

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
Medicina veterinaria

Ovum pick-up nella bovina

Relatore
Prof. Calogero Stelletta

Laureando
Filippo Calabrese
Matricola n.
1017573/MV

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

Indice:

Riassunto:	4
Abstract:	5
1. Introduzione	7
1.1 Generalità	7
1.2 Primi tentativi di aspirazione follicolare con fine IVP nella bovina da latte	10
1.3 Progressi nella metodologia e nella strumentazione dell'ovum pick-up	10
1.4 I paragoni tra l'approccio laparoscopico e quello eco-guidato	14
1.5 Studi condotti per migliorare l'efficienza dell'OPU: frequenza di campionamento, trattamenti ormonali e rimozione del follicolo dominante	15
1.6 Crio-preservazione	19
1.6.1 Congelamento rapido e congelamento lento	19
1.6.2 Vittrificazione in Open pulled straws	21
1.6.3 Vittrificazione della corticale ovarica	22
2. Scopo del lavoro:	24
3. Materiali e metodi:	26
4. Risultati	33
5. Discussione	36
6. Conclusioni	41
7. Bibliografia	43

Riassunto:

A livello internazionale l'ovum pick-up (OPU) sta avendo grande successo per le sue caratteristiche: alta ripetibilità, possibilità di effettuarlo in qualsiasi momento del ciclo estrale o in gravidanza, possibilità di praticarlo in assenza di stimolazione ormonale e su soggetti infertili o sub-fertili. La via ecografica trans-vaginale ha preso il sopravvento su quella laparoscopica soprattutto per la sua praticità e a tal proposito sono stati sviluppati una serie di dispositivi montabili su sonde ecografiche che permettono l'utilizzo di appositi aghi da ovum pick-up lunghi 55 cm. Generalmente vengono utilizzate sonde MAP (*Multiple angle probe*) che consentono una miglior visualizzazione dei follicoli rispetto alle sonde lineari. Di norma il recovery rate (numero di oociti raccolti/numero di follicoli aspirati*100) va dal 40% al 70% e vengono considerati validi solo i COC (*cumulus oocyte complex*) di grado 1 e 2, mentre vengono scartati quelli di grado 3 e 4. Nel tempo sono stati tentati vari trattamenti ormonali, per lo più a base di FSH (*follicle-stimulating hormone*) o eCG (*equine chorionic gonadotropine*) ma la loro efficacia risulta tuttora dubbia. La rimozione del follicolo dominante risulta essere efficace per ottenere una coorte omogenea di follicoli ed effettuare i prelievi due volte a settimana porta al maggior numero di oociti ottenuti su base settimanale e potenzialmente può portare ad ottenere oltre 100 embrioni l'anno dalla stessa bovina. La vitrificazione è attualmente la metodologia migliore per la conservazione di oociti, essa porta infatti a un numero maggiore di blastocisti ottenute nel post scongelamento rispetto ai normali metodi di congelamento lento. Questi oociti fanno parte della coorte di follicoli che viene reclutata in una determinata ondata follicolare, mentre i follicoli primordiali presenti sulla corticale ovarica (contenenti oociti nella profase della meiosi 1) non sono aspirabili e possono essere conservati solo mediante vitrificazione della corticale stessa, da impiantare successivamente su una ricevente.

Questo lavoro ha avuto come fine la creazione di una *Genetic resource bank* (GRB = banca dati genetica) per la razza burlina, ottenuto effettuando prelievi oocitari mediante OPU su 9 soggetti di diversi allevamenti e mantenuti presso due strutture separate. Sono stati scelti soggetti infertili o sub-fertili, al fine di poter preservare la variabilità genetica della razza (attualmente a rischio estinzione). Sono stati vitrificati in *Open pulled straw* (OPS; metodologia secondo G. Vajta) 19 oociti ottenuti durante 33 sessioni effettuate in 9 giornate diverse. Non è stato possibile effettuare i prelievi con regolarità settimanale e ciò permetteva ripetutamente la formazione di follicoli dominanti che esercitavano influenza negativa sugli

altri, infatti il recovery rate ottenuto è del 22,83%. La media di oociti ottenuti per sessione è di 0,58, e diventa 0,73 eliminando dal conteggio le due bovine da cui non si è ottenuto alcun gamete.

La corticale della donatrice migliore è stata vitrificata in quanto, avendo manifestato la sindrome della vacca a terra, si è vista la necessità di sacrificarla prima della fine delle sessioni OPU.

Abstract:

Internationally ovum pick-up (OPU) is having great success for its features: high repeatability, chance to do it at any time of the estrous cycle or during pregnancy, possibility of doing it without any stimulation and in infertile cows. The trans-vaginal route has taken place on the laparoscopic route, especially for its practicality. For this reason a lot of needle guidance systems have been developed, they allow to use 55 cm long disposable needles. Normally multiple angle probe (MAP) transducers are used for OPU, due to their ability to visualize smaller follicles than linear array transducers. In most cases recovery rate (number of collected oocyte/number of visualized follicles) is between 40-70% and only grade 1 and 2 COCs (cumulus oocyte complex) are used, while the others (grade 3 and 4) are considered not usable. During time very much attempts of hormonal treatments to increase the number of collected oocyte have been made, mostly using FSH (follicle-stimulating hormone) or eCG (equine chorionic gonadotropin) but their effectiveness has not been yet demonstrated. Dominant follicle ablation leads to obtain a homogeneous cohort of follicles and a twice-weekly program leads to reach the higher number of collected oocyte per week. Theoretically, with OPU, it is possible to obtain more than 100 embryos per year from the same donor cow. Vitrification is the best method for the oocyte cryo-preservation, it permits to get more expanded blastocyst after thawing than conventional slow freezing. Those oocytes belong from a cohort that is recruited during a follicular wave, while primordial follicles present on the ovarian cortex cannot be aspirated (they contain oocyte in the prophase of meiosis 1) and can be collected only with the vitrification of the whole ovarian cortex, and subsequently grafted on a histocompatible recipient.

The aim of this work was to create a Genetic resource bank (GRB) for Burlina breed, practicing OPU on 9 cows of different owners maintained in two dislocated structures. Infertile and sub-fertile subjects have been chosen in order to maintain the genetic variability

of the breed (Burlina is currently an endangered breed). Nineteen oocyte have been vitrified with open pulled straw (OPS) method during 33 OPU session in 9 different days. It was not possible to maintain regularity in OPU session and this lead to the formation of dominant follicles, prejudicing the development of subordinate follicles. Indeed the recovery rate was only 22,83%. Within used animals a big individual variability has been observed, with fluctuations of the recovery rate from 0% to 56,67%. The mean of obtained oocyte per session is 0,58, but it increase to 0,73 excluding from counting the two worste bovine (with 0 oocyte donate from each one).

Ovarian cortex of the best donor of this study was vitrified due to the need to slaughter it before the end of OPU sessions (for downer cow syndrome).

1. Introduzione

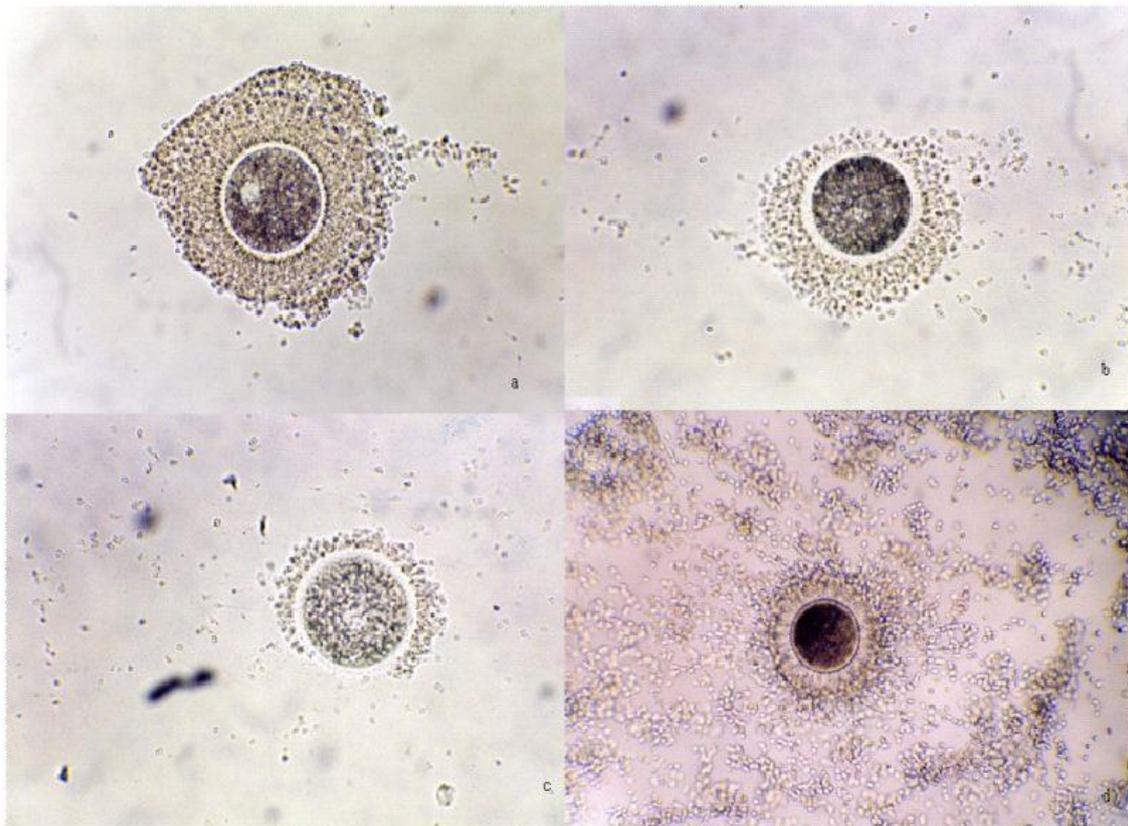
1.1 Generalità

Aumentare la prolificità di soggetti di alto interesse genetico (generalmente per caratteristiche produttive) è uno degli aspetti maggiormente studiati dai tecnologi della riproduzione nelle ultime decadi. Le alternative principali nell'allevamento bovino moderno sono: 1) il prelievo oocitario da ovaie reperite al macello da animali sacrificati, 2) l'*embryo transfer* (ET) spesso preceduto da protocolli di superovulazione (*multiple ovulation* MO), e 3) il prelievo oocitario transvaginale eco-guidato, ossia l'*ovum pick-up* (OPU). Risulta evidente che le ultime due opzioni abbiano un potenziale di efficienza maggiore rispetto alla prima considerando il numero limitato di follicoli che si sviluppano durante ogni ciclo estrale e che sono quindi reperibili post-mortem. Il MOET è attualmente la metodologia maggiormente utilizzata in Italia.

L'*ovum pick-up* consente di ottenere oociti da bovine in qualsiasi stato fisiologico o patologico (Bols et al., 1996 a), a prescindere dal momento del ciclo estrale, da gravidanze, infezioni uterine e in soggetti refrattari ai protocolli di superovulazione. Gli oociti raccolti possono essere fecondati, maturati (per 7 giorni fino al raggiungimento dello stadio di blastocisti) e conservati (mediante vitrificazione o congelamento lento) o trasferiti su bovine riceventi adeguatamente sincronizzate (7 giorni post-estro). La produzione di embrioni mediante OPU è quindi soggetta non solo all'efficienza del prelievo oocitario ma anche all'efficienza delle metodologie IVP (*in vitro embryo production*) applicate (Boni, 2012). L'efficienza dell'OPU si valuta considerando il numero di follicoli visibili e aspirabili per sessione e il numero di oociti raccolti. Gli oociti vengono classificati in quattro classi: 1) cumulo compatto, pluristratificato (con più di tre strati di cellule) e citoplasma scuro; 2) cumulo compatto con due o tre strati cellulari completi e citoplasma scuro non omogeneo; 3) presenza di un solo strato di cellule della granulosa (a volte anche due o tre ma incompleti) e citoplasma chiaro e disomogeneo; 4) cumulo espanso o oocita denudato (Figura 1.1.1). I primi due stadi sono da considerarsi i migliori, con alta capacità di sviluppo e soprattutto con alta percentuale di sopravvivenza alla congelazione. A volte durante le sessioni di OPU è possibile trovare oociti che presentano un citoplasma uniforme ma privi di rivestimento, questo perché il COC che passa all'interno del sistema di aspirazione può sfaldarsi a causa della forte

pressione a cui è sottoposto e del fatto che, per via delle turbolenze all'interno del condotto, può sbattere sulle pareti perdendo così gli strati esterni. Tali oociti sono comunque da considerarsi validi in quanto presentano una percentuale di sviluppo allo stadio di morula/blastocisti sovrapponibile a quella dei COC di grado.

Figura 1.1.1: Complesso cumulo oocita (COC) di gatto raccolti da follicoli preantrali (*Preantral Follicles* PAF); gradi: a) grado 1: cumulo pluristratificato compatto e integro e ooplasma scuro; b) grado 2: cumulo compatto ma non integro e paucistratificato, e colorazione scura ma non omogenea dell'ooplasma; c) grado 3: cumulo interrotto e non compatto e ooplasma chiaro; d) grado 4: cumulo espanso (Cocchia et al., 2015).



Gli oociti ottenuti da follicoli inferiori a 2 mm hanno minor capacità di maturare e dare origine a embrioni. Abitualmente si utilizzano follicoli compresi tra i 2 e i 6 mm ma secondo alcuni studi gli oociti di follicoli >6 mm danno embrioni di miglior qualità, probabilmente perché il follicolo stesso crea un ambiente favorevole allo sviluppo del gamete.

A Cuba nel 2005 nacque il primo vitello creato per clonazione a partire da un oocita ottenuto mediante ovum pick-up (Denis, 2008)

L'ovum pick-up risulta una tecnica poco invasiva e ripetibile che permette di aumentare il rendimento di bovine di alto valore genetico, di animali sub-fertili, animali prepuberi e gestanti, il che porta ad avere maggior precisione negli indici di selezione e nei programmi di miglioramento genetico, diminuendo al contempo l'intervallo generazionale (Douar, 1998).

L'ovum pick-up è una tecnica operatore dipendente, che richiede capacità ecografiche e precisione da parte dell'equipe di lavoro (per OPU è necessario che vi siano almeno due operatori). Un'equipe esperta è necessaria per l'efficienza dell'OPU, come dimostrato dagli studi condotti per periodi prolungati (Chaubal et al., 2005; De Roover et al., 2008).

La tecnica OPU (così come il MOET) bypassa il problema della ridotta capacità riproduttiva della specie bovina. Le bovine da latte infatti generalmente vengono eliminate dopo 2,2-2,6 lattazioni (quindi parti), per cui una bovina normalmente darebbe origine a meno di tre vitelli durante la sua carriera produttiva. Grazie all'OPU è possibile incrementare la progenie dei soggetti di alto valore genetico aumentandone la progenie e utilizzando come riceventi quelle bovine che si vogliono escludere dai piani di miglioramento genetico dell'azienda. Inoltre congelando il materiale genetico a fini commerciali si bypassano una serie di problematiche cruciali nell'allevamento bovino. L'immunità passiva infatti viene trasmessa dalla madre uterina (ossia la bovina ricevente) per cui, soprattutto nel commercio tra paesi lontani, conviene commercializzare un oocita o un embrione più che un vitello, in quanto il vitello nato nell'allevamento di destinazione avrà un sistema immunitario più "preparato" ad affrontare i patogeni presenti in quella determinata zona rispetto ad un vitello nato e successivamente trasferito.

I due protocolli (OPU e MOET) possono essere combinati, infatti aspirando il follicolo dominante mediante ovum pick-up 36-48 ore prima del trattamento super-ovulatorio Merton et al. (2003) riuscirono ad aumentare la media di embrioni ottenuti sia da vacche pluripare che da manze.

1.2 Primi tentativi di aspirazione follicolare con fine IVP nella bovina da latte

Il prelievo di oociti eco-guidato fu tentato inizialmente da Holland *et al.* (1981) procedendo per via laparoscopica dalla fossa del fianco sinistro. Questa tecnica si dimostrò eccessivamente costosa e poco pratica per la difficoltà nel reperire l'ovaio destro a causa dell'omento e del grasso perirenale e per la necessità di tenere gli animali a digiuno per 48h, inoltre vennero riscontrate numerose aderenze e peritoniti date dalla laparoscopia. Nel 1983 Lambert *et al.* condussero uno studio su 50 bovine in cui il prelievo di oociti veniva effettuato mediante endoscopia attraverso la fossa del fianco destro. Vennero effettuate 129 laparoscopie (delle 50 bovine 8 furono sottoposte a più di quattro sessioni) testando diversi aghi e settando la pompa a pressioni diverse. L'ago 19 G con la pompa settata a 250 mm Hg diede i risultati migliori.

Callesen *et al.* (1987) effettuarono uno studio su 7 manze sottoposte a superovulazione e il prelievo venne effettuato per via transcutanea previo posizionamento delle ovaie a ridosso del legamento sacro-ischiatico. Mediante questa tecnica riuscirono ad aspirare 38 follicoli, ottenendo un totale di 16 oociti, con quindi un Recovery Rate (RR: numero di oociti raccolti/numero di follicoli aspirati) del 42% e 2,3 oociti/bovina.

Pieterse *et al.* (1988) condussero il primo studio sull'ovum pick-up in senso stretto, adattando alle bovine la tecnica utilizzata in medicina umana. Questo studio dimostrò come l'OPU poteva essere praticato senza rischi sulla salute e l'attività riproduttiva dei soggetti trattati. Vennero effettuate sessioni OPU con cadenza settimanale in 10 vacche, durante le quali furono raccolti 54 oociti da 197 follicoli aspirati. L'RR medio fu del 27,4% e il numero di oociti/vacca/trattamento 1,5. Stimolando le bovine con PMSG si ottenne sia un aumento di RR (40% vs 18 %) che del numero di oociti/vacca/trattamento (2,7 vs 1,0). Il dosaggio del progesterone circolante dimostrò come l'OPU non aveva causato interruzione del ciclo estrale. Gli oociti raccolti furono maturati e fertilizzati in vitro e poi trasferiti su ovidotti legati di pecore (riceventi temporanee) con il 24% di embrioni sviluppati allo stadio di morula o blastocisti.

1.3 Progressi nella metodologia e nella strumentazione dell'ovum pick-up

Pieterse *et al.* (1991) valutarono l'effetto di campionamenti effettuati settimanalmente sul ciclo estrale degli animali trattati. Gli animali furono divisi in tre gruppi: A, B1 e B2. Il gruppo A (n=10) vacche che vennero sottoposte a OPU una volta a settimana per un

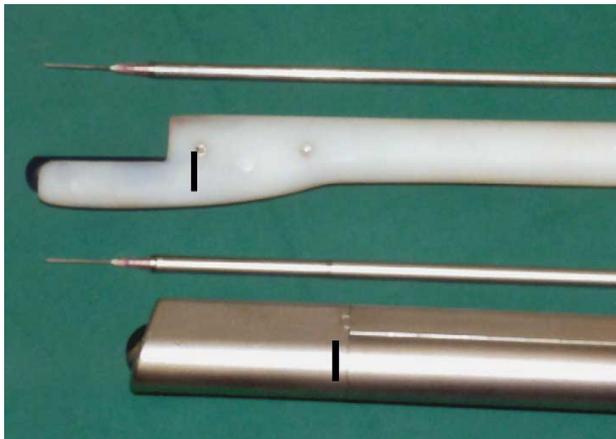
periodo di tre mesi; su 9 di queste vacche l'ovum pick-up venne praticato per un periodo aggiuntivo di tre mesi (gruppo B1) e contemporaneamente vennero effettuati prelievi su 11 nuovi animali (gruppo B2). Le sessioni di OPU vennero effettuate nei giorni 3-4, 9-10 e 15-16 del ciclo estrale. La durata media del ciclo estrale dopo i trattamenti non differiva tra i tre gruppi. Il maggior numero di follicoli/trattamento in tutti e tre i gruppi si ottenne nei giorni 3-4 del ciclo estrale ($4,9 \pm 0,3$ vs $3,4 \pm 0,2$ e $3,9 \pm 0,2$ follicoli rispettivamente nei giorni 3-4 vs 9-10 e 15-16). Alla fine vennero aspirati in media 12,6 follicoli ottenendo 6,9 oociti per soggetto nell'arco di ogni ciclo estrale. Utilizzando questa tecnica il numero di follicoli aspirati e di oociti raccolti era drasticamente più basso del numero medio di follicoli presenti in qualsiasi momento del ciclo estrale e dal numero di oociti ottenibile da ovaie di animali macellati.

Nel 1995 Bols et al. misero a punto un sistema che permettesse di utilizzare aghi usa e getta, riducendo i costi, inoltre la cruna degli aghi non usa e getta tende a smussarsi rendendo il recupero oocitario meno efficiente. Il dispositivo veniva montato su una sonda MAP (Multi Angle Probe) per far sì che l'ago entrasse completamente nel campo visivo, e collegato a una pompa a pressione settata a 90-100 mmHg. Il dispositivo venne testato su 27 bovine (di razza bianca e blu belga) di queste, alcune vennero sottoposte a un solo trattamento, mentre altre furono trattate 2 volte a settimana per 3 settimane consecutive. Furono aspirati 291 follicoli dai quali si ottennero 122 oociti (RR = 42%) che furono fatti maturare e fertilizzati secondo le normali tecniche di IVM e IVF (*in vitro maturation* e *in vitro fertilization*). Il 28% degli oociti raggiunsero lo stadio di blastocisti, percentuale sovrapponibile a quella degli oociti recuperati da ovaie di vacche macellate nello stesso periodo.

Bols et al. (1996 b) dimostrarono come il diametro dell'ago utilizzato e la pressione della pompa siano due aspetti che condizionano sia il recovery rate, sia la qualità dei COC che la capacità degli oociti raccolti di maturare fino allo stadio di blastocisti. In questo studio vennero messi a confronto aghi usa e getta di dimensioni diverse (18 G, 19 G e 21 G) ciascuno dei quali fu testato a diverse pressioni di aspirazione, nello specifico a 50, 70, 90, 110 e 130 mmHg. I prelievi furono effettuati su ovaie di animali sacrificati al fine di avere un campione ampio su cui lavorare. L'ago meno sottile (18 G) si dimostrò quello con una efficienza maggiore sia a livello di RR, sia considerando la qualità dei COC, sia considerando la percentuale di sviluppo fino allo stadio di blastocisti. Per

quanto riguarda la pressione invece, se da un lato l'RR aumenta all'aumentare della pressione la percentuale di blastocisti ottenute decresce. Risultati simili furono ottenuti da Ward et al. (2000) che registrarono una significativa diminuzione nella produzione di blastocisti in vitro quando la pressione di aspirazione era al di là dei 50 mm Hg. Sarebbe opportuno stabilire un giusto compromesso tra l'efficienza di aspirazione e la qualità dei COC. Infatti il danno meccanico generato dal trasporto del COC attraverso l'ago è dato tanto dall'ago quanto dalla pressione di aspirazione. Comunque, mentre i due precedenti parametri sono scelti dall'operatore, quest'ultimo dipende dalla grandezza dell'ago e cala anche a causa di altri fattori, come la differenza di pressione tra vagina e peritoneo. Utilizzando ovaie prese da animali macellati, quindi in condizioni sperimentali, non è possibile stabilire quale sia la pressione migliore da utilizzare sul campo.

Figura 1.3.2: 2 tipi di sonde utilizzate: in alto la sonda lineare, in basso la sonda MAP. Entrambe montano lo stesso supporto per aghi monouso. La linea nera verticale indica la fine della sonda.



Anche la conicità dell'ago influenza la raccolta. Bols et al. (1997) dimostrarono che è possibile ottenere un miglior RR con aghi a cono allungato. Altri autori, come Fayer-Hosken e Caudle (1991) e Kruip et al. (1994), al contrario, scelsero aghi più corti sulla base di concetti e considerazioni non riportate in letteratura (Boni, 2012). L'effetto dell'acutezza della punta dell'ago può essere valutata facilmente sul campo; considerando che il riutilizzo degli aghi influisce negativamente sulla punta, ci si è focalizzati sul rendere la sostituzione dell'ago più semplice ed economica, utilizzando aghi monouso.

Speciali aghi lunghi 55 cm sono ora disponibili sul mercato; vengono totalmente sostituiti dopo 3-4 PS, oppure si può cambiare solo la punta che è attaccata con della colla a un lumen 17 G (Kruip et al., 1994; Galli et al., 2001). Bols et al. (1995) proposero un dispositivo per OPU che montava aghi usa e getta 19 G connessi a tubi di silicone con un connettore di acciaio inossidabile. Questo sistema veniva inserito in un tubo di acciaio inossidabile, creando una struttura rigida all'interno della quale l'ago poteva scorrere in avanti e indietro. Anche Bungartz et al. (1995) valutarono la possibilità di utilizzare un ago monouso collegato a un tubo permanente; questo sistema non ottenne un grande apprezzamento commerciale probabilmente a causa della grande quantità di fluidi necessaria a pulire il supporto per l'ago (Boni, 2012). Un aumento ulteriore nella raccolta si ottiene girando l'ago all'interno del follicolo in fase di aspirazione (Fayrer-Hosken e Caudle, 1991). Questa tecnica mostra un aumento del 30% dell'RR e un maggiore ottenimento di COC grazie al raschiamento della parete del follicolo (Sasamoto et al., 2003).

La sensibilità dell'ecografo rappresenta un altro parametro di estrema rilevanza per l'efficacia dell'OPU. Nel primo studio sull' OPU in Olanda si utilizzò una sonda lineare meccanica da 5.0 MHz con la possibilità di visualizzare follicoli superiori ai 3 mm. Il passaggio a sonde elettroniche convex da 6.5 MHz aumentò significativamente sia il numero di follicoli rilevati che il numero di oociti raccolti (Kruip et al., 1994). Bols et al. (2004) fecero una comparazione tra una sonda lineare elettronica e una meccanica settoriale multiangolare (MAP). Furono aspirati follicoli dalle ovaie di 5 bovine, in un programma di OPU bisettimanale della durata di 4 settimane, usando due diverse sonde da 5 MHz che montavano un identico supporto per l'ago. Ogni ovaio fu esaminato con entrambe le sonde prima dell'aspirazione e fu registrato il numero di follicoli rilevati secondo il criterio: diametro < 5 mm = piccoli e \geq 5 mm = grandi. Successivamente da un ovaio veniva effettuato il prelievo con la sonda MAP e dal controlaterale con la sonda lineare elettronica. Nella sessione successiva in ogni animale veniva invertito il sistema (metodo di studio "tipo crossover"). Si riscontrò una notevole differenza nel rilevare i follicoli di piccole dimensioni (inferiori a 5 mm) a favore della sonda MAP, con una visualizzazione media di $71,6 \pm 30,3$ di tali follicoli, rispetto ai $59,8 \pm 25,7$ della sonda lineare. Non vennero riscontrate differenze nella capacità di rilevare follicoli di grandi dimensioni. Comparata con la sonda lineare, la sonda MAP permise di ottenere un numero maggiore di oociti ($14,2 \pm 7,2$ vs $7,4 \pm 6,1$).

1.4 I paragoni tra l'approccio laparoscopico e quello eco-guidato

Un' altro metodo possibile per raccogliere oociti in vivo venne proposto da Reichenbach et al. (1994) che sviluppò una tecnica di prelievo di oociti per via laparoscopica (L-OPU). Questa tecnica permette di effettuare ripetuti esami laparoscopici attraverso il solco anulare vaginale, che hanno il fine di ottenere la visualizzazione delle strutture dell'apparato genitale per avere un aiuto visivo durante la procedura. Si può effettuare facilmente in meno di 15 minuti e si può effettuare in campo. Vennero aspirati follicoli di almeno 2 mm in animali sottoposti a sedazione e anestesia epidurale. In questo studio 11 vacche e 8 manze vennero divise in due gruppi: 12 animali vennero trattati settimanalmente con 500 UI di PMSG, gli altri 7 animali non vennero sottoposti a stimolazione. Il numero di oociti raccolti da vacche e manze trattate (6,3 e 3,3) non differiva significativamente da quello di vacche e manze non trattate (5,5 e 4). Quando le donatrici venivano sottoposte a trattamento 2 volte a settimana la media dei follicoli osservati (16,2 vs 7) e il numero di oociti raccolti (12,2 vs 5,2) per settimana risultava notevolmente più alto ($P < 0,05$). L-OPU dimostrò molti vantaggi rispetto a OPU; in particolare: 1) l'aspirazione dei follicoli primari superficiali; 2) la visione diretta dell'ovaio e il controllo della procedura; 3) un ridotto rischio di danni per l'ovaio.

Santl et al. (1998) ottennero risultati diversi confrontando l'efficienza di L-OPU e U-OPU su 14 manze di razza simmenthal. In questo esperimento ogni soggetto fu sottoposto a 8 settimane di U-OPU (2 trattamenti a settimana), seguite da 11 settimane di pausa, per poi essere sottoposto a altre 8 settimane di L-OPU. Con U-OPU si ottenne un numero significativamente maggiore di blastocisti che con L-OPU, questo perché, anche se l'RR di L-OPU era maggiore di quello di U-OPU, mediante U-OPU si otteneva una percentuale maggiore di COC di grado 1 (38,7% vs 21%), i risultati sono riportati in tabella 1.

Risulta quindi che con U-OPU ci sia una maggior efficienza, sia per quanto riguarda i follicoli aspirati, sia per il numero e la qualità degli embrioni ottenuti.

Tabella 1.4.1: U-OPU vs L-OPU. Nella stessa riga valori contrassegnati con “a-d” sono significativamente differenti (a:b: P<0,001; c:d: P<0,05) (Santl et al., 1998).

		U-OPU	L-OPU
Sessioni	n	210	177
Follicoli aspirati^f	media (SD)	5,7 (3,6) ^a	4,3 (2,4) ^b
	Mediana	5	4
Oociti recuperati^f	media (SD)	3,3 (2,7) ^c	2,7 (2,1) ^d
	mediana	3	2
Recovery Rate	%	58	63
Classificazione dei COC^e			
Classe I	n (%)	269 (38,7) ^a	100 (21,0) ^b
Classe II	n (%)	109 (15,7)	92 (19,3)
Classe III	n (%)	50 (7,2) ^a	84 (17,6) ^b
Classe IV	n (%)	267 (38,4)	200 (42,0)
Embrioni ottenuti^{e,g}	n (%)	404 (58,1) ^c	248 (52,1) ^d
Morule e blastocisti^{e,h}	n (%)	188 (27,1) ^a	66 (13,9) ^b
Embrioni per sessione^f	media (SD)	0,9 (1,4) ^a	0,4 (0,6) ^b

1.5 Studi condotti per migliorare l'efficienza dell'OPU: frequenza di campionamento, trattamenti ormonali e rimozione del follicolo dominante

Da quando si è cominciato a sviluppare la metodologia OPU la frequenza del campionamento ha rappresentato un punto cruciale nella ricerca. Il passaggio da uno a due campionamenti a settimana ha coinciso con un significativo aumento dell'efficienza dell'OPU (Boni, 2012). Petyim et al. (2003) paragonarono l'efficienza dell'OPU effettuato due volte a settimana usando due diversi schemi: continuo e discontinuo

(limitato ai giorni 0-12 del ciclo estrale). Il numero medio di follicoli aspirati, di oociti raccolti e la qualità stessa degli oociti non mostrava differenze tra i due protocolli, quindi il programma continuo permette di ottenere un numero maggiore di oociti in quanto, per periodi prolungati, aumentano le sessioni a parità di lasso di tempo. Le bovine sottoposte a OPU continuo manifestavano raramente la normale ciclicità, con interestro irregolare e pochi segni estrali. Venne fatta un'attenta valutazione e comparazione di due lavori (Gibbons et al., 1994; Lopes et al., 2006; Li et al., 2007) partendo dal presupposto comune che il campionamento due volte a settimana porti all'ottenimento di un numero maggiore sia di oociti che di embrioni trasferibili. Recentemente, comparando diversi protocolli OPU: 1) due volte a settimana (ogni 3-4 giorni); 2) ogni 5 giorni; 3) una volta a settimana; 4) ogni 10 giorni; 5) una volta ogni 2 settimane, Ding et al. (2008) ottennero i seguenti tassi di sviluppo fino allo stadio di blastocisti: 1) 23,1%; 2) 15%; 3) 10,9%; 4) 4,9%; 5) 29%. Questo dimostra che il tasso di ottenimento embrionale dalla medesima donatrice cambia in funzione della frequenza di campionamento, questo probabilmente è dovuto alla relazione tra PSI e il grado di atresia dei follicoli (Boni et al. 1996), e la frequenza migliore è due volte a settimana (come dimostrato da altri studi). Un piano bisettimanale di OPU porta a: 1) aumento della frequenza delle ondate follicolari; 2) arresto del ciclo estrale, maturazione follicolare e ovulazione (Goodhand et al., 1999). Gli animali sottoposti a questo protocollo entravano in uno stato parafisiologico in cui le ondate follicolari erano asincrone rispetto al ciclo estrale (Kruip et al. 1994). In ogni caso, dal momento in cui si cessavano i prelievi, l'ovulazione avveniva entro 6 giorni (Boni et al. 1993). Un ulteriore aumento nella frequenza dei trattamenti (PS interval = 2 giorni) portava a una diminuzione sia nel numero di follicoli aspirati (Boni et al. 1997) che negli oociti raccolti, sebbene l'RR fosse aumentato, associato a una miglior qualità degli oociti. Kruip et al. (1994) pubblicarono un report dettagliato su OPU effettuato due volte a settimana per un periodo prolungato nella bovina. Furono condotti tre tipi di esperimenti per esaminare gli effetti dell'aspirazione sul reclutamento di follicoli e sul numero di oociti raccolti con sessioni effettuate ogni 3-4 giorni. Gli oociti furono maturati e fertilizzati in vitro e il numero di embrioni trasferibili venne registrato. Nell'esperimento 1 un campione di vacche da latte (n=10) fu sottoposto a OPU per un periodo di 5 mesi e gli oociti furono fertilizzati col seme di un solo toro. Nell'esperimento 2 furono sottoposte a OPU una vacca di 12 anni di alto valore genetico e una vacca al primo mese di gravidanza. Nell'esperimento 3

furono sottoposte a OPU 6 bovine da carne per un periodo di due mesi e gli oociti furono fertilizzati con il seme di due tori della stessa razza (ogni toro fertilizzava gli oociti di tre vacche). Nell'esperimento 1 furono aspirati $14,5 \pm 0,4$ follicoli con $8,0 \pm 0,3$ oociti ottenuti per settimana. Una media del 16% degli oociti raggiunse lo stadio di blastocisti, con un tasso di gravidanza del 40%. Nessuna differenza sul mese di prelievo venne riscontrata, ad indicare che il sistema di aspirazione transvaginale può essere condotto per almeno 5 mesi di fila. Così da ottenere circa 340 oociti, quindi circa 54 embrioni trasferibili per vacca nell'arco dei 5 mesi. Nessun effetto dannoso fu osservato dopo visita clinica e visita post mortem, né la razza o l'età della donatrice sembrano aver influenzato il risultato. Furono rilevate differenze individuali tra le vacche e differenze date dalla combinazione vacca toro. In particolare l'uso del seme di due tori per fertilizzare oociti provenienti da tre Blond d'Aquitane mise in luce l'importante ruolo giocato dal maschio, che fu rilevato dalla diversa percentuale ottenuta di blastocisti dai due tori ($P < 0,01$) e l'effetto individuale (femminile) rilevato dalla diversa efficienza di IVP tra ogni femmina e i due tori. L'influenza materna su IVP nella bovina è stato analizzato da Tamassia et al. (2003) dimostrando che la donatrice influenza lo sviluppo fino allo stadio di blastocisti.

Negli anni molti tentativi di stimolazione ormonale sono stati fatti al fine di aumentare la popolazione follicolare negli animali sottoposti a OPU. Pieterse et al. (1988) trattarono le bovine con PMSG 1000-3000 UI in presenza di un CL attivo 2 giorni prima dell'OPU. La media dei follicoli aspirati aumentò significativamente negli animali trattati rispetto a quelli non trattati. Al contrario il trattamento diminuì l'RR in donatrici problematiche, che non avevano avuto successo con le altre metodologie di embryo production. Looney et al. (1994) raccolsero una media di 6,3 oociti per trattamento con un programma di prelievo settimanale. La stimolazione con 4-5 mg di pFSH per i 3 giorni precedenti OPU aumentò sia il numero di oociti raccolti che il numero di COC di grado 1-2 per sessione rispetto agli animali non trattati (1.38 vs 0.96). In donatrici gravide, trattate o con 20 mg o con 40 mg di FSH o non trattate, Meintjes et al. (1995) riscontrarono una percentuale più alta di oociti nel gruppo trattato con 40 mg. Stubbing e Walton (1995) non riscontrarono una differenza significativa di oociti per sessione in vacche trattate con FSH e con prelievo una volta a settimana e vacche trattate con FSH ma con due prelievi a settimana. Bungartz et al. (1995) paragonarono l'efficienza dell'OPU in 8 vacche di cui alcune stimulate, altre no, 4 giorni prima dell'OPU con una

e una sola iniezione di pFSH. Il numero di follicoli aspirati era più alto nel gruppo trattato ($10,6 \pm 0,7$ vs $8,9 \pm 0,5$; $P < 0,05$); in ogni caso il numero di oociti raccolti ($7,0 \pm 0,6$ vs $5,8 \pm 0,5$), RR (66,6% vs 65,4%), percentuale di oociti utilizzabili (56,8% vs 52,1%) e tasso di blastocisti ottenute (3,8% vs 2,9%) non differiva significativamente tra i due campioni. Blondin et al. (2002) propose un protocollo di superstimolazione in cui venivano effettuate varie iniezioni di FSH e una sola di LH (6 ore prima di OPU). Raccogliere oociti che già avevano cominciato i processi di maturazione aumentò significativamente l'efficienza di IVP. Nel 1999 Goodhand et al. condussero uno studio su un campione di bovine di razza simmenthal ($n=24$) diviso in tre gruppi nei quali i follicoli venivano aspirati 1) una volta a settimana, 2) due volte a settimana e 3) una volta a settimana, preceduta di tre giorni da somministrazione di FSH. Gli oociti raccolti furono valutati, lavati e maturati per 20-24h e successivamente fecondati con seme congelato/refrigerato di un unico toro. Fu riscontrato un numero significativamente minore di follicoli visibili ($14,7 \pm 2,3$ vs $27,4 \pm 3,1$ vs $23,1 \pm 2,8$) e aspirabili ($12,0 \pm 2$ vs $21,8 \pm 2,7$ vs $20,1 \pm 2,8$) nelle bovine sottoposte a un trattamento a settimana rispetto sia a quelle del gruppo 2 che 3 ($P < 0,05$). Nonostante ciò non si riscontrò una differenza significativa sul numero totale di oociti raccolti per settimana per bovina, ma rispetto al gruppo 1 i gruppi 2 e 3 mostravano un numero significativamente maggiore di COC di grado 1 ($0,9 \pm 0,2$ vs $1,5 \pm 0,3$ vs $2,8 \pm 0,4$) così come il numero di morule e blastocisti ottenute ($1,0 \pm 0,3$ vs $2,4 \pm 0,4$ vs $2,1 \pm 0,4$).

De Roover et al. (2008) sottoposero a OPU, 2 volte alla settimana, 81 vacche (di razza bianca e blu belga) non stimolate (1396 PS) e, una volta ogni due settimane, 112 vacche (bianca e blu belga) sottoposte a stimolazione mediante FSH-LH (640 PS). Al contrario di altri autori (Pieterse et al., 1991 e Walton et al. 1993) che hanno ottenuto un maggior RR nelle vacche non superstimolate, ottennero un RR migliore nelle vacche stimolate (79% vs 57%), ottenendo lo stesso numero di COC nello stesso lasso di tempo ma con un quarto di PS. I COC ottenuti dalle vacche non stimolate avevano un grado di atresia minore, in quanto raccolti all'inizio dell'ondata follicolare. La stimolazione con FSH-LH portò anche all'aumentare del tasso di sviluppo allo stadio di blastocisti (29% vs 18%). Anche l'esperienza acquisita dal team durante i 7 anni di prelievi può averne migliorato l'efficienza, infatti i prelievi da vacche non stimolate furono effettuati nei quattro anni precedenti ai tre anni di prelievi delle vacche stimolate. Nello stesso studio furono confrontati due diverse tecniche di coltura: la prima con

Bovine oviduct epithelium co-culture (BOEC) in Ménézo B2 (50µl drops; Laboratoires CCD, Parigi, Francia); la seconda con synthetic oviduct fluid (SOF) medium-based system (400 µl drops; Minitube, Tiefenbach, Germania), ma non furono riscontrate differenze significative tra i due sistemi.

Chaubal et al (2006) valutarono gli effetti di: OPU effettuato o una o due volte a settimana, aspirazione del follicolo dominante (*Dominant follicle removal: DFR*) e stimolazione con FSH prima del trattamento (una volta a settimana 200 mg "Folltropin" diviso in 80 mg IM e 120 mg SC) in 5 gruppi di 3 vacche ciascuno; a ogni gruppo era assegnato un protocollo diverso che venne ripetuto per le dieci settimane a venire. Il trattamento con FSH seguito da due prelievi a settimana dimostrò che non esiste un effetto sinergico tra la stimolazione con FSH e l'aumento della frequenza dei prelievi. Quando l'FSH veniva somministrato 36 ore dopo DFR, seguito da OPU 48 ore dopo, venivano aspirati più follicoli e si ottenevano più oociti e embrioni per sessione ma non su base settimanale. Le analisi dei risultati dopo le 10 settimane hanno evidenziato un generale miglioramento delle prestazioni nei gruppi trattati con sessioni di OPU bisettimanali, a causa del numero raddoppiato di sessioni OPU eseguita. Tuttavia, il protocollo che consisteva in DFR, trattamento FSH e una successiva singola sessione OPU a settimana è stato identificato come il più produttivo e conveniente. Secondo Merton et al. (2003) rimuovere il follicolo dominante aumenta significativamente il numero di COC/sessione ottenuti mediante OPU nelle vacche ($5,9 \pm 0,4$ vs $7,6 \pm 0,6$), ma lo stesso non accade nelle manze ($6,7 \pm 0,5$ vs $7,0 \pm 1,0$), così come la percentuale di embrioni ottenuti (58 ± 3 vs 76 ± 5 in vacche e 60 ± 4 vs 68 ± 7 nelle manze; $P < 0,005$). Il follicolo dominante (DF) esercita la sua dominanza tra i giorni 3 e 8 ± 1 del ciclo estrale, e la sua azione, oltre ad aumentare il grado di atresia dei follicoli già in via di sviluppo, ha effetto negativo sulla capacità degli altri oociti di svilupparsi (*in vitro*). Infatti Hendriksen et al. (2004) riscontrarono una differenza significativa nello sviluppo (allo stadio di blastocisti) di oociti raccolti durante sessioni di OPU condotte in presenza e assenza del DF (36% vs 44,8%).

1.6 Crio-preservazione

1.6.1 Congelamento rapido e congelamento lento

La crio-preservazione di embrioni è largamente utilizzata su scala mondiale nell'allevamento bovino. In Europa nel 2014 (AETE, 2016

<http://www.aete.eu/index.php/statistics/132-aete-statistics-2014/file>) sono stati raccolti (mediante la tecnica dell'embryo transfer) 200'939 embrioni bovini di cui 138'418 trasferibili, di cui in Italia ne sono stati prodotti rispettivamente 26'728 e 17'726 (dei quali il 97,7% per bovine da latte). In Europa circa il 45% degli embrioni prodotti viene congelato, mentre poco più del 50% viene trasferito fresco (il resto viene refrigerato e trasferito in tempi brevi), mentre in Italia gli embrioni prodotti *in vivo* vengono di norma trasferiti immediatamente.

Il processo di congelazione può essere classificato come “lento” o “rapido” a seconda della velocità in cui si instaura il processo. In ogni caso in entrambi i protocolli i principi di preservazione della cellula sono i medesimi: protezione dagli effetti tossici delle temperature estreme in fase di congelamento e scongelamento, protezione dai danni causati dai cristalli di ghiaccio che si formano durante il processo.

Per preservare le cellule dai cristalli di ghiaccio i protocolli comunemente utilizzati prevedono la disidratazione cellulare. Per il congelamento lento generalmente si immerge la cellula in una soluzione contenente il 10% di agenti crio-protettivi. Quando il congelamento inizia i cristalli di ghiaccio cominciano a formarsi nella soluzione, facendo passare l'acqua dallo stato liquido allo stato solido aumenta la concentrazione dei soluti extra-cellulare, con conseguente richiamo osmotico dall'interno all'esterno della cellula. Se da un lato al diminuire della temperatura aumenta la quantità di acqua che può venire solidificata, dall'altro lato diminuisce la quantità di acqua che riesce a permeare la membrana cellulare, rendendo necessario equilibrare la quantità di acqua che esce dalla cellula con quella che viene convertita in ghiaccio (Shaw et al., 2000). Perché questa tecnica sia efficace è necessario che anche lo scongelamento sia lento, in modo da permettere alla cellula di espellere i crio-protettori, che sono tossici per la cellula stessa (Paynter et al., 1999).

Il congelamento rapido richiede alte dosi di crio-protettori, la cui tossicità è ridotta dalla rapidità del congelamento, ottenuta immergendo gli oociti (o gli embrioni) in azoto liquido. La maggior parte dei protocolli di congelamento rapido utilizzano soluzioni con alte dosi di soluti (glicole etilenico, crio-protettori, zuccheri) che richiamano rapidamente acqua al di fuori della cellula (Vajta et al., 1998). Grazie queste soluzioni la cellula diventa sufficientemente disidratata e permeata da crio-protettori da poter tollerare l'immersione diretta in azoto liquido. Durante questo processo non si ha la formazione

di cristalli di ghiaccio, ma un aumento della viscosità tale da rendere la soluzione simile al vetro, da cui il termine *vitrificazione*.

1.6.2 Vittrificazione in Open pulled straws

Nella “vittrificazione in open-pulled straw” gli agenti protettivi sono DMSO (dimetilsolfossido) e glicole etilenico. Il glicole etilenico veniva già usato come agente protettivo per il materiale genetico bovino, per via della sua alta capacità di permeare le cellule e della sua scarsa tossicità (Sommerfeld e Niemann, 1999). L’uso combinato di PBS (*Phosphate buffered saline*) e glicole etilenico ha migliorato la capacità di sopravvivenza post-scongelo degli oociti e la capacità di svilupparsi allo stadio di morula e/o blastocisti (Vajta et al., 1998). Attualmente esistono in commercio soluzioni contenenti i crio-protettori nelle giuste proporzioni e pronte all’uso (es.: DAP213: 2 M DMSO, 1 M acetamide, 3 M propandiole e 10% *Fetal calf serum*). Altri dei benefici della Metodologia in OPS derivano dall’assottigliamento della parete e del diametro interno della paillette, che minimizzano il volume di crioprotettore utilizzato e, aumentando la capillarità stessa della paillette, permettono di mantenere la cellula in una quantità costante e ridotta di crioprotettori (Vajta et al., 1998; Isachenko et al., 2005; Xu et al., 2006). Il calo della temperatura da 0°C a -196°C è accelerato dal contatto diretto dei crio-protettori con l’azoto liquido (infatti è necessario per questa tecnica utilizzare azoto liquido asettico) con un raffreddamento pari a 16’700 - 22’500°C/min, che è circa dieci volte superiore alla velocità di congelamento con le normali paillettes (Lopatarova et al., 2006). L’efficienza di questa tecnica è aumentata, in fase di scongelamento, dal contatto diretto tra l’embrione e il medium di coltura utilizzato, che porta la cellula ad essere immediatamente reidratata (Vajta et al., 1998). Un altro punto a favore di questa tecnica è la riduzione dei danni alla zona pellucida, che invece sono tipici di altre tecniche di congelamento (Vajta et al., 1999; Lazar et al., 2000; Lopatarova et al., 2006).

La rimozione dei lipidi intra-citoplasmatici porta ad un miglioramento nella sopravvivenza oocitaria ma rende il processo molto più impegnativo (Vajta e Kuwayama, 2006). La riduzione degli effetti negativi di questi lipidi si può ottenere mediante l’utilizzo di fenazina metosolfato (PES), che è un composto in grado di ossidare il NADPH (Seidel Jr., 2006).

Il trasferimento di embrioni vitrificati porta a un tasso di gravidanza di circa il 50% (Lewis et al., 1999; Lazar et al., 2000). Lopatarova et al. (2006) confrontarono l'effetto della vitrificazione a differenti stadi di sviluppo sul tasso di concepimento, confrontando i risultati con i normali metodi di congelamento lento. Non furono riscontrate differenze tra i due sistemi utilizzati, tranne che per gli embrioni allo stadio di blastocisti espansa (48,3% vs 57,7%), a favore del metodo in OPS, ma con $P > 0.05$ la differenza non risultava significativa. La qualità dell'embrione nei primi stadi è il fattore che, più di tutti condiziona sia lo sviluppo a blastocisti, sia l'attecchimento che l'esito della gravidanza, infatti embrioni di grado 1 hanno un tasso di concepimento del 54,1% (con congelamento lento) e del 55,1% (con vitrificazione in OPS), mentre embrioni di grado 2 hanno il 32,9% (con congelamento lento) e del 36,4% (con vitrificazione in OPS) (Lopatarova et al., 2006).

1.6.3 Vitrificazione della corticale ovarica

Da un punto di vista biologico i follicoli considerati meno vulnerabili al congelamento sono i follicoli primordiali. Tali follicoli contengono una cellula germinale arrestata nella profase della meiosi I, che presenta una serie di caratteristiche atte a renderla più adatta al congelamento rispetto ad un follicolo maturo. Queste caratteristiche sono: a) la ridotta dimensione cellulare, b) il metabolismo lento (rispetto a una cellula in metafase) c) l'assenza di zona pellucida, e) l'assenza di granuli periferici, f) la presenza di un numero limitato di lipidi intracellulari sensibili alle basse temperature. Dato che a minor volume corrisponde una superficie esterna proporzionalmente maggiore queste cellule sono meno a rischio verso i problemi dati dal passaggio di liquidi e soluti tra cellula e ambiente esterno. Per stoccare tali follicoli è necessario congelare pezzi di corticale ovarica.

Dato che il prelievo di tessuto ovarico è indipendente dall'età e dalla fase del ciclo estrale della donatrice, e che è possibile praticarlo anche su animali che muoiono senza preavviso, può essere considerato un metodo ideale di stoccaggio di materiale genetico (Shaw et al., 2000). Il limite di questa tecnica è che i follicoli primordiali sono molto immaturi, pertanto è necessario o impiantare la corticale ovarica su un soggetto istocompatibile (altrimenti ci sono alte probabilità di rigetto) o sottoporli a una coltura in vitro molto prolungata.

I protocolli di vitrificazione della corticale ovarica non sono efficaci su grandi pezzi di tessuto, pertanto è necessario tagliare il tessuto ovarico in piccoli pezzi. Questo ha un

risvolto negativo sull'impianto in quanto la rivascolarizzazione può esserne compromessa. Tuttavia secondo alcuni studi effettuati su diverse specie risulta che questa tecnica sia una valida alternativa nello stoccaggio di materiale genetico (Paynter et al., 1999; Sztejn et al., 1998; Revel et al., 2004). Il danno alla corticale è causato in parte dai radicali liberi che si formano quando l'ossigeno ritorna al tessuto che ne era in debito. Il danno prodotto dai radicali liberi può essere ridotto somministrando vitamina E. È riportato che anche altre molecole, come fattori di crescita endoteliali vasoattivi e gonadotropine, facilitino la rivascolarizzazione del tessuto trapiantato (Ledda et al., 2000).

2. Scopo del lavoro:

La “burlina” (Figura 2.1 e Figura 2.2) è l’unica razza bovina di origine veneta e fino agli anni 30 era la razza maggiormente allevata per il latte nelle aziende del Veneto (15000 capi registrati nel 1931). Durante il ventennio fascista la burlina subì una drastica diminuzione dell’allevamento a favore di razze più produttive (in particolare la frisona) e subì una profonda modificazione della razza a seguito dell’utilizzo di tori di razze diverse per aumentarne la produttività, fino ad arrivare ai giorni nostri a contare meno di 300 capi iscritti al registro.

Il presente lavoro è stato supportato dal programma BIONET (rete regionale per la conservazione e caratterizzazione della biodiversità di interesse agrario), in particolare dal gruppo di lavoro WP1, iniziativa finanziata dal PSR (piano per lo sviluppo rurale) per il Veneto 2007-2013 (misura 214 h).

Lo scopo di questo lavoro è stato creare una *Genetic resource bank* contenente oociti ed embrioni congelati di tale razza, programmando gli incroci con tori burlini selezionati. Per il prelievo sono stati utilizzati soggetti sub-fertili che altrimenti sarebbero stati scartati dai piani di accoppiamento e destinati alla macellazione, al fine di aumentare i riproduttori e la variabilità genetica della razza.

L’OPU è stato preferito rispetto a ET per diverse ragioni:

- Gli allevamenti in cui sono presenti burline che hanno preso parte a questo progetto sono allevamenti biologici, quindi non è possibile stimolare le vacche mediante l’utilizzo di ormoni
- Le bovine entrate nel programma presentavano problemi riproduttivi (soprattutto idrosalpinge mono o bilaterale, salpingiti e presenza di adesioni) che diminuiscono drasticamente l’efficienza dell’embryo transfer e la possibilità che l’animale resti gravido
- La raccolta di oociti, anziché di embrioni, permette di fecondare ogni singolo oocita col seme di un toro diverso, aumentando così la variabilità genetica e conoscendo, della prole, sia la madre che il padre e consente di utilizzare tale cellula avendo come fine la clonazione

Figura 2.3: Toro di razza burlina. (“Aladino”)



Figura 2.4: Vacca di razza burlina.



3. Materiali e metodi:

Durante il primo trimestre del 2013 sono state selezionate le bovine potenzialmente idonee per le sessioni di OPU (n = 9). Le donatrici disponibili sono state identificate in diverse aziende e mantenute presso due strutture: Villiago, dove sono state monitorate 5 vacche di cui 2 ritenute idonee per le sessioni di OPU, e quelle dell'azienda agricola "la Decima" dove sono state visitate tutte le bovine di razza burlina escludendo le vacche in gravidanza e i soggetti non puberi. Per l'identificazione delle idonee sono stati registrati gli eventi riproduttivi salienti (parto, fecondazione, visite, note) mediante 30 visite ecografiche e 7 diagnosi di gravidanza e sessaggio fetale ecografico. Le sessioni di OPU sono iniziate dopo aver avuto le informazioni riguardanti il loro stato di registrazione e il piano di accoppiamento possibile (le vacche selezionate per il prelievo di oociti e i piani di accoppiamento sono riportati in tabella 3.1).

Per l'individuazione delle bovine sono stati effettuati il riconoscimento anagrafico e una visita ginecologica effettuata mediante l'ausilio di strumentazione dedicata (n = 3 ecografi portatili: Kretz Technik SA 600V fornito di tre sonde ecografiche: lineare lv 5-9, convex c 5-8, endocavitaria 6.5 Hz; Esaote MyLab Vet ONE fornito di sonda ecografica lineare endocavitaria 6-10 Hz; Esaote MyLab 25 gold fornito di sonda endocavitaria SE3123).

Il prelievo oocitario è stato effettuato mediante l'ausilio di una sonda endocavitaria (Esaote MyLab 25 gold, sonda SE3123) collegata ad una pompa a vuoto (COOK Vacuum pomp 10- 500 mmHg), utilizzando aghi per ovum pick-up (COOK ago OVA-STIFF per pick up a lume singolo, diametro 17 G e lunghezza 35 cm, con un tubo di raccordo lungo 90 cm) e uno specifico medium di raccolta (Minitube, Recovery medium supplementato con eparina) e termostato per il trasporto in laboratorio a 37°C.

Tabella 3.2: Elenco bovine candidate al prelievo oocitario, i soggetti selezionati ed utilizzati per lo studio sono evidenziati in rosso. Le bovine contrassegnate con *2 hanno ottenuto l'approvazione per piani di accoppiamento dall'AIA ma sono state scartate dal programma OPU; le bovine contrassegnate con *3 sono state utilizzate nello studio, ma non hanno ancora ottenuto l'approvazione dall'AIA per i piani di accoppiamento.

Matricola	Nome	Data di nascita	Allevamento
Bovina S1	“825”	02/12/2006	Villiago
Bovina S2 *2	Banda	02/04/2011	Raccanello F.lli Mario e Claudio
Bovina S3	Iside	10/03/2008	Raccanello F.lli Mario e Claudio
Bovina S4	Jerlyna	22/04/2012	Az. Agricola sperimentale “la decima”
Bovina S5 *2	Boccarda	28/10/2005	Az. Agricola sperimentale “la decima”
Bovina S6 *2	Manuela	06/12/2007	Az. Agricola sperimentale “la decima”
Bovina S7 *2	“255”	26/01/2013	Az. Agricola sperimentale “la decima”
Bovina 1 *3	Irpinia	11/12/2008	Villiago
Bovina 2 *3	Freccia	04/11/1999	Villiago
Bovina 3 *3	Teofila	05/03/2009	Az. Agricola sperimentale “la decima”
Bovina 4	Luna	19/02/2009	Az. Agricola sperimentale “la decima”
Bovina 5	Gemma (“215”)	25/02/2007	Az. Agricola sperimentale “la decima”
Bovina 6	Stella	26/10/2007	Az. Agricola sperimentale “la decima”

Continua

Continua

Matricola	Nome	Data di nascita	Allevamento
Bovina 7 * ³	Nanto V203	27/10/2012	Az. Agricola sperimentale "la decima"
Bovina 8 * ³	Nobile	11/02/2004	Az. Agricola sperimentale "la decima"
Bovina 9 * ³	"211"	18/04/2006	Az. Agricola sperimentale "la decima"

Figura 3.5: Geo-localizzazione delle aziende di mantenimento delle donatrici di ovociti e del laboratorio di riproduzione animale del dipartimento MAPS.

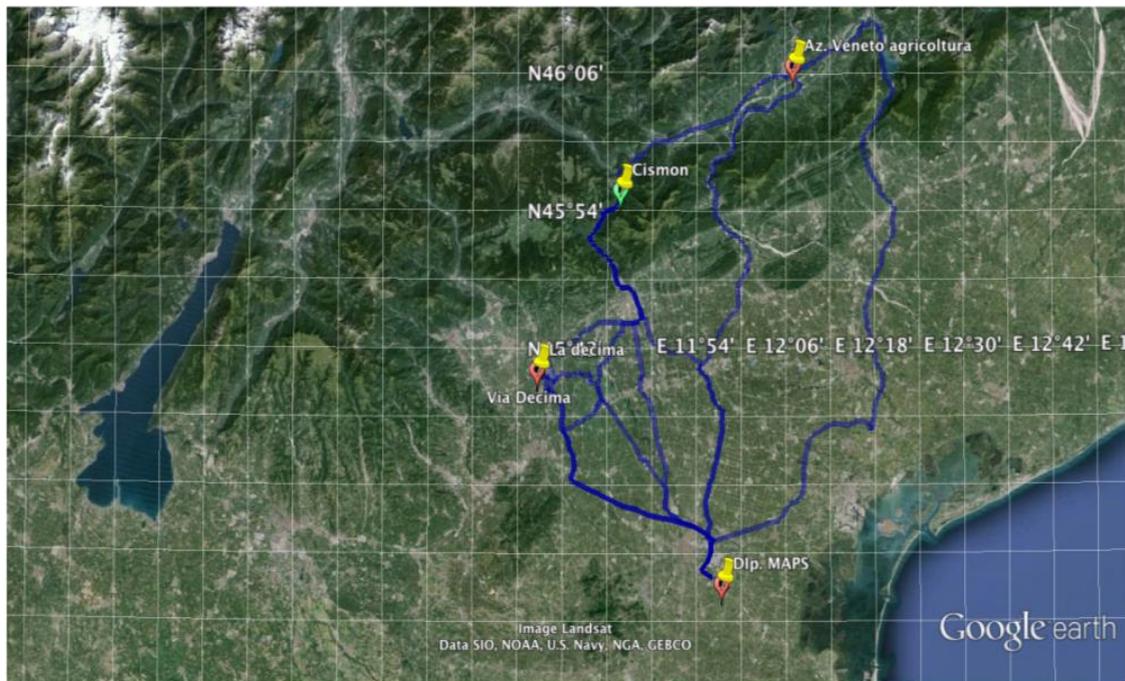


Figura 3.6: Sonda endocavitaria “Esaote SE3123”.



Figura 3.7: Pompa a pressione “COOK vacuum pomp – 10 – 500 mmHG”.



Gli oociti sono stati valutati mediante la classificazione internazionale e destinati alle procedure o di conservazione. Gli oociti conservati sono stati crio-protetti mediante un sistema specifico (Vitrification Unit, Minitube) in “open pulled straws” secondo la metodologia di vitrificazione sviluppata da Gabor Vajta (1998).

I COC di grado 3 e 4 sono stati scartati in quanto considerati troppo poco resistenti alla congelazione e per questo non hanno inciso sull'RR. Gli oociti destinati alla fertilizzazione (provenienti COC di grado 1 e 2) sono stati fertilizzati usando seme congelato, la cui scelta è derivante dai piani di accoppiamento stabiliti dall'AIA

(associazione italiana allevatori), utilizzando terreni di fertilizzazione utili allo scopo (*synthetic oviductal fluid* SOF). Gli zigoti ottenuti mediante IVF sono stati messi in terreno di coltura idoneo allo sviluppo fino allo stadio di morula o blastocisti (7 giorni in incubatore HERAEUS Heracell a 38°C con atmosfera controllata al 5% di CO₂).

Descrizione della tecnica OPU:

- Svuotamento del retto dal contenuto fecale
- Pulizia, disinfezione e asciugatura di vulva e regione perianale
- Si colloca l'ago per OPU all'interno della guida (precedentemente montata sulla sonda ecografica)
- Il veterinario procede alla localizzazione trans-rettale delle ovaie e avvicinamento delle stesse alla cervice (lato destro o sinistro a seconda dell'ovaio) (Figura 3.3)
- Lo stesso operatore, con la mano libera, introduce la sonda in vagina, avvicinandola all'ovaio
- Visualizzazione dei follicoli: essi appaiono come figure anecogene (nere) rotondeggianti all'interno dell'ovaio
- Introduzione dell'ago all'interno dei follicoli e successiva aspirazione mediante attivazione della pompa a pressione settata a 50 mmHg (questa operazione viene effettuata da un secondo operatore)
- Il contenuto dei follicoli passa all'interno di un tubo di raccordo e finisce in una provetta contenente il medium di coltura (PBS + 10%FCS), tale provetta va conservata a 37°C fino al momento della ricerca dei COC
- Prima di iniziare con le operazioni di aspirazione è importante far scorrere attraverso il tubo di raccordo qualche ml di medium eparinizzato, al fine di evitare coaguli all'interno del tubo che possono compromettere il passaggio dei COC o danneggiarne la struttura
- Ricerca dei COC all'interno del medium di raccolta mediante uno stereomicroscopio e successiva vitrificazione

La sonda ecografica e il supporto per l'ago vengono anticipatamente coperti con un preservativo e con un guanto da esplorazione, e fissati alla sonda con degli elastici, per garantire maggior pulizia.

Figura 3.8: Posizionamento dell'ovaio a lato della cervice su un apparato riproduttore reperito al macello. (Denis, 2008)

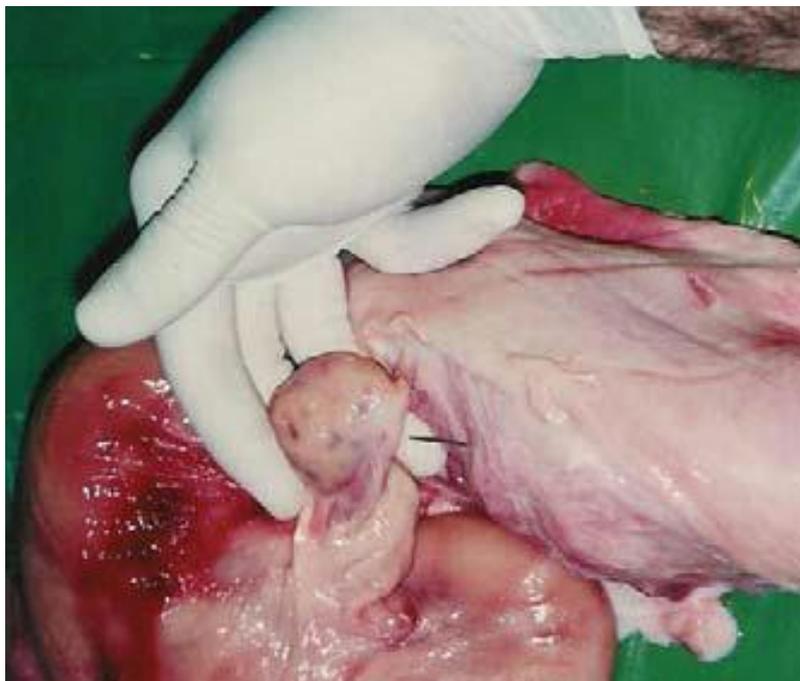


Figura 3.9: visualizzazione follicolare mediante sonda MAP (sessione del 17/11/2014, bovina IT026000025010).



Vitrificazione in “open pulled straws”¹:

- Incubazione dell’oocita in medium colturale modificato (PBS + 10% FCS supplementato con il 7,5% di glicole etilenico 7,5% DMSO (dimethyl sulphoxide) per 3 minuti;
- Trasferimento dell’oocita in 20 µl di medium colturale supplementato con 16,5 % di glicole etilenico e 16,5% DMSO e 0,5 mmol/l di saccarosio;
- Separazione di una goccia (1 o 2 µl di soluzione) di medium ad alta concentrazione di crio-protettori, contenente 1-3 oociti;
- “Caricamento” delle paillette sfruttandone la capillarità;
- Immersione della paillette in azoto liquido per 20s e successivo inserimento della stessa in una French mini-straw 0,5 ml, conservata poi nel bidone dell’azoto liquido.

¹ Attualmente sono disponibili sul mercato paillette già allungate, tagliate e sterilizzate (utilizzate nel presente lavoro). In passato la vitrificazione in OPS prevedeva 2 passaggi preliminari:

- Preparazione delle paillette: riscaldamento di una “french mini-straw” e allungamento della stessa fino a che il diametro interno e lo spessore della parete risultino 0,8 mm e 0,07 mm rispettivamente (anziché 1,7 mm e 0,15 mm);
- Taglio della paillette modificata nel punto di minor diametro.

4. Risultati

Sono state eseguite 33 sessioni di OPU diversamente distribuite tra i vari animali: dalle 5 sessioni della “Freccia” (Bovina 2) e della “215” (Bovina 5), alle 2 della “Irpinia” (Bovina 1) e della “Teofila” (Bovina 3). Nelle tabelle 4.3 e 4.4 sono riportati i principali risultati delle sessioni di aspirazione. L’RR individuale varia dallo 0% nei casi della “253” (Bovina 5) e della “Nobile” (Bovina 8) al 56,67% nel caso della “Freccia” (Bovina 2) mentre l’RR totale è del $22,83\% \pm 17,32\%$ (ds).

Le sessioni di OPU sono state effettuate a intervalli discontinui: in alcuni casi si è proceduto a rimuovere il follicolo dominante per tornare 24 ore dopo, mentre in altri l’intervallo è stato di 29 giorni. Sono stati vitrificati 19 oociti aspirati da 7 bovine (2-5/bovina) mentre dalle due sopracitate non si è ottenuto alcun oocita con una media di 0,58 oociti/sessione. Gli oociti di grado 3 e 4 sono stati scartati e non sono entrati nel conteggio dell’RR. Di fatto nella sessione dell’11/11/2014 erano stati aspirati due COC, ma entrambi sono stati scartati perché di grado 4.

Tabella 4.3: Principali risultati delle sessioni di aspirazione follicolare per donatrice. Per ogni soggetto viene riportata la matricola, il numero di sessioni di aspirazioni follicolari, l'età media, il numero di oociti vitrificati, di follicoli aspirabili, l'RR medio (indicato con "RR (m)") e l'RR della sessione migliore (indicato con "RR (sm)"). Con * sono indicate le bovine mantenute presso l'allevamento di Villiago.

	Sessioni OPU (n)	Età donatrici	Oociti vitrificati	Follicoli aspirabili	RR (m)	RR (sm)
OPU	33	8,36	19	66	22,83%	100%
Bovina 1*	2	6,07	2	5	25%	50%
Bovina 2 *	5	15,26	5	10	56,67%	100%
Bovina 3	2	5,78	2	4	33,33%	66,67%
Bovina 4	4	5,82	2	6	25,00%	100%
Bovina 5	5	7,83	2	12	13,33%	33,33%
Bovina 6	4	7,15	3	10	21,67%	66,67%
Bovina 7	3	2,07	0	4	0%	0%
Bovina 8	4	10,92	0	5	0%	0%
Bovina 9	4	8,70	3	9	25%	66,67%

Tabella 4.4: Principali risultati delle sessioni di aspirazione follicolare divisi per data. Per ogni donatrice viene riportata la matricola, il numero di sessioni di aspirazioni follicolari, l'età media, il numero di oociti vitrificati e di follicoli aspirabili. Con RR (s) è indicato l'RR complessivo della sessione; con RR (dm) è indicato l'RR della donatrice migliore in quel dato giorno. Con * sono indicate le sessioni effettuate presso l'allevamento di Villiago.

	Sessioni OPU (n)	Età donatrici	Oociti vitrificati	Follicoli aspirabili	RR (s)	RR (dm)
OPU	33	8,36	19	66	22,83%	100%
03/11/2014*	1	15,22	2	2	100%	100%
04/11/2014	4	6,41	4	11	33,33%	66,67%
10/11/2014*	1	15,24	1	1	100%	100%
11/11/2014	4	6,65	0	6	0%	0%
13/11/2014	6	7,7	4	10	27,78%	100%
18/11/2014*	7	8,26	1	14	2,86%	20%
19/11/2014*	2	10,64	1	4	16,67%	33,33%
20/11/2014	6	7,72	3	11	16,67%	66,67%
18/12/2014*	2	10,72	3	6	50%	50%

5. Discussione

In questo lavoro è stato applicato un protocollo discontinuo di sessioni OPU. L'intervallo tra le sessioni è stato variabile: da uno a ventinove giorni, di cui le giornate dell'11/11/2014 e del 18/11/2014 sono state dedicate principalmente alla rimozione del follicolo dominante. L'intervallo tra le sessioni influenza sia la quantità che la qualità degli oociti e attualmente c'è generale consenso che un piano bisettimanale di OPU porti a massimizzare il numero di oociti raccolti su base settimanale (Merton et al., 2003; Garcia e Salaheddine, 1998; Gibbons et al., 1994; Goodhand et al., 2000). Un intervallo di 7 giorni tra le sessioni comporta lo sviluppo di un follicolo dominante che esercita un effetto negativo sui follicoli subordinati. Questi oociti hanno una qualità inferiore e un maggior grado di atresia che sembra influenzare negativamente lo sviluppo embrionale. L'aspirazione cada 3 / 4 giorni previene lo sviluppo del DF e la regressione dei follicoli subordinati, e consente di aspirare una coorte omogenea di follicoli. La rimozione del follicolo dominante mediante aspirazione (Gibbons et al., 1997) porta allo sviluppo di una nuova ondata follicolare in 2 giorni (Boni et al., 1997; Garcia e Salaheddine, 1998). Come dimostrato da Boni et al. (1997) l'aumento dell'intervallo tra le sessioni non porta a un aumento nel numero di follicoli, ma solo delle loro dimensioni.

I follicoli ovarici si sviluppano in risposta al rilascio di FSH, che è soppresso a causa del feedback negativo esercitato dall'estradiolo-17 β e dall'inibina prodotta dai follicoli già in accrescimento. La rimozione dei follicoli più grandi elimina la causa di feedback negativo, permettendo il rilascio di FSH, seguito dallo sviluppo di una nuova ondata follicolare. Questa coorte di follicoli proviene da follicoli che al momento del DFR erano di piccole e medie dimensioni e successivamente hanno avuto la possibilità di crescere. La persistenza prolungata degli oociti nell'ambiente follicolare permette lo stoccaggio di un maggior quantitativo di mRNA materno e proteine all'interno dell'oocita, aumentando la capacità di sviluppo fino allo stadio di blastocisti (Vassena et al., 2003). In data 11/11/2014 venne eseguita la DFR e due giorni dopo sono stati recuperati 4 oociti competenti (grado 1 e 2), invece quando l'intervallo DFR/prelievo è stato di solo 24 ore (18-19/11/2014) il numero di oociti aspirati non è aumentato. Tuttavia per migliorare l'efficienza dell'OPU, oltre a mantenere costanza negli intervalli tra sessioni, è consigliabile applicare un programma continuativo della durata di almeno 3-4 mesi, in quanto ciò comporta un aumento nella quantità dei follicoli aspirabili e a una maggior

qualità e omogeneità degli stessi (Goodhand et al., 1999; Chaubal et al., 2005), considerando migliori gli oociti provenienti da follicoli di 3-7mm (Hendriksen et al., 2003).

Un altro fattore che influenza la raccolta oocitaria è la razza della donatrice (Figueiredo et al., 1997; Quispe et al., 2015). Le burline utilizzate in questo lavoro sono soggetti subfertili di una razza che manifesta normalmente problemi riproduttivi (sono stati scelti i soggetti peggiori da un punto di vista riproduttivo, proprio perché con le altre metodologie attualmente praticate non erano stati ottenuti risultati soddisfacenti e tali animali sarebbero stati destinati alla macellazione, perdendo così il loro patrimonio genetico) per cui è normale attendere un RR inferiore rispetto ai lavori di altri autori.

In questo studio gli animali non sono stati sottoposti a trattamenti ormonali in quanto appartenenti ad allevamenti biologici (Regolamento CEE n. 1804 /1999 del consiglio del 19 luglio 1999). In ogni caso studi precedentemente condotti sia su vacche normalmente fertili (De Roover et al., 2008; Pieterse et al., 1991; Walton et al., 1993) che in vacche problematiche riportano dati contrastanti riguardo l'efficacia di tali trattamenti (Pieterse et al., 1988; Bols et al., 1996 a).

L'RR ottenuto (22,83%) è in linea con quelli riscontrati in letteratura che vanno dal 18% ad oltre il 70% (Pieterse et al., 1988; Bols et al., 1995; Santl et al., 1998). Nella maggior parte degli altri studi si è potuto selezionare un campione ampio e adatto allo scopo, scartando bovine problematiche e utilizzando solo le migliori, in questo lavoro la scelta di soggetti sub-fertili o infertili e, in particolare, la scelta della razza hanno influenzato l'efficienza dell'OPU. Il numero di oociti/sessione è sensibilmente inferiore rispetto ai dati riportati in letteratura (Pieterse et al., 1988; Looney et al., 1994; Santl et al., 1998; Quispe et al., 2015) ma il divario si riduce notevolmente scartando dal conteggio le due bovine da cui non si sono ottenuti oociti (oociti ottenuti/sessioni ($n=26$) = 0,73) così come per l'RR (=33,3%). Inoltre bisogna tenere conto del fatto che i COC di grado 3 e 4, a differenza degli altri studi, sono stati scartati dal conteggio, influenzando al ribasso l'RR e il numero di oociti/sessione.

Secondo molti autori gli oociti ottenuti da vacche hanno maggior capacità di sviluppo in vitro rispetto agli oociti prelevati da manze. Rizos et al. (2005) confrontarono in 4 esperimenti diversi l'efficienza dell'ovum pick-up in manze e vacche in lattazione, sia in termini di oociti aspirati per sessione, sia in termini di capacità degli oociti di svilupparsi

adeguatamente. I risultati furono totalmente a favore delle vacche, soprattutto per quanto riguarda le capacità di sviluppo. In altri studi non fu evidenziata differenza nella capacità di donare oociti tra vacche e manze (Bruggerhoff et al., 2002). In questo lavoro l'unica manza utilizzata è la "Bovina 7", dalla quale non è stato ottenuto alcun oocita, pur essendo sottoposta a 3 sessioni di aspirazione, mentre la bovina più produttiva è stata la più anziana di tutte, ossia la "Freccia" (Bovina 2).

Gli oociti ottenuti sono stati vitrificati in assenza di cellule del cumulo ooforo, in quanto la presenza di tali cellule riduce l'efficacia della vitrificazione modificando la permeazione dei soluti all'interno dell'oocita (Chian et al., 2004), in contrasto con quanto accade durante il congelamento lento. Le percentuali di oociti che raggiungono lo stadio di blastocisti post-vitrificazione restano comunque sensibilmente più basse rispetto agli oociti maturati e impiantati freschi (Albarracìn et al., 2005).

L'OPU fu applicato sulla razza bianca e blu belga nel 1996 (Bols et al., 1996 a), su soggetti infertili o sub-fertili (alcuni soggetti manifestavano aderenze del tratto genitale, salpingiti e idrosalpingi mono o bi-laterali, altri soggetti non mostravano anomalie all'esplorazione trans-rettale ma non rimanevano gravide con le altre metodologie né si sono dimostrate adatte al MOET). Delle bovine selezionate (n=12) solo tre furono sottoposte a OPU anche dopo stimolazione ormonale, dimostrando come su alcuni soggetti la super-stimolazione abbia un effetto positivo sulla produzione oocitaria. Lo studio dimostrò anche che esiste una enorme variabilità individuale all'interno della stessa razza, come dimostrato dalla tabella 5.5.

Le bianca e blu belga sopracitate hanno caratteristiche simile (come scelta del campione) alle burline oggetto di questo studio. Entrambe presentano le stesse patologie riproduttive e le stesse problematiche per cui sono state scartate da altri programmi di riproduzione. Pur essendo noto che la razza stessa condizioni l'efficienza dell'ovum pick-up, la differenza sostanziale in questo caso è data dalla differenza di frequenza di campionamento. Infatti le bianca e blu belga analizzate da Bols et al. sono state sottoposte a sessioni OPU in programmi con cadenza settimanale o bisettimanale. Invece le burline di questo studio sono state sottoposte a sessioni discontinue, senza un vero controllo del ciclo estrale e quindi trovandosi di fronte a coorti di follicoli non omogenee, e spesso in presenza di un follicolo dominante in stadio avanzato, con conseguente atresia degli altri follicoli.

Tabella 5.5: risultati di OPU su donatrici infertili o sub-fertili di razza bianca e blu belga. Con * sono indicate le bovine affette da adesioni, con ** da idrosalpinge (Bols et al., 1996 a)

Nome della Bovina	Sessioni OPU (n)	Follicoli aspirabili	Oociti raccolti	Oociti sviluppati
Ablette*	6	23	10	1 (10%)
Blanche	4	13	6	1 (17%)
Blondie	16	59	23	3 (13%)
Caroline	10	68	54	2 (4%)
Echappe	1	16	11	3 (27%)
Fleur**	9	55	46	1 (2%)
Galoche	9	36	20	1 (5%)
Galopeuse*	6	25	13	5 (38%)
Illusion	17	93	52	12 (23%)
Jenny	9	59	33	9 (27%)
Nolita	13	50	21	4 (19%)
Novalgine	6	50	43	13 (30%)
Sessioni con super-ovulazione				
Blondie	3	51	20	4 (25%)
Illusion	2	39	14	2 (14%)
Nolita	1	35	4	3 (75%)

Nei programmi di preservazione di razze e specie a rischio un ruolo fondamentale è giocato dalle *Genetic resource bank* (GRS: raccolte di materiale genetico, sia esso seme, oociti o embrioni) combinato con le moderne tecnologie della riproduzione (Holt e Pickard, 1999). Le biotecnologie riproduttive sono state utilizzate, con successo, allo scopo di preservare numerose specie a rischio, tra cui: gazzelle (*Gazella dama mhor*) (Berlinguer et al., 2008; Holt et al., 1996), antilopi (*Antilope cervicapra*) (Holt et al., 1988), panda (*Ailuropoda melanoleuca*) (Moore et al., 1984) e furetti (*Mustela nigripes*) (Howard et al., 1991). Le GRS sono storicamente utilizzate per lo stoccaggio di seme e embrioni già formati, mentre pochi sono gli studi in cui si è scelto di conservare oociti al posto di embrioni. Grazie ai moderni progressi nelle biotecnologie della

riproduzione è stato possibile far portare a termine gravidanze impiantando gli embrioni su soggetti appartenenti a specie diverse da quella della donatrice (su specie affini) (Holt e Pickard, 1999). In questo lavoro è stata creata una GRS per la razza burlina contenente oociti (di 7 soggetti) e corticale ovarica (di un solo soggetto). Le bovine scelte sono entrate a far parte di un piano di accoppiamenti approvato dall'AIA (associazione italiana allevatori) per cui il seme di burlini è già stato stoccato. Naturalmente è più semplice applicare i protocolli di conservazione per una razza che non per un'intera specie, ad esempio è molto più semplice trovare delle riceventi istocompatibili all'interno della stessa specie, sia per quanto riguarda gli embrioni, sia per quanto riguarda la corticale ovarica.

La produzione in vitro rappresenta la naturale prosecuzione all'attività di raccolta degli oociti. Tale tecnica da tempo utilizzata nei laboratori specializzati prevede prima una maturazione oocitaria e la fertilizzazione con seme di tori interessanti per il mantenimento delle caratteristiche genetiche delle razze bovine e dipendenti da piani d'accoppiamento per garantire il mantenimento della biodiversità. Successivamente viene atteso un periodo di 7 giorni per la crescita embrionale fino allo stadio di blastocisti. Tali fasi di produzione sono efficacemente portate a termine grazie all'uso d'idonee strumentazioni di laboratorio. La selezione degli oociti da destinare alla maturazione e successiva fertilizzazione dipende dalla loro qualità al momento dell'aspirazione; il tasso di fertilizzazione dipende dalla qualità del trattamento del seme per la sua attività in vitro e dal grado di maturazione oocitaria; il tasso di crescita dipende, oltre che da specifici terreni nutritivi, dalla temperatura mantenuta stabile (38,5 °C) durante tutte le fasi di produzione e dalla presenza del 5% di CO₂. La produzione in vitro verrà effettuata quando verrà raggiunto un numero di oociti per bovina sufficiente a garantire la produzione embrionale (generalmente il tasso di sviluppo fino allo stadio di morula o blastocisti è del 15% con un tasso di gravidanza del 40%).

6. Conclusioni

È dimostrato che l'ovum pick-up sia un metodo efficace per il prelievo degli oociti da bovine in carriera. L'OPU può essere associato all'IVF e IVM anche in bovine infertili o sub-fertili (Bols et al., 1996 a). Spesso i soggetti sottoposti a OPU hanno un alto valore genetico e appartengono a razze con un basso numero di capi. Questi soggetti sono quelli da utilizzare maggiormente nell'ambito di programmi di miglioramento della razza, ed è importante non perderne il patrimonio genetico per mantenere linee di sangue forti e produttive e per aumentare la variabilità genetica della razza di appartenenza (Bols et al., 2000).

La vitrificazione degli oociti permetterà in futuro di agire su di essi con tecniche che al giorno d'oggi necessitano di una maggior standardizzazione. Al contempo vitrificare gli oociti significa non poter sapere quanti di essi daranno origine a gravidanze portate a termine.

Il numero di oociti ottenuti per sessione è più basso dei dati riportati negli studi antecedenti, tuttavia è ormai riconosciuta l'esistenza di una variabilità di razza, e, all'interno di essa, una variabilità individuale. Le bovine scelte infatti non avevano risposto positivamente ai precedenti tentativi di inseminazione o ET.

La strumentazione per ovum pick-up ormai ha raggiunto una certa standardizzazione, e gli aghi e i dispositivi di scorrimento sono disponibili sul mercato. Le sonde MAP sono generalmente preferite rispetto alle sonde lineari e la sensibilità dell'ecografo risulta giocare un ruolo chiave nell'efficienza dell'ovum pick-up. Un altro punto considerato cruciale in letteratura è il timing delle sessioni: il programma bisettimanale viene considerato infatti il migliore. In questo lavoro, per motivi logistici, non è stato possibile applicarlo e le sessioni non hanno avuto regolarità, per cui spesso ci si è trovati di fronte a un follicolo dominante che inibiva la crescita degli altri follicoli, rendendo il prelievo meno efficace o, in alcuni casi, del tutto inefficace.

La stimolazione ormonale è un punto molto dibattuto. In questo studio non è stata effettuata stimolazione alcuna, essendo nell'ambito di allevamenti biologici. In futuro si potrebbe tentare il prelievo post stimolazione ormonale (ovviamente su altri soggetti) per capire se possa aver un effetto positivo sull'efficienza di OPU nella burlina.

La media di follicoli aspirabili per sessione e per singolo animale è risultata essere più bassa di quella di altre razze. Sono stati vitrificati 19 oociti di 7 bovine (2-5 oociti per bovina) e la prosecuzione dell'attività porterebbe ad avere un numero idoneo di oociti da singola bovina destinabili al processo di produzione embrionale (maturazione, fertilizzazione e coltura in vitro fino allo stadio di morula e/o blastocisti).

7. Bibliografía

Albarracín, J. L., R. Morató, C. Rojas and T. Mogas. 2005. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 63(3): 890-901.

Berlinguer, F., R. González, S. Succu, A. Del Olmo, J. Garde, G. Espeso, M. Gomendio, S. Ledda and E. R. Roldan. 2008. In vitro oocyte maturation, fertilization and culture after ovum pick-up in an endangered gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Theriogenology* 69(3): 349-359.

Blondin, P., D. Bousquet, H. Twagiramungu, F. Barnes and M. A. Sirard. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of reproduction* 66(1): 38-43.

Bols, P., J. Leroy, T. Vanholder and A. Van Soom. 2004. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology* 62(5): 906-914.

Bols, P., M. Ysebaert, A. Van Soom and A. de Kruif. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47(6): 1221-1236.

Bols, P., A. Van Soom, G. Vanroose and A. De Kruif. 1996 a. Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgian Blue donor cows: preliminary results. *Theriogenology* 1(45): 359.

Bols, P., J. Vandenheede, A. Van Soom and A. de Kruif. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43(3): 677-687.

Bols, P., A. Van Soom, M. Ysebaert, J. Vandenheede and A. de Kruif. 1996 b. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 45(5): 1001-1014.

Boni, R. 2012. Ovum Pick-up in cattle—a 25-yr retrospective analysis. *Anim Reprod* 9(3): 362-369.

Boni, R., S. Roviello and L. Zicarelli. 1996. Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46(5): 899-909.

- Boni, R., M. Roelofsen, M. Pieterse, J. Kogut and T. Kruip. 1997. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 48(2): 277-289.
- Bruggerhoff, K., V. Zakhartchenko, H. Wenigerkind, H. D. Reichenbach, K. Prella, W. Schernthaner, R. Alberio, H. Kuchenhoff, M. Stojkovic, G. Brem, S. Hiendleder and E. Wolf. 2002. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: effect of maternal lineage of oocyte donors. *Biology of reproduction* 66(2): 367-373.
- Bungartz, L., A. Lucas-Hahn, D. Rath and H. Niemann. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology* 43(3): 667-675.
- Callesen, H., T. Greve and F. Christensen. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 27(1): 217.
- Chaubal, S., L. Ferre, J. Molina, D. Faber, P. Bols, P. Rezamand, X. Tian and X. Yang. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU–IVP system. *Theriogenology* 67(4): 719-728.
- Chaubal, S., J. Molina, C. Ohlrichs, L. Ferre, D. Faber, P. Bols, J. Riesen, X. Tian and X. Yang. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65(8): 1631-1648.
- Chian, R., M. Kuwayama, L. Tan, J. Tan, O. Kato And T. Nagai. 2004. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *Journal of Reproduction and Development* 50(6): 685-696.
- Cocchia, N., S. Tafuri, L. Abbondante, L. Meomartino, L. Esposito and F. Ciani. 2015. Assisted Reproductive Technologies in Safeguard of Feline Endangered Species.
- De Roover, R., J. Feugang, P. Bols, G. Genicot and C. Hanzen. 2008. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle In Vitro Embryo Production. *Reproduction in domestic animals* 43(2): 239-245.

- De Roover, R., G. Genicot, S. Leonard, P. Bols and F. Dessy. 2005. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science* 86(1): 13-25.
- Denis, R. 2008. Aspiración folicular in vivo (OPU) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción. *Ciencia y tecnología ganadera (cuba)*, (May-Ago 2(2): 57-70.
- Ding, L., H. Tian, J. Wang, J. Chen, H. Sha, J. Chen and G. Cheng. 2008. Different intervals of ovum pick-up affect the competence of oocytes to support the preimplantation development of cloned bovine embryos. *Molecular reproduction and development* 75(12): 1710-1715.
- Fayrer-Hosken, R. and A. Caudle. 1991. The laparoscope in follicular oocyte collection and gamete intrafallopian transfer and fertilization (GIFT). *Theriogenology* 36(5): 709-725.
- Figueiredo, R., C. Barros, O. Pinheiro and J. Soler. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 47(8): 1489-1505.
- Galli, C., G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi and G. Lazzari. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55(6): 1341-1357.
- Garcia, A. and M. Salaheddine. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50(4): 575-585.
- Gibbons, J., W. Beal, R. Krisher, E. Faber, R. Pearson and F. Gwazdauskas. 1994. Effects of once-versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 42(3): 405-419.
- Gibbons, J. R., M. C. Wiltbank and O. J. Ginther. 1997. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biology of reproduction* 57(5): 1066-1073.
- Goodhand, K., R. Watt, M. Staines, J. Hutchinson and P. Broadbent. 1999. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology* 51(5): 951-961.

- Hendriksen, P., W. Steenweg, J. Harkema, J. Merton, M. Bevers, P. Vos and S. Dieleman. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 61(5): 909-920.
- Holland, E., B. Bindon, L. Piper, J. Thimonier, K. Cornish and H. Radford. 1981. Endoscopy in cattle: techniques for ovarian examination by the paralumbar and mid-ventral routes. *Animal Reproduction Science* 4(2): 127-135.
- Holt, W., T. Abaigar and H. Jabbour. 1996. Oestrous synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reproduction, fertility and development* 8(8): 1215-1222.
- Holt, W. V. and A. R. Pickard. 1999. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Reviews of reproduction* 4(3): 143-150.
- Holt, W. V., H. D. Moore, R. D. North, T. D. Hartman and J. K. Hodges. 1988. Hormonal and behavioural detection of oestrus in blackbuck, Antelope cervicapra, and successful artificial insemination with fresh and frozen semen. *Journal of reproduction and fertility* 82(2): 717-725.
- Howard, J. G., M. Bush, C. Morton, F. Morton, K. Wentzel and D. E. Wildt. 1991. Comparative semen cryopreservation in ferrets (*Mustela putorius furo*) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility* 92(1): 109-118.
- Isachenko, V., M. Montag, E. Isachenko, V. Zaeva, I. Krivokharchenko, R. Shafei and H. van der Ven. 2005. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. *Human reproduction (Oxford, England)* 20(2): 492-496.
- Kruip, T. A., R. Boni, Y. Wurth, M. Roelofsen and M. Pieterse. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42(4): 675-684.
- Lambert, R., C. Bernard, J. Rioux, R. Beland, D. D'amours and A. Montreuil. 1983. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology* 20(2): 149-161.

- Lazar, L., J. Špak and V. David. 2000. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology* 54(4): 571-578.
- Ledda, S., G. Leoni, L. Bogliolo and S. Naitana. 2001. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology* 55(6): 1359-1371.
- Lewis, I., M. Lane and G. Vajta. 1999. Pregnancy rates following transfer of in vitro produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw (OPS) method. *Theriogenology* 51(1): 168.
- Li, F., X. Chen, W. Pi, C. Liu and Z. Shi. 2007. Collection of Oocytes Through Transvaginal Ovum Pick-up for In Vitro Embryo Production in Nanyang Yellow Cattle. *Reproduction in domestic animals* 42(6): 666-670.
- Looney, C., B. Lindsey, C. Gonseth and D. Johnson. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41(1): 67-72.
- Lopatarova, M., S. Cech, L. Holy and R. Dolezei. 2006. The effect of vitrification in open pulled straws on pregnancy rates after transfer of in vivo produced bovine embryos. *Veterinarni Medicina-Praha-* 51(9): 454.
- Lopes, A., T. Martinussen, T. Greve and H. Callesen. 2006. Effect of Days Post-Partum, Breed and Ovum Pick-Up Scheme on Bovine Oocyte Recovery and Embryo Development. *Reproduction in domestic animals* 41(3): 196-203.
- Meintjes, M., M. Bellow, J. Broussard, J. Paul and R. Godke. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in vitro fertilization. *Journal of animal science* 73(4): 967-974.
- Merton, J., A. De Roos, E. Mullaart, L. De Ruigh, L. Kaal, P. Vos and S. Dieleman. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59(2): 651-674.
- Moore, H., M. Bush, M. Celma, A. Garcia, T. Hartman, J. Hearn, J. Hodges, D. Jones, J. Knight and L. Monsalve. 1984. Artificial insemination in the Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of zoology* 203(2): 269-278.

Paynter, S., A. Cooper, B. Fuller and R. Shaw. 1999. Cryopreservation of Bovine Ovarian Tissue: Structural Normality of Follicles after Thawing and Culture in Vitro. *Cryobiology* 38(4): 301-309.

Perez, O. 2003. *Oocyte production in the early postpartum cow.*

Petyim, S., R. Båge, T. Hallap, A. Bergqvist, H. Rodríguez-Martínez and B. Larsson. 2003. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology* 60(1): 175-188.

Pieterse, M., K. Kappen, T. A. Kruip and M. Taverne. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30(4): 751-762.

Pieterse, M., P. Vos, T. A. Kruip, Y. Wurth, T. H. Van Beneden, A. Willemse and M. Taverne. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35(4): 857-862.

Quispe, C., E. Fernández, E. Ancco, K. Oriundo and E. Mellisho. Efecto de la raza de la donadora sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal.

Revel, A., A. Elami, A. Bor, S. Yavin, Y. Natan and A. Arav. 2004. Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation. *Fertility and sterility* 82(6): 1714-1715.

Rizos, D., L. Burke, P. Duffy, M. Wade, J. F. Mee, K. J. O'Farrell, M. MacSiurtain, M. P. Boland and P. Lonergan. 2005. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. *Theriogenology* 63(3): 939-949.

Santl, B., H. Wenigerkind, W. Scherthaner, J. Mödl, M. Stojkovic, K. Prella, W. Holtz, G. Brem and E. Wolf. 1998. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. *Theriogenology* 50(1): 89-100.

Sasamoto, Y., M. Sakaguchi, S. Katagiri, Y. Yamada and Y. Takahashi. 2003. The effects of twisting and type of aspiration needle on the efficiency of transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science* 65(10): 1083-1086.

Seidel, G. E. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65(1): 228-235.

- Shaw, J., A. Oranratnachai and A. Trounson. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53(1): 59-72.
- Sommerfeld, V. and H. Niemann. 1999. Cryopreservation of Bovine in Vitro Produced Embryos Using Ethylene Glycol in Controlled Freezing or Vitrification. *Cryobiology* 38(2): 95-105.
- Stubbings, R. and J. Walton. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* 43(4): 705-712.
- Sztejn, J., H. Sweet, J. Farley and L. Mobraaten. 1998. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. *Biology of reproduction* 58(4): 1071-1074.
- Tamassia, M., Y. Heyman, Y. Lavergne, C. Richard, V. Gelin, J. P. Renard and S. Chastant-Maillard. 2003. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)* 126(5): 629-637.
- Vajta, G., N. Rindom, T. Peura, P. Holm, T. Greve and H. Callesen. 1999. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 52(5): 939-948.
- Vajta, G., P. Holm, M. Kuwayama, P. J. Booth, H. Jacobsen, T. Greve and H. Callesen. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular reproduction and development* 51(1): 53-58.
- Vajta, G. and M. Kuwayama. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65(1): 236-244.
- Van Wagtenonk-de Leeuw, A. 2006. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65(5): 914-925.
- Vassena, R., R. J. Mapletoft, S. Allodi, J. Singh and G. P. Adams. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60(5): 923-932.
- Walton, J., K. Christie and R. Stubbings. 1993. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on bovine ovarian dynamics. *Theriogenology* 39(1): 336.

Ward, F., P. Lonergan, B. Enright and M. Boland. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54(3): 433-446.

Xu, J., Z. Guo, L. Su, T. Nedambale, J. Zhang, J. Schenk, J. Moreno, A. Dinnyés, W. Ji and X. Tian. 2006. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *Journal of dairy science* 89(7): 2510-2518.