | Ordine di parto | | | Anno | | | | Stagione | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fenotipo | 1 | 2 | 3 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 | Inverno | Primavera | Estate | Autunno |
| N. embrioni | 10.96 | 10.8 | 13.89 | 11.1 | 12.16 | 11.55 | 10.85 | 10.79 | 12.58 | 11.52 | 10.75 |
| N. embrioni disponibili | 8.73 | 7.77 | 8.57 | 9.11 | 9.24 | 8.1 | 7.5 | 8.08 | 9.38 | 7.86 | 8.11 |
| Rapporto disponibili su totale | 0.75 | 0.71 | 0.6 | 0.8 | 0.73 | 0.71 | 0.56 | 0.71 | 0.72 | 0.68 | 0.68 |

1= Manze, 2=Primipare, 3=Pluripare

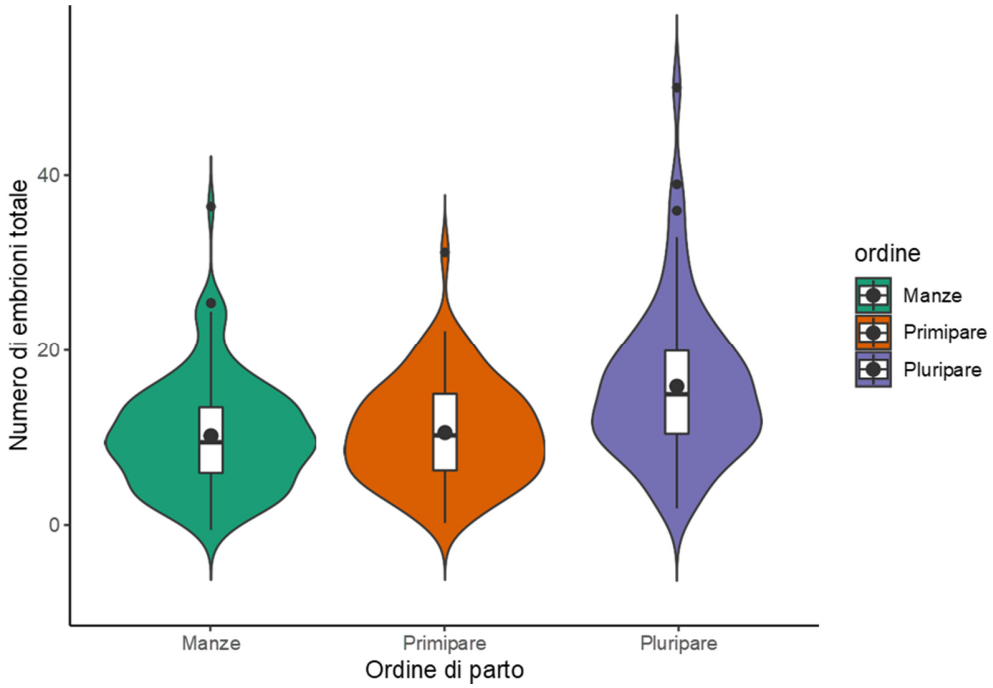


Figura 5: Numero di embrioni totale suddiviso per ordine di parto

Le pluripare sembrano quindi generare un numero di embrioni superiore alle manze o alle primipare specificatamente ai processi di produzione embrionali in vivo. Di certo la conferma di questo aspetto, con un numero di campioni superiore, potrebbe determinare risvolti economici interessanti, confermando di fatto le scelte illustrate nella parte dei “materiali e metodi", dove la pratica di scegliere donatrici con ordini di parto superiori a due per la produzione di un numero elevato di embrioni determinerebbe un aumento delle scorte aziendali per incrementare il *conception rate* (CR) e le probabilità di attecchimento in situazioni nelle quali la pratica tradizionale di FA risultasse inefficiente.

Dallo studio però emerge anche un aspetto che è in contrapposizione con quanto appena esposto, in quanto la *qualità* embrionale del materiale trapiantabile proveniente dalle pluripare dopo flushing sembra essere minore. Infatti, come è possibile evidenziare in Figura 6, per il rapporto fra numero di embrioni disponibili e totale sembra esserci un trend negativo, se rapportato all’ordine di parto. Questo è stato verificato dall’analisi statistica in cui il fattore ordine di parto è risultato essere significativo; all’aumentare dell’ordine di parto, la percentuale di embrioni disponibili sul totale diminuisce (da 75% in media nelle manze a 60% nelle pluripare).

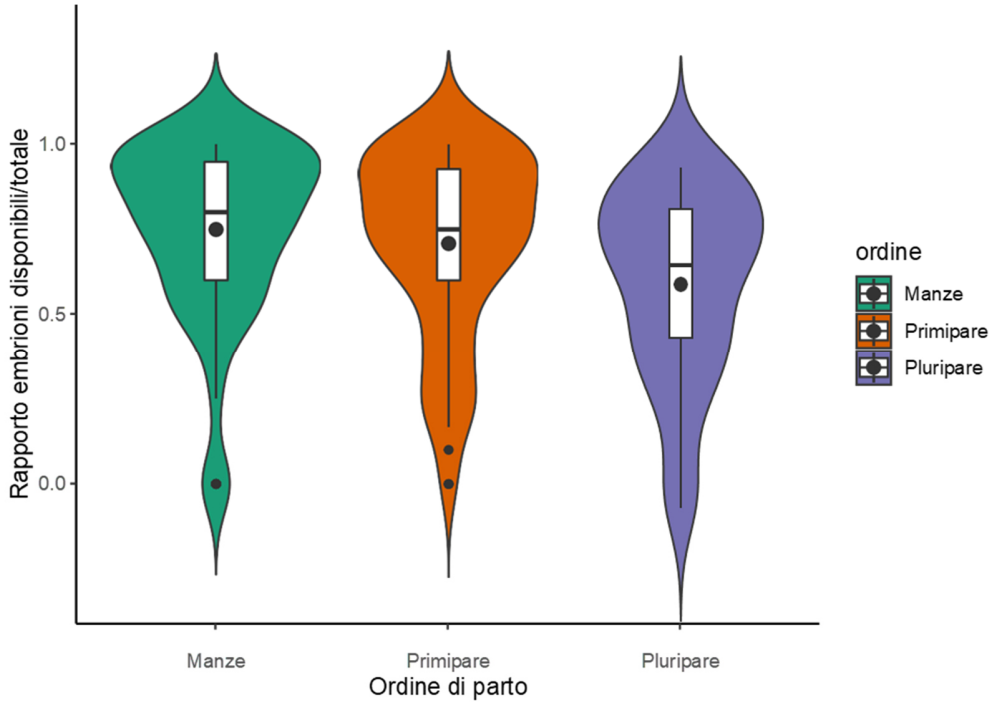


Figura 6: Rapporto embrioni disponibili sul totale suddiviso per ordine di parto

In merito a questo elemento c'è da considerare che i dati raccolti per il database riferibile al ET sono corrispondenti per la maggior parte alle operazioni effettuate su pluripare, mentre il campione delle manze/primipare dovrebbe essere ulteriormente ampliato. Si potrebbe inoltre ipotizzare che le pluripare abbiano la capacità di innescare un responso *quantitativamente* maggiore in risposta al trattamento super-ovulatorio portando a maturazione un maggior numero di oociti rispetto alle manze/pluripare ma *qualitativamente* inferiori a quest'ultime, con oociti probabilmente non fisiologicamente adatti per i processi di fertilizzazione. Interessante sarebbe capire se i fattori che concorrono alla genesi di questo evento siano riportabili a fenomeni epigenetici indotti dai trattamenti di SO o dalla ripetizione di quest'ultimi sullo stesso animale, visto che ad oggi in letteratura non risultano studi che possano avvalorare questo risultato. Dunque, l'indicazione suggerita da questa parte dello studio potrebbe essere quella di sottoporre a ET manze/primipare

se i primi interventi di FA dovessero portare a diagnosi negative di gravidanza per la produzione di embrioni *qualitativamente* migliori, mentre l'utilizzo di pluripare è preferito nel caso in cui si volessero aumentare le probabilità di produzione embrionale *quantitativamente* proporzionali alle aspettative di rialzo in termini di CR. Per quanto riguarda la pratica OPU, lo *status* dell'animale ha portato ad evidenziare una maggior variabilità entro il gruppo delle *cistiche* e un valore medio più alto rispetto al gruppo delle gravide per quanto riguarda la maggior parte dei fenotipi analizzati (Tabella 5) e in particolar modo per il fenotipo numero di follicoli totali (Figura 7). Purtroppo, per quanto riguarda lo status dell'animale, il numero esiguo di campioni eseguiti su animali con problematiche ovariche (n. cistiche = 5) potrebbe non essere rappresentativo della attuale variabilità. Perciò quest'ultimo aspetto andrà rivalutato con un campione di dati maggiore. L'anno in cui è stato effettuato il campionamento è risultato significativo nel caso del numero di follicoli totali (Tabella 5). In Tabella 6 sono presentate le medie corrette per i due fattori risultati significativi per la tecnica OPU (Status dell'animale e Anno di campionamento).

Tabella 5: Risultati ANOVA per la metodica OPU

| | | N. follicoli totali | | Numero follicoli con corona | | Numero di embrioni | | Numero follicoli denaturati | | Numero follicoli degenerati | | Rapporto embrioni su follicoli | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fattore | DF | F | P. | F | P. | F | P. | F | P. | F | P. | F | P. |
| Anno | 2 | 4.21 | ** | 0.89 | NS | 0.89 | NS | 1.66 | NS | 0.75 | NS | 0.8 | NS |
| Ordine in classi | 2 | 1.92 | NS | 2.00 | NS | 1.02 | NS | 1.69 | NS | 1.08 | NS | 0.9 | NS |
| Status | 3 | 5.12 | ** | 2.66 | * | 1.35 | NS | 6.88 | *** | 0.34 | NS | 2.4 | * |
| Stagione | 3 | 0.54 | NS | 0.25 | NS | 1.39 | NS | 0.67 | NS | 0.37 | NS | 2.0 | NS |

NS= Non significativo, * P=0.05, ** 0.01<P<0.05 e *** P≤0.01

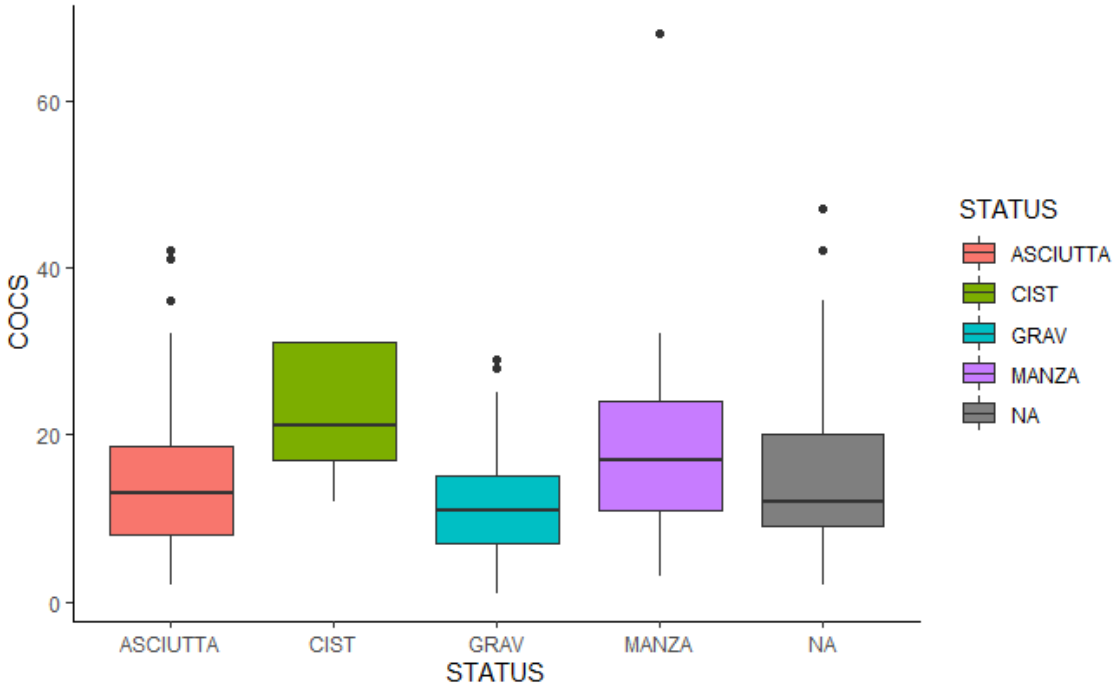


Figura 7: Numero di follicoli con cumulo oocitario compatto suddiviso per status dell'animale

Tabella 6: Medie Corrette per i fattori significativi: Status e Anno per tecnica OPU

| | Status | | | | Anno | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fenotipo | Cistiche | Manze | Gravide | Asciutta | 2019 | 2020 | 2021 |
| N. follicoli totali | 22.11 | 17.2 | 12.83 | 13.02 | 21.86 | 16.4 | 13.87 |
| Numero follicoli con corona | 7.65 | 2.48 | 4.01 | 4.01 | 5.68 | 4.57 | 3.18 |
| Numero di embrioni | 4.0 | 1.30 | 3.01 | 3.5 | 5.49 | 4.41 | 3.89 |
| Numero follicoli denaturati | 14.53 | 0.88 | 2.07 | 3.48 | 4.18 | 5.37 | 6.35 |
| Numero follicoli degenerati | 0.0 | 0.74 | 0.5 | 0.32 | 0.61 | 0.11 | 0.37 |
| Rapporto embrioni su follicoli | 0.31 | 0.09 | 0.27 | 0.19 | 0.16 | 0.25 | 0.17 |

Dalla stima parametri genetici sono emersi alcuni risultati incoraggianti per quanto riguarda l'ereditabilità e la ripetibilità dei caratteri presi in esame. In particolare, per il carattere *COCS* (Numero di follicoli con cumulo oocitario compatto) l'ereditabilità è risultata uguale a 0.27 (± 0.12), valore *medio/alto* rispetto ai classici caratteri di fertilità più tradizionalmente utilizzati. Anche la ripetibilità di questo carattere è risultata medio/alta essendo uguale a 0.55; anche questo valore va però verificato con un numero di osservazioni superiore, il quanto il numero ridotto di animali non permette una stima accurata di questi parametri. Questo è il motivo per il quale siamo riusciti a stimare l'ereditabilità e ripetibilità soltanto di questo fenotipo e non degli altri, per i quali il modello non ha raggiunto convergenza a causa del ridotto numero di osservazioni. Da queste stime preliminari si può però suppore una prospettiva di sviluppo di un indice genetico che tenga in considerazione anche la possibile selezione di questi aspetti legati alla fertilità *in vitro*. In ambito selettivo la pratica di aspirazione follicolare potrebbe avere nei prossimi anni sempre più un ruolo di rilievo, dato il vantaggio applicativo della tecnica su animali in diverse condizioni fisiologiche e la facilità di gestione degli stessi, ma anche data la possibile introduzione di una selezione genomica degli embrioni prodotti con tecnica IVF. Effettuando, infatti, una biopsia embrionale allo stadio di morula si potrebbe allestire un test genomico da utilizzare sul materiale embrionale genotipizzato in modo da facilitare la scelta in fase di trapianto degli embrioni che maggiormente presentano da un punto di vista genomico le caratteristiche richieste dall'allevatore.

In questo elaborato di tesi è stata inoltre svolta una preliminare analisi GWAS con i 126 animali sottoposti a ET e 109 animali sottoposti a OPU di cui si disponevano informazioni genomiche. Questi risultati sono da considerarsi preliminari in quanto normalmente uno studio GWAS prevede almeno 500 animali con sia l'informazione genomica che fenotipica. Nonostante ciò, abbiamo potuto identificare alcune regioni genomiche che sembrano essere significativamente associate con

i fenotipi raccolti in questo studio. In particolare, il numero di embrioni totali sembra essere associato a una regione del cromosoma 11 contenente tre SNPs e una regione sul cromosoma 22 contenente un solo SNP significativo (Figura 8). La regione sul cromosoma 11 sembra anche essere significativamente associata al numero di embrioni disponibili per la tecnica ET (Figura 9).

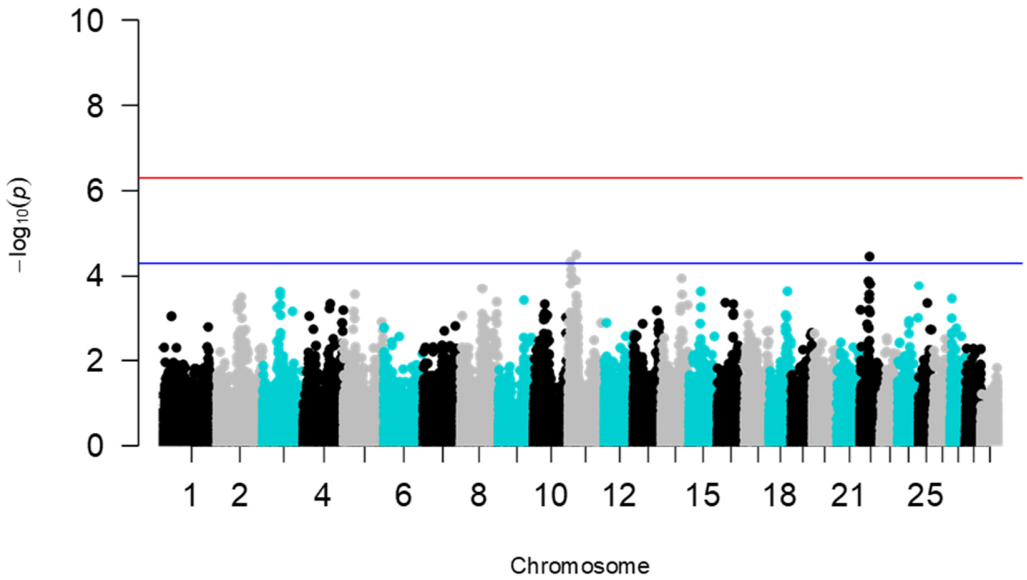


Figura 8: Manhattan Plot per il carattere numero di embrioni totale per la tecnica ET. La linea rossa indica il livello di significatività calcolato sulla base di una correzione di Bonferroni mentre la linea blu rappresenta la significatività calcolato a $p \leq 5x10^{-5}$

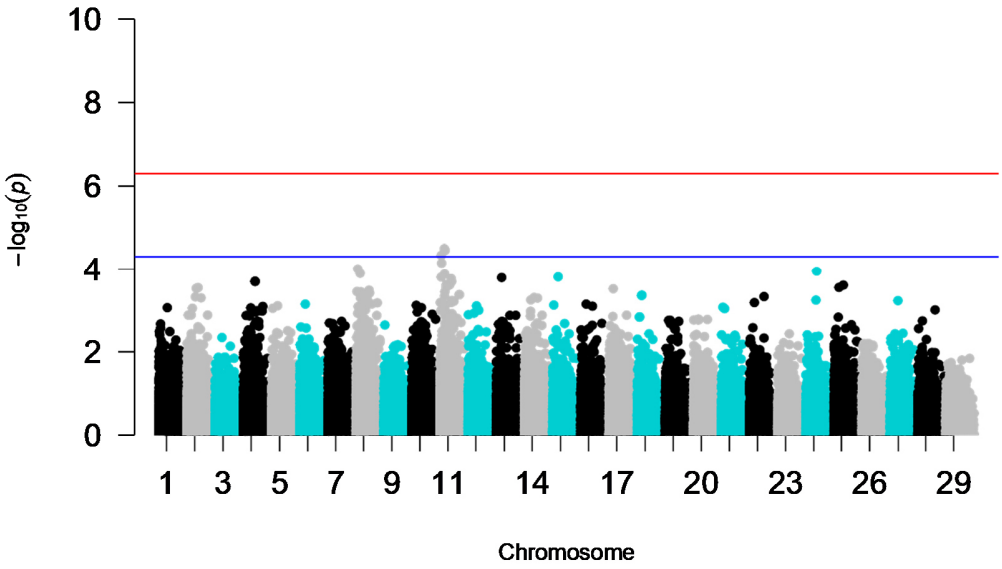


Figura 9: Manhattan Plot per il carattere numero di embrioni disponibili per la tecnica ET. La linea rossa indica il livello di significatività calcolato sulla base di una correzione di Bonferroni mentre la linea blu rappresenta la significatività calcolato a p ≤ 5x10ˆ-5

Possiamo ipotizzare che quest'ultima regione genomica sul cromosoma 11 abbia un ruolo significativo per l'embriogenesi essendo risultata associata per due fenotipi caratterizzanti questo processo. Inoltre, degno di nota è il fatto che questi primi risultati sono in linea con quanto osservato da Jaton, et al. (2019), dove le stesse regioni sul cromosoma 11 sono risultate significativamente associate al numero di embrioni nella Frisona Canadese, indicando un potenziale ruolo regolatore di queste regioni sulla produzione di embrioni. Interessante però notare anche la presenza di uno SNP significativo per il carattere Rapporto tra numero di embrioni disponibili e numero totale sul cromosoma 10 (Figura 10).

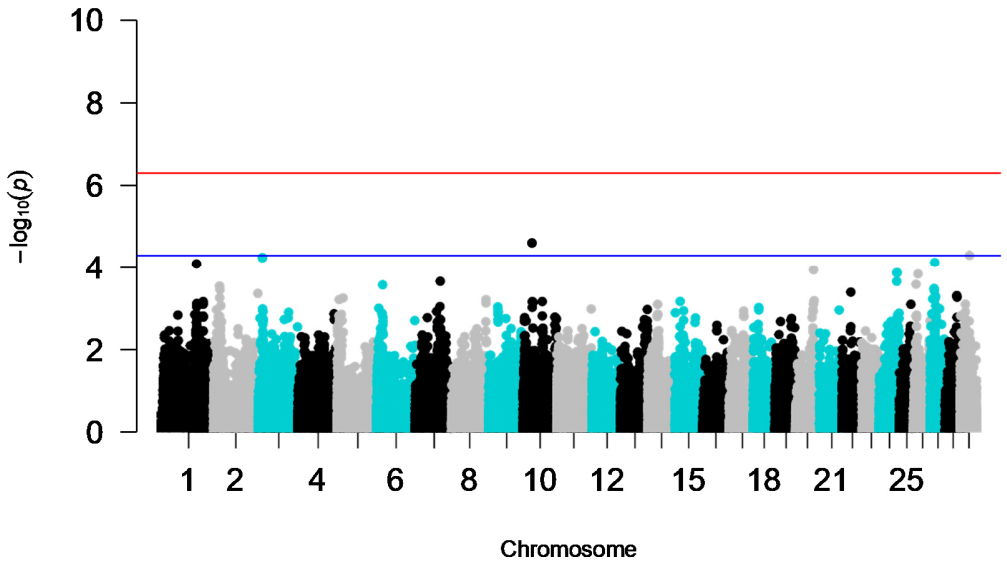


Figura 10: Manhattan Plot per il Rapporto tra numero di embrioni disponibili e numero totale. La linea rossa indica il livello di significatività calcolato sulla base di una correzione di Bonferroni mentre la linea blu rappresenta la significatività calcolato a $p \leq 5x10^{-5}$

Il fatto che regioni differenti genomiche siano associate ai diversi caratteri valutati per la tecnica ET, ci fa ipotizzare che questi fenotipi abbiano un diverso background genetico e che quindi siano influenzati dall'azione di geni differenti. Una delle ipotesi che si può avanzare relativamente al ruolo di quest'ultima regione genomica sul cromosoma 10 è che contenga geni responsabili del proseguimento del normale sviluppo embrionale, di modifiche irreversibili al genoma embrionale e conseguente degenerazione (embrioni degenerati) e alterata secrezione dei fattori di crescita (embrioni di classe 3). Situazione differente per quanto riguarda la pratica di aspirazione oocitaria, dove gli SNPs più significativi sembrano risiedere in regioni genomiche nei cromosomi 1 e 4 (Figura 11).

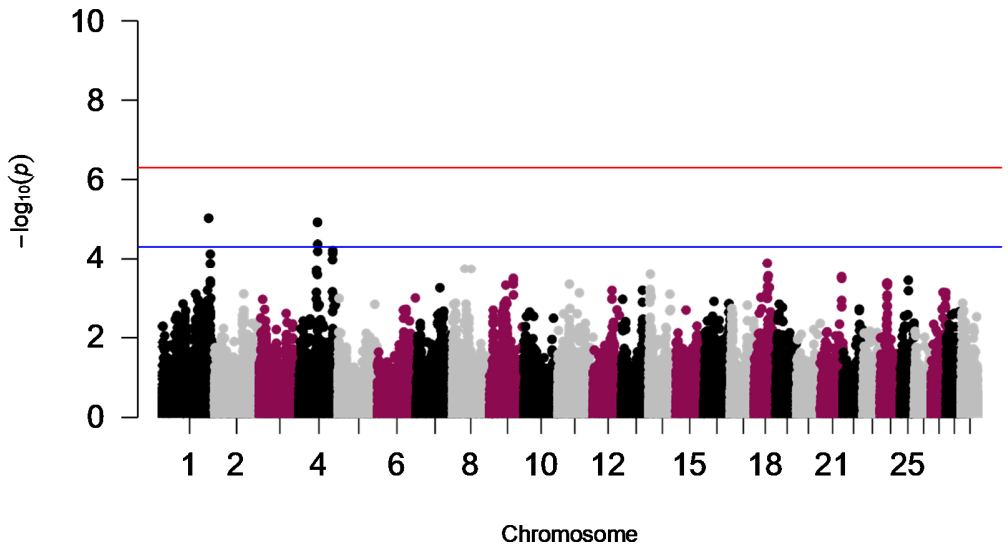


Figura 11: Manhattan Plot per il numero di follicoli tramite tecnica OPU. La linea rossa indica il livello di significatività calcolato sulla base di una correzione di Bonferroni mentre la linea blu rappresenta la significatività calcolato a $p \leq 5x10^{-5}$

# CONCLUSIONI

Lo studio necessita di ulteriori osservazioni per avere una significatività sufficientemente alta per intraprendere con sicurezza un percorso di selezione genetica per la produzione di embrioni con tecniche di riproduzione assistita.

Dall'individuazione sul genoma bovino delle regioni responsabili di questi nuovi caratteri di fertilità si potranno creare diverse possibilità di utilizzo di pratiche ET e OPU come mezzi per incrementare la selezione genetica della mandria, ma soprattutto per rendere queste pratiche sempre più accessibili ed affidabili nell'assistenza riproduttiva. Nella situazione presa in esame, i primi risultati potrebbero essere di sicuro di interesse per l'industria zootecnica italiana, poiché forniscono le prime informazioni genomiche utili per gli allevatori interessati a produrre embrioni da donatrici di alto profilo genetico mediante queste tecniche. L'indicazione del cromosoma 11 come portatore di regioni significative per lo sviluppo embrionale e dei cromosomi 1 e 4 come sedi di maturazione oocitaria, porta ad essere ragionevolmente ottimisti per intraprendere e giustificare il proseguimento di questo lavoro, con la raccolta di ulteriori dati per stabilire ancora più precisamente il background genetico di questi innovati fenotipi.

# BIBLIOGRAFIA


1. AA.VV.; Atti congressi annuali S.I.E.T Società Italiana Embryo Transfer 2008
2. Bagnato A., Bertoni G., Brizzi A., Calamari L., Canavesi F., Fantini A., Frigo E., Gnemmi G., Guarneri P. L, Sali G., Samorè A., Vincenzoni G.; «Gestione clinica della riproduzione bovina»; Point Veterinaire Italie, 2013
3. Bò G.; Anim. Reprod., v.10, n.3, p.344-348, Jul./Sept. 2013
4. Camargo L.S. A, J.H.M.Viana, W.F. Sá, A.M. Ferreira, A.A. Ramos, V.R. Vale Filho (2006), Factors influencing in vitro embryo production, Anim. Reprod., v.3, n.1, p.19-28
5. Falconer D.S.,Mackay T.F.C. Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. Longman, Essex, UK1996
6. Ferré L. B., M. E. Kjelland, L. B. Strøbech, P. Hyttel, P. Mermillod and P. J. Ross, (2019), Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods, 14:5, pp 991–1004 © The Animal Consortium 2019 animal doi: 10.1017/S1751731119002775
7. Galli C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi and G. Lazzari, (2000), embryo production by ovum pick u from live donors, Theriogenology 55:1341-1357
8. Gilmour A.; ASReml User Guide https://asreml.kb.vsni.co.uk
9. Hayes B. J., P. J. Bowman, A. J. Chamberlain, and M. E. Goddard.; Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges" (J. Dairy Sci. 92:433–443)
10. https://www.aete.eu/publications/statistics/
11. Jaton C., A.F. S. Schenkel B , T. C. S. Chud B , F. Malchiodi A , M. Sargolzaei C , C. A. Price D , A. Canovàs B , C. Baes B and F. Miglior B E F.; Genetic and genomic analyses of embryo production in dairy cattle, Reproduction, Fertility and Development 32(2) 50-55 https://doi.org/10.1071/RD19275 Published: 2 December 2019
12. Meuwissen T.H.E. Hayes B.J. Goddard M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. Genetics. 2001; 157: 1819-1829
13. João Henrique Moreira Viana, Ana Cristina Silva Figueiredo, Luiz Gustavo Bruno Siqueira, Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future, http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR989Anim Reprod, vol.14, n3, p.476-481, 2017