



# UNIVERSITÀ DI PARMA

**Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie**

**Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria**

**EFFICIENZA PLACENTARE E SVILUPPO FETALE  
PER IL MIGLIORAMENTO GENETICO DEL SUINO**

**PLACENTAL EFFICIENCY AND FETAL DEVELOPMENT  
FOR SWINE GENETIC IMPROVEMENT**

**Relatore:**

**Chiar.ma Prof.ssa Roberta Saleri**

**Correlatore:**

**Dott.ssa Melania Andrani**

**Laureando:**

**Domenico Valtulini**

**Matricola 300527**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**

*Ai miei nonni*

# EFFICIENZA PLACENTARE E SVILUPPO FETALE PER IL MIGLIORAMENTO GENETICO DEL SUINO

Domenico Valtulini

<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>6</b>
1.1 Cenni di anatomia dell'apparato riproduttivo femminile .....	6
1.2 Pubertà delle scrofette.....	8
1.3 Asse endocrino ipotalamo-ipofisi-ovaie .....	10
1.4 Estro e ciclo estrale .....	12
<b>2. FECONDAZIONE ARTIFICIALE E GRAVIDANZA NELLA SCROFA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Prelievo e valutazione del materiale seminale.....	15
2.2 Congelamento del seme.....	17
2.3 Tecniche di fecondazione artificiale .....	19
2.4 Dai gameti allo zigote .....	21
2.5 Inizio della gravidanza .....	22
2.6 Segnali di gravidanza e ritorni in calore .....	23
<b>3. MIGLIORARE L'EFFICIENZA PLACENTARE E LO SVILUPPO PLACENTARE.....</b>	<b>25</b>
3.1 Formazione e caratteristiche della placenta suina.....	25
3.2 Influenza dell'apporto proteico sullo sviluppo placentare .....	27
3.3 Funzioni della placenta.....	28
3.4 Valutazione dell'efficienza placentare .....	31
3.5 Fattori condizionanti l'efficienza placentare.....	34
3.6 Selezione genetica per l'efficienza placentare .....	37
3.7 Ereditabilità dell'efficienza placentare.....	39
<b>4. IMPATTO DELLA VITA INTRAUTERINA SULLO SVILUPPO E SULLA PRODUZIONE.....</b>	<b>41</b>
4.1 Influenza dell'apporto proteico in gestazione sullo sviluppo muscolare della prole.....	41
4.2 Restrizione intrauterina.....	43
4.3 Crowding uterino.....	45
4.4 Impatto della posizione del feto sul suo sviluppo .....	48
4.5 Ruolo del sesso dei feti sullo sviluppo e sulla riproduzione .....	50
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>53</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>54</b>

# RIASSUNTO

In riproduzione suina l'efficienza placentare, definita come il rapporto tra il peso del suinetto e quello della sua placenta, è un indicatore della funzionalità placentare e dell'adattamento fetoplacentare. Dopo essersi soffermata su alcuni aspetti generali e specifici della riproduzione, la trattazione si addentra negli aspetti caratteristici della placentazione suina, al fine di comprendere l'origine delle differenze in termini di efficienza placentare che sussistono tra le razze suine, ma anche all'interno della stessa nidiata. L'ipotesi analizzata è che alla base ci siano un diverso sviluppo della componente vascolare placentare e l'espressione differenziale di alcuni geni, come quelli che codificano per i trasportatori molecolari.

La ricerca sui geni correlati con l'efficienza placentare è ancora incompleta; tuttavia, in vista di ulteriori progressi scientifici in questo campo, viene valutata l'opportunità di approntare programmi di selezione genetica indiretta che utilizzino l'efficienza placentare come carattere strumento, al fine di ottenere nidiata con una percentuale maggiore di nati vivi e con pesi alla nascita più uniformi.

Parallelamente, questa tesi analizza i principali fattori in grado di influenzare lo sviluppo del feto suino e della relativa placenta, individuati nella nutrizione materna, nello spazio disponibile in utero, nella posizione del *conceptus* e nel sesso dei feti adiacenti. La conoscenza di questi elementi apre alla possibilità di migliorare le prestazioni riproduttive, intervenendo in modo mirato sulla gestione della scrofa in gravidanza.

Il fine ultimo è quello di aumentare il numero di suinetti svezzati annualmente per ogni scrofa, rendendo così più efficienti le scrofaie, con particolare riferimento a quelle presenti sul territorio del Nord Italia, vocate alla produzione di suinetti destinati alle filiere del Prosciutto di Parma e del Prosciutto di San Daniele.

# ABSTRACT

In swine reproduction, placental efficiency, defined as the ratio of the weight of the piglet to that of its placenta, is used as an index of placental function and feto-placental adaptation. After dwelling on some general and specific aspects of reproduction, this thesis evaluates the characteristic aspects of porcine placentation, with the intention of understanding the origin of the differences in placental efficiency that exist between pig breeds and within the same broodstock. The investigated hypothesis is that a different development of placental vascular component and the differential expression of certain genes, such as those coding for molecular transporters, are involved.

Research on genes related with placental efficiency is still incomplete; however, in view of further findings in this field, the opportunity to prepare indirect genetic selection programs using placental efficiency as a tool character is being considered, in order to obtain broods with a higher percentage of live births and more uniform birth weights.

Also, this thesis analyses the main factors that can influence the development of the porcine fetus and its placenta, which are maternal nutrition, available space in the uterus, position, and sex of adjacent fetuses. Knowing these elements allows to improve reproductive performance by taking targeted action on pregnant sow management.

The goal is to increase the number of piglets weaned annually for each sow, thus making sow breeding farms more efficient, with particular reference to those in Northern Italy dedicated to the production of piglets for the Prosciutto di Parma and Prosciutto di San Daniele supply chains.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Cenni di anatomia dell'apparato riproduttivo femminile

L'apparato genitale femminile comprende strutture che producono le cellule germinali e altre che le trasportano e le accolgono. Le prime sono le ovaie, mentre le seconde annoverano le tube uterine, l'utero e la vagina (*König e Liebich, 2017*). Vi sono infine i genitali esterni, ovvero la vulva. L'ovaio è un organo pari che deriva dalla cresta germinale e si sviluppa su entrambi i lati nella regione lombare. Esso contiene le cellule germinali e le cellule follicolari, queste ultime accessorie alle prime. Nella scrofa, l'ovaio scende ventralmente fino a metà della cavità addominale.

In sezione l'ovaio mostra una zona midollare interna, poco compatta e riccamente vascolarizzata, e una zona corticale esterna, più consistente, dove si trovano i follicoli e i corpi lutei. Esternamente è presente una tonaca albuginea, a sua volta rivestita dall'epitelio germinale.

Le tube uterine o salpingi presentano, all'estremità che sbocca nella cavità peritoneale, un infundibolo, a forma di imbuto, rivolto verso l'ovaio. Qui, la superficie interna è percorsa da pieghe della mucosa che si allungano verso l'ovaio, formando le fimbrie ovariche. Nella scrofa anche la superficie esterna dell'infundibolo, a contatto con il peritoneo, contiene cellule dell'epitelio tubarico, che guidano l'oocita ovulato verso l'interno della tuba (*Yaniz et al., 2007*). All'infundibolo fa seguito l'ampolla della tuba, più ampia, dove di solito ha luogo la fecondazione. Segue l'istmo, la parte tortuosa della salpinge, che termina con l'ostio uterino della tuba.

Il passaggio tra salpinge e corno uterino è graduale. Nella scrofa, le corna uterine sono collocate in cavità addominale e presentano delle anse. Le due corna confluiscono nel corpo uterino, impari e di dimensioni ridotte, che è suddiviso da un setto mediano nella sua parte craniale. In sezione, partendo dal lume, la parete uterina è formata da:

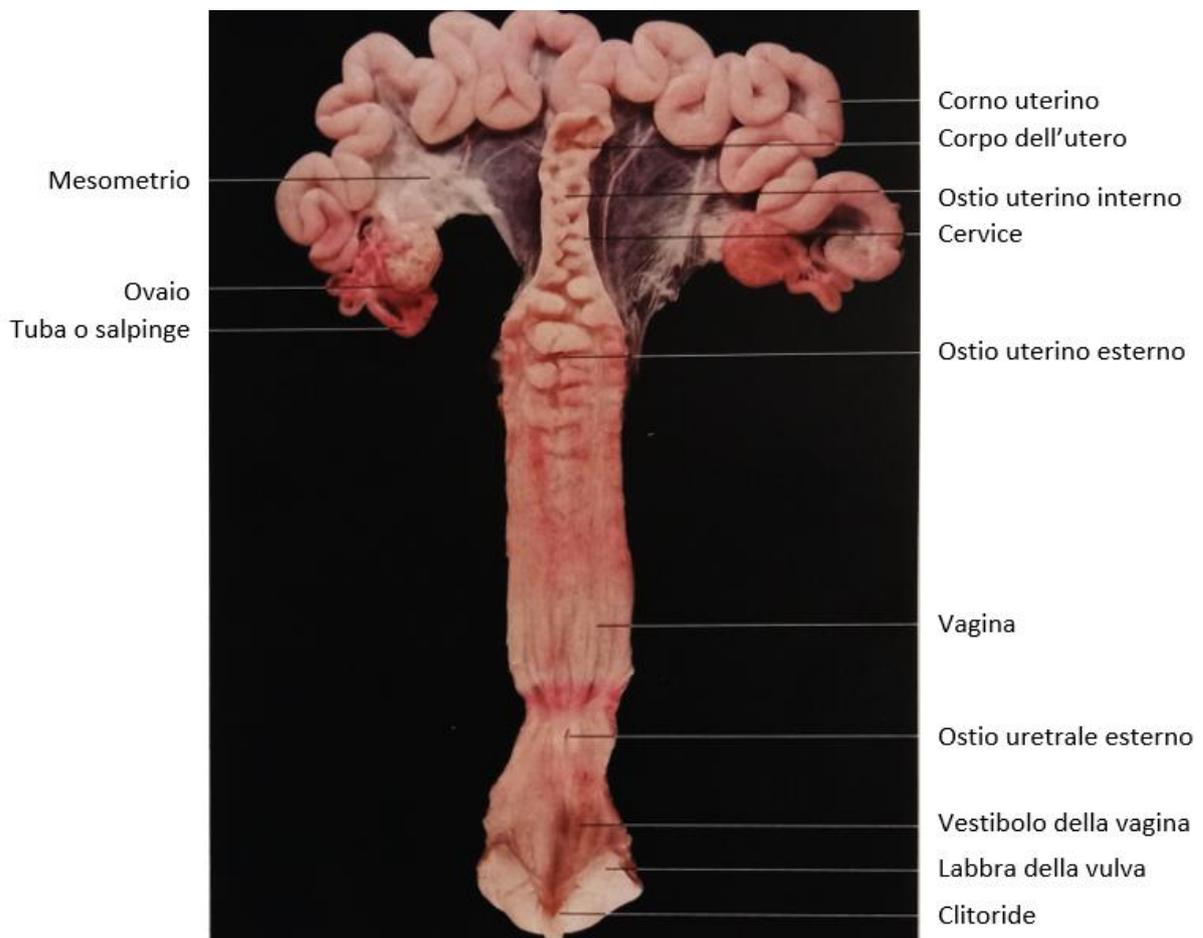
- una tonaca mucosa o endometrio, di spessore variabile nelle diverse fasi. Durante la gravidanza, su di essa si impiantano gli embrioni e prendono attacco le placente
- una tonaca muscolare o miometrio, con uno strato muscolare circolare interno e uno strato muscolare longitudinale esterno, separati da uno strato vascolare
- una tonaca sierosa o perimetrio

La cervice uterina segue caudalmente il corpo dell'utero; ha una parete spessa e rimane chiusa se non durante l'estro e in occasione del parto. La finalità è preservare l'utero dai patogeni presenti all'esterno. I *concepti* non si annidano in questa parte anatomica. Il canale cervicale è inteso come la parte che inizia dall'ostio uterino interno, collocato nella cavità del corpo uterino,

e termina in corrispondenza dell'ostio uterino esterno, che si apre a forma di imbuto nella vagina. La chiusura del canale cervicale, nella scrofa, è garantita dai pulvini o cuscinetti cervicali, pieghe della mucosa a forma di cono. Ai fini della chiusura del lume, inoltre, le ghiandole cervicali producono un secreto che forma un tappo mucoso.

La vagina è la porzione delle vie genitali che accoglie il pene durante la copula; essa va dall'ostio uterino esterno fino allo sbocco dell'uretra. La sua collocazione topografica è tra il retto e la vescica urinaria. Nel suino, le femmine giovani presentano nella parte caudale della vagina una piega della mucosa, con una funzione simile all'imene nell'uomo. Il vestibolo della vagina è collocato sull'arcata ischiatica ed è inclinato ventralmente verso le labbra della vulva. Questo aspetto va tenuto in considerazione durante l'introduzione del catetere per la fecondazione artificiale. Per facilitare la copula, la mucosa del vestibolo della vagina viene umidificata dalle ghiandole vestibolari. L'odore del loro secreto esercita un'azione stimolante per il maschio.

I genitali esterni femminili sono rappresentati dalla vulva, formata da due labbra. In corrispondenza dell'angolo ventrale della vulva è collocato il clitoride, formato da due pilastri, un corpo e un glande del clitoride (*Figura 1*) (König e Liebich, 2017).



*Figura 1. Apparato genitale di scrofa, in parte aperto dorsalmente (König e Liebich, 2017).*

## 1.2 Pubertà delle scrofette

La pubertà è il periodo in cui inizia l'attività sessuale: nelle femmine compare il primo estro, il quale culmina nella prima ovulazione (*Sjaastad et al., 2013*). La comparsa della pubertà può essere accelerata mettendo a contatto le scrofette per almeno 20 minuti al giorno con un verro, iniziando intorno ai sei mesi di età. Si è visto che più si ritarda l'età in cui l'animale viene stimolato per la prima volta, tanto più sono frequenti i casi di anestro o di più lento raggiungimento della pubertà (*Beccaro e Faravelli, 2004*).

Dalla nascita fino all'inizio della pubertà, gli organi riproduttivi si sviluppano in parallelo con il resto del corpo, secondo un modello di crescita isometrica. Durante la pubertà, la crescita degli organi sessuali e delle ghiandole mammarie diviene molto più veloce rispetto al resto del corpo, a causa delle variazioni ormonali: si parla di crescita allometrica. La pubertà è preceduta da un periodo in cui si registra un aumento progressivo della funzionalità dell'asse endocrino ipotalamo-ipofisi-gonadi.

Come nella maggior parte dei mammiferi, la pubertà viene raggiunta prima del completo sviluppo somatico e risulta anticipata nelle femmine rispetto che nei maschi. Le scrofette divengono puberi, ovvero sessualmente recettive e fertili, intorno ai sei mesi di età, quando si manifesta il primo calore, che è poco evidente e può passare inosservato.

Il principale fattore che funge da discriminante per l'età di ingresso in pubertà è il raggiungimento di una taglia corporea minima, che consente alla femmina di sostenere la gravidanza e l'allattamento. I processi riproduttivi, infatti, sono molto dispendiosi dal punto di vista energetico per le femmine. È cruciale, in particolare, la disponibilità di una giusta quota di tessuto adiposo. Infatti, in caso l'adipe corporeo sia troppo poco oppure eccessivo, le funzionalità riproduttive possono essere ostacolate.

Se una femmina rimane gravida prima di aver raggiunto le dimensioni corporee dell'adulto, le necessità metaboliche che deve fronteggiare durante la gestazione e l'allattamento entrano in competizione con i fabbisogni metabolici e impediscono il completamento della crescita. Questo è il motivo per cui esistono dei meccanismi secondo i quali alcuni segnali metabolici influenzano lo sviluppo dei neuroni ipotalamici e il tasso di secrezione del GnRH, l'ormone di rilascio delle gonadotropine. Sono oggetto di studio i ruoli della leptina e della kisspeptina in queste dinamiche.

La leptina è un ormone proteico da 16 kDa con una struttura simile alle citochine, espressa dal gene *ob*. Risulta in grado di influire sulla regolazione del peso corporeo, sulla velocità del

metabolismo e su alcune funzioni riproduttive. Essa fu scoperta nel 1994 (*Zhang Y et al., 1994*) e prende il suo nome dal greco *leptos*, che significa magro, sottile.

La leptina viene secreta prevalentemente dagli adipociti, ma in piccole quantità viene prodotta anche dagli altri tipi cellulari. I livelli di questo ormone sono correlati positivamente con la quantità di grasso dorsale (*Robert et al., 1998*), e l'analisi dei livelli di leptina fornisce una stima attendibile dello stato nutrizionale dell'animale. Infatti, nella zona dell'ipotalamo in cui avviene il controllo del peso corporeo, sono numerosi i recettori per la leptina, che svolge a tale livello un'azione anoressizzante.

Il gene *ob*, che codifica per la leptina, è tra quelli coinvolti nella patogenesi dell'obesità. È stato osservato che i topi omozigoti per mutazioni inattivanti il gene *ob* tendono a diventare obesi, ma se ad essi viene somministrata leptina per via iniettiva, l'ingestione di cibo si riduce in maniera significativa (*Hamann e Matthaei, 1996*).

Da sempre è noto che il digiuno influisce negativamente sulle funzioni riproduttive. Oggi si sa che quando lo stato nutrizionale dell'animale è buono, i livelli di leptina sono alti e la sintesi di GnRH aumenta. La leptina, infatti, agisce direttamente sui neuroni che rilasciano il GnRH e anche indirettamente condizionando neuroni intermedi in grado di rilasciare il neuropeptide Y.

Vista l'importanza del GnRH durante la pubertà, un corretto razionamento alimentare, ben calibrato soprattutto nell'apporto energetico, è in grado di anticipare l'insorgenza del primo calore. Una carenza proteica, al contrario, ritarda questo momento (*Duée e Étienne, 1974*).

*Dourmad et al. (1990)* hanno confermato che un elevato apporto energetico durante la crescita aumenta il contenuto di grasso corporeo e riduce l'età della scrofetta alla pubertà. Questo studio aveva ipotizzato anche che una limitazione nell'ingestione di lisina determinasse un aumento del grasso corporeo, ma questa supposizione è stata messa in dubbio da nuovi risultati, discordanti con i precedenti, esposti in un articolo pubblicato pochi anni dopo (*Dourmad et al., 1993*).

Studi più approfonditi sono necessari per chiarire il ruolo nella comparsa della pubertà esercitato dalla kisspeptina, una proteina prodotta a livello ipotalamico. Nei ratti e nei primati, infatti, è stato teorizzato che l'aumento dell'espressione dei suoi recettori che precede la pubertà ha un ruolo nell'incrementare la pulsatilità dell'LH. Vi è la possibilità che esistano meccanismi simili anche nel suino, alla luce del fatto che iniezioni di kisspeptina effettuate sperimentalmente in scrofette hanno stimolato intensamente la secrezione di gonadotropine (*Lents et al., 2020*). Rimangono ancora da esplorare le reali influenze di questa proteina nel periodo puberale.

### 1.3 Asse endocrino ipotalamo-ipofisi-ovaie

Il controllo endocrino dell'attività delle gonadi dipende dall'asse endocrino ipotalamo-ipofisi anteriore-gonadi. In particolare, il neuropeptide GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), prodotto dall'ipotalamo, raggiunge l'ipofisi tramite il circolo ematico, sfruttando il sistema portale ipotalamo-ipofisario. Qui, regola la secrezione delle gonadotropine ipofisarie, che sono l'ormone follicolostimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH). Le cellule gonadotrope dell'adenoipofisi, infatti, presentano sulla propria membrana cellulare i recettori per il GnRH, il cui numero è sottoposto a cambiamenti (up-regulation e down-regulation) che a valle regolano la secrezione delle gonadotropine. Segnatamente, la continua occupazione di tali recettori da parte del GnRH è causa di down-regulation (*Davidson e Stabenfeldt, 2020*).

La secrezione del GnRH diviene rilevante durante la pubertà, quando si instaura una peculiare pulsatilità nel suo rilascio. La sua produzione, come detto, avviene a livello ipotalamico, dove sono presenti un centro della secrezione tonica e uno della secrezione fasica. Quest'ultimo è inattivato nel maschio e attivo solo nella femmina. Il centro della secrezione tonica genera brevi impulsi di GnRH, con frequenza e ampiezza che dipendono dal suo grado di attivazione neuronale, mediato dai centri encefalici superiori. L'attività del centro tonico permette di mantenere nel tempo una secrezione basale di gonadotropine, anch'essa di tipo pulsatile.

Il centro fasico, da parte sua, è responsabile del picco preovulatorio di gonadotropine, e in assenza di stimolazione libera solo piccole quantità di GnRH. In presenza di un aumento rilevante dei livelli plasmatici di estrogeni in assenza di progesterone, il centro fasico rilascia un picco di GnRH, a cui fanno seguito un picco di LH e l'ovulazione

L'FSH è responsabile della stimolazione dei follicoli, mentre l'LH è fondamentale nell'innescare della maturazione finale del follicolo e nell'induzione della maturazione. Nella femmina le gonadotropine stimolano, ognuna in modo diverso, l'attività delle gonadi e la produzione di steroidi sessuali: estrogeni nei follicoli e progesterone a livello di corpi lutei (*Sjaastad et al., 2013*).

Gli estrogeni derivano dagli androgeni prodotti dalla teca interna del follicolo, che vengono captati dalle cellule della granulosa e prontamente convertiti in estradiolo.

Estrogeni e progesterone modificano, con dei meccanismi di *feedback* ad ansa lunga, la secrezione del GnRH dall'ipotalamo, e contemporaneamente esercitano un effetto diretto sulle cellule secernenti gonadotropine nell'ipofisi anteriore. L'estradiolo, il più importante estrogeno, aumenta la sensibilità dell'ipofisi al GnRH stimolando a tale livello un aumento dell'espressione del gene che codifica per il recettore del GnRH.

Gli estrogeni, però, diminuiscono l'ampiezza degli impulsi alla secrezione di gonadotropine. Il progesterone, dal canto suo, ne diminuisce la frequenza. Ciò significa che, nella fase follicolare, la frequenza degli impulsi aumenta a causa dell'assenza di progesterone, mentre l'ampiezza dell'impulso diminuisce a causa della presenza di estrogeni. Questa combinazione è importante per alimentare la fase finale di crescita del follicolo antrale in via di sviluppo (Davidson e Stabenfeldt, 2020).

L'FSH stimola la secrezione di un ormone peptidico, l'inibina, la quale a sua volta manifesta un effetto inibitorio sulla secrezione dell'FSH, ma non dell'LH. In particolare, l'inibina è in grado di ridurre il numero di recettori del GnRH sulle cellule della ghiandola pituitaria secernenti FSH e di ostacolare l'up-regulation esercitata dal GnRH sui geni che codificano per i propri recettori (Wang et al., 1988; Anderson, 2011). Si può affermare che l'inibina, modulando differenzialmente l'attività del GnRH, permette di diversificare la produzione delle gonadotropine, favorendo quella dell'LH nei momenti antecedenti l'ovulazione.

La Figura 2 schematizza l'assetto ormonale nelle parti iniziale e finale della fase follicolare.

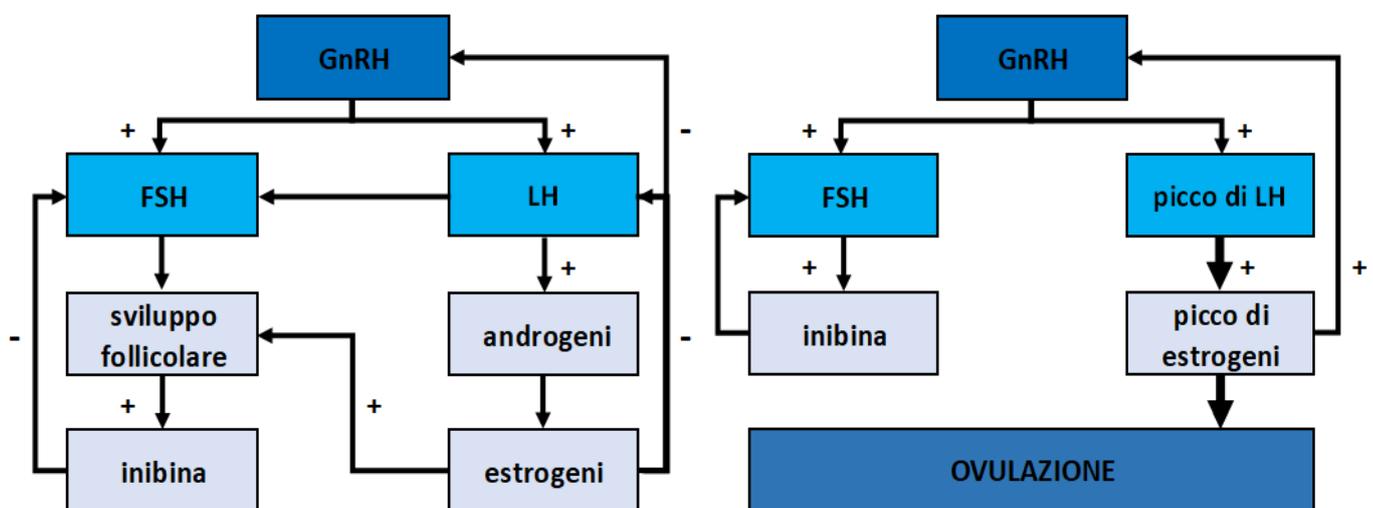


Figura 2. Assetto ormonale dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi all'inizio (a sinistra) e alla fine (a destra) della fase follicolare

## 1.4 Estro e ciclo estrale

Il suino *Sus scrofa domesticus* è una specie politocica poliestrale. Solo in corrispondenza della lattazione, il ciclo estrale della scrofa entra in una fase anestrata, per riprendere dopo lo svezzamento, quando si riattiva la produzione di estrogeni e si manifesta un nuovo calore. Il fotoperiodismo ha sul ciclo ovarico influenze solo minime, rintracciabili nelle tempistiche leggermente più prolungate tra svezzamento e ovulazione in estate rispetto all'inverno (*Prunier et al., 1996*).

La durata media del ciclo estrale è di 21 giorni; esso è suddiviso in fase follicolare e fase luteale. La fase follicolare prevede lo sviluppo di numerosi follicoli, ciascuno contenente un oocita, in contemporanea su entrambe le ovaie. A differenza che in altre specie, nel suino non ci sono ondate follicolari vere e proprie, anche se i follicoli antrali si possono sviluppare in modo sincronizzato (*Evans, 2003*). Durante il proestro, che dura per i primi 2-3 giorni del ciclo, i follicoli passano da una fase immatura, quella di follicolo primordiale, allo stadio di follicolo primario e poi secondario. L'oocita viene rivestito da diversi strati cellulari, divisi tra la granulosa (interna) e la teca (esterna), separate dalla membrana basale.

Al termine della fase follicolare, sulla superficie delle ovaie vi sono numerosi follicoli antrali, pronti per ovulare, che secernono alte quantità di estrogeni (*Sjaastad et al., 2013*). Gli estrogeni sono gli ormoni steroidei responsabili della comparsa del calore o estro. Nel corso dell'estro si evidenziano il riflesso di immobilità al verro, l'emissione di muco vulvare e una netta esposizione della vulva, che si presenta arrossata e rigonfiata. Nel vestibolo vaginale la temperatura risulta aumentata. Questi sono i segni che permettono all'allevatore di rilevare l'estro e di procedere con la fecondazione in tempi utili.

Durante l'estro si verifica il cosiddetto picco preovulatorio dell'LH, che ha questi effetti:

- aumento del flusso ematico all'ovaio
- aumento del liquido nei tessuti circostanti l'ovaio
- accumulo di fluido nella cavità follicolare
- secrezione da parte del follicolo di collagenasi, la quale indebolisce la parete follicolare
- contrazione delle cellule muscolari lisce dell'ovaio
- differenziazione delle cellule follicolari in cellule luteiniche

Questi eventi esitano in una progressiva protrusione dei follicoli sulla superficie ovarica, processo che si conclude con l'ovulazione, ovvero la discesa dei follicoli. L'ovulazione porta alla fuoriuscita del liquido follicolare, che contiene la cellula uovo circondata dalle cellule della

granulosa. Gli oociti vengono accolti dalle fimbrie delle tube ovariche e convogliati verso l'ampolla (*Sjaastad et al., 2013*).

A ogni ovulazione vengono rilasciati dai 20 ai 30 oociti, che sopravvivono per alcune ore. Ciò che rimane dei follicoli dopo l'ovulazione si riorganizza in corpi lutei, ghiandole endocrine secernenti progesterone, avente la funzione di sostenere l'eventuale gravidanza. Questa è la fase luteale, sovrapponibile al metaestro e al diestro. Normalmente il tredicesimo giorno dopo l'ovulazione segna la fine della crescita del corpo luteo. A questo punto, in assenza di gravidanza, i corpi lutei iniziano a regredire: si parla di luteolisi. Dopo altri tre giorni, il corpo luteo si presenta ridotto sensibilmente di dimensioni e trasformato in corpo albicante (*Wilfinger, 1974*).

La principale responsabile della luteolisi è la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), che la induce tramite vasocostrizione (*McCracken et al., 1970*). Tale sostanza, prodotta a livello endometriale, ha anche un ruolo nell'ovulazione, nell'insorgenza della contrattilità uterina e nell'annidamento dell'embrione. La sua azione si svolge sia nel circolo sistemico sia con un sistema di flusso locale controcorrente (*De Rensis et al., 2012*): dalle vene uterine la  $PGF_{2\alpha}$  si propaga in direzione opposta al flusso ematico verso l'arteria ovarica, sfruttando la differenza di concentrazione. Questa prostaglandina è metabolizzata molto rapidamente: il 90% viene inattivata con un solo passaggio attraverso i polmoni (*Davidson e Stabenfeldt, 2020*).

Nella scrofa, a differenza che in altre specie, la sintesi di  $PGF_{2\alpha}$  in un solo corno uterino è sufficiente per causare luteolisi in entrambe le ovaie. Una singola somministrazione di  $PGF_{2\alpha}$  determina di norma solo un abbassamento dei livelli di progesterone, mentre iniezioni multiple possono indurre la luteolisi se effettuate prima del dodicesimo giorno del ciclo estrale: questo rende la  $PGF_{2\alpha}$  efficace in alcuni protocolli per la sincronizzazione dell'ovulazione. Tuttavia, essa viene più spesso usata per l'induzione del parto e per svuotare l'utero nel post-parto. È stato inoltre dimostrato che la somministrazione di  $PGF_{2\alpha}$  al momento dell'inseminazione può aumentare la fertilità. Per esempio, nelle scrofe sottoposte a stress da caldo estivo, essa migliora le prestazioni riproduttive (*De Rensis et al., 2012*).

Oltre alla  $PGF_{2\alpha}$ , per controllare lo sviluppo follicolare nelle scrofe e nelle scrofette si possono usare il progestinico altrenogest, il GnRH, l'LH suino (porcine LH, pLH), la gonadotropina corionica equina (eCG) o la gonadotropina corionica umana (hCG) (*De Rensis e Kirkwood, 2016*).

Le tempistiche con cui le scrofe vanno in calore dopo lo svezzamento sono variabili; tanto più precoce è il calore, tanto più esso è duraturo e tanto più fertile è l'animale. Una piccola percentuale di scrofe (2-3% della mandria) potrebbe aver già riattivato la sua attività ciclica negli

ultimi giorni di lattazione: in questo caso, l'estro si manifesta il giorno stesso dello svezzamento. Nelle rimanenti, il contatto (per almeno dieci minuti al giorno) con un verro ruffiano dopo lo svezzamento è utile a stimolare la comparsa del calore e ad aumentarne la durata e l'entità delle manifestazioni. Il verro, di norma vasectomizzato, viene fatto passare davanti alle scrofe, in autonomia o all'interno di una gabbia mobile. Le scrofe, in tal modo, vengono stimolate visivamente e olfattivamente. Al contempo, l'operatore le manipola simulando l'azione del verro, ovvero toccando la schiena e tirando la piega della grassella.

Una percentuale significativa di scrofe va in calore dal quarto al settimo giorno dopo lo svezzamento (*Soede et al., 2011*) e ha una durata in calore superiore ai due giorni. Quelle che vanno in calore alla quinta giornata hanno un calore di circa 48 ore, mentre i calori insorti al sesto giorno durano circa 36 ore (*Boulot et al., 2014*). La dimensione e il numero di follicoli maturi, infatti, influenzano la quantità di estrogeni e quindi l'entità delle manifestazioni estrali.

## 2. FECONDAZIONE ARTIFICIALE E GRAVIDANZA NELLA SCROFA

### 2.1 Prelievo e valutazione del materiale seminale

Nella specie suina, è ampiamente affermata la fecondazione artificiale (FA) con seme fresco o refrigerato. L'allevatore acquista il seme dalle case genetiche, che lo forniscono in dosi preconfezionate, o in alternativa lo preleva dai verri presenti all'interno dell'allevamento se questo è dotato di un laboratorio di fecondazione artificiale.

Per il prelievo del seme, il verro viene fatto montare su un manichino, sfodera il pene ed eiacula. Il seme raccolto viene esaminato al microscopio per valutare la motilità, la morfologia, la concentrazione, la vitalità e l'integrità della membrana degli spermatozoi. La motilità dei singoli spermatozoi viene solitamente valutata preparando un vetrino a fresco con una piccola quantità di sperma, pari a circa 10 µl. Dopo aver osservato diversi campi microscopici scelti a caso a un ingrandimento di almeno 200 x, si esprime una stima percentuale della motilità (*Althouse, 1999*). Valutare al microscopio la morfologia degli spermatozoi di un'eiaculato permette di giudicare il loro stadio di sviluppo e di maturazione. Ci si può avvalere di diverse colorazioni. Quando un numero elevato di spermatozoi si presenta morfologicamente anormale, si è di fronte a una situazione patologica che va individuata con indagini diagnostiche sull'animale, dato che le anomalie spermatiche sono raramente patognomoniche (*Althouse, 1999*).

Per determinare la concentrazione degli spermatozoi si può fare una conta diretta con una camera contaglobuli oppure si può valutare l'opacità, che si correla positivamente con la concentrazione, tramite l'uso di un fotometro (*Althouse, 1999*). Moltiplicando la concentrazione per il volume dell'eiaculato si ottiene il numero totale di spermatozoi.

La stima della vitalità degli spermatozoi è un altro aspetto fondamentale dell'analisi del seme. La valutazione della motilità, di per sé, non permette di distinguere le cellule in anabiosi, ovvero quelle che sono immobili ma in grado di riprendere le proprie funzioni, da quelle danneggiate che hanno perso la propria capacità fecondante. Per questo, è importante condurre test più approfonditi per la stima della vitalità. Per esempio, si possono sfruttare tecniche come l'analisi cellulare videografica computerizzata, la microscopia elettronica, la flussocitometria e le misurazioni fluorometriche. Esistono poi in commercio i test alla resazurina: si tratta di esami

colorimetrici in vitro in cui il viraggio cromatico indica la concentrazione di spermatozoi vitali nell'eiaculato non diluito (Althouse, 2000).

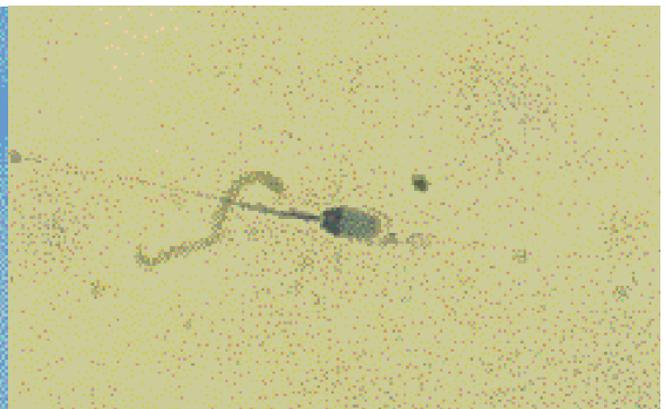
L'integrità delle membrane cellulari è il più rilevante indicatore di vitalità. Alcuni coloranti permettono di distinguere gli elementi vivi da quelli morti; in alternativa si può effettuare il test di rigonfiamento iposmotico: in un ambiente iposmotico, gli spermatozoi integri (Figura 3a) si rigonfieranno, a differenza di quelli con la membrana danneggiata (Figura 3b) (Althouse, 2000).

Un adattamento del test di rigonfiamento iposmotico è il test di resistenza osmotica, in cui lo sperma fresco viene aggiunto a terreni isotonici e ipotonici. Dopo avere incubato i terreni per periodi di tempo variabili, si valuta la percentuale di acrosomi normali in ciascuno e si classifica la qualità della fertilità del verro come elevata, media o scarsa (Althouse, 2000).

Se la valutazione dà risultati soddisfacenti, il materiale seminale viene diluito, arricchito con un extender o mestruo e diviso in dosi. Il mestruo, di norma, è ricco in glucosio e sodio citrato. Ogni dose dovrebbe contenere almeno 2 miliardi di spermatozoi in un volume intorno ai 100 ml (Beccaro e Faravelli, 2004), anche se per l'inseminazione post-cervicale si possono usare volumi inseminanti minori. La dose viene posta in un contenitore monouso comprimibile, che verrà poi collegato al catetere per la fecondazione. Nell'attesa di essere utilizzato, per un breve periodo, il seme può essere mantenuto a 37°C. In alternativa, il seme può essere portato a una temperatura tra 15 e 19 °C.



*Figura 3a.* Immagine microscopica in campo luminoso della morfologia normale degli spermatozoi di verro. Colorazione di Hancock modificata, ingrandimento originale 1250 x (Althouse, 1999)



*Figura 3b.* Fotografia al microscopio al contrasto di spermatozoo non vitale di suino. Il cappuccio acromiale è distaccato. Colorazione Tripan blu, ingrandimento originale 1250 x (Althouse, 2000)

## 2.2 Congelamento del seme

A differenza di quanto accade in altre specie zootecniche, nella riproduzione suina l'utilizzo di seme congelato in azoto liquido è molto limitato: l'ostacolo è la bassa vitalità che gli spermatozoi scongelati mostrano la maggior parte delle volte. In particolare, la quota di spermatozoi ancora vitali allo scongelamento risulta del 30-50% inferiore a quella di partenza (Tarocco, 2000). I danni da congelamento che le membrane plasmatiche subiscono riguardano la perdita o l'inattivazione di enzimi acrosomiali come la ialuronidasi e l'acrosina, senza i quali la penetrazione nell'ovocita diviene impossibile. Vengono persi anche fosfolipidi, magnesio e potassio, con conseguenti modifiche della permeabilità cellulare (Tarocco, 2000).

Nei verri, in realtà, l'efficienza della crioconservazione del seme sembra essere altamente soggetta a variazioni individuali più che alle caratteristiche dei processi di congelamento e scongelamento (Medrano et al., 2009). Soltanto il 20-40% dei verri sarebbe in grado di dare materiale spermatico adatto al congelamento (Tarocco, 2000).

Gli studi sulla possibilità di congelare il materiale spermatico di verro risalgono già agli anni '50. Nel 1973 si registrò la nascita della prima nidiata di suinetti proveniente da una fecondazione artificiale eseguita con seme congelato (Tarocco e Goldoni, 1973). Da allora sono stati compiuti molti sforzi per identificare i fattori responsabili della bassa attitudine al congelamento del seme della maggioranza dei verri.

È noto che le membrane spermatiche contenenti molto colesterolo rispetto ai fosfolipidi sono meno suscettibili ai danni da basse temperature (Darin-Bennett e White, 1977). Il motivo è che il rapporto tra colesterolo e fosfolipidi influenza la fluidità di membrana. Tale rapporto, negli spermatozoi di verro, è pari a 0,2 e risulta inferiore a quello degli spermatozoi di toro (0,51; Parks e Graham, 1992), di stallone (0,36; Amann e Graham, 1993) e di ariete (0,85; Holt e North, 1985). Nelle tre specie citate il congelamento è praticato di routine, ma va detto che i volumi inseminanti sono molto minori che nel suino.

Data la difficoltà tecnica legata ai maggiori volumi di seme da congelare e stoccare, il congelamento non può prescindere da un processo di concentrazione, che consiste nell'eliminazione almeno parziale del plasma seminale, costituito dalle secrezioni delle ghiandole annesse all'apparato riproduttivo. La sua rimozione, oltre a permettere di lavorare con volumi minori, innalza il tasso di spermatozoi mobili e il numero di acrosomi normali (Pursel e Johnson, 1971). La concentrazione viene normalmente fatta precedere da un periodo di incubazione a 37 °C, atto a favorire la fissazione delle proteine del plasma seminale sulla membrana spermatica.

Prima di procedere con il congelamento, è importante aggiungere un diluente isotonic, che svolga una funzione tampone e che contenga lipoproteine o altre sostanze protettive contro lo shock da freddo. Altre caratteristiche richieste per i diluenti sono l'indennità da germi patogeni e la presenza di sostanze nutritive per il metabolismo degli spermatozoi (*Beccaro e Faravelli, 2004*). La diluizione ottimale si aggira intorno ai 600 milioni di spermatozoi per millilitro (*Polge, 1976*). A questo punto il materiale viene inserito in apposite paillettes.

Il raffreddamento viene condotto in modo lento e graduale, mentre il congelamento vero e proprio deve essere rapido al fine di evitare la formazione di cristalli di ghiaccio intracellulare. Lo scongelamento, invece, è da eseguirsi tramite immersione delle paillettes in acqua a 42 °C per 20 secondi. Di solito è necessario unire più paillettes per ricostituire una dose; il loro contenuto va aggiunto al mestruo diluente.

Le difficoltà nel congelare il seme suino limitano la possibilità di trasportarlo e conservarlo, con un certo danno per il progresso genetico. Infatti, se fosse disponibile contemporaneamente il seme congelato di tutti i verri controllati geneticamente, l'impulso della selezione sarebbe maggiore. Inoltre, si ridurrebbero i rischi sanitari legati al trasporto e all'adattamento dei verri, perché non sarebbe più necessaria la loro compravendita (*Beccaro e Faravelli, 2004*).

Uno studio pubblicato su *Animal Reproduction Science* (*Guimarães et al., 2017*) si è posto l'obiettivo di individuare, tra le proteine espresse sugli spermatozoi suini, alcuni marker di congelabilità del seme. In tale studio, il seme di quattordici verri adulti è stato sottoposto a un congelamento lento e a uno scongelamento rapido. La successiva valutazione del vigore e della motilità degli spermatozoi ha permesso di dividere i verri in due gruppi, uno con buona capacità di congelamento (sei verri) e uno con bassa capacità di congelamento (otto verri).

In seguito, le proteine della membrana spermatica sono state estratte e sottoposte a elettroforesi bidimensionale. I gel sono stati analizzati per evidenziare le proteine espresse in modo significativamente differenziale, identificate mediante spettrometria di massa. L'esperimento è riuscito in tal modo a identificare quattro potenziali marker di congelabilità: l'arilsulfatasi A e la F-actin capping protein subunità  $\alpha 1$  erano maggiormente espresse nel gruppo a buona capacità di congelamento, mentre la lactaderina e il frammento Fc della proteina legante le IgG erano più presenti sugli spermatozoi dei verri il cui seme aveva mostrato una minore vitalità e una minore motilità dopo lo scongelamento.

L'arilsulfatasi A è presente nell'acrosoma degli spermatozoi e sulla loro superficie e interagisce con la galattocerebrosidasi, un enzima che partecipa al metabolismo dei carboidrati e di altre

molecole (Peng et al., 2015). L'interazione tra arilsulfatasi A e galattocerebrosidasi potrebbe avere un ruolo importante nel metabolismo energetico dello sperma, e questo spiega la maggiore motilità post-scongelo del seme con una maggiore concentrazione di arilsulfatasi A.

La F-actin capping protein subunità  $\alpha$  è una proteina in grado di legare l'actina, stabilizzando la sua lunghezza. È possibile che tale molecola agisca come scavenger, ovvero trasformi i radicali dell'ossigeno in composti non radicalici. La limitazione dei danni ossidativi preserva la vitalità degli spermatozoi dopo lo scongelamento (Guimarães et al., 2017).

La lactaderina è implicata nell'interazione tra i gameti; la sua quantità nello sperma è positivamente correlata con la motilità degli spermatozoi nello sperma fresco (González-Cadavid et al., 2014) sebbene, come detto, sia negativamente correlata con la vitalità e la motilità post-scongelo. Questa apparente contraddizione è risolta dall'evidenza che la lactaderina lega la  $\alpha$ -sinucleina, una proteina chaperone presente nei fluidi extracellulari: questa interazione sembra essere tossica a lungo termine. Inoltre, la lactaderina potrebbe facilitare eventi precoci di capacitazione, indesiderati e deleteri per la crioconservazione. Gli spermatozoi capacitati, infatti, sopportano meno il congelamento.

Infine, riguardo al ruolo della proteina legante le IgG nell'abbassamento della vitalità post-scongelo, si ipotizza che essa si leghi alla caderina del plasma seminale la quale, a sua volta, aggrega gli ioni calcio. Questo si traduce in una capacitazione prematura, che rende gli spermatozoi inadatti al congelamento (Guimarães et al., 2017).

## 2.3 Tecniche di fecondazione artificiale

In scrofaia, la chiave per ottenere buoni risultati in termini di fertilità è fecondare con le corrette tempistiche in modo da effettuare le coperture durante l'estro. L'ovulazione avviene a due terzi del calore, a prescindere dalla sua durata. Per conoscere la durata del calore nella singola scrofa, è possibile monitorarla costantemente; in alternativa si può effettuare una stima sulla base del momento di insorgenza rispetto allo svezzamento, come descritto nel *Capitolo 1.4*.

Il momento ottimale per fecondare l'animale è quello immediatamente precedente all'ovulazione. Dopo questo evento il tasso di fecondazione, cioè la proporzione di oociti che possono essere fecondati, cala in modo rapido, fino al 30% di 24 ore dopo. Ciò è dovuto al veloce invecchiamento degli oociti, che oltre a compromettere il successo della fecondazione può determinare la genesi di zigoti non in grado di sopravvivere.

Se invece la scrofa viene fecondata 24 ore prima dell'ovulazione, il tasso di fecondazione è simile al caso in cui la si feconda al momento dell'ovulazione, solo leggermente inferiore. Gli spermatozoi, infatti, all'interno delle vie genitali della femmina sopravvivono e mantengono la capacità fecondante anche per un giorno.

Queste dinamiche, unite alla difficoltà di individuare il momento dell'ovulazione con precisione in tutti gli animali, rendono vantaggioso compiere fecondazioni multiple, di solito 2 o 3. È stato visto che, aumentando la frequenza delle inseminazioni, si ottiene un incremento della numerosità della nidiata (*Flowers et al., 1993*). È stato però anche dimostrato che un numero troppo elevato di interventi fecondativi aumenta l'incidenza della sindrome degli scoli vulvari, con effetti deleteri sull'apparato riproduttivo.

L'uso di verri ruffiani, sperma non vitale ed estrogeni aumenta sia la fertilità che la numerosità della nidiata (*Tarocco, 2000*). Si tratta di stimoli spesso utilizzati all'atto della fecondazione artificiale. In particolare, è corretto presentare i verri ruffiani davanti alle scrofe se si usa un protocollo di fecondazione artificiale intracervicale, per favorire la risalita del seme fino al corno uterino. Al contrario, questa pratica non va applicata nel caso della fecondazione intrauterina o post-cervicale, nella quale una dose minore di seme viene posizionata direttamente a livello uterino con un apposito catetere "a tampone" come quello a destra in *Figura 4*. Il motivo è che i movimenti della muscolatura uterina rischierebbero di essere controproducenti.



*Figura 4.* Diverse tipologie di catetere per la fecondazione artificiale.

A sinistra il classico catetere a spirale, che simula la forma del pene del verro.

Al centro un catetere multilamellare.

A destra un catetere a tampone, usato per l'inseminazione post-cervicale.

## 2.4 Dai gameti allo zigote

Quando gli spermatozoi raggiungono l'epididimo, ha inizio una fase di maturazione, che prevede per prima cosa il riassorbimento del fluido tubulare, che fino a questo momento ha avuto la funzione di mezzo per il movimento degli spermatozoi. Vengono poi aggiunte glicoproteine (che impacchettano gli spermatozoi), carnitina e glicerilfosforilcolina. Inoltre, gli spermatozoi passano al metabolismo anaerobio, la cromatina viene ulteriormente condensata, viene persa la goccia citoplasmatica e il flagello acquisisce una certa motilità. Dopo la maturazione gli spermatozoi sostano nel condotto deferente, per unirsi al liquido secreto dalle ghiandole al momento dell'eiaculazione.

Quando il seme arriva nella cervice dell'utero, inizia la capacitazione, che consiste nella perdita del rivestimento glicoproteico, denaturato grazie all'ambiente acido delle vie genitali femminili, del colesterolo di membrana e di altri fattori inibitori. Una piccola percentuale di spermatozoi, dopo essere transitati nell'utero, giunge nell'istmo della tuba. Qui, se lo scoppio del follicolo non è ancora avvenuto, gli spermatozoi sostano per alcune ore.

Giunti nei pressi della cellula uovo, gli spermatozoi intraprendono l'attivazione. In primo luogo, si ha la reazione acrosomiale: in questa fase la membrana esterna dell'acrosoma si fonde con quella plasmatica e si liberano le spermolisine, le quali permettono allo spermatozoo di trapassare la corona radiata, che insieme al cumulo ooforo si interpone tra il lume della tuba e l'ovulo. In seguito, la membrana acrosomiale interna ripristina la continuità con la membrana plasmatica. A questo punto, si assiste a movimenti a frusta del flagello, che danno una propulsione allo spermatozoo.

La membrana plasmatica si modifica e vengono espresse proteine di superficie che permettono l'adesione e la fusione con essa. La successiva attivazione di preacrosina e acrosina induce la digestione di parte della membrana pellucida: a questo punto lo spermatozoo entra nel citoplasma dell'oocita.

Grazie ai meccanismi di blocco della polispermia, che avviene in concomitanza con la maturazione dell'oocita (*Baker e Polge, 1976*), un solo spermatozoo riesce a penetrare. Il blocco della polispermia inizia entro pochi minuti dalla penetrazione e consiste di due fasi:

- depolarizzazione della membrana vitellina tramite ingresso di ioni sodio; è un blocco rapido e immediato ma temporaneo, perché la polarizzazione si ripristina. Lo scambio di ioni sodio e protoni stimola la sintesi proteica e la duplicazione del DNA grazie all'aumento di pH dovuto dallo scambio

- attivazione di fosfolipasi chinasi-dipendenti, cui segue la liberazione di ioni calcio (onda calcio) e lo scoppio dei granuli corticali; vengono mascherate le proteine di membrana ZP per evitare il riconoscimento di ulteriori spermatozoi. Dall'ispessimento della membrana pellucida si crea la membrana di fecondazione (*Pelagalli et al., 2014*)

## 2.5 Inizio della gravidanza

Quando uno spermatozoo riesce a penetrare in un ovulo e a fecondarlo, la meiosi si completa e viene emesso un globulo polare, cellula non funzionale derivante dalla divisione cellulare impari dell'ovocita secondario. Si ricostituisce l'involucro nucleare. Nell'ootide, così è chiamata la fase di transizione tra oocita e zigote in cui i due corredi sono separati, ognuno dei due pronuclei duplica il proprio patrimonio genomico, dopo averlo decondensato. Avviene quindi la singamia, ovvero l'integrazione del materiale genetico di derivazione paterna con quello di derivazione materna (*Pelagalli et al., 2014*).

A questo punto, ha inizio la segmentazione del nuovo individuo, che prevede una serie di divisioni mitotiche. Dopo 4 giorni dalla fecondazione dell'ovulo, si forma la morula; nel frattempo sta avvenendo la migrazione tubarica. La fecondazione, infatti, avviene nelle ampolle della tuba dell'utero, poi il *conceptus* si sposta, coperto dalla membrana di fecondazione, che evita contatti con la tuba che potrebbero esitare in annidamenti scorretti (*Pelagalli et al., 2014*).

Il giorno successivo si ha la formazione della blastula o blastocisti. Fra l'11° e il 12° giorno le blastocisti si allungano di un metro in 24 ore. Al centro delle blastocisti filamentose vi è il nodo embrionale. L'allungamento è dovuto primariamente a variazioni nella forma delle cellule del trofoectoderma, le quali mostrano un cambio di espressione genica. In particolare, è stato dimostrato che, durante questo processo, tali cellule esprimono in modo differenziato la ribonucleoproteina associata all'RNA eterogeneo nucleare (hnRNP) A2/B1. Tale proteina regola lo splicing, ovvero la rimozione degli introni del pre-mRNA, favorendo l'espressione proteica (*Wilson et al., 2000*).

Attraverso l'attività degli ormoni ovarici, in particolare del progesterone prodotto dal corpo luteo, l'endometrio viene preparato alla formazione della placenta. Il *conceptus* raggiunge la mucosa uterina a livello delle corna, dove avviene la dissoluzione della membrana di fecondazione. Può iniziare la fase di impianto: il trofoectoderma prende intimi rapporti con l'epitelio luminale dell'utero (*Bazer e Johnson, 2014*). A questo punto, i villi coriali del trofoblasto entrano in funzione permettendo gli scambi tra madre e *conceptus*.

L'intervallo tra l'inizio e la fine dell'ovulazione è di circa sei ore; questo comporta già una differenza di età tra gli embrioni al momento dell'annidamento. Inoltre, ha un ruolo importante la velocità di migrazione, che è influenzata soprattutto dalle secrezioni prodotte dagli embrioni. Dopo la blastocisti, si sviluppa la gastrula (gastrulazione) e inizia la fase embrionale propriamente detta, in cui si formano i tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma) e in seguito gli abbozzi degli organi (*Pelagalli et al., 2014*).

Intorno al diciottesimo giorno, tra il 20% e il 30% degli embrioni sono stati persi. Questo evento è fisiologico e avviene anche con valori normali di tasso di ovulazione, ovvero il numero di oociti ovulati. Tra il trentesimo e il quarantesimo giorno, un ulteriore 10% degli embrioni rimasti viene perso. Nel periodo intermedio della gravidanza, la situazione si assesta, mentre negli ultimi 25 giorni viene perso di nuovo il 5-10% dei feti rimasti.

L'inizio della gravidanza è associato a profondi cambiamenti funzionali nell'utero. In particolare, l'intensa angiogenesi porta all'accumulo nell'endometrio di liquido interstiziale. Quest'ultimo potrebbe risultare pericoloso per il trofoblasto se non intervenisse la linfangiogenesi, ovvero il processo di creazione e rimodellamento dei vasi linfatici. La linfangiogenesi è mediata dal fattore di crescita VEGF-C ed è fondamentale per determinare il successo dell'impianto. La presenza del trofoblasto nel lume uterino influisce positivamente sull'espressione del VEGF-C (*Złotkowska et al., 2019*).

Tradizionalmente la durata della gravidanza nella specie suina è indicata in 114 giorni, ovvero 3 mesi, 3 settimane e 3 giorni (*Pelagalli et al., 2014*). Attualmente, però, in molte linee genetiche si sta notando un lieve prolungamento.

## 2.6 Segnali di gravidanza e ritorni in calore

Mentre si allungano, tra l'11° e il 12° giorno di gravidanza, le blastocisti producono estrogeni, in particolare estrone solfato, che blocca il rilascio di  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e quindi la luteolisi. Se almeno 4-5 embrioni producono estrogeni e occupano l'endometrio, l'assetto ormonale materno si predispone ad accoglierli (*Davidson e Stabenfeldt, 2020*): si parla di primo segnale di gravidanza. Quando, a 17-25 giorni dalla fecondazione, inizia l'annidamento uterino, vi è un secondo picco di estradiolo (*Ziecik et al., 2011*). In pratica, viene emesso un secondo segnale di gravidanza: gli embrioni mantengono bloccato il rilascio delle  $\text{PGF}_{2\alpha}$  tramite l'estrone solfato. Se però gli embrioni sono in numero inferiore ai 5, tale segnale non si verifica perché la concentrazione di estrone solfato è insufficiente.

La distinzione tra primo e secondo segnale di gravidanza è funzionale a descrivere la distribuzione delle classi di ritorno in calore. Infatti, se il primo segnale non viene emesso, oppure non è abbastanza forte, si ha luteolisi e la scrofa ritorna in estro dopo 18-24 giorni dall'estro precedente. Si tratta di un ritorno in calore in ciclo per riassorbimento embrionale precoce (*Mazzoni et al., 2020*).

Se invece il primo segnale è positivo, ma poi si perdono degli embrioni e il secondo non si verifica, la  $PGF_{2\alpha}$  causa luteolisi e la scrofa ritorna fuori ciclo (dopo 25-30 giorni). In questo caso si parla di ritorno in calore fuori ciclo (o aciclici) di primo tipo e di riassorbimento embrionale tardivo (*Mazzoni et al., 2020*). Il termine riassorbimento è in realtà improprio, in quanto gli embrioni non vengono riassorbiti dall'utero, bensì espulsi, solitamente senza che gli operatori se ne accorgano, e in parte fagocitati dai macrofagi.

I ritorni aciclici di secondo tipo sono invece quelli conseguenti agli aborti precoci, e si verificano tra i 31 e i 38 giorni dall'inseminazione artificiale. Una scrofa che sta perdendo la gravidanza presenta una vulva edematosa, con la mucosa molto arrossata. Il motivo è la vasodilatazione attiva mediata dagli estrogeni, finalizzata a permettere il passaggio di cellule del sistema immunitario all'interno del lume uterino.

L'obiettivo delle scrofaie è mantenere la percentuale dei ritorni in ciclo inferiore al 7-8% rispetto al totale delle inseminate, e quella dei ritorni fuori ciclo sotto il 4%. Gli aborti, invece, non dovrebbero mai superare l'1%. Si tende a ritenere accettabile una portata al parto, ovvero una percentuale di scrofe inseminate che arrivano a partorire, intorno all'85% (*Knox, 2016*).

In caso ci si trovi davanti a un tasso anomalo di ritorni in calore, bisogna chiedersi se la scrofa sia stata coperta al momento giusto e se il seme fosse sufficientemente vitale e mobile. Se a tornare in calore è una scrofetta, è importante anche escludere malformazioni dell'apparato genitale e cause alimentari. Quando invece le pluripare tornano in calore più volte di seguito, bisogna pensare a vaginiti, metriti o a squilibri alimentari durante la lattazione. Spesso anche uno svezzamento troppo precoce fa sì che i primi calori ad esso successivi siano infecondi (*Curto, 1980*).

# 3. MIGLIORARE L'EFFICIENZA PLACENTARE E LO SVILUPPO PLACENTARE

## 3.1 Formazione e caratteristiche della placenta suina

La cellula uovo dei mammiferi della sottoclasse *Theria*, detti placentati, è priva del deutoplasma, comunemente detto vitello o tuorlo, che in altri animali costituisce la fonte di nutrimento durante le prime fasi di sviluppo del *conceptus*. Di fronte a questa mancanza di riserve, spetta all'organismo materno provvedere, durante la gravidanza, al fabbisogno del *conceptus* in termini di ossigeno e nutrienti. Questo compito viene svolto dalla placenta, che presenta una parte materna (che deriva dall'endometrio, la mucosa dell'utero) ed una parte fetale (ovvero il corion). Il corion è un annesso embrionale posto tra il trofoblasto e la somatopleura extraembrionale. Esso si allega all'amnios, altro importante annesso, in corrispondenza del rafe corioamniotico e forma, insieme all'allantoide, l'allantocorion. Per questo, si parla di placenta allantocoriale. L'allantoide è un annesso permanente, di grandi dimensioni; la placenta è vascolarizzata all'allantoide (*Pelagalli et al., 2014*). Infine, il sacco vitellino è un annesso fetale rudimentale, che nelle prime fasi di gestazione va incontro ad atrofia e non partecipa agli scambi materno-fetali (*Santos et al., 2012*).

Durante la formazione degli annessi fetali, i villi primari o coriali del trofoblasto si arricchiscono di tessuto connettivo lasso prendendo la denominazione di villi secondari. Si ha poi la trasformazione in villi terziari, che vedono la presenza di isole angiogeniche, le quali danno poi origine ai vasi dell'embrione e alle cellule del sangue. Quando lo sviluppo è terminato e sono possibili gli scambi di tipo emotrofico tra madre ed embrione, si parla di villi coriali.

La fase placentare inizia intorno al quindicesimo giorno di gravidanza. Il periodo che va dal ventesimo al settantesimo giorno di gravidanza vede un importante sviluppo della placenta, in preparazione alla rapida crescita del feto, che inizia proprio intorno al settantesimo giorno (*Bazer e Johnson, 2014*).

Lo sviluppo placentare raggiunge quindi il suo apice intorno al settantesimo giorno di gestazione, quando la superficie arriva fino ai 1000 cm<sup>2</sup>. Da quel momento fino al centesimo giorno di gravidanza l'area della placenta rimane costante. Negli ultimi dieci giorni, però, l'area della placenta torna a crescere (*Fiorimanti et al., 2022*).

Nel suino, la placenta copre quasi interamente l'epitelio uterino ed è pieghettata (*Bertasoli et al., 2015*). Essa è a localizzazione diffusa incompleta: i villi coriali sono presenti ubiquitariamente, all'infuori delle estremità. Questi villi hanno una lunghezza compresa tra 0,8 e 1,0  $\mu\text{m}$  e un diametro di 0,08  $\mu\text{m}$  (*Björkman, 1965*).

Dal punto di vista istologico, la placentazione suina è classificata come epitelio-coriale vera (*Bazer e Johnson, 2014*): i villi si giustappongono all'epitelio uterino, e al momento del parto si liberano con facilità, senza causare emorragia. Questo è dovuto al fatto che il sinciziotrofoblasto non va a corrodere la mucosa uterina né i suoi capillari. Si può parlare anche di placenta adeciduata, contrapposta alla placenta deciduata in cui all'atto del parto vi è perdita di sangue e tessuto uterino (*Pelagalli et al., 2014*).

Le interdigitazioni microscopiche lungo l'interfaccia feto-materna sono denominate pieghe primarie (*Pelagalli et al., 2014*) e prendono forma tra il trentacinquesimo e il quarantesimo giorno di gestazione. Il grado di interdigitazione tra i villi e l'epitelio aumenta nel tempo e si forma un'area tridimensionale di contatto (*Leiser e Dantzer, 1988*). Durante l'ultimo terzo della gestazione, la superficie funzionale per lo scambio di nutrienti e rifiuti viene aumentata dallo sviluppo di un ulteriore livello di interdigitazione lungo le pieghe primarie, denominate pieghe secondarie (*Björkman e Dantzer, 1987*).

Il cordone ombelicale è attraversato dal peduncolo vitellino, dal peduncolo allantoideo e dai relativi vasi: due arterie e una vena (*Pelagalli et al., 2014*).

Tra il sangue materno e quello fetale risultano i seguenti strati (*Beaudoin et al., 1998*):

- endotelio materno
- tessuto connettivo
- epitelio uterino
- lume uterino
- trofoblasto
- tessuto connettivo fetale
- endotelio dei vasi sanguigni fetali

La *Figura 5* schematizza i tessuti che partecipano all'interfaccia feto-materna.

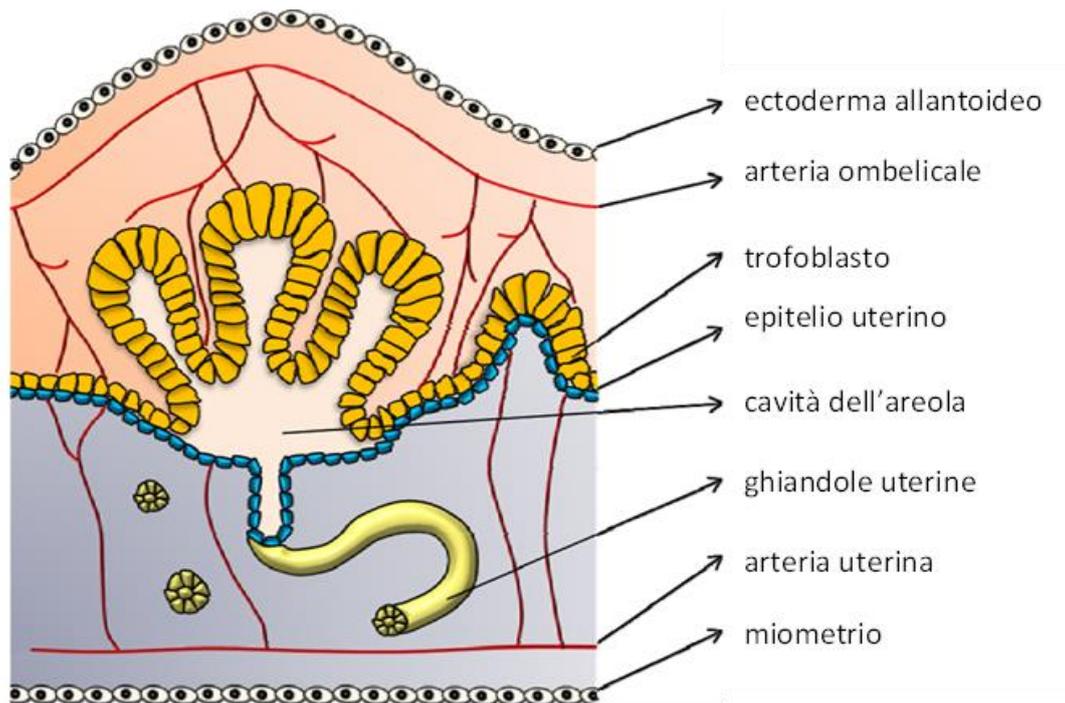


Figura 5. Schema dell'interfaccia feto-materna (Olio et al., 2014)

### 3.2 Influenza dell'apporto proteico sullo sviluppo placentare

Una delle cause del basso peso alla nascita dei suinetti e dell'elevata variabilità di peso all'interno delle nidiate è la ridotta crescita delle placente. È stato osservato che, fornendo alle scrofette o alle scrofe in gestazione un'integrazione alimentare di arginina e glutammina, si favoriscono la crescita della placenta e lo sviluppo dei suoi vasi. Questi due aminoacidi, infatti, servono per la sintesi delle proteine presenti nei tessuti, ma anche delle poliammine e dell'ossido nitrico, che a livello placentare stimolano la sintesi del DNA e delle proteine, l'angiogenesi e la crescita vascolare. Questi accorgimenti nutrizionali, di conseguenza, sono in grado di incrementare il tasso di sopravvivenza e di migliorare lo sviluppo dei *concepti* (Wu et al., 2017).

La dieta a base di mais e soia che viene somministrata in gestazione non fornisce mai più del 50% dell'apporto che l'animale assumerebbe se fosse alimentato ad libitum. Il razionale è evitare che la scrofa vada in sovrappeso, per scongiurare disordini metabolici, disturbi della lattazione e insulino-resistenza (Kim et al., 2009). Il punto debole di questa dieta è che non permette alle placente di esprimere completamente il proprio potenziale di crescita.

Nel 2004 fu condotto uno studio volto a verificare se esistesse una correlazione tra il trasporto aminoacidico a livello di interfaccia utero-placentare e la dimensione dei feti (Finch et al., 2004). In particolare, era stata presa in considerazione l'uptake della leucina, l'amminoacido più abbondante nella dieta fornita in gestazione. Il trasporto della leucina può avvenire tramite un

sistema sodio-indipendente (sistema L), attivo già dall'impianto uterino, oppure attraverso il sistema B<sup>0</sup>, sodio-dipendente, che entra in funzione solo in seguito. Per questo studio furono utilizzate undici scrofe meticce, figlie di un verro di razza Large White e di una scrofa Landrace (LW x L). Dopo averle inseminate, le scrofe furono sopresse a diversi momenti della gravidanza: quattro di esse a 45 giorni, quattro a 65 giorni e tre a 100 giorni. L'analisi delle placente delle scrofe abbattute al centesimo giorno di gestazione rivelò che i microvilli dei feti più piccoli utilizzavano, per l'uptake della leucina, solo il sistema sodio-indipendente, mentre nelle placente dei feti di dimensioni medie e grandi era entrato in funzione, dopo i 45 giorni di gestazione, anche il sistema sodio-dipendente. Tuttavia, tra i suinetti normopeso e quelli più piccoli non c'erano differenze significative nell'uptake totale, se non al quarantacinquesimo giorno di gestazione. Un altro studio (*Chen et al., 2015*) ha analizzato i proteomi, ovvero i patrimoni proteici, delle placente e dell'endometrio durante la seconda metà della gravidanza, differenziando le placente dei feti con crescita normale da quelle dei feti che avevano uno sviluppo più rallentato. I risultati, ottenuti tramite Western Blotting e proteomica, mostrano una differente espressione delle proteine strutturali della cellula, ma anche di quelle implicate nel metabolismo energetico, nella risposta allo stress, nel turnover cellulare e nel trasporto e metabolismo dei nutrienti. L'analisi delle funzioni di tali proteine suggerisce che nei feti con crescita rallentata ci sia stata una riduzione della produzione di ATP e del trasporto di nutrienti e, dall'altro lato, un aumento dello stress ossidativo e dell'apoptosi e un'alterazione del metabolismo cellulare. In questi soggetti, quindi, si può parlare a tutti gli effetti di una disfunzione utero-placentare.

### 3.3 Funzioni della placenta

Dalla superficie di attacco e dalla vascolarizzazione della placenta dipendono la disponibilità di nutrienti ai *concepti*, la loro esposizione a ormoni come la leptina e di conseguenza il loro sviluppo e accrescimento. Durante la vita fetale, la placenta e la circolazione placentare suppliscono alla funzione dei polmoni, del tratto gastrointestinale e dei reni, dal momento che presiedono allo scambio di gas (O<sub>2</sub> in entrata e CO<sub>2</sub> in uscita) e provvedono a fornire al feto nutrienti come acqua e amminoacidi (*Sjaastad et al., 2013*). Una importante funzionalità della placenta è rimuovere i metaboliti fetali di scarto quale l'ammoniaca (*Wu et al., 2017*).

L'insieme delle sostanze secrete dalle ghiandole del miometrio e di quelle trasudate dalla mucosa uterina è detto istiotrofo. L'istiotrofo, ricco di nutrienti disponibili per il feto, comprende anche materiale risultante dalla decomposizione di tessuti materni in corso di ricambio (*Mossman,*

1987). Il contenuto dell'istiotrofo varia in base ai livelli ormonali. In particolare, durante la fase luteale sono maggiormente espresse proteine deputate alla proliferazione e alla differenziazione cellulare, al metabolismo, ad attività enzimatiche, all'angiogenesi, al trasporto intracellulare mediato da vescicole, al trasporto di ossigeno e all'organizzazione della matrice extracellulare. Questo cambio di espressione determina conseguenze importanti sull'ambiente uterino, il quale viene preparato all'accoglimento del *conceptus* (Lee et al., 2016).

L'istiotrofo si accumula nelle areole, peculiari strutture di alcuni millimetri presenti nella zona di contatto tra il trofoectoderma e l'epitelio della mucosa uterina (Bazer e Johnson, 2014). L'epitelio di rivestimento delle areole è colonnare, con lunghi microvilli e un sistema tubulare apicale ben sviluppato. Risulta inoltre in grado di formare numerose vescicole (Friess et al., 1981). Questi elementi lo rendono efficiente nella sua funzione di assorbire i nutrienti presenti nell'istiotrofo e veicarli nel circolo fetale. Le areole sono classificate come regolari se raccolgono il secreto di una sola ghiandola uterina, mentre sono dette irregolari se le ghiandole di riferimento sono diverse (Bertasoli et al., 2015). Secondo Miglino et al. (2001), per ogni *conceptus* si riscontrano fino a 7000 areole regolari e intorno alle 1500 areole irregolari.

Il trasporto di glucosio, fruttosio e amminoacidi avviene tramite specifici trasportatori espressi dal trofoectoderma, e in seguito dall'allantocorion. Per il glucosio e il fruttosio, i trasportatori a livello di interfaccia utero-placentare sono della famiglia SLC2A; in particolare sono abbondantemente espressi SLC2A3 e SLC2A8. Il primo è un trasportatore ad alta capacità e ad alta affinità per il glucosio, mentre il secondo può trasportare sia glucosio che fruttosio (Johnson et al., 2023). Parlando degli amminoacidi, la maggior parte di essi sfruttano meccanismi di trasporto attivo e si muovono contro gradiente, ma alcuni attraversano le membrane per diffusione. Trasportatori amminoacidici degni di nota a livello placentare sono SLC7A7, SLC7A1, SLC7A2 e SLC3A1 (Krombeen et al., 2019a). La placenta suina è in grado di sintesi amminoacidica, in particolare può produrre glutamina e, in quantità minori, alanina (Self et al., 2004). Infine, il calcio attraversa il citoplasma in forma libera, mentre il ferro legato all'uteroferrina utilizza delle vescicole (Roberts et al., 1986).

L'interrelazione sanguigna materno-fetale è complessa e può essere descritta come a corrente incrociata doppia (Santos et al., 1988). Questo sistema è condiviso con i primati primitivi ed è un ibrido tra il sistema controcorrente e quello a corrente incrociata. Il flusso controcorrente (*countercurrent*), in cui il circolo materno e quello fetale scorrono affiancati ma in direzioni opposte, determina scambi efficienti e permette l'equilibrio del sangue fetale con le pressioni

parziali dei gas arteriosi materni (Ewart, 2020). Nel flusso a corrente incrociata (*crosscurrent*) i vasi fetali formano delle anse, in corrispondenza delle quali incrociano il flusso materno (Wilmoth, 2009). Nel caso del suino, il circolo fetale forma le anse e il circolo materno le intercetta sia in una direzione che nell'altra, entrambe le volte in modo perpendicolare.

La placenta svolge anche funzioni endocrine, dal momento che può produrre estrogeni, progesterone e gonadotropine corioniche. La produzione di progesterone P<sub>4</sub> aumenta costantemente durante la gestazione. Tuttavia, nel suino, la placenta non produce mai abbastanza progesterone da sostenere da sola la gravidanza: per questo, l'apporto del corpo luteo è fondamentale in ogni fase (Knight, 1994).

La placenta, nella scrofa gravida, è anche la principale responsabile della produzione di leptina. Durante la gestazione, però, vi è una certa leptino-resistenza: vi è una down-regulation dei recettori centrali per la leptina. In circolo, la leptina si ritrova soprattutto legata alle proteine di trasporto. Le concentrazioni di questo ormone nel sangue sono quindi alte, nonostante esso sortisca solo effetti blandi. Di conseguenza, quale che sia la copertura adiposa, l'azione oreosizzante del cortisolo prevale su quella anoressizzante della leptina.

Per questo motivo, nelle scrofe alimentate ad libitum durante la gestazione, vi è la tendenza all'accumulo di tessuto adiposo bianco sottocutaneo. Questo ha un'azione positiva per la madre, ma negativa sul tasso di sopravvivenza embrionale e fetale, così come sulla lattazione. Se durante la gestazione le scrofe fossero alimentate ad libitum, ingerirebbero il doppio di quello che viene loro somministrato normalmente, pari a circa 2 kg di mangime al giorno. Venendo meno la funzione endocrina della placenta, al momento del parto la produzione di leptina crolla, determinando uno stato di anoressia che rappresenta una sfida per l'allevatore, perché può compromettere la lattazione.

Nel maiale, a differenza di altre specie come cavallo, cane e gatto, la placenta non produce relaxina ed è sostituita in questo compito dal corpo luteo. La relaxina svolge un'azione di supporto alla gravidanza, sinergica con quella del progesterone. In corrispondenza della luteolisi *pre-partum* si assiste a un picco nella secrezione della relaxina (Petroff e Greco, 2020), che in questa fase predispone i tessuti molli del canale pelvico al parto, rendendoli più elastici. Nella placenta suina, inoltre, non viene prodotto lattogeno placentare (Farmer, 2001), ormone che in altre specie ha un ruolo nell'insorgenza della lattazione.

### 3.4 Valutazione dell'efficienza placentare

L'efficienza placentare (PE) viene definita come il rapporto tra la massa (o il peso) del suinetto, o del feto suino, e la massa (o il peso) della sua placenta (*Wilson e Ford, 2001*):

$$PE = m_{\text{suinetto}} / m_{\text{placenta}}$$

L'efficienza fetale può essere considerata come un carattere genetico. Essendo la placenta di pertinenza fetale (*Krombeen et al., 2019a*), il carattere efficienza placentare non dipende solamente dal valore genetico della scrofa per quel carattere, ma anche da quello del verro.

All'interno di una nidiata, l'efficienza placentare può variare sensibilmente: è frequente che nascano suinetti con pesi molto simili, le cui placente differiscono tra loro fino al 25% di peso. Le placente con alti valori di efficienza placentare associati a feti di dimensioni medie hanno solitamente una maggiore capacità di trasporto dei nutrienti. Al contrario, quelle con valori bassi di efficienza placentare associate a feti che mostrano un ritardo di crescita hanno spesso una ridotta capacità di trasporto dei nutrienti. Queste evidenze portano a individuare nell'efficienza placentare un indice affidabile della funzionalità placentare e dell'adattamento feto-placentare (*Krombeen et al., 2019b*).

È assodato, da molteplici autori, che le placente più grandi sono in media meno efficienti di quelle più piccole. Non emerge invece un'associazione tra il peso della placenta e quello del feto, se non nei periodi iniziali della vita fetale (*Krombeen et al., 2019a*). In generale, si pensa che i suinetti nati con un peso maggiore abbiano una maggiore probabilità di avere una placenta altamente efficiente. Tuttavia, in uno studio del 2004 (*Finch et al., 2004*), analizzando i pesi dei feti al quarantacinquesimo giorno di gravidanza e quelli delle relative placente è emerso che, a tale stadio della gestazione, l'efficienza placentare è maggiore per i feti di dimensioni minori.

È interessante ragionare in termini di efficienza media della nidiata, intesa come media delle efficienze placentari dei suinetti di una stessa nidiata (*Wilmoth, 2009*). All'interno di una stessa razza o linea genetica di suini, le nidiate con un'efficienza placentare media superiore alle altre hanno generalmente placente più efficienti che occupano meno spazio uterino, con il risultato che vi è più spazio disponibile per i feti.

Similmente, le razze più prolifiche e che portano più suinetti allo svezzamento sono le stesse che mostrano una maggiore efficienza placentare media (*Krombeen et al., 2019b*). Nelle razze europee e nordamericane, anche in una scrofa sana e performante, una quota rilevante di

potenziali suinetti viene persa nelle diverse fasi della gestazione. In particolare, a fronte dell'ovulazione di circa 26 oociti, quasi tutti fecondati, una percentuale di embrioni compresa tra il 30 e il 40% viene persa nel periodo di allungamento e di annidamento della blastocisti, ovvero tra il dodicesimo e il diciottesimo giorno dal concepimento (*Pope, 1994*).

Al contrario, le razze iperprolifiche di provenienza cinese come la Meishan riescono a portare a termine un numero maggiore di suinetti perché, nel periodo di preimpianto, il tasso mitotico è più basso, perciò i feti rimangono di dimensioni minori durante tutta la gestazione (*Ford, 1997*).

Va sottolineato che la Meishan ha un tasso di ovulazione e una dimensione uterina simile a quella delle razze commerciali occidentali, se non leggermente inferiore (*Bazer et al., 1988*).

Per ogni feto Meishan, è sufficiente una superficie endometriale minore rispetto a un feto di una razza europea o americana allo stesso stadio della gestazione. Le placente risultano sensibilmente più piccole e leggere (*Christenson, 1993*), con un peso che si aggira intorno al 70% del peso di una placenta di un feto di razza Yorkshire dello stesso peso. Le placente Meishan sembrano quindi essere mediamente più efficienti.

Il pattern di crescita della placenta è un altro aspetto che differenzia la Meishan dalle razze europee e americane. In queste ultime, la massa placentare aumenta esponenzialmente dal 20° al 70° giorno di gestazione, poi si attesta su un plateau fino al 100° giorno di gestazione: solo negli ultimi giorni prima del termine si evidenzia un aumento secondario della massa. Le placente Meishan, al contrario, non aumentano di dimensioni in corrispondenza del parto, ma a partire dal novantesimo giorno di gravidanza migliorano dal punto di vista della vascolarizzazione, aumentando la densità dei vasi all'interfaccia feto-materna e di conseguenza l'efficienza della placenta (*Biensen et al., 1998*).

Per stimare con precisione le differenze di efficienza placentare tra le razze iperprolifiche e quelle commerciali è opportuno ridurre la variabilità genetica dovuta alla madre. Per questo, è stato condotto uno studio in cui embrioni di razza Meishan sono stati trasferiti in femmine riceventi di razza Yorkshire e viceversa. Al parto, le placente dei suinetti Meishan avevano un'efficienza placentare di  $8,7 \pm 0,4$ , che si abbassava a  $6,3 \pm 0,5$  quando gestavano nell'utero di riceventi Yorkshire. In questo secondo caso, infatti, si assisteva allo sviluppo di placente più simili a quelle tipiche della razza Yorkshire. Dall'altro lato, i suinetti Yorkshire mostravano un'efficienza placentare di  $3,4 \pm 0,8$ , che aumentava a  $4,1 \pm 0,9$  se erano stati trasferiti in femmine Meishan (*Wilson et al., 1998*). La maggiore efficienza si traduceva in un numero medio di nati vivi sensibilmente maggiore, dell'ordine di 3-5 suinetti in più per nidiata (*Wilson et al., 1999*).

Le evidenze riportate indicano l'efficienza placentare come un componente cardine della capacità uterina, ovvero il numero di suinetti che una scrofa riesce a portare al parto. Questo carattere descrive l'attitudine dell'utero a garantire i nutrienti necessari per sostenere lo sviluppo del maggior numero di feti fino al parto. In una visione più funzionale alla selezione, è stato proposto di definire la capacità uterina come la massa di tessuto placentare che una femmina può portare fino al termine della gravidanza (*Wilson e Ford, 2001*).

La valutazione dell'efficienza placentare in vivo non è semplice e mostra alcuni limiti. Chi scrive ha effettuato alcuni campionamenti, immediatamente a seguito di parti naturali di scrofe di razza Landrace Italiana (LI) e Large White Italiana (LWI) e meticce LWI x LI e LI x LWI. In particolare, sono stati registrati i pesi delle placente e dei suinetti neonati e, per ognuno di essi, la lunghezza dall'occipite alla base della coda. La finalità era quella di verificare la correlazione esistente tra il peso del suinetto e l'efficienza placentare e tra questa e la lunghezza del suinetto.

Inoltre, l'mRNA estratto da porzioni di placenta adiacenti ai vasi è stato sottoposto a qPCR per quantificare l'espressione di alcuni geni coinvolti nelle attività di trasporto di amminoacidi e glucosio. L'obiettivo era correlare l'efficienza placentare con l'espressione di tali mRNA.

Al fine di ridurre la variabilità fenotipica dovuta all'ambiente, i campionamenti sono stati eseguiti in una sola scrofaia. In tal modo, le condizioni ambientali erano simili o sovrapponibili per tutte le nidiate e l'alimentazione delle scrofe gestanti era quanto più possibile standardizzata.

I campionamenti e le raccolte dati venivano effettuati immediatamente al termine del parto, per non disturbare la scrofa in un momento così delicato. Talvolta, però, non c'era la certezza che il secondamento, ovvero l'espulsione delle placente e degli invogli fetali, fosse terminato.

I risultati di questi esperimenti non sono riportati in questa tesi a causa di alcuni ostacoli riscontrati. Il primo di essi è relativo all'elevata numerosità dei campioni che è necessario raccogliere e analizzare prima di sancire o escludere l'esistenza delle correlazioni ipotizzate. I dati ottenuti dalle nidiate campionate non hanno permesso di elaborare dati statisticamente significativi e non vi era la possibilità di seguire un numero sufficientemente elevato di parti.

Un secondo ostacolo è la difficoltà riscontrata nel delimitare le placente dei singoli suinetti e nell'attribuirle ad ognuno. Alcune placente, infatti, vengono espulse contestualmente al feto, ma la maggior parte di esse fuoriesce dall'utero solo al termine del parto, durante il secondamento. Spesso, poi, i punti di rottura delle placente sono casuali, così come quelli dei cordoni ombelicali (*Pelagalli et al., 2014*). Era quindi possibile stimare un'efficienza placentare media, mentre il dato individuale era soggetto un'imprecisione troppo elevata.

Solo un'indagine in laparotomia in un elevato numero di femmine gravide in condizioni standard permette di attribuire correttamente le placente, e quindi ottenere dati di efficienza placentare individuale omogenei e utilizzabili. Molti degli studi citati sopra hanno seguito questa via, ma motivazioni di carattere etico rendono sempre più difficile ottenere l'autorizzazione per eseguire esperimenti di questo tipo.

### 3.5 Fattori condizionanti l'efficienza placentare

Una domanda cruciale, che ha guidato vari studi, è quali siano le differenze strutturali, funzionali e genetiche tra le placente ad alta efficienza e quelle a bassa efficienza. L'ipotesi, ancora da confermare, è che valori estremi di efficienza placentare siano correlati alla diversa espressione di geni che promuovono la crescita fetale, la vascolarizzazione e il trasporto dei nutrienti.

È stata riferita recentemente una correlazione positiva dell'efficienza placentare con la densità vascolare (VD) della placenta a 110 giorni di gravidanza (*Krombeen et al., 2019a*), ma i risultati ottenuti campionando a 90 giorni di gravidanza sono discordanti. Un articolo recente riporta che l'angiogenesi placentare è attiva fino intorno al giorno 77 di gestazione (*Fiorimanti et al., 2022*). *Vonnahme e Ford (2001)* avevano stabilito che le placente dei *concepti* risultanti dall'accoppiamento tra verri e scrofette selezionati per un'elevata efficienza placentare mostrano una maggiore espressione dell'mRNA per i fattori di crescita vascolare endoteliale (VEGF), oltre che una maggiore efficienza placentare.

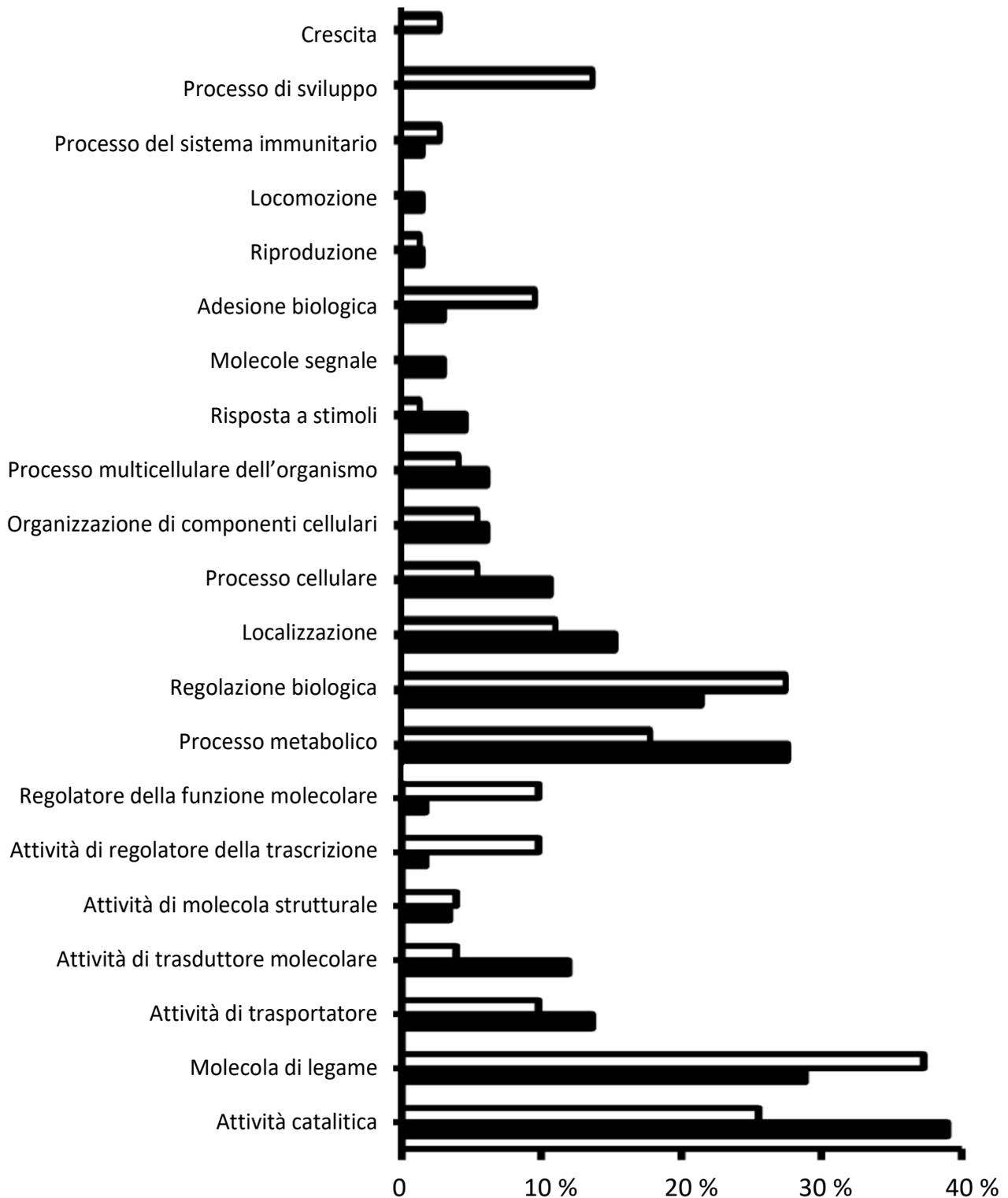
In un nuovo studio, è stato riscontrato che l'espressione dei marker di angiogenesi, tra cui la caderina dell'endotelio vascolare e il VEGF-A, era più bassa nelle placente dei suinetti che alla nascita pesavano meno di 500 grammi rispetto alle altre (*Hu et al., 2020*). Questi risultati, combinati, suggeriscono che nell'efficientamento della placenta possano essere implicate modificazioni vascolari che si verificano nelle fasi finali della gestazione.

*Krombeen et al. (2019a)* hanno analizzato anche la relazione tra l'efficienza placentare e l'espressione di sette geni che codificano per trasportatori di glucosio, amminoacidi e acidi grassi nella placenta e nell'endometrio adiacente di scrofette di linea materna. I campionamenti sono stati eseguiti ai giorni 70, 90 e 110 di gestazione.

Al 70° giorno, le variazioni dell'efficienza placentare erano correlate ad alterazioni dell'espressione dei trasportatori di amminoacidi (SLC7A7, SLC7A1, SLC3A1) nella placenta e nell'endometrio. Al 90° giorno di gestazione, la PE era correlata positivamente all'espressione

placentare di un trasportatore di glucosio (SLC2A3) e negativamente all'espressione endometriale di due trasportatori di amminoacidi cationici (SLC7A1 e SLC7A2). Al giorno 110, al termine della gravidanza, la PE era negativamente correlata all'espressione di due trasportatori di amminoacidi (SLC7A7 e SLC7A1) e di un trasportatore di glucosio (SLC2A3).

La *Figura 7* si riferisce all'espressione genetica in placentate ad alta efficienza. Viene confrontata la percentuale dei geni coinvolti in una funzione che risultano down-regolati con la percentuale dei geni quelli up-regolati che fanno capo alla stessa funzione. Si noti che, tra i geni implicati in attività catalitiche, metaboliche e di trasporto, ve ne sono di più up-regolati (39%, 27% e 14% rispettivamente) che down-regolati (25,5%, 17% e 10% rispettivamente). Per motivi ancora da esplorare, invece, i geni con attività di regolazione delle funzioni molecolari o della trascrizione sono entrambi per il 2% up-regolati e per il 10% down-regolati (*Krombeen et al., 2019b*).



*Figura 6. Classificazione dei geni espressi differenzialmente che risultano down-regolati (in bianco) e up-regolati (in nero) nelle placente ad alta efficienza placentare rispetto a quelle a bassa efficienza placentare. I dati sono espressi come percentuale dei geni esaminati per ogni funzione e sono riferiti al 95° giorno di gravidanza.*

*Classificazione funzionale dei geni ottenuta da Gene Ontology (Krombeen et al., 2019b).*

### 3.6 Selezione genetica per l'efficienza placentare

Nelle scrofaie il numero di nati vivi, insieme alla mortalità nelle prime settimane di vita, rappresenta un elemento critico per la riproduzione e la produttività. In assoluto, il parametro che descrive con più precisione la resa di una scrofaia e che riassume meglio i due valori sopra citati è il numero di svezzati per scrofa per anno (*Mazzoni, 2010*). Questo parametro risente dell'età dei suinetti allo svezzamento, che può anticipare oppure ritardare la nuova inseminazione, ma è soprattutto un indice delle performance delle scrofe.

La selezione genetica diretta per la numerosità della nidiata, quando applicata, non ha dato i risultati sperati a causa della grande variabilità e complessità delle componenti fisiologiche che determinano questo valore. Se si seleziona per la numerosità della nidiata senza tener conto della capacità uterina, si ottiene una riduzione del peso medio alla nascita inversamente proporzionale all'aumento dei suinetti nati. Vi è inoltre il rischio che aumenti la natimortalità, poiché vengono favoriti tassi di ovulazione elevati più che una maggiore capacità uterina. Il risultato è la selezione di scrofe che non sono in grado di portare tutti i *concepti* fino al parto (*Wilson e Ford, 2001*).

Si è aperta quindi la possibilità di selezionare i riproduttori per l'efficienza placentare, in una dinamica di selezione indiretta. Come detto, infatti, l'efficienza placentare media è correlata positivamente con la capacità uterina della scrofa (*Wilson e Ford, 2001*) e con la sua prolificità (*Krombeen et al., 2019b*). Migliorare l'efficienza placentare tramite selezione genetica può dunque portare ad aumentare la media dei nati vivi, mantenendo al contempo il peso alla nascita e il tasso di sopravvivenza pre-svezzamento stabili, uniformi e su buoni livelli.

Il numero di svezzati diviene così il carattere obiettivo della selezione, mentre l'efficienza placentare è il carattere strumento. La sfida della selezione indiretta è ottenere per il carattere obiettivo un buon progresso genetico, definito come variazione nelle generazioni del valore genetico medio per un carattere all'interno di una popolazione. Il progresso genetico per il carattere obiettivo è pari a quello per il carattere strumento corretto per la correlazione genetica tra i due caratteri (*Oldenbroek e van der Waaij, 2014*). Di conseguenza, il primo è minore del secondo, ma ciò non rende questo approccio meno meritevole di essere esplorato, in virtù dei risultati che potrebbe garantire.

Sarebbe quindi da sperimentare la possibilità di impostare un indice di selezione genetica che tenga conto dell'efficienza placentare. Restrungendo il campo alla suinicoltura italiana, la selezione per l'efficienza placentare si inserisce bene nella macroarea della selezione per la prolificità. Quest'ultima è prevista tra le finalità della selezione per le razze Landrace Italiana e

Large White Italiana, enunciate all'articolo 10 del Disciplinare per l'Attuazione dei Programmi Genetici della Specie Suina (*Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2020*). Queste due razze, insieme alla Duroc Italiana, costituiscono la base genetica per tutti i suini destinati alla produzione del Prosciutto di Parma e del Prosciutto di San Daniele. I riproduttori di queste razze sono iscritti in un Libro Genealogico tenuto dall'Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS). In particolare, i verri, per essere ammessi al Libro Genealogico, devono essere sottoposti al Sister and Brother Test (SIB test).

Questo test prevede la rigorosa valutazione dei dati produttivi delle due migliori sorelle piene e del miglior fratello pieno del verro candidato. A oggi, i caratteri valutati sono:

- il numero di nati vivi
- il numero di mammelle
- l'indice di accrescimento giornaliero
- l'indice di conversione alimentare
- lo spessore del lardo in corrispondenza della parte mediale del muscolo gluteo medio al momento della macellazione
- il peso complessivo delle coppe con osso e delle spalle e delle lombate a caldo
- il calo peso delle cosce dopo la prima salagione

Questi parametri rientrano poi in diversi indici genetici parziali, ognuno dei quali ha un peso differente, di cui si tiene conto durante il computo dell'Indice Selezione, un indice genetico aggregato che assegna un valore genetico al riproduttore (*Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2020*).

Per inserire l'efficienza placentare media come carattere oggetto di selezione, istituendo un indice genetico che ne tenga conto, si potrebbe fecondare una o più delle sorelle piene del verro e, al parto, rapportare il peso totale dei suinetti al peso totale delle placente.

Questa proposta, chiaramente, potrà essere testata sperimentalmente solo una volta che sarà stato chiarito il ruolo di tutti i fattori che concorrono a definire il valore medio dell'efficienza placentare in una nidiata. Sarà inoltre necessario studiare le interazioni del carattere efficienza placentare con gli altri caratteri oggetto di selezione, come è buona norma fare per non compromettere il progresso genetico per gli altri indici genetici parziali (*Oldenbroek e van der Waaij, 2014*).

Oggi, in molti Paesi, i programmi di miglioramento genetico dei riproduttori suini stanno cercando di acquisire un approccio sempre più rivolto verso la genomica, in modo da rendere più

veloce ed efficiente il progresso genetico. Per trasferire l'indice di selezione proposto sul piano genomico, vanno necessariamente individuati alcuni *loci* genetici che descrivano in modo accurato il carattere (*Oldenbroek e van der Waaij, 2014*). A quel punto, sarebbe possibile approntare un test genomico che permetta di selezionare con facilità i riproduttori per l'efficienza placentare.

Il fine ultimo di queste proposte è aumentare con successo il numero di nati vivi, l'uniformità dei suinetti al parto, il tasso di sopravvivenza pre-svezzamento e, in ultima analisi, il numero di suinetti svezzati per scrofa per anno.

### 3.7 Ereditabilità dell'efficienza placentare

La selezione genetica per un carattere porta a un miglioramento genetico che è tanto più rapido quanto più tale carattere è ereditabile. L'ereditabilità ( $h^2$ ) è definita come la quota della varianza fenotipica ( $V_p$ ) che è di natura genetica additiva ( $V_g$ ) e non di natura ambientale, e quindi risulta trasmissibile alla progenie (*Oldenbroek e van der Waaij, 2014*). La formula per calcolarla è:

$$h^2 = \frac{V_{g\ add}}{V_p}$$

Considerando per semplicità il genotipo indipendente dall'ambiente, e trascurando quindi il contributo dato dall'epigenetica, la varianza fenotipica può essere espressa come somma della varianza genotipica con la varianza ambientale. Nella formula dell'ereditabilità viene computata solo la varianza genetica additiva ( $V_{g\ add}$ ), ovvero quella slegata dalle interazioni tra i geni, perché è l'unica trasmissibile alle generazioni future.

L'ereditabilità assume sempre valori tra 0 e 1, estremi esclusi. Infatti, se essa fosse pari zero allora la varianza genetica sarebbe anch'essa nulla, quindi non si tratterebbe di un carattere genetico. Se il valore fosse pari ad uno, invece, si tratterebbe di un carattere mendeliano puro, ovvero determinato solo da fattori genetici e non influenzato dall'ambiente in nessun modo.

Va sottolineato inoltre che l'ereditabilità è specifica per ogni tratto genetico, ma cambia leggermente anche per ogni popolazione in un ambiente particolare. Questo è dovuto alle differenze di variabilità genetica tra le diverse popolazioni (*Oldenbroek e van der Waaij, 2014*).

I caratteri legati alla riproduzione mostrano tradizionalmente un'ereditabilità molto bassa. Alcuni autori hanno suggerito che la loro importanza per la sopravvivenza della specie abbia

determinato, nel corso dell'evoluzione, la presenza di un gran numero di geni con pochi alleli ognuno, situazione in cui è meno probabile che la progenie esprima lo stesso fenotipo della generazione parentale. Tuttavia, se si tratta di fattori importanti per la produzione, si tende a selezionare gli animali anche per i caratteri che hanno una bassa ereditabilità.

Alcuni studi si sono posti l'obiettivo di stimare l'ereditabilità del carattere efficienza placentare. Uno studio del 1999 (*Wilson et al., 1999*) ha selezionato due gruppi di suini di pari peso alla nascita, il primo caratterizzato da un'efficienza placentare superiore alla media (gruppo A) e il secondo con un'efficienza placentare più bassa della media (gruppo B). Le scrofette di ognuno dei due gruppi sono state coperte con il seme di verri dello stesso gruppo.

L'analisi statistica della numerosità delle nidiote ottenute mostra un importante divario tra il gruppo A, che ha avuto una media di  $12,5 \pm 0,7$  nati vivi, e il gruppo B, con  $9,6 \pm 0,5$  nati vivi ( $P < 0,5$ ). Nonostante i suinetti del gruppo A fossero il 20% meno pesanti di quelli del gruppo B, le loro placentate pesavano il 40% di meno. Risultati ancora migliori furono ottenuti al secondo parto.

In questo studio, l'ereditabilità del carattere efficienza placentare era stata misurata pari 0,37: si tratta di un valore elevato, degno di nota. Un altro studio ha ottenuto il risultato di  $0,29 \pm 0,08$  (*Vallet et al., 2001*), anch'esso ragguardevole per un carattere riproduttivo e sicuramente molto maggiore dei valori segnalati per l'ereditabilità della capacità uterina (0,09) (*Young et al., 1996*) e della dimensione della nidiata (0,16) (*Hertzer et al., 1940*).

## 4. IMPATTO DELLA VITA INTRAUTERINA SULLO SVILUPPO E SULLA PRODUZIONE

### 4.1 Influenza dell'apporto proteico in gestazione sullo sviluppo muscolare della prole

Lo sviluppo delle fibre muscolari inizia già durante la fase embrionale; il loro numero non aumenta più dopo la nascita (*Wigmore e Stickland, 1983*). La nutrizione materna, per il suinetto, gioca un ruolo fondamentale nel corretto sviluppo dell'apparato muscolare e non solo. Un corretto apporto proteico può migliorare la quantità e la qualità degli amminoacidi trasferiti al feto attraverso la placenta, oltre che la concentrazione di proteine e grasso nel colostro e nel latte. Al contrario, limitazioni qualitative e quantitative nell'apporto proteico possono alterare la miogenesi fetale a causa dell'indisponibilità di alcuni amminoacidi (*Zhang S. et al., 2019*). Gli amminoacidi essenziali per la scrofa in gestazione sono la L-arginina, la L-glutamina, la L-prolina e la glicina: i piani alimentari devono essere mirati a soddisfarne l'apporto, per scongiurare limitazioni nella crescita dei feti.

Un tenore di proteine grezze (crude protein, CP) pari al 6.5% è risultato insufficiente per le scrofe in gravidanza, tanto da risultare in un ritardo della crescita fetale pari al 15% (*Rehfeldt et al., 2011*). Nella razza Landrace Tedesca, l'apporto proteico alla scrofa incide sulla regolazione del gene della subunità I della condensina fetale; si ipotizza che ciò influisca sulla divisione cellulare a livello di muscolatura scheletrica (*Altmann et al., 2012*). Anche in altre razze, un apporto limitato di proteine compromette la miogenesi e l'adipogenesi. Vi sono diverse motivazioni.

In primo luogo, nei feti figli di scrofe alimentate con diete a basso contenuto proteico viene favorita la via di segnale della miostatina e inibita quella di mTOR (mechanistic target of rapamycin, bersaglio meccanicistico della rapamicina). La miostatina (GDF-8) è un membro della famiglia del TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) e ha un ruolo autocrino e paracrino nell'inibizione della crescita del muscolo scheletrico. È stato infatti osservato che, in topi con delezione del gene della miostatina, la massa muscolare arriva a essere 2-3 volte maggiore che in quelli wild-type, a seguito di fenomeni di ipertrofia e di iperplasia (*McPherron et al., 1997*). La miostatina, inoltre, influenza negativamente il differenziamento miogenico: una sovraespressione del suo gene si traduce nell'inibizione del processo miogenico. Detta inibizione

è reversibile e passa attraverso l'abbassamento dei livelli dell'mRNA dei regolatori muscolari MyoD e miogenina, il cui bersaglio a valle è la creatina chinasi (Rios *et al.*, 2002). Il gene della miostatina va incontro a up-regulation, cioè viene sovraespressa, quando la testa della proteina FoxO3 e quella del recettore dei glucocorticoidi si legano al suo promotore (Jia *et al.*, 2016).

mTOR, dall'altro lato, è implicata in svariati processi cellulari e si assembla in due complessi multiproteici noti come mTORC1 e mTORC2 (Saxton e Sabatini, 2017). In particolare, mTORC1 ha un ruolo fondamentale nel muscolo scheletrico (Bentzinger *et al.*, 2008), tanto che la sua attivazione risulta nell'innescare di processi di ipertrofia muscolare (Bodine *et al.*, 2001).

Oltre a essere sovraespressa la miostatina e inibita mTOR, nei feti le cui madri sono alimentate con scarsità di proteine sono bassi i livelli miogenina e di altri fattori regolatori miogenici fondamentali per lo sviluppo e la crescita muscolare (Kalbe *et al.*, 2017). I fattori regolatori miogenici (MRFs) sono oggetto di studio per la produzione di carne suina magra (Ropka-Molik *et al.*, 2011). È stato infatti scoperto che quando due di essi, Myf5 e MyoD, non erano espressi, la progenie depositava quantità eccessive di tessuto adiposo al posto del muscolo (Kablar *et al.*, 2013).

Inoltre, la formazione delle fibre muscolari risente dell'epigenetica, ovvero di modificazioni stabili ed ereditabili che non riguardano direttamente la sequenza del DNA, ma influenzano il modo in cui essa viene espressa. Tra le modificazioni epigenetiche si annoverano la metilazione e l'acetilazione del DNA, ma anche modificazioni a carico degli istoni, proteine basiche responsabili della struttura della cromatina nel nucleo, da cui dipende l'espressione del DNA.

Per descrivere le modificazioni epigenetiche che avvengono in gravidanza si usa l'espressione programmazione fetale. Nel caso dello sviluppo delle fibre muscolari, sono da tenere in considerazione diverse modificazioni degli istoni (acetilazione, metilazione, fosforilazione e ubiquitinazione) e la metilazione operata dalla DNA metiltransferasi. Questo enzima, più precisamente, catalizza l'attacco di un gruppo metile all'estremità 5' della citosina nei dinucleotidi citosina post-guanina posti a ridosso dei promotori dei geni implicati nella sintesi proteica (CpG) (Ji *et al.*, 2017). Tale processo è anch'esso soggetto alle variazioni della disponibilità proteica della madre (Altmann *et al.*, 2012).

Un ultimo modo in cui la restrizione proteica nella dieta materna compromette la crescita fetale, notato nei suini (Kalbe *et al.*, 2017) ma anche nei bovini (Perry *et al.*, 2002) e negli ovini (Brameld *et al.*, 2000), è la riduzione nell'espressione dell'insulin-like growth factor 1 (IGF-1) e del relativo

sistema recettoriale, noto come insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP). Si tratta di un sistema ormonale con un ruolo fondamentale nello sviluppo muscolare e di altri tessuti.

Riassumendo, un apporto proteico insufficiente nella dieta della scrofa in gestazione rischia di portare alla nascita di suinetti con problemi di sviluppo muscolare, che raggiungono il peso alla macellazione con più difficoltà e con una qualità della carne inferiore. In quest'ottica risulta evidente l'importanza di formulare diete equilibrate per il settore gestazione.

Al contrario, un eccesso proteico nella dieta materna ha effetti solo marginali nel fenotipo della miogenesi (*Rehfeldt et al., 2012*), anche se è in grado di aumentare l'espressione di vari fattori regolatori della miogenesi, di favorire il sistema IGF-1 (*Kalbe et al., 2017*) e di modulare la metilazione del DNA (*Altmann et al., 2012*).

## 4.2 Restrizione intrauterina

In inglese, per indicare un suinetto di dimensioni inferiori alla media, si usa il termine *runt*, da cui deriva l'espressione *runting*, usata per riferirsi a un limitato accrescimento intrauterino. Il *runting* si traduce in una riduzione del tasso di sopravvivenza post-natale e in uno svantaggio permanente in termini di peso. Il minor peso è la ripercussione della scarsità di elementi nutritivi subita in gravidanza, che porta questi feti a deviare quasi tutte le proprie risorse energetiche verso gli organi fondamentali, a svantaggio degli altri. Per esempio, l'ossigenazione del sistema nervoso centrale e del cuore è privilegiata mediante un aumento del flusso ematico a loro carico.

I *runts* possono presentare il cosiddetto Brain Sparing Effect: il profilo della loro testa è concavo e allungato, la forma ricorda quella della testa di un delfino. Inoltre, gli occhi sono molto sporgenti e sul grugno vi sono delle pliche perpendicolari alla bocca. A tal proposito, uno studio ha evidenziato come i feti di razze con resistenza alla leptina, come il suino iberico, mostrino mediamente un peso relativo del cervello più elevato e una maggiore incidenza del Brain Sparing Effect (*Torres-Rovira et al., 2013*).

Un concetto correlato con il *runting* è il ritardo di crescita intrauterino o IUGR (Intrauterine Growth Restriction), definito come un'alterazione della crescita e dello sviluppo di un *conceptus* durante la gravidanza (*Figura 7*) (*Hu et al., 2020*).

Le cause della restrizione intrauterina sono genetiche, epigenetiche, ambientali e legate alla maturità della madre. Anche lo stress ossidativo, con livelli troppo elevati di radicali ossidativi liberi (ROS), può causare complicanze come lo IUGR (*Hu et al., 2020*).



*Figura 7. Suinetto nato con ritardo di crescita*

Un suinetto può essere valutato come IUGR quando il peso alla nascita è inferiore al decimo percentile per l'età gestazionale (Gutaj e Wender-Oregowska, 2016). Solitamente si considera un peso di 1 kg o 1,1 kg come limite. Fa fatta però una distinzione tra i suinetti IUGR e quelli detti Small for Gestational Age (SGA), che sono piccoli per età gestazionale ma hanno raggiunto le proprie potenzialità genetiche, quindi non sono da considerare patologici. Spesso, sono SGA i neonati di razze molto prolifiche.

La restrizione della crescita intrauterina ha effetti nefasti durante tutta la vita della prole: riduce la sopravvivenza neonatale, rallenta permanentemente la crescita post-natale e abbassa l'efficienza nell'utilizzo del mangime. Inoltre, compromette la salute a lungo termine (Wu et al., 2006): il 76% delle morti prima dello svezzamento riguardano suinetti IUGR, poiché tali soggetti mostrano tassi di morbilità e mortalità molto superiori agli altri (Kirkden et al., 2013). I motivi sono da ricercarsi nel mancato controllo dell'igiene, della nutrizione e della temperatura.

Parlando di quest'ultima, gli IUGR sono più soggetti alla morte per ipotermia rispetto agli altri suinetti. Il suino neonato, in generale, ha caratteristiche fisiologiche che impediscono una corretta gestione della temperatura. In primo luogo, le ghiandole sudoripare esistono ma non sono funzionali e non aiutano nella dispersione del calore.

Inoltre, alla nascita, i lipidi costituiscono l'1% della massa corporea e la disponibilità di corpi chetonici è molto limitata. Il motivo è che nella vita fetale, il suino mostra una sintesi limitata di acidi grassi e triacilglicerolo. La scarsa copertura adiposa, oltre a rendere limitata la disponibilità di fonti energetiche, diminuisce l'isolamento termico. In aggiunta, non sono presenti riserve di tessuto adiposo bruno, che negli altri animali ha un ruolo importante nella cosiddetta termogenesi senza brivido.

Non avendo a disposizione queste modalità di approvvigionamento energetico e di termoregolazione, i suinetti con deficit di sviluppo possono entrare in un circolo vizioso in cui meno energia hanno a disposizione, meno ne assumono perché sono debilitati e tendono a muoversi di meno. Quando le scarse riserve energetiche che hanno a disposizione sono completamente esaurite, si ritrovano in una situazione di ipoglicemia accompagnata da ipotermia: si parla di sindrome ipoglicemia-ipotermia. Questa sindrome si traduce in un deperimento che può determinare danni cerebrali permanenti e portare fino alla morte. Per questo, assicurare a tutti i suinetti una fonte di calore è un obiettivo importante nelle sale parto, che prevedono la presenza di una o più lampade riscaldanti a infrarossi in ogni gabbia parto. Se i soggetti IUGR sopravvivono, presentano effetti negativi permanenti sulla struttura degli organi e sulla composizione del muscolo scheletrico. Vi è infatti un ridotto numero di fibre muscolari, unito a una deposizione del grasso muscolare potenziata. Già a partire dal sessantesimo giorno di gestazione, infatti, nei feti più piccoli si osservano quantità di grasso muscolare maggiori che negli altri soggetti (*Karunaratne et al., 2005*). Questa condizione della muscolatura rimane costante per tutta la vita ed è riscontrata anche al macello, dove le carcasse di questi soggetti sono classificate come meno pregiate in quanto più grasse. Anche la funzionalità renale, negli IUGR, è bassa a causa della scarsità di glomeruli; vi è inoltre un ridotto numero di isole pancreatiche. Ciò ha un impatto sulla conversione alimentare e sull'utilizzo dei nutrienti, e di converso sulle prestazioni produttive. È chiaro che tali soggetti ingeriranno più mangime e impiegheranno più tempo degli altri prima di giungere al peso di macellazione. Questo spreco di alimento e di spazio, unito al minor pregio della carcassa, penalizza economicamente gli allevatori, motivo per cui si tende ad evitare di portare questi suini fino al peso di macellazione.

### **4.3 Crowding uterino**

Nelle razze non iperprolifiche, quando il numero di embrioni eccede i 14 si parla di crowding o sovraffollamento uterino. Più precisamente, il crowding si esprime come rapporto tra il numero di embrioni e la superficie dell'endometrio. Questa situazione è limitante per il peso medio alla nascita, l'uniformità della nidiata e il tasso di nati vivi (*Almeida e Alvarenga Dias, 2022*).

In caso di crowding, infatti, le placente si sviluppano in modo insufficiente. L'efficienza della placenta, in un certo grado e nelle prime fasi di gestazione, riesce a compensare la bassa qualità degli scambi dovuta alla sua limitata estensione. Tale compensazione, più che nelle razze

commerciali europee e americane, è stata osservata nella Meishan, dove la placenta arriva ad essere più irrorata (*Biensen et al., 1998*). In questa e in altre razze iperprolifiche, tutti i suinetti nascono uniformemente piccoli (*Ford, 1997*). Nel periodo preimpianto, i meccanismi che promuovono la competizione hanno come effetto la riduzione delle variazioni intra-nidiata durante lo sviluppo. La numerosità della nidiata può però aumentare la probabilità che alcuni suinetti non trovino un capezzolo o che ne trovino uno funzionale, considerato che ognuno seleziona un capezzolo e si allatta a quello per tutta la lattazione. Si devono quindi prevedere sistemi di allattamento alternativi.

In letteratura viene suggerito che cambiamenti nella formazione dello stroma placentare potrebbero aumentare la capacità della placenta di compensare il ridotto spazio intrauterino, determinando il miglioramento della funzione placentare e la riduzione delle perdite fetali durante la tarda gestazione (*Vallet et al., 2011*). Di solito, però, in condizioni di affollamento intrauterino si verificano profondi cambiamenti nello sviluppo della placenta: la riduzione nella formazione dello stroma placentare compromette la sua capacità di adattamento. Coerentemente con questo, sia l'acido ialuronico che la ialuronidasi mostrano un'attività minore nella placenta di feti piccoli rispetto che in quella di feti più grandi (*Vallet et al., 2011*).

Il ridotto sviluppo della placenta è alla base dell'insufficienza placentare, situazione in cui il feto non riceve un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti dalla placenta. L'insufficienza placentare è causa primaria di sofferenza fetale e aumento della mortalità fetale. Nel caso del crowding, la mortalità fetale aumenta in modo rilevante intorno al trentacinquesimo giorno di gravidanza (*Knight et al., 1977*). Un articolo riporta che tra il 30° e il 40° giorno, il sovraffollamento in utero si traduce in una perdita significativa del numero di *concepti* (*Vallet et al., 2011*).

In tale fase della gravidanza, l'annidamento è completato e comincia il processo di mineralizzazione ossea, che determina il passaggio dalla vita embrionale a quella fetale. I feti morti, da questo momento in poi, rimangono in utero e vengono espulsi al momento del parto come mummificati, poiché è impossibile il riassorbimento. Di conseguenza, questi feti continuano a occupare spazio, sebbene meno di quelli vivi.

Le placente dei feti rimasti vivi mostrano una certa capacità di crescere asimmetricamente invadendo lo spazio disponibile, ma il beneficio in termini di peso dei *conceptus* non è elevato, probabilmente per l'incompleta funzionalità del tessuto placentare neoformato. In uno studio, i feti adiacenti a feti soppressi chirurgicamente hanno mostrato un peso alla nascita del 10% superiore e una placenta del 6% più pesante rispetto agli altri (*Vallet et al., 2011*).

È noto che, durante il parto, tanto più l'intervallo che intercorre tra la nascita di un suinetto e quella del successivo è prolungato, tanto più alti sono lo stress da parto per la scrofa e la natimortalità. Questo è il motivo per cui molti allevatori scelgono di effettuare l'assistenza al parto e, se un suinetto tarda a nascere, intervengono manualmente. È stato osservato che, nelle nidiata sovraffollate, l'intervallo tra due nascite consecutive è inferiore a quello riscontrato nelle nidiata meno numerose (*Canario et al., 2006*). Nell'ottica di ridurre l'incidenza dello stress e della natimortalità, si è cercato di dare una spiegazione a questo fatto.

Escluso un ruolo delle maggiori concentrazioni di estradiolo fetale, il fenomeno è stato imputato al peso medio dei feti, a cui la numerosità della nidiata è correlata negativamente. Tuttavia, nemmeno questo secondo parametro sembra spiegare appieno la correlazione positiva tra intervalli di nascita e dimensione della nidiata (*Vallet et al., 2010*).

La terza ipotesi è che la costrizione dell'utero in corrispondenza delle regioni rimaste vuote costituirebbe un ostacolo al parto e determinerebbe l'allungamento delle tempistiche. Per verificare questa possibilità, è stato condotto uno studio su scrofe gravide nel quale, a livello di cervice o all'apice del corno uterino, veniva creato artificialmente uno spazio vuoto tramite la soppressione di uno o due feti. I risultati hanno escluso un contributo significativo dello spazio vuoto all'allungamento dei tempi di parto (*Vallet et al., 2011*).

Rimangono da esplorare gli effetti cumulativi dei glucocorticoidi fetali e delle prostaglandine prodotte dall'utero e dalle placenti sulle tempistiche di parto. Ognuna di queste due molecole sembra giocare un ruolo rilevante, rispettivamente per l'avvio del parto e per la contrazione dell'utero; la presenza di un maggior numero di feti aumenta le loro concentrazioni e potrebbe esitare in effetti più spiccati (*Vallet et al., 2011*). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere meglio queste dinamiche.

## 4.4 Impatto della posizione del feto sul suo sviluppo

Gli embrioni sono spazati in modo equidistante, quindi lo spazio assoluto fra i feti è proporzionale allo spazio totale disponibile, da cui dipende anche l'area di scambio e quindi il tasso di crescita fetale. La dimensione dell'utero, però, decresce progressivamente dal corno uterino verso la cervice (*Wise e Christenson, 1992*).

Le posizioni migliori per l'annidamento sono quelle alle estremità ovariche dell'utero, ovvero all'apice delle corna uterine: qui il conceptus ha la possibilità di avere una placenta più estesa, che prenda attacco all'estremità del corno. I feti impiantatisi all'apice di un corno hanno alte probabilità di essere più grandi degli altri (*Wise e Christenson, 1992*), almeno quando nel corno vi sono più di cinque feti (*Perry e Rowell, 1969*). Un'altra posizione favorevole allo sviluppo è quella più prossima al canale del parto, all'estremità cervicale. Spesso, infatti, il primo suinetto che nasce è il più grande della nidiata.

Al contrario, i feti che alloggiavano nelle posizioni intermedie dell'utero hanno uno sviluppo più modesto, così come le relative placente. I più svantaggiati sono quelli in seconda o in terza posizione dall'estremità cervicale dell'utero (*Lents e Freking, 2019*), come mostrato in *Figura 8*. Tali suinetti possono essere persi durante il parto, poiché risentono molto delle contrazioni, che possono indurre ipossia. In ambienti uterini affollati, gli effetti della posizione intrauterina sullo sviluppo fetale e placentare si verificano più precocemente e sono più evidenti rispetto a nidiate intatte meno affollate. Per questo, i grafici riportati in *Figura 8* prendono in considerazione solo nidiate che hanno subito crowding uterino. Il riferimento è a uno studio, condotto da *Lents e Freking (2019)*, nel quale le 297 scrofette coinvolte sono state ovarioisterectomizzate unilateralmente, poi fecondate e sacrificate a 105 giorni di gravidanza.

È possibile che i feti alle estremità ovarica e cervicale dell'utero beneficino dell'aver un solo feto adiacente, e quindi una minore competizione per lo spazio. Questo spiegherebbe, almeno in parte, il maggiore peso di tali soggetti. L'ipotesi che lo imputava a un maggiore apporto ematico è stata confutata (*Perry e Rowell, 1969*). Tale teoria emodinamica è confermata solo nei topi e nei conigli (*McLaren, 1965*), dove l'architettura vascolare uterina è differente. Nei suini, infatti, l'arteria uterina è diretta verso il punto mediano del corno uterino, da dove si dirama nel mesometrio con un andamento radiale. Non vi è quindi motivo di credere che i feti alle estremità siano più irrorati. (*Oxenreider et al., 1965*).

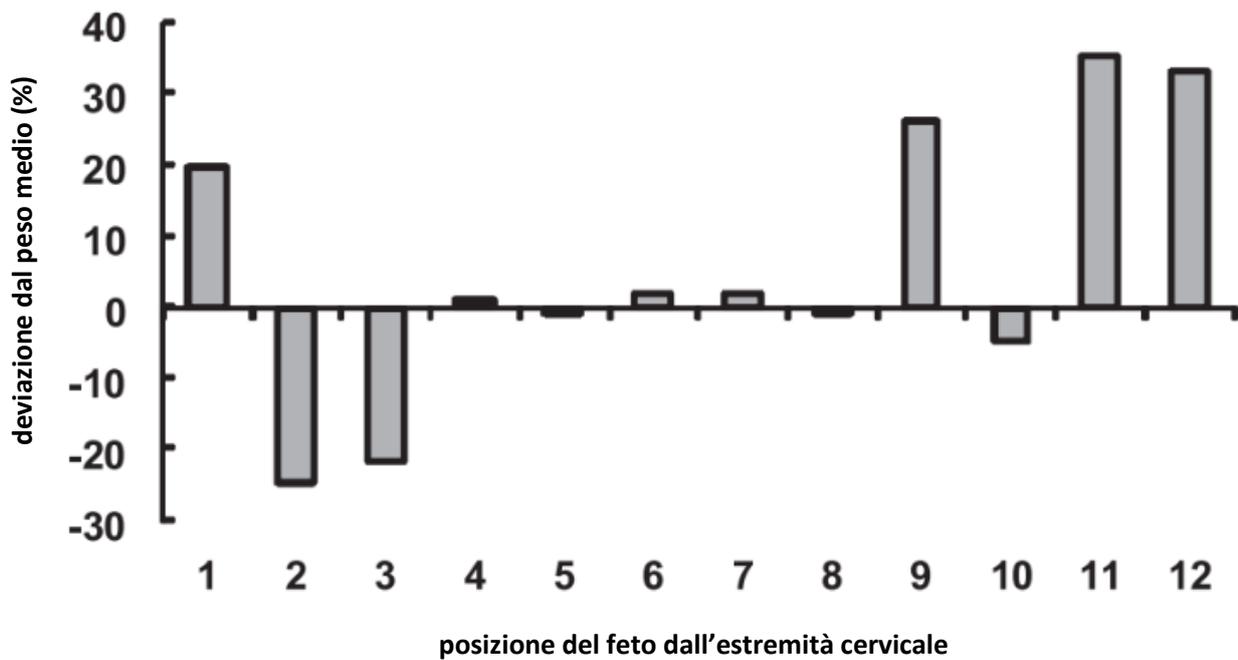
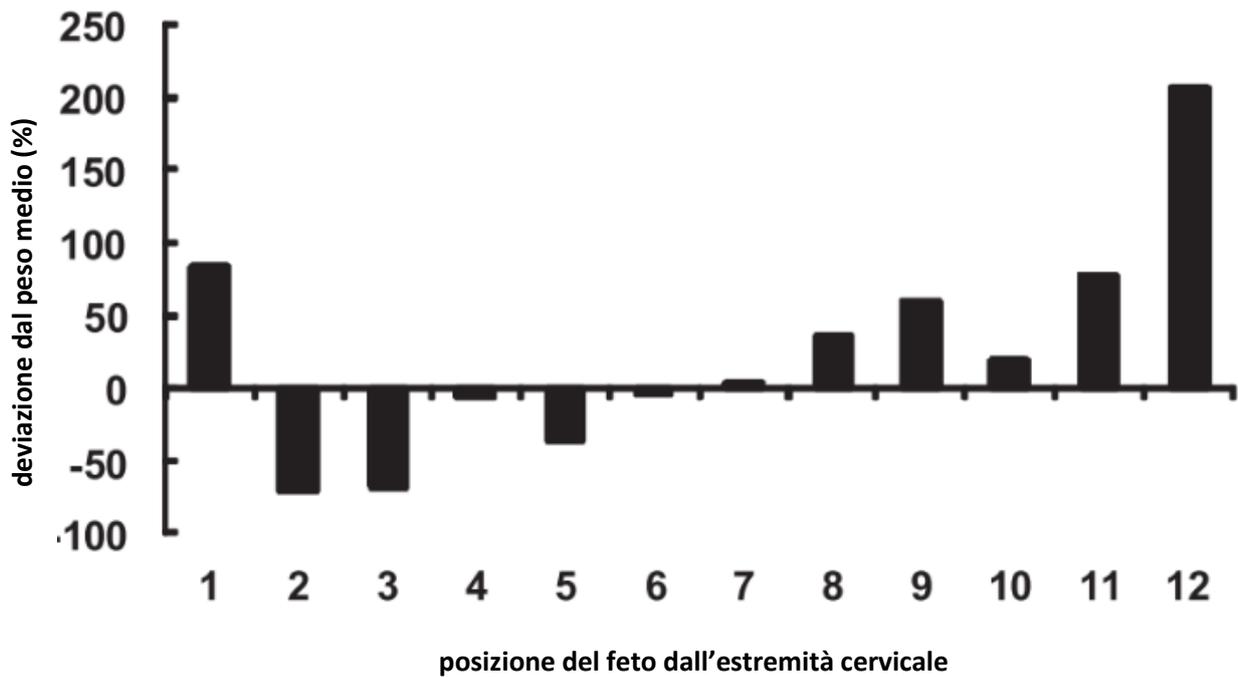


Figura 8. Masse medie dei feti (sopra) e delle placente (sotto) di nidiata sovraffollate, espresse come deviazione dalla media della nidiata (asse delle ordinate). Le 297 scrofette coinvolte sono state ovarioisterectomizzate unilateralmente, poi fecondate e sacrificate a 105 giorni di gravidanza. I numeri sull'asse delle ascisse identificano i feti, che sono stati numerati in base alla posizione a partire dall'estremità cervicale dell'utero (Lents e Freking, 2019).

## 4.5 Ruolo del sesso dei feti sullo sviluppo e sulla riproduzione

Alcuni studi hanno preso in considerazione l'influenza del sesso nello sviluppo fetale e placentare. Un aspetto ancor più rilevante nel suino, in quanto specie politocica, è il ruolo del sesso dei feti adiacenti nella crescita pre- e post-natale del suinetto, nello sviluppo della sua placenta e nelle sue prestazioni riproduttive da adulto.

In scrofe macellate a 104 giorni di gravidanza, non sono state riscontrate differenze di peso dovute al sesso, né nei feti né nelle placente (*Krombeen et al., 2019a*). Tuttavia, sono stati ottenuti risultati controversi secondo cui, a 95 giorni di gravidanza, le placente dei maschi con un'efficienza placentare elevata erano più leggere di quelle delle femmine, e le placente dei maschi con una efficienza placentare bassa erano più pesanti di quelle delle femmine (*Krombeen et al., 2019b*).

Secondo *Wise e Christenson (1992)* i feti affiancati da due feti di sesso opposto pesano di meno e hanno placente più leggere di quelli affiancati da due feti dello stesso sesso. *Lents e Freking (2019)* hanno fornito i risultati riportati in *Figura 9*, che fanno riferimento al peso del suinetto e della sua placenta al 105° giorno di gravidanza in base al numero di suinetti dello stesso sesso adiacenti (0, 1 oppure 2). I dati fanno riferimento a nidiata sovraffollate dove, come nel caso della posizione intrauterina, questi effetti sono più significativi.

È noto che le placente di feti affiancati da feti dello stesso sesso producono in media più estrone delle altre a 100 giorni di gestazione (*Tarraf e Knight, 1995*). Questo però non spiega il minor peso rispetto alle altre, tanto più che non le due situazioni non sembrano essere correlate: la maggior produzione di estrone si verifica anche senza differenze di peso. Inoltre, a causa della struttura epiteliochoriale della placenta suina, non vi è trasferimento di steroidi sessuali tra feti, a differenza che nelle specie con placentazione emocoriale. È quindi inverosimile che l'estrone prodotto da un feto influenzi i feti vicini.

Due studi hanno confermato che il sesso del feto adiacente, nel suino, non influisce sulle concentrazioni di steroidi sessuali nel sangue ombelicale o nel liquido allantoideo, né in scrofe intere (*Wise e Christenson, 1992*) né in scrofe ovarioisterectomizzate su un lato (*Tarraf e Knight, 1995*). Sono quindi necessari ulteriori approfondimenti proteomici e trascrittomici per comprendere la causa del minor peso dei feti e delle relative placente quando essi sono affiancati da feti di sesso opposto.

Secondo *Rohde Parfet et al. (1990b)*, i maschi sviluppatasi in utero tra due feti di sesso maschile, se nutriti con alimentazione razionata, aumentavano di peso più velocemente rispetto agli altri

maschi. Il motivo è stato attribuito a una maggiore aggressività, che avrebbe aumentato le possibilità di accesso al mangime.

Parlando delle femmine, il sesso dei feti adiacenti non aveva alcun effetto sul tasso di crescita postnatale quando il mangime era disponibile ad libitum. La pubertà, però, tendeva a essere più precoce in quelle affiancate in utero da due feti maschi (187 giorni di età in media) rispetto a quelle sviluppatesi tra due feti femmina (192 giorni) o tra un feto maschio e un feto femmina (194 giorni) (*Rohde Parfet et al., 1990a*).

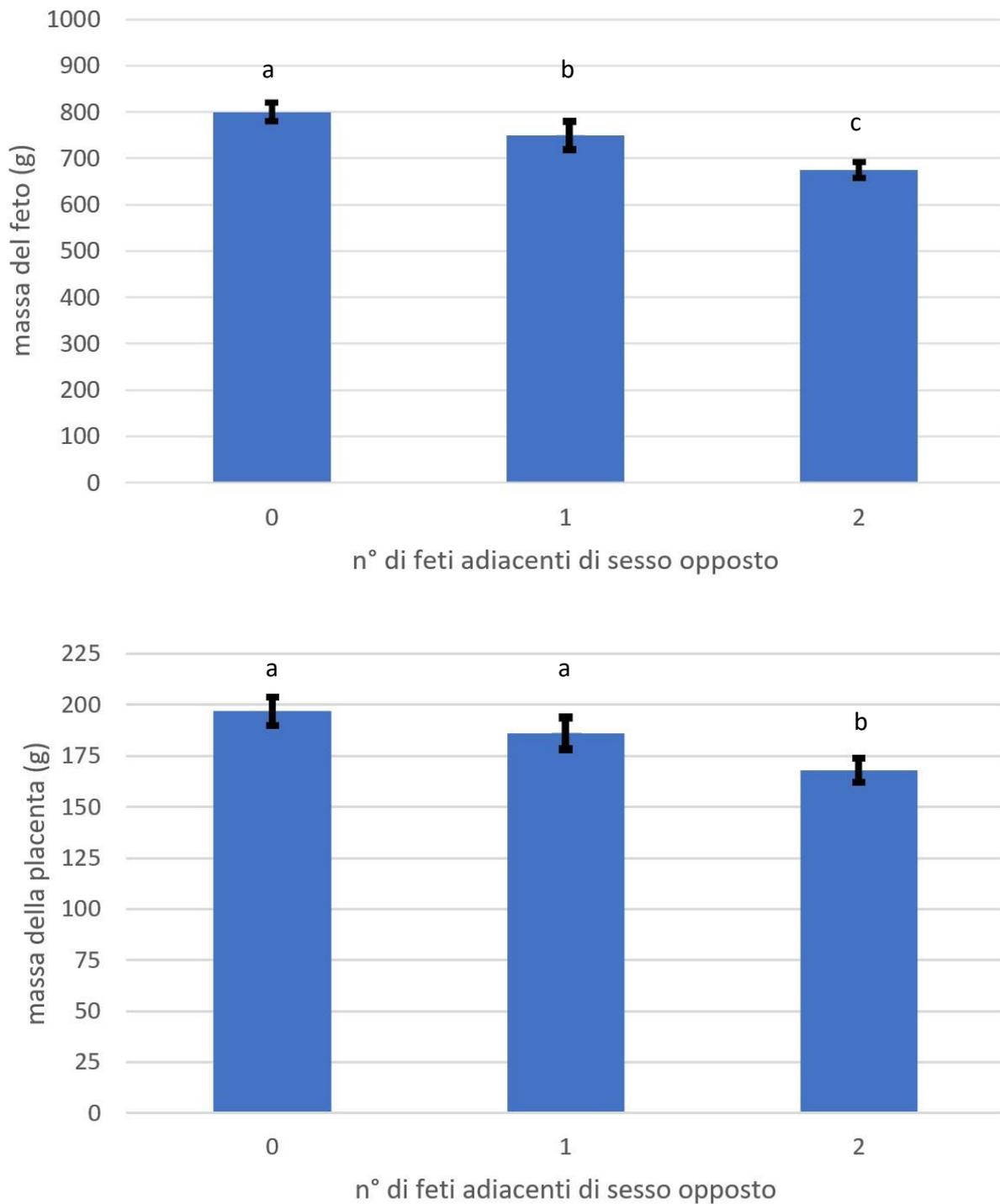
Questo è confermato indirettamente anche da uno studio del 1998 (*Lamberson et al., 1988*) che ha osservato che, nelle singole nidiate, un aumento della percentuale di maschi corrispondeva a un abbassamento dell'età alla pubertà delle scrofette. Dato che la probabilità di un feto femmina di trovarsi tra due feti maschi aumenta all'aumentare della proporzione di maschi nella nidiate, i risultati sono ascrivibili a quanto riportato da *Rohde Parfet et al., 1990a*.

Sulla durata del ciclo estrale e sul tasso di ovulazione, invece, il sesso dei feti adiacenti non aveva alcun effetto. È interessante però notare che le femmine che nella vita intrauterina erano adiacenti a due femmine partecipavano a meno lotte e vincevano meno frequentemente di quanto previsto dal calcolo delle probabilità (*Rohde Parfet et al., 1990a*).

In un altro studio, le scrofette sviluppatesi in utero tra due feti femmina hanno mostrato un riflesso di immobilità più spiccato al momento dell'estro, fattore positivamente correlato con il tasso di portata al parto dopo la fecondazione (*Knauer et al., 2011*). È dunque possibile che tali soggetti abbiano un successo riproduttivo maggiore.

Questo concetto è rafforzato dai risultati opposti riportati per scrofette provenienti da nidiate a prevalenza maschile, ovvero con più del 60% di maschi. I dati mostrano che il picco preovulatorio di LH, in tali scrofette, è ritardato e i tassi di concepimento ridotti (*Seyfang et al., 2018*). Inoltre, risultati preliminari hanno indicato che scrofe nate in nidiate con meno del 15% di maschi hanno successivamente partorito nidiate più grandi rispetto a scrofe nate in nidiate con più del 50% di maschi (*Edgerton e Cromwell, 1986*).

Inoltre, la limitata frequenza di nidiate con proporzioni tra i sessi verso le estremità della curva di distribuzione riduce la capacità di confermare con precisione molte delle osservazioni riportate. In futuro, il progresso di tecnologie riproduttive come il seme sessato e l'inseminazione intrauterina profonda potrebbe portare a un miglioramento della capacità di controllare il rapporto tra i sessi dei feti.



*Figura 9.* Massa media dei feti (sopra) e delle placente (sotto) di nidiata sovraffollate, in base al numero di feti di sesso opposto adiacenti (0, 1 oppure 2). Le 297 scrofette coinvolte in questo esperimento sono state ovario-isterectomizzate unilateralmente, poi fecondate e sacrificate a 105 giorni di gravidanza. Viene evidenziato un effetto dei feti adiacenti sia sul peso dei suinetti ( $P < 0.001$ ) che sul peso della placenta ( $P < 0.01$ ) (Lents e Freking, 2019).

## 5. CONCLUSIONI

Il corretto sviluppo della placenta, viste le svariate funzioni a suo carico, va posto tra gli obiettivi principali nella gestione delle scrofe gravide. L'efficienza placentare può essere considerata un indicatore attendibile della sua funzionalità e dell'adattamento feto-placentare; tale parametro si presta bene anche a descrivere l'attitudine fetale alla crescita. Tuttavia, sono necessari studi più approfonditi per arrivare a incorporare l'efficienza placentare in schemi di selezione genetica. In particolare, le associazioni esistenti tra il fenotipo della placenta e il genoma andrebbero identificate con più precisione e depurate dagli errori.

Per diminuire l'errore nei dati sull'efficienza placentare, va prestata particolare attenzione all'accuratezza nella misurazione del peso e gli altri parametri biometrici delle placenti e dei feti. Nonostante le premesse promettenti, solo una prova sperimentale permetterà di capire se davvero la selezione per l'efficienza placentare abbia la capacità di migliorare con successo la percentuale di nati vivi, l'uniformità dei suinetti al parto, il tasso di sopravvivenza pre-svezzamento e, in ultima analisi, il numero di suinetti svezzati per scrofa per anno. Potenzialmente, la selezione per l'efficienza placentare può anche evitare, in massima parte, l'insorgenza di situazioni deleterie come il crowding uterino e la restrizione della crescita intrauterina. Raggiungere tutti questi obiettivi permetterebbe alle scrofaie di aumentare il proprio margine di guadagno senza variare sensibilmente le spese.

In due diversi capitoli, sono state analizzate le ripercussioni sulla prole della restrizione proteica nella dieta delle scrofe in gestazione, evidenziando gli effetti negativi sullo sviluppo placentare e sulla miogenesi fetale: è evidente come questi si ripercuotano su tutta la vita produttiva del suino, penalizzando economicamente gli allevatori.

Di conseguenza, a parità degli altri fattori, una scrofaia riesce a svezzare suinetti performanti in termini di crescita solo se investe su piani di razionamento adeguati, appoggiandosi a veterinari alimentaristi capaci di formulare, per il reparto gestazione, mangimi con il corretto apporto di ogni nutriente, con particolare riferimento alle proteine.

Infine, la comprensione di come la posizione intrauterina e il sesso dei feti adiacenti influiscono sul fenotipo adulto risulta utile per spiegare alcune dinamiche fisiche e biochimiche della gravidanza suina che risultano tuttora oscure. Anche in questo campo ci si attende che la ricerca faccia altri progressi; in particolare è ancora da scoprire la motivazione per cui i feti che si annidano alle estremità ovarica e cervicale dell'utero sono avvantaggiati nella crescita.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Almeida FRCL, Alvarenga Dias ALN. Pregnancy in pigs: the journey of an early life. *Domestic animal endocrinology* 78.1, 2022

Althouse GC. Valutazione dello sperma del suino per l'inseminazione artificiale parte I. *Large Animals Review* 5.4, 1999 (pp. 37-42)

Althouse GC. Valutazione dello sperma del suino per l'inseminazione artificiale parte II. *Large Animals Review* 6.1, 2000 (pp. 51-55)

Altmann S, Murani E, Schwerin M, Metges CC, Wimmers K, Ponsuksili S. Maternal dietary protein restriction and excess affects offspring gene expression and methylation of non-SMC subunits of condensin I in liver and skeletal muscle. *Epigenetics* 7.3, 2012 (pp.239-252)

Amann RP, Graham JK. Spermatozoal function. *Equine reproduction* 7, 1993 (pp. 15-745)

Anderson LL. Riproduzione negli animali da allevamento, 2011

Baker RD, Polge C. Fertilization in swine and cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 56.2, 1976 (pp. 105-119)

Baratta M, Saleri R, Mainardi GL, Valle D, Giustina A, Tamanini C. Leptin regulates GH gene expression and secretion and nitric oxide production in pig pituitary cells. *Endocrinology* 143.2, 2002 (pp. 551-557)

Bazer FW, Johnson GA. Pig blastocyst-uterine interactions. *Differentiation* 87.1-2, 2014 (pp. 52-65)

Bazer FW, Thatcher WW, Martinat-Botte F, Terqui M. Conceptus development in Large White and prolific Chinese Meishan pigs. *Reproduction* 84.1, 1988 (pp. 37-42)

Beaudoin S, Simon L, Simeoni J, Sacquin P, Bargy F. Surgical approach of an early mammalian embryo: the rabbit model. *Fetal Diagnosis and Therapy* 13.2, 1998 (pp. 82-85)

Beccaro P, Faravelli E. Fecondazione artificiale del suino, 2004 (capitoli 12, 13 e 16)

Bentzinger CF, Romanino K, Cloëtta D, Lin S, Mascarenhas JB, Oliveri F, Xia J, Casanova E, Costa CF, Brink M, Zorzato F, Hall MN, Rüegg MA. Skeletal Muscle-Specific Ablation of raptor, but not of rictor, Causes Metabolic Changes and Results in Muscle Dystrophy. *Cell Metabolism* 8.5, 2008 (pp. 411-424)

Bertasoli BM, Santos AC, Paula RS, Barbosa AS, Silva GAB, Jorge EC. Swine placenta and placentation. *Brazilian Journal of Biological Sciences* 2.4, 2015 (pp. 199-207)

Biensen NJ, Wilson ME, Ford SP. The impact of either a Meishan or Yorkshire uterus on Meishan or Yorkshire fetal and placental development to days 70, 90, and 110 of gestation. *Journal of Animal Science* 76.8, 1998 (pp. 2169-2176)

Björkman N, Dantzer V. Placentation. *Textbook of Veterinary Histology* 3, 1987 (pp- 340-359)

Björkman N. On the fine structure of the porcine placental barrier. *Acta Anatomica* 62.3, 1965 (pp. 334-342)

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology* 3.11, 2001 (pp. 1014-1019)

Boulot S, Le Jeune M, Huang Y, Sallé E. Evaluation du moment d'ovulation chez les truies en élevage de production: facteurs de variation et conséquences. *Journées de la Recherche Porcine* 46, 2014 (pp. 287-288)

Brameld J, Mostyn A, Dandrea J, Stephenson T, Dawson J, Buttery P, Symonds M. Maternal nutrition alters the expression of insulin-like growth factors in fetal sheep liver and skeletal muscle. *Journal of Endocrinology* 167.3, 2000 (pp. 429-438)

Canario L, Roy N, Gruand J, Bidanel JP. Genetic variation of farrowing kinetics traits and their relationships with litter size and perinatal mortality in French Large White sows. *Journal of Animal Science* 84.5, 2006 (pp. 1053-1058)

Chen F, Wang T, Feng C, Lin G, Zhu Y, Wu G, Johnson G, Wang J. Proteome Differences in Placenta and Endometrium between Normal and Intrauterine Growth Restricted Pig Fetuses. *PloS One* 10.11, 2015

Christenson RK. Ovulation rate and embryonic survival in Chinese Meishan and white crossbred pigs. *Journal of animal science* 71.11, 1993 (pp. 3060-3066)

Curto GM. *Allevamento del suino*, 1980 (capitolo V, sottocapitolo IV A)

Darin-Bennett A, White IG, Hoskins DD. Phospholipids and phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of spermatozoa and seminal plasma of rhesus monkeys. *Reproduction* 49.1, 1977 (pp. 119-122)

Davidson AP, Stabenfeldt GH. *Cunninghams Textbook of Veterinary Physiology* 6<sup>th</sup>, 2020 (chapters 35-38)

De Kretser DM, Robertson DM. The Isolation and Physiology of Inhibin and Related Proteins. *Biology of Reproduction* 40.1, 1989 (pp. 33-47)

De Rensis F, Kirkwood RN. Control of estrus and ovulation: Fertility to timed insemination of gilts and sows. *Theriogenology* 86.6, 2016 (pp. 1460-1466)

De Rensis F, Saleri R, Tummaruk P, Techakumphu M, Kirkwood RN. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and control of reproduction in female swine: A review. *Theriogenology* 77.1, 2012 (pp. 1-11)

Dos Santos AC, Bertasoli BM, Oliveira FD, Assis-Neto AC, Miglino MA. Circulação vitelina: análise comparativa. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 2012

Dourmad JY, Etienne M, Prunier A. Influence des apports énergétiques et protéiques sur les performances de croissance, la composition corporelle et le développement sexuel de la jeune truie, 1993

Dourmad JY, Prunier A, Etienne M, Jossec PL. Effect of protein and energy intake on growth performance, body composition and sexual development of young sows for reproduction. *Journées de la Recherche Porcine en France* 22, 1990 (pp. 251-258)

Duée PH, Étienne M. Influence de l'alimentation pendant la croissance de la truie sur la maturité sexuelle et les performances de reproduction: résultats préliminaires. *Annales de zootechnie* 23.3, 1974 (pp. 377-378)

Edgerton LA, Cromwell GL. Sex of siblings may influence reproductive performance of sows. *Journal of Animal Science* 63 supplement 1, 1986

Evans ACO. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals* 38.4, 2003 (pp. 240-246)

Ewart SL. *Cunninghams Textbook of Veterinary Physiology* 6<sup>th</sup>, 2020 (chapter 51)

Farmer C. The role of prolactin for mammogenesis and galactopoiesis in swine. *Livestock Production Science* 70.1-2, 2001 (pp. 105-113)

Finch AM, Yang LG, Nwagwu MO, Page KR, McArdle HJ, Ashworth CJ. Placental transport of leucine in a porcine model of low birth weight. *Reproduction* 128.2, 2004 (pp. 229-235)

Fiorimanti MR, Cristofolini AL, Moreira-Espinoza MJ, Rabaglino MB, Barbeito CG, Merkis CI. Placental vascularization in middle and late gestation in the pig. *Reproduction and Fertility* 3.1, 2022 (pp. 57-66)

Flowers WL, Esbenshade KL. Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *Journal of reproduction and fertility supplement* 48, 1993 (pp. 217-228)

Ford SP. Embryonic and fetal development in different genotypes in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility supplement* 52, 1997 (pp. 165-176)

Friess AE, Sinowatz F, Skolek-Winnisch R, Träutner W. The placenta of the pig: II. The ultrastructure of the areolae. *Anatomy and Embryology* 163, 1981 (pp. 45-53)

González-Cadavid V, Martins JAM, Moreno FB, Andrade TS, Santos ACL, Monteiro-Moreira ACO, Moreira RA, Moura AA. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology* 82.5, 2014 (pp. 697-707)

Guimarães DB, Barros TB, Van Tilburg MF, Martins JA, Moura AA, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Toniolli R. Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 183, 2017 (pp. 27-38)

Gutaj P, Wender-Ozegowska E. Diagnosis and management of IUGR in pregnancy complicated by type 1 diabetes mellitus. *Current diabetes reports* 16, 2016 (pp. 1-9)

Hamann A, Matthaei S. Regulation of energy balance by leptin. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 104.04, 1996 (pp. 293-300)

Hertzer HO, Lambert WV, Zeller HH. Influence of inbreeding and other factors on litter size in Chester White swine. *United States Department of Agriculture* 570, 1940

Holt WV, North RD. Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. *Reproduction* 73.1, 1985 (pp. 285-294)

Hu C, Yang Y, Deng M, Yang L, Shu G, Jiang Q, Zhang S, Li X, Yin Y, Tan C, Wu G. Placentae for low birth weight piglets are vulnerable to oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impaired angiogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020

Ji Y, Wu Z, Dai Z, Wang X, Li J, Wang B, Wu G. Fetal and neonatal programming of postnatal growth and feed efficiency in swine. *Journal of animal science and biotechnology* 8.1, 2017 (pp. 1-15)

Jia Y, Gao G, Song H, Cai D, Yang X, Zhao R. Low-protein diet fed to crossbred sows during pregnancy and lactation enhances myostatin gene expression through epigenetic regulation in skeletal muscle of weaning piglets. *European journal of nutrition* 55, 2016 (pp. 1307-1314)

Johnson GA, Seo H, Bazer FW, Wu G, Kramer AC, McLendon BA, Cain JW. Metabolic pathways utilized by the porcine conceptus, uterus, and placenta. *Molecular Reproduction and Development* 90.7, 2023 (pp. 673-683)

Kablar B, Krastel K, Tajbakhsh S, Rudnicki MA. Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. *Developmental Biology* 258.2, 2003 (pp. 307-318)

Kalbe C, Lösel D, Block J, Lefaucheur L, Brüßow KP, Bellmann O, Pfuhl R, Puppe B, Otten W, Metges CC, Rehfeldt C. Moderate high or low maternal protein diets change gene expression but not the phenotype of skeletal muscle from porcine fetuses. *Domestic animal endocrinology* 58, 2017 (pp. 63-75)

Karunaratne JF, Ashton CJ, Stickland NC. Fetal programming of fat and collagen in porcine skeletal muscles. *Journal of Anatomy* 207.6, 2005 (pp. 763-768)

Kim SW, Hurley WL, Wu G, Ji F. Ideal amino acid balance for sows during gestation and lactation. *Journal of Animal Science* 87 supplement 14, 2009

Kirkden RD, Broom DM, Andersen IL. Invited review: piglet mortality: management solutions 1. *Journal of Animal Science* 91.7, 2013 (pp. 3361-3389)

Knauer MT, Cassady JP, Newcom DW, See MT. Phenotypic and genetic correlations between gilt estrus, puberty, growth, composition, and structural conformation traits with first-litter reproductive measures. *Journal of Animal Science* 89.4, 2011 (pp. 935-942)

Knight JW, Bazer FW, Thatcher WW, Franke DE, Wallace HD. Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: interrelations among hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth. *Journal of Animal Science* 44.4, 1977 (pp. 620-637)

Knight JW. Aspects of placental estrogen synthesis in the pig. *Experimental and Clinical Endocrinology* 102.03, 1994 (pp. 175-184)

Knox RV. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 85.1, 2016 (pp. 83-93)

König HE, Liebich HG (a cura di). *Anatomia dei mammiferi domestici 6° edizione*, 2017 (capitolo 11)

Kridli RT, Khalaj K, Bidarimath M, Tayade C. Placentation, maternal–fetal interface, and conceptus loss in swine. *Theriogenology* 85.1, 2016 (pp. 135-144)

Krombeen SK, Bridges WC, Wilson ME, Wilmoth TA. Factors contributing to the variation in placental efficiency on days 70, 90, and 110 of gestation in gilts. *Journal of Animal Science* 97.1, 2019a (pp. 22-23)

Krombeen SK, Shankar V, Noorai RE, Sasaki CA, Sharp JL, Wilson ME, Wilmoth TA. The identification of differentially expressed genes between extremes of placental efficiency in maternal line gilts on day 95 of gestation. *BMC genomics* 20, 2019b (pp. 1-15)

Lamberson WR, Blair RM, Rohde Parfet KA, Day BN, Johnson RK. Effect of sex ratio of the birth litter on subsequent reproductive performance of gilts. *Journal of Animal Science* 66.3, 1988 (pp. 595-598)

Lee SH, Song EJ, Hwangbo Y, Lee S, Park CK. Change of uterine histroph proteins during follicular and luteal phase in pigs. *Animal reproduction science* 168, 2016 (pp. 26-33)

Leiser R, Dantzer V. Structural and functional aspects of porcine placental microvasculature. *Anatomy and Embryology* 177, 1988 (pp. 409-419)

Lents CA, Freking BA. Intrauterine position and adjacent fetal sex affects fetal and placental growth throughout gestation, but not embryonic viability, in pigs selected for component traits of litter size. *Animal reproduction science* 209, 2019

Lents CA, Lindo AN, Hileman SM, Nonneman DJ. Physiological and genomic insight into neuroendocrine regulation of puberty in gilts. *Domestic Animal Endocrinology* 73, 2020

Mazzoni C, Romano G, Vivace R. Ritorni in calore. *Daily Suivet* 6, 2020 Apr (p.2)

Mazzoni C. Efficienza della scrofa ed efficienza tecnica. *Suivet management*, 2010

McCracken JA, Glew ME, Scaramuzzi RJ. Corpus Luteum Regression Induced by Prostaglandin F<sub>2α</sub>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 30.4, 1970 (pp. 544-546)

McLaren A. Genetic and environmental effects on foetal and placental growth in mice. *Reproduction* 9.1, 1965 (pp.79-98)

McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 387, 1997 (pp. 83-90)

Medrano A, Holt WV, Watson PF. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Andrologia* 41.4, 2009 (pp. 246-250)

Miglino MA, Pereira FTV, Santos TC, Carvalho AF. A morfologia placentária dos suínos domésticos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, 2001 (pp. 71-76)

Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali. Decreto Ministeriale n.1222 del 02/04/2020

Mossman HW. Vertebrate fetal membranes. New Brunswick: Rutgers University Press, 1987

Oldenbroek K, van der Waaij L. Textbook animal breeding: Animal breeding and genetics for BSc students, 2014.

Olio RL, Lobo LM, Pereira MA, Santos AC, Viana DC, Favaron PO, Miglino MA. Accessory placental structures - a review. *Open Journal of Animal Sciences* 4.05, 2014 (p. 305)

Oxenreider SL, McClure RC, Day BN. Arteries and veins of the internal genitalia of female swine. *Reproduction* 9.1, 1965 (pp. 19-27)

Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38.4, 1992 (pp. 209-222)

Pelagalli GV, Castaldo L, Lucini C, Patruno M, Scocco P. Embriologia Morfogenesi e Anomalie dello Sviluppo III edizione, 2014 (capitoli 3 e 12)

Peng J, Chen B, Shen Z, Deng H, Liu D, Xie X, Gan X, Xu X, Huang Z, Chen J. DNA promoter hypermethylation contributes to down-regulation of galactocerebrosidase gene in lung and head and neck cancers. *Journal of Clinical & Experimental Pathology* 8.9, 2015

Perry JS, Rowell JG. Variations in foetal weight and vascular supply along the uterine horn of the pig. *Journal of Reproduction and Fertility* 19.3, 1969 (pp. 527-534)

Perry V, Norman S, Daniel R, Owens P, Grant P, Doogan V. Insulin-like growth factor levels during pregnancy in the cow are affected by protein supplementation in the maternal diet. *Animal Reproduction Science* 72.1-2, 2002 (pp. 1-10)

Petroff BK, Greco DS. *Cunninghams Textbook of Veterinary Physiology* 6<sup>th</sup>, 2020 (chapters 33-34)

Polge C. 8<sup>o</sup> International Congress on Animal Reproduction, Krakow, 1976

Pope WF. Embryonic mortality in swine. *Embryonic mortality in domestic species* 53, 1994 (p. 77)

Prunier A, Quesnel H, Messias de Bragança M, Kermabon AY. Environmental and seasonal influences on the return-to-oestrus after weaning in primiparous sows: a review. *Livestock Production Science*, 1996 (pp. 103-110)

Pursel VG, Johnson LA. Fertility with frozen boar spermatozoa. *Journal of Animal Science* 33.1, 1971

Rehfeldt C, Lang IS, Görs S, Hennig U, Kalbe C, Stabenow B, Brüssow KP, Pfuhl R, Bellman O, Nürnberg G, Metges CC. Limited and excess dietary protein during gestation affects growth and compositional traits in gilts and impairs offspring fetal growth. *Journal of Animal Science* 89.2, 2011 (pp. 329-341)

Rehfeldt C, Lefaucheur L, Block J, Stabenow B, Pfuhl R, Otten W, Metges CC, Kalbe C. Limited and excess protein intake of pregnant gilts differently affects body composition and cellularity of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue of newborn and weanling piglets. *European Journal of Nutrition* 51, 2012 (pp. 151-165)

Ríos R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 282.5, 2002 (pp. C993-C999)

Robert C, Palin MF, Coulombe N, Roberge C, Silversides FG, Benkel BF, McKay RM, Pelletier G. Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. *Canadian Journal of Animal Science* 78.4, 1998 (pp. 473-482)

Roberts RM, Raub TJ, Bazer FW. Role of uteroferrin in transplacental iron transport in the pig. *Federation proceedings* 45.10, 1986 (pp. 2513-2518)

Rohde Parfet KA, Ganjam VK, Lamberson WR, Rieke AR, vom Saal FS, Day BN. Intrauterine position effects in female swine: subsequent reproductive performance, and social and sexual behaviour. *Applied Animal Behaviour Science* 26.4, 1990a (pp. 349-362)

Rohde Parfet KA, Ganjam VK, Lamberson WR, Rieke AR, vom Saal FS, Day BN. Intrauterine position effects in male and female swine: subsequent survivability, growth rate, morphology and semen characteristics. *Journal of Animal Science* 68.1, 1990b (pp. 179-185)

Ropka-Molik K, Eckert R, Piórkowska K. The expression pattern of myogenic regulatory factors MyoD, Myf6 and Pax7 in postnatal porcine skeletal muscles. *Gene Expression Patterns* 11.1-2, 2011 (pp. 79-83)

Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 168.6, 2017 (pp. 960-976)

Self JT, Spencer TE, Johnson GA, Hu J, Bazer FW, Wu G. Glutamine Synthesis in the Developing Porcine Placenta. *Biology of Reproduction* 70.5, 2004 (pp. 1444-1451)

Seyfang J, Plush KJ, Kirkwood RN, Tilbrook AJ, Ralph CR. The sex ratio of a litter affects the behaviour of its female pigs until at least 16 weeks of age. *Applied Animal Behaviour Science* 200, 2018 (pp. 45-50)

Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. *Fisiologia degli animali domestici*, 2013 (capitolo 19)

Soede NM, Langendijk P, Kemp B. Reproductive cycles in pigs. *Animal Reproduction Science* 124.3-4, 2011 (pp. 251-258)

Tarocco C, Goldoni G. *Il nuovo Progresso Veterinario* 28, 1973

Tarocco C. Scrofette sempre al top? Ecco come “prepararle”. *Rivista di suinicoltura* 41.6, 2000 (pp. 17-22)

Tarraf CG, Knight JW. Effect of intrauterine position on conceptus development, placental and endometrial release of progesterone and estrone in vitro, and concentration of steroid hormones in fetal fluids throughout gestation in swine. *Domestic Animal Endocrinology* 12.2, 1995 (pp. 179-187)

Torres-Rovira L, Tarrade A, Astiz S, Mourier E, Perez-Solana M, de la Cruz P, Gomez-Fidalgo E, Sanchez-Sanchez R, Chavatte-Palmer P, Gonzalez-Bulnes A. Sex and breed-dependent organ development and metabolic responses in foetuses from lean and obese/leptin resistant swine. *PLoS One* 8.7, 2013

Vallet JL, Freking BA, Miles JR. Effect of empty uterine space on birth intervals and fetal and placental development in pigs. *Animal reproduction science* 125.1-4, 2011 (pp. 158-164)

Vallet JL, Leymaster KA, Cassady IP, Christenson RK. Are hematocrit and placental selection tools for uterine capacity in swine? *Journal of Animal Science* 79 supplement 2, 2001 (p. 89)

Vallet JL, McNeel AK, Johnson G, Bazer FW. Triennial reproduction symposium: limitations in uterine and conceptus physiology that lead to fetal losses. *Journal of Animal Science* 91.7, 2013 (pp. 3030-3040)

Vonnahme KA, Ford SP. Selection for increased placental efficiency (PE) results in increased placental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pig. *Journal of Animal Science supplement* 79, 2001 (pp. 1821-1825)

Wang QF, Farnworth PG, Findlay JK, Burger HG. The effect of pure 31 kDa bovine inhibin on the specific binding of GnRH to rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 123.5, 1988 (pp. 2161-2166)

Wigmore P, Stickland N. Muscle development in large and small pig fetuses. *Journal of Anatomy* 137.2, 1983 (p. 235)

Wilfinger Jr, WW. Plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin in ovariectomized, hysterectomized and intact swine. *Tesi di dottorato*, 1974

Wilmoth TA. Variation in, and contributing factors of placental efficiency in swine. *West Virginia University*, 2009

Wilson ME, Biensen NJ, Ford SP. Novel insight into the control of litter size in pigs, using placental efficiency as a selection tool. *Journal of Animal Science* 77.7, 1999 (pp. 1654-1658)

Wilson ME, Biensen NJ, Youngs CR, Ford SP. Development of Meishan and Yorkshire Littermate Conceptuses in Either a Meishan or Yorkshire Uterine Environment to Day 90 of Gestation and to Term. *Biology of Reproduction* 58.4, 1998 (pp. 905-910)

Wilson ME, Ford SP. Comparative aspects of placental efficiency. *Reproduction supplement* 58, 2001 (pp. 223-232)

Wilson ME, Sonstegard TS, Smith TP, Fahrenkrug SC, Ford SP. Differential gene expression during elongation in the preimplantation pig embryo. *Genesis* 26.1, 2000 (pp. 9-14)

Wise TH, Christenson RK. Relationship of fetal position within the uterus to fetal weight, placental weight, testosterone, estrogens, and thymosin beta  $\beta$ 4 concentrations at 70 and 104 days of gestation in swine. *Journal of Animal Science* 70.9, 1992 (pp. 2787-2793)

Wislocki GB, Dempsey EW. Histochemical reactions of the placenta of the pig. *American Journal of Anatomy* 78.2, 1946 (pp. 181-225)

Wu G, Bazer FW, Johnson GA, Herring C, Seo H, Dai Z, Wang J, Wu Z, Wang X. Functional amino acids in the development of the pig placenta. *Molecular Reproduction and Development* 84.9, 2017 (pp. 870-882)

Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE. Board-invited review: intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *Journal of Animal Science* 84.9, 2006 (pp. 2316-2337)

Yániz JL, Recreo P, Carretero T, Arceiz E, Hunter RH, López-Gatius F. The peritoneal mesothelium covering the genital tract and its ligaments in the female pig shows signs of active function. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 290.7, 2007 (pp. 831-837)

Young LD, Leymaster KA, Christenson RK. Opportunities for indirect selection for uterine capacity of swine. *Journal of Animal Science supplement* 74 supplement 1, 1996 (p. 119)

Zhang S, Heng J, Song H, Zhang Y, Lin X, Tian M, Chen F, Guan W. Role of maternal dietary protein and amino acids on fetal programming, early neonatal development, and lactation in swine. *Animals* 9.1, 2019 (p. 19)

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372.6505, 1994 (pp. 425-432)

Ziecik AJ, Waclawik A, Kaczmarek MM, Blitek A, Jalali BM, Andronowska A. Mechanisms for the establishment of pregnancy in the pig. *Reproduction in domestic animals* 46, 2011 (pp. 31-41)

Złotkowska A, Adamczyk S, Andronowska A. Presence of trophoblast in the uterine lumen affects VEGF-C expression in porcine endometrium. *Theriogenology* 125, 2019 (pp. 216-223)