



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE
Dottorato di Ricerca in Scienze veterinarie

AGGIORNAMENTI IN RIPRODUZIONE BOVINA E BUFALINA

Tesi di Dottorato di:
MICHELANGELO LA SPISA

Tutor:
Chiar.ma Prof.ssa: Antonina ZANGHI'

Anno accademico 2018 / 2019

INDICE

Abstract	pag. 4
Linea di ricerca 1. Primi dati sulla MOET (<i>Multiple Ovulation and Embryo Transfer</i>) nella bovina Modicana	pag. 6
• Introduzione	pag. 7
• Scopo dello studio	pag. 33
• Materiali e metodi	pag. 33
• Risultati	pag. 52
• Discussioni	pag. 55
Linea di ricerca 2. Monitoraggio di un caso di tumore a cellule della granulosa: considerazioni cliniche ed ormonali	pag. 59
• Caso clinico	pag. 60
• Discussioni	pag. 70
Linea di ricerca 3. Resynch in bufale siciliane: dati preliminari	pag. 80
• Introduzione	pag. 81
• Scopo dello studio	pag. 107

- Materiali e metodi pag. 108
- Risultati pag. 113
- Discussioni pag. 116

Ringraziamenti pag. 122

Bibliografia pag. 124

ABSTRACT

This PhD thesis includes 3 lines of research. A first study was the optimization of the protocol of multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in the Modicana breed, a minor Italian cattle breed, autochthonous of Sicily. Our data suggested that a low dose of FSH is effective for MOET schedules in Modicana breed. Despite individual differences, Modicana breed is candidate to be a good embryo producer among dairy cattle breeds. A second line of research included the study of a long-standing granulosa cell tumour in a 6-year-old Holstein Friesian cow with irregular heats. The clinical findings underlined the effects on the genital tract caused by a prolonged exposition to E2, AMH and INH. Ultrasound, E2, INH and AMH evaluations were confirmed to be helpful for the diagnosis of GTCT. A third study was on an intense experience of resynchronization in Sicilian domestic buffalos. The reproductive efficiency of this species is often poor because of late sexual maturity, seasonal ovarian activity, prolonged postpartum anoestrus and consequent prolonged calving intervals. This study confirmed that Resynch may be applied in the buffalo breeding in Sicily. It may be useful to answer to the market demand of milk and “mozzarella” in the summer period, contrasting the spontaneous seasonality (short day breeders).

Linea di ricerca 1

PRIMI DATI SULLA MOET (MULTIPLE OVULATION AND EMBRYO TRANSFER) NELLA BOVINA MODICANA

(La Spisa M; Marino G; Zanghì A; Chiofalo V (2018). First data of multiple ovulation and embryo transfer in Modicana cows. 72° Congress of the Italian Society of Veterinary Sciences (SISVet) & 16° Congress of the Italian Society of Animal Reproduction (SIRA), Turin 20-22 June 2018. ISBN: 978-8890909214 (p. 354). http://www.sisvet.it/00_atti/atti_sisvet_2018.pdf.)

FIRST DATA OF MULTIPLE OVULATION AND EMBRYO TRANSFER IN MODICANA COWS

Michelangelo La Spisa (1,2), Gabriele Marino (1,2), Antonina Zanghì (1), Vincenzo Chiofalo (1,2)
(1) Università degli Studi di Messina, Dipartimento di Scienze Veterinarie; (2) Consorzio di Ricerca Fileria Carni, Messina

The Modicana is one of the minor Italian cattle breeds of limited diffusion, is autochthonous of Sicily and has a prevalent dairy aptitude. Multiple ovulation and embryo transfer (MOET) is an important tool for the genetic improvement and preservation of endangered breeds. Superovulation protocols use FSH extracted from porcine or ovine pituitaries and the two commercial products approved in Italy give comparable results despite different FSH/LH ratio [1]. Despite manufacturers' recommendations, the final dose of the drug is empirically adjusted in relation to aptitude, breed and age. Aim of the study was the application of MOET in Modicana cows using a protocol based on FSH/LH (Pluset, Bio 98).

A total of 9 flushings in 9 donors were performed in a Modicana cattle farm placed in Ragusa, Italy. The criteria of selection of the donors were: age of 4-5 years, 90-200 days post partum, body condition score around 3.5, free from diseases with special regard to the genital tract. The study was performed from September 2016 to June 2017. The donors were visited 10 days after the onset of standing estrus to count the antral follicles of 2-3 mm and, eventually, to aspirate dominant follicles. Superovulation was induced by 10 intramuscular injections of Pluset, at 12-hour intervals over 5 days. A total of 500 UI of FSH were administered in declining doses after 6 unsuccessful experiences in 6 different donors with the manufacturer's dose (1000 UI). On day 4, cloprostenol (Estrumate, MSD Animal Health) was given. On day 6 and 7, each cow was inseminated with frozen semen 3 times at 8 hours interval, starting 12 hours after the onset of the standing estrus. Embryos were collected 7 days after inseminations by transcervical uterine flushing using a standard protocol and commercial media. Embryo morphology was assessed under a stereomicroscope according to the International embryo transfer Society classification guidelines [2]. Embryos were transferred in Modicana heifer recipients fresh or after freezing with a standard curve for bovine embryos (from -7°C to -35°C with a rate -0.5°C/min). All the data were presented as mean and standard deviation. Fisher's exact test was used to analyze results. The estimated count of antral follicles in the selected donors was 14±6 resulting in 12±3 corpora lutea in the study group (n. 9) versus 2±1 corpora lutea in the manufacturer's dose group (n. 6) (p=0.04). A total of 70 embryos were recovered, evaluated and 53 were transferred as fresh (n. 18) or frozen (n. 35). The number of recovered and transferable embryos for cow was: 10±1 and 8±1. First grade blastocysts (6.1) and morulae (4.1) were the most represented embryos (34 and 19%). Non-transferable embryos (14%) were mainly represented by unfertilized ova (70%). Pregnancy rates (42 day) of recipients were 50% for fresh and 48% for frozen transferred embryos (p=1). Our data suggest that a low dose of FSH is effective for MOET schedules in Modicana breed. Despite individual differences, Modicana breed is candidate to be a good embryo producer among dairy cattle breeds.

References
[1] Mikkola M, Tapponen J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Follitropin or Pluset. Theriogenology 88:88-98, 2017.
[2] Stringfellow D, Givens MD. Manual of the International embryo transfer Society, Fourth edition. Savoy, IL: IETS, 2010.

Acknowledgements
Regione Sicilia, Assessorato Regionale dell'Agricoltura, dello Sviluppo Rurale e della Pesca Mediterranea
Consorzio Ricerca Fileria Carni (CarfiCarni), Messina
Misura 4.1.2 - PO FESR 2007/2013. Linea 4.1.A. - Azione a). Centro per l'innovazione dei sistemi di qualità, tracciabilità e certificazione dell'agroalimentare (iCQVET)



Fig. 1. Modicana donor flushed with a two-way catheter.



Fig. 2. Embryos were concentrated with a filter, searched and evaluated under stereomicroscope and frozen with ethylene glycol.

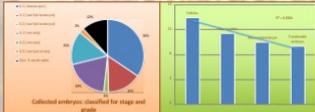


Fig. 3. Embryo distribution, on the left. Graphic correlation among antral follicles, corpora lutea, recovered and transferable embryos, on the right.



Fig. 4. Modicana heifers used as recipients and the first calf born from a frozen embryo.

16° Congress SIRA, 72° Congress SISVet, Turin, Italy, 20-22 June 2018

INTRODUZIONE

La *Multiple Ovulation Embryo Transfer* (MOET) è una tecnica riproduttiva ampiamente diffusa nella specie bovina, praticata nelle aziende zootecniche da più di un quarantennio con lo scopo di ottenere un rapido miglioramento genetico ed un incremento della produttività. Una bovina generalmente genera 1 vitello l'anno e 4-5 in tutta la sua vita; con la MOET è potenzialmente in grado di generare 6-8 embrioni ogni 2 mesi, quindi potenzialmente anche 40-50 l'anno. Questa tecnica riproduttiva permette di prelevare gli embrioni da un soggetto definito "donatrice" e trasferirli ad altri soggetti "riceventi". Tutte le operazioni possono essere effettuate direttamente in allevamento e il trasferimento degli embrioni nella ricevente può anche effettuarsi altrove, vista la possibilità di congelare gli embrioni prelevati.

La prima prova coronata da successo, che ha portato alla nascita di un vitello da una procedura di ET, ha avuto luogo nel 1951 (Willett et al 1951) e nel 1973 è nato il primo vitello in seguito al trasferimento di un embrione congelato (Wilmot e Rowson 1973). Nel 1976, con l'applicazione di tecniche non

chirurgiche per il prelievo degli embrioni, l'ET cominciò ad essere diffuso nelle razze da latte. Negli anni '90 la tecnica è stata affinata con il sessaggio embrionale e con lo *splitting*. Oggi le nuove frontiere sono l'utilizzo del seme sessato, la biopsia embrionale per la genomica e l'*embryo therapy*. Si calcola che ogni anno si effettuano nel mondo 100.000 *flushing*, la metà circa solo in Nord America, sia in razze da latte (57%) che da carne (43%). In Europa, solo l'Olanda e la Francia effettuano circa 6000 *flushing* l'anno, l'Italia 2000 (Fonti IETS: *International Embryo Transfer Society*).

L'ET si esplica attraverso diverse fasi:

- Selezione delle bovine donatrici e delle riceventi
- Sincronizzazione dei cicli
- Superovulazione delle donatrici
- Fecondazione
- *Flushing*
- Valutazione e stoccaggio degli embrioni
- Trapianto embrionale nelle riceventi

Selezione donatrice e riceventi. Il vero fattore limitante della MOET è la selezione della bovina donatrice. In uno studio effettuato su 2048 bovine da carne, in media venivano prodotti per ciascun trattamento 6,2 embrioni trasferibili; il 30% delle bovine produceva il 70% degli embrioni, mentre il 24% delle bovine non dava nessun embrione (Looney 1986). Dati simili sono stati riscontrati in un gruppo di 987 vacche da latte (Lerner et al 1986).

Indipendentemente dall'impiego dei criteri di selezione della donatrice (anamnesi riproduttiva, età e stato nutrizionale), una bovina verrà classificata come buona o cattiva donatrice solo quando verrà sottoposta a un trattamento di MOET.

La donatrice (vacca o manza) è scelta di concerto con l'allevatore sulla base delle caratteristiche genetiche (morfologia, incremento ponderale, produzione di latte); tuttavia, deve possedere dei requisiti minimi stabiliti dalla legge (D.M. 172/94). In particolare le donatrici devono: essere iscritte agli albi genealogici; essere rimaste nel territorio dello Stato nei 6 mesi precedenti; provenire da un allevamento ufficialmente indenne da leucosi bovina enzootica o che non abbiano presentato, negli

ultimi 3 anni, alcun segno clinico riferibile alla malattia; provenire da un allevamento le cui bovine non abbiano presentato, nell'anno precedente, alcun segno clinico riferibile a rinotracheite infettiva/vulvo vaginite pustolosa; aver soggiornato nei 6 mesi precedenti in non più di due diverse mandrie di stato sanitario inferiore; nel giorno della raccolta, essere in un'azienda non oggetto di misure di interdizione o quarantena e che non presenti segni clinici di malattia.

Con il fine di garantire lo stato di salute ottimale della donatrice e di ottimizzare la risposta superovulatoria, le bovine devono essere almeno a 80-90 giorni post-parto, con una *body condition score* (BCS) di circa 3,5 e a una distanza di almeno 60 giorni da una eventuale pregressa superovulazione. La bovina deve essere clinicamente sana, fertile e in bilancio energetico positivo. Non deve aver presentato condizioni patologiche quali complicazioni puerperali, ritenzioni placentari e infezioni uterine e deve aver manifestato almeno 2-3 calori con intervalli regolari. Inoltre i trattamenti antiparassitari e le vaccinazioni devono essere effettuate almeno 30 giorni prima (Guarneri 2013).

La bovina è in genere valutata durante l'emergenza di

un'ondata follicolare ossia, in vacche da latte a 2 ondate, al giorno 0 o con maggiore frequenza al giorno 10. In tali giornate con un accurato esame ecografico è possibile valutare il *pool* follicolare mediante conta dei follicoli superiori a 2-3 mm di diametro e fare una previsione della risposta superovulatoria. È stato infatti dimostrato che il numero di follicoli antrali di 2-3 mm presenti in questo momento è correlato al numero di embrioni trasferibili (Singh et al 2004). Con lo stesso scopo è stato proposto il dosaggio dell'ormone antimülleriano (AMH), prodotto da tutti i follicoli antrali presenti sull'ovaio (Rico et al 2009; Abdel et al 2017; Hirayama et al 2017).

La bovina donatrice al momento della visita possiede un corpo luteo fisiologico, o in formazione (giorno 0) o diestrare (giorno 10). La dimensione del corpo luteo è correlata alla concentrazione di progesterone e le vacche con livelli di progesterone elevati, secondo alcuni Autori, risponderebbero meglio alla superovulazione (Kayacik et al 2005; Kudláč et al 1991); tuttavia, secondo altri Autori, livelli di progesterone troppo alti potrebbero inibire l'ondata follicolare (Tamboura et al 1985). Livelli bassi di progesterone potrebbero determinare,

invece, follicoli grandi, anche anovulatori (El-Sherry et al 2010).

Il trasferimento di embrioni viene effettuato su vacche o su manze, preventivamente selezionate sulla base dell'età, delle caratteristiche morfologiche (BCS) e riproduttive. In genere si selezionano manze cicliche, di 14–15 mesi di età che abbiano raggiunto un peso di almeno 350 kg al momento del trasferimento; è essenziale che la ricevente abbia una conformazione tale da garantire la nascita di vitelli di grandi dimensioni. Inoltre è fondamentale che la ricevente possieda il giorno del trapianto un corpo luteo di 7 giorni circa, dalle ottimali caratteristiche morfologiche (diametro >20 mm, sporgenza). Ciò si ottiene attraverso protocolli di sincronizzazione o sfruttando i calori naturali e attraverso uno specifico esame clinico dell'apparato genitale prima di procedere al trapianto, per valutare la qualità del corpo luteo.

Recentemente è stato studiato l'impiego dell'ecografia *Doppler* per selezionare le riceventi migliori (Kanazawa et al 2016; 2017). Secondo questi studi una buona ricevente deve avere un corpo luteo con un'area di perfusione superiore a 0,5 cm² e la somministrazione di GnRH al 5° giorno potrebbe

migliorare la perfusione del corpo luteo e di conseguenza la sensibilità della rilevazione *Doppler*.

Sincronizzazione dei cicli delle donatrici e delle riceventi. Poiché il tasso di attecchimento dell'embrione trasferito dipende dall'ambiente uterino cui sarà esposto (ricevente), che deve essere simile all'ambiente uterino di origine (donatrice), risulta necessario sincronizzare donatrici e riceventi. Se il *flushing* della donatrice ha luogo a 7 gg dal calore, la ricevente dovrebbe trovarsi anche a giorno 7. Un'asincronia minima è tollerata, tuttavia i migliori risultati si hanno con riceventi a 7-8 giorni (Rodrigues et al 2018). Qualsiasi protocollo può essere impiegato per sincronizzare donatrici e riceventi. Essendo per definizione animali ciclici s'impiegano essenzialmente prostaglandine.

Superovulazione donatrice. La superovulazione è una tecnica che si basa sull'utilizzo di FSH (e LH), estratto dalle ipofisi ovine o porcine, per indurre lo sviluppo e l'ovulazione di più follicoli nella bovina donatrice. I due prodotti commerciali

approvati in Italia (*Pluset* e *Folltropin*) hanno differenti quantità di LH (ratio LH/FSH: 1 vs 0,12) ma danno risultati simili se analizzati in termini di embrioni trasferibili (Mikkola e Taponen 2017). Nonostante le indicazioni riportate nel foglietto illustrativo, la dose finale di FSH è aggiustata empiricamente in relazione all'attitudine, razza ed età. Negli animali da latte si dovrebbero impiegare 700 UI di *Folltropin* o 1000 UI di *Pluset*. Tendenzialmente sarebbe meglio usare dosi basse per limitare l'effetto deleterio dell'LH sullo sviluppo follicolare e sugli ovociti (Ferrè et al 2016; Mikkola e Taponen 2017), soprattutto utilizzando il *Pluset*. In uno studio, la dose totale di *Folltropin* e *Pluset* in bovine da latte Ayrshire e Holstein veniva utilizzato il 90% (630 UI di *Folltropin*) e l'85% (850 UI di *Pluset*) della dose raccomandata dal produttore (Kaimio et al 2013; Mikkola e Taponen 2017). Nelle manze, seguendo le indicazioni del *Pluset*, si dovrebbero impiegare 800 UI di FSH, mentre sempre 700 UI utilizzando il *Folltropin*, oppure rapportare la dose usata nelle vacche alla taglia della manza, riducendo in pratica la dose del 50-80% (Mikkola e Taponen 2017). Nelle bovine da carne si dovrebbero impiegare 800 UI (*Pluset*) o 700 UI (*Folltropin*),

sebbene in Angus sono descritte 1000 UI di FSH (Rodrigues et al 2018), ma nelle bovine Marchigiane sono state utilizzate solo 300 UI (Biancucci et al 2016).

Il dosaggio va poi distribuito in somministrazioni costanti o decrescenti ogni 12 h per 4-5 giorni, a causa della breve emivita dell'FSH. Prolungando il periodo di somministrazione (7 giorni) sono stati descritti miglioramenti della risposta superovulatoria (García Guerra et al 2015); soprattutto nelle bovine da carne, con temperamento nervoso, le punture giornaliere potrebbero arrecare stress e traumi. In questi casi si sta cercando, al contrario, un sistema a lento rilascio, effettuando somministrazioni sottocutanee o diluendo l'FSH in una matrice con acido ialuronico e riducendo i trattamenti ad 1-2 (Bò et al 1994; Biancucci et al 2016).

La superovulazione deve iniziare all'emergenza di una nuova ondata follicolare (in una bovina a 2 ondate follicolari l'emergenza si ha a giorno 0 e giorno 10). Se la superovulazione inizia dopo la selezione del follicolo dominante, i risultati finali sono inferiori (Guilbault et al 1991; Adams 1994; Bungartz e Niemann 1994; Baracaldo et al 2000; Shaw e Good 2000; Diaz et

al 2001; Kim et al 2001; Merton et al 2003).

Il follicolo cavitario di diametro superiore a 5 mm, con la produzione di inibina ed estradiolo, interferisce sul rilascio di FSH; pertanto, al fine di controllare l'ondata follicolare, è utile annullare l'effetto del follicolo dominante, aspirandolo con metodi meccanici per via transvaginale ecoguidata (Baracaldo et al 2000) o luteinizzandolo con farmaci come l'estradiolo, vietato in Europa, e sostituito non adeguatamente dal GnRH o dall'hCG (Bò et al 2008).

Al 3° o 4 giorno dal trattamento con FSH, deve essere somministrata la prostaglandina (2 dosi distanziate di 24h) e la bovina normalmente sarà in estro 36-48h dopo.



Fig. 1. Ovaie di una bovina superovulata.

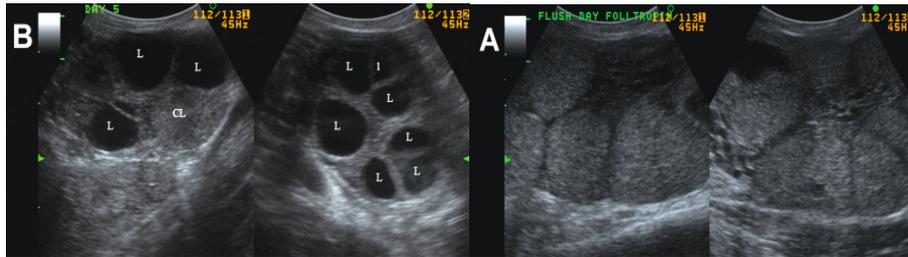


Fig. 2. Ecografia ovarica in bovina superovulata prima e dopo l'ovulazione con visualizzazione dei corpi lutei prodotti.

Fecondazione. Dopo aver applicato il protocollo di superovulazione e la PGF2alpha, la bovina donatrice viene fecondata 2-3 volte, generalmente con seme congelato a 12, 24 e 36h dopo la comparsa dell'estro o 72, 84 e 96h dopo la PGF2alpha. Sebbene sia auspicabile l'uso del seme sessato, questo dà minori *performance* nella MOET (Seidel 2007; Kaimio et al 2013) ed alcune aziende produttrici non ne garantiscono l'efficacia.

L'utilizzo del seme sessato richiede almeno una doppia dose per depositare il seme (2 milioni spz) in ciascun corno.

Le manze sembrano rispondere meglio al seme sessato, non presentando differenze significative rispetto al seme convenzionale (Kaimio et al 2013).

Flushing. Il *flushing* si effettua dopo 7-7,5 giorni dall'estro.

L'intervallo di tempo è importantissimo perché influenza il rapporto morule/blastocisti recuperate.

Può essere utile effettuare un'anestesia epidurale nella donatrice. L'epidurale servirebbe a rallentare la defecazione, a immobilizzare la coda che può essere così protetta e legata fuori dal campo di lavoro; ridurrebbe inoltre le contrazioni uterine che potrebbero interferire con le operazioni di *flushing* (Castro Neto et al 2005; Guarneri 2013).

Dopo un'accurata pulizia del perineo e delle labbra vulvari, si passa all'inserimento di un catetere da *flushing* (catetere di *Foley* a 2 o 3 vie) attraverso la cervice. Un dilatatore cervicale può essere utile a tale scopo, soprattutto negli animali giovani. Il catetere ha tipicamente una via dedicata all'ingresso di aria o soluzione salina che dilata il palloncino localizzato all'estremità del catetere, in modo che resti bloccato a circa metà del corno uterino. Sebbene alcuni professionisti credano che il posizionamento profondo del palloncino renda il *flushing* più efficace, in uno studio comparativo, il posizionamento alla base del corno uterino ha aumentato le quantità di liquido necessario per il *flushing*, ma ha migliorato le percentuali di raccolta

(Sartori et al 2003). Altri Autori posizionano il palloncino caudalmente alla biforcazione, come nella cavalla (Castro Neto et al 2005).

Una seconda via del catetere o via principale ospita un mandrino di acciaio che, nella fase di introduzione, facilita la progressione del catetere attraverso la cervice e poi nel corno uterino, guidato mediante esplorazione rettale. Durante il *flushing*, la via principale è connessa con un raccordo a due vie con il contenitore contenente il medium, posto in alto, e con il filtro posto in basso (tecnica a 3 vie o per caduta o aperta). Nella tecnica a 2 vie o chiusa, la via principale è connessa direttamente con una siringa attraverso la quale vengono iniettati 30-50 ml di medium per volta. Il medium raccolto dopo ogni lavaggio, mediante un delicato massaggio del corno uterino, viene versato in un filtro; vengono impiegati circa 300-500 ml di medium per lavare ciascun corno uterino (Guarneri 2013). Il medium generalmente utilizzato per il *flushing* è una soluzione di tampone fosfato (PBS di Dulbecco), disponibile in commercio, addizionata con l'1-2% di FCS (siero fetale di vitello) e antibiotici/antimicotici.

Molti fattori possono influenzare la percentuale di raccolta degli embrioni: il muco, l'intrappolamento in pliche endometriali, una ritardata discesa dagli ovidutti (Alvarez et al 1999; Castro Neto et al 2005). Per migliorare la raccolta di un 30%, alcuni Autori ritengono utile ripetere il *flushing* dopo 24 h (Subramaniam et al 1991) o dopo 30 minuti (Castro Neto et al 2005).

Valutazione e stoccaggio degli embrioni. I filtri, dopo il *flushing*, sono trasferiti in un laboratorio per la ricerca degli embrioni. Il laboratorio deve avere una temperatura di 18-22°C. Il contenuto dei filtri viene trasferito in una piastra di ricerca ed osservata allo stereomicroscopio per la ricerca e la valutazione degli embrioni, che va fatta a 50-100 ingrandimenti per apprezzare l'integrità della zona pellucida e la presenza di eventuali detriti cellulari adesi (Direttiva 89/556/CEE).

Gli embrioni vengono trasferiti dal medium di raccolta in un medium di mantenimento (*holding*), nel quale possono rimanere per diverse ore a temperatura ambiente o essere raffreddati e mantenuti in frigorifero per qualche giorno o congelati. Si

effettuano 10 lavaggi in *holding*; nel terzo bagno si inserisce per sicurezza sanitaria la tripsina all'1,5% (Stringfellow e Givens 2010). I ripetuti lavaggi con medium sterile sono utili per rimuovere eventuali contaminanti batterici o virali.

La valutazione degli embrioni, in accordo alle linee guida internazionali IETS, si basa su due punteggi: il codice di sviluppo da 1 a 9, il codice di qualità o grado da 1 a 4.

Le prime divisioni mitotiche dell'embrione avvengono in salpinge; dopo 4-5 giorni, allo stadio di 16 cellule, l'embrione arriva in utero; continuano le divisioni (32-64 cellule) e l'embrione viene detto morula. A 7-8 giorni si forma una piccola cavità (blastocela) e l'embrione è detto blastocisti precoce, blastocisti (7-9 gg), blastocisti espansa (8-10 gg). A 9 giorni comincia il dissolvimento della zona pellucida e la blastocisti protrude dalla breccia formando una blastocisti preimpianto (*hatching*), che ancora si espande nei giorni successivi. I codici di sviluppo degli embrioni prelevati sono 4 (morula compatta), 5 (blastocisti precoce), 6 (blastocisti) e 7 (blastocisti espansa). Gli embrioni di stadio inferiore a 4 sono immaturi o il loro sviluppo si è arrestato e sono generalmente considerati degenerati e non

trasferibili.

Un embrione di buona qualità deve avere dimensioni di almeno 150 micron, forma regolare e sferica (quelli ovali sono degenerati); i blastomeri devono essere simili, la tessitura omogenea, il colore né troppo chiaro né troppo scuro e non devono esserci vescicole o cellule estruse; lo spazio perivitellino deve essere vuoto e la zona pellucida deve essere integra, sferica, non raggrinzita o collassata. In particolare una morula deve possedere una superficie bozzellata (*sculpture*) ed un aspetto compatto (Stringfellow e Givens 2010).

Il grado 1 o eccellente è dato ad un embrione con massa embrionale simmetrica e sferica, con i singoli blastomeri di uguale dimensione, colore e densità. Le imperfezioni devono essere minime e almeno l'85% deve corrispondere alla massa embrionale vitale e intatta. Cioè, è ammesso che un 15% di cellule sia estruso nello spazio perivitellino. La zona pellucida deve essere inoltre liscia e intatta, priva di zone concave o piatte che farebbero aderire l'embrione alla piastra o alla *paillette*. Gli embrioni con zona pellucida non integra non garantiscono le condizioni sanitarie minime e, come tali, non possono essere

commercializzati negli scambi internazionali.

Il grado 2 o discreto è dato ad un embrione con minime imperfezioni ma che possiede almeno il 50% della massa embrionale intatto e non estruso nello spazio perivitellino.

Il grado 3 o scarso si dà se solo il 25% dell'embrione è intatto.

Il grado 4 (morto o degenerato) si dà quando la massa embrionaria è in degenerazione o per gli ovociti non fecondati o embrioni di 1 cellula. Generalmente, solo gli embrioni di grado 1 sono commercializzati (Stringfellow e Givens 2010).

Una volta valutati, gli embrioni possono essere confezionati e trapiantati a fresco, oppure possono essere congelati.

Il criocongelamento offre numerosi vantaggi: consente di conservare il materiale genetico per tempi illimitati, facilita lo scambio commerciale di embrioni a distanza, annulla la trasmissione di malattie infettive, evita di preparare le riceventi parallelamente alle donatrici. L'unico svantaggio è un lieve calo della percentuale di attecchimento, rispetto agli embrioni trapiantati a fresco.

Per convenzione internazionale, si possono congelare solo

embrioni di almeno 7 giorni, ma generalmente si cerca di congelare morule di grado 1.

Il criocongelamento può essere lento ($0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) o rapido ($200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ detto vitrificazione). L'embrione deve subire una serie di processi osmotici che portano alla sostituzione dell'acqua con il crioprotettore, senza che si formino cristalli, responsabili della rottura delle membrane cellulari.

I crioprotettori più usati sono alcoli come il glicerolo (1,5-1,6M) (utilizzate *paillette cristal 133* trasparenti) ed il glicole etilenico (1,4 M) (utilizzate *paillette cristal 133* gialle). Entrambi possono essere associati ad uno zucchero crioprotettore che è il saccarosio, al quale l'embrione è assolutamente non permeabile, ma la sua presenza ne migliora la disidratazione. Il crioprotettore deve essere solubile in acqua, deve abbassare il punto crioscopico favorendo la disidratazione e deve essere poco tossico. Il glicole è più tossico e l'embrione dovrebbe essere esposto per un minimo di 3' (tempo di equilibrio) e un massimo di 5-10', secondo la temperatura del laboratorio. Tuttavia, per il suo basso peso molecolare, passa velocemente attraverso la zona pellucida e questo consente un congelamento/scongelo

molto rapido. Il glicerolo è meno tossico, richiede almeno 10' di esposizione o più se la temperatura ambiente è bassa, ma l'embrione può sostare anche per 15-30'. Il glicerolo avendo un peso molecolare maggiore, a differenza del glicole, passa lentamente attraverso la zona pellucida. Il glicole è sempre più usato perché fornisce *paillettes ready to use*, che allo scongelamento non richiedono ulteriori passaggi.

Il sistema di chiusura delle *paillettes* prevede, in genere, un *jonc*, dove va riportato il codice del gruppo di raccolta, la data di congelamento, il toro, la donatrice, lo stadio e la qualità dell'embrione (Stringfellow e Givens 2010).

In genere si fanno 5 colonne separate da 4 bolle d'aria così composte: *thawing* + glicole + glicole ed embrione + glicole + *thawing*. Al posto del *thawing* (soluzione di scongelamento, economica, prodotta dall'IMV) può essere utilizzato l'*holding*, oppure anche il glicole. Mettendo il glicole si può prolungare il tempo di permanenza nella camera del criocongelatore, stabilizzata ad una temperatura tra i -5°C e i -7°C, perché a queste temperature non congela, consentendo di lavorare anche gruppi numerosi di embrioni. Tendenzialmente il glicole è

proinfiammatorio nell'utero della ricevente, ma le quantità così piccole non danno differenze significative se confrontate con il *thawing* o l'*holding*. Con il glicerolo si fanno 3 colonne tutte di glicerolo con al centro l'embrione.

Un passaggio importante è il *seeding* che si realizza dopo meno di 1'. Il *seeding*, letteralmente mettere il seme, è l'innescò della cristallizzazione ottenuto mediante contatto tra una colonna della *paillette* con uno strumento sottile impregnato di azoto liquido. Il *seeding* innesca la cristallizzazione dell'acqua extracellulare, l'ambiente extracellulare diventa iperosmotico e ciò favorisce la disidratazione dell'embrione (Liebermann et al 2003).

Nel congelamento lento, la velocità ideale di discesa della temperatura è di $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sebbene non ci siano differenze significative con velocità tra -0.1 e $-0.8^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Si calcola che a -22°C la disidratazione si sia completata e l'embrione possa essere immerso in azoto liquido, sebbene le curve di congelamento si fermino a $-32/35^{\circ}\text{C}$, detta *plunge temperature*. Il tempo totale, tra raccolta e congelamento, deve essere da 1 a 3 ore, con una perdita di 10 punti percentuali ogni due ore in più.

La tecnica di scongelamento prevede, nel caso del glicole (*one step*), che la *paillette* sia lasciata 7'' all'aria ruotandola, quindi a bagnomaria a 37°C per 20-30''. Per il glicerolo è invece necessario effettuare 4 passaggi (*multistep*) in soluzioni decrescenti di glicerolo.

Trapianto embrionale nelle riceventi. Negli ultimi decenni la tecnica di trasferimento degli embrioni non ha subito grosse modifiche e innovazioni. La percentuale di attecchimento degli embrioni è generalmente di circa il 40% (Nabenishi et al 2018). Il motivo di questa percentuale relativamente bassa va ricercata in cause materne (sincronizzazione non ottimale, ambiente uterino non idoneo, livelli di progesterone insufficienti), cause tecniche legate al congelamento ed allo scongelamento e cause embrionali legate in genere a fattori genetici che causano una morte precoce dell'embrione. Un recente studio realizzato in bovine da carne, che spesso hanno un temperamento eccitabile e poco si prestano alle manipolazioni tipiche del trasferimento embrionale, ha dimostrato che la somministrazione di flunixin meglumine subito dopo il

trasferimento embrionale migliora la *pregnancy rate*, probabilmente per inibizione della sintesi di PGF2alpha (Kasimanickam et al 2018). L'uso di GnRH al 5° giorno in bovine riceventi causa un aumento della vascolarizzazione del corpo luteo, ma non un aumento della *pregnancy rate* (Kanazawa et al 2017). L'uso di progesterone (CIDR) postimpianto non influenza la *pregnancy rate*, ma migliora la sincronizzazione dei calori nelle riceventi vuote, che possono più facilmente essere fecondate o ritrapiantate (Purcell et al 2005; Monteiro et al 2009).

Un'altra innovazione nell'ambito della buiatria e dell'ET degli ultimi anni è l'utilizzo dell'ecografia *Doppler* per la misurazione della vascolarizzazione del corpo luteo. La vascolarizzazione consente infatti di predire il successo del trapianto già a 7 giorni ossia prima di effettuarlo, permettendo di escludere le bovine riceventi con un corpo luteo anche grande ma con insufficiente vascolarizzazione (Kanazawa et al 2016). Il *Doppler* consente anche di effettuare una diagnosi di non gravidanza a 21 giorni e persino a 14 giorni e di rimettere in riproduzione le bovine riceventi rimaste vuote, che altrimenti

verrebbero diagnosticate tali dopo circa 30-40 giorni, al tempo della diagnosi clinica di gravidanza (Utt et al 2009; Guimaraes et al 2015; Kanazawa et al 2016).

Bovina Modicana. La razza Modicana è una razza bovina minore italiana a limitata diffusione, è autoctona della Sicilia e ha un'attitudine prevalentemente per il latte. Originaria dell'antica Contea di Modica, che si identifica con l'attuale provincia di Ragusa, si è in breve tempo diffusa in diverse parti della Sicilia, arrivando anche in Sardegna. Qui, agli inizi del 1900, grazie alla sua rustica frugalità e attitudine al lavoro, è stata incrociata con delle razze autoctone, dando così vita alla razza Sardo-Modicana. Il dibattito sul suo arrivo nell'isola sicula è ancora irrisolto: secondo alcuni è giunta dal Mediterraneo, secondo altri dall'Europa continentale, al seguito di Normanni e Angioini. Quando nel 1985 è stato istituito il Registro Anagrafico delle Popolazioni Bovine Autoctone e Gruppi Etnici a limitata diffusione, la razza Modicana è stata identificata come una delle razze da salvaguardare. Dagli anni '60 si è registrato un calo drastico dei capi: dai 25000 di allora si è passati a circa 1800 di

oggi, che diventano 650 se si prendono in considerazione soltanto gli animali allevati nella culla di origine. Le cause della diminuzione del numero di questi esemplari sono da ricercare principalmente nell'introduzione dei mezzi meccanici, ma anche nella scarsa resa sia del latte che al macello.

La razza Modicana si riconosce per taglia e statura modesta, scheletro solido e forma angolosa. Il mantello è di colore uniforme rosso scuro, con sfumature sul nero nei tori, mentre nelle vacche tendenti al fromentino chiaro. Il colore nero sfumato si presenta prevalentemente nella parte anteriore e sulla faccia esterna delle cosce, mentre sono rigorosamente neri gli unghioni e il fiocco della coda. Le corna sono giallastre alla base, ma nere sulla punta. Il musello, invece, si presenta rosso scuro, le narici nero ardesia. La mammella è grande con i capezzoli lunghi, grossi e spesso disarmonici. Il maschio può arrivare a 160 cm al garrese per un peso di 900–1000 kg, mentre la femmina solitamente arriva ai 145 cm al garrese per un peso di 550–600 kg. Estremamente rustica, riesce a sopravvivere alle torride estati mediterranee, alimentandosi prevalentemente al pascolo, con un'integrazione in stalla nei periodi in cui questo scarseggia. La

razza Modicana si presenta come una razza a triplice attitudine. Si rilevano ottime caratteristiche per il lavoro, grazie agli arti e agli unghioni molto forti. La produzione di latte oscilla fra i 18 e i 22 kg al giorno in una lattazione di 200-220 giorni; il latte ha una percentuale di grasso di circa il 4% e da esso vengono prodotti formaggi tipici siciliani come il Ragusano DOP. La carne ha alta qualità e salubrità, grazie all'allevamento completamente brado, ma la sua commercializzazione non riscontra grande successo poiché risulta più difficile da trattare se non si individua il grado esatto di frollatura.

Fin dal 1994 l'Istituto Sperimentale Zootecnico per la Sicilia si è attivato per la conservazione e lo studio del germoplasma della razza Modicana; sono state prelevate 12000 dosi di seme che sono custodite presso il Centro Italiano Zootecnico (CIZ) e a disposizione degli allevatori tramite l'AIA.

Il 18 Gennaio 2018 è stato approvato, dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, il progetto “DUAL BREEDING” (*le razze bovine a duplice attitudine: un modello alternativo di zootecnia eco-sostenibile*), proposto dall'ANAPRI. Tale progetto è finalizzato alla caratterizzazione delle risorse

genetiche animali di interesse zootecnico e alla salvaguardia della biodiversità. Uno dei punti chiave è rappresentato dalla conservazione delle razze autoctone a limitata diffusione mediante un programma di raccolta di materiale biologico e germoplasma che si articola in: mantenimento/creazione banche del seme, riproduzione di specifici ceppi a rischio e produzione del seme in loco o presso centro tori. Il programma è attualmente in corso e prevede il congelamento di dosi di seme di almeno 6 tori Modicani.



Fig. 3. Toro di razza Modicana.

Sono stati realizzati studi relativi alla qualità del latte delle vacche Modicane. È stato dimostrato che diversi fattori, quali l'alimentazione e la razza, possono influenzare la percentuale di antiossidanti liposolubili nel latte (Marino et al 2012). Uno studio

sull'assetto cromosomico degli spermatozoi post scongelamento, ha evidenziato che il corredo cromosomico della razza Modicana, rispetto ad altre razze lattifere quali Bruna e Frisona, presenta una percentuale più alta di aneuploidia (Pauciullo et al 2012). A seguire, alcuni studi sul genoma della Modicana (Mastrangelo et al 2014; 2016; 2018) hanno confermato la presenza di un recente aumento di consanguineità in questa razza, indicando una sofferenza demografica importante.

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio è stato l'applicazione della tecnica MOET nella razza Modicana ottimizzando un protocollo basato sull'uso di FSH/LH (Pluset, Bio 98), con lo scopo ultimo di valorizzare/preservare questa razza a limitata diffusione genetica.

MATERIALI E METODI

Sono state selezionate bovine di razza Modicana presso un'unica azienda di Ragusa (Azienda Mezzasalma, IT009RG292), caratterizzata da ottimi livelli di *management*, indenne da malattie infettive abortigene, ad eccezione di una

sieroprevalenza di rinotraicheite infettiva del 5%.



Fig. 4. Alcuni capi dell'Azienda Mezzasalma, Ragusa.

I criteri di selezione delle donatrici sono stati: età 4-5 anni, 90-200 giorni *post partum*, BCS di circa 3.5, assenza di malattie soprattutto a carico dell'apparato genitale, ciclicità regolare.

I criteri di selezione delle riceventi sono stati: età di almeno 18 mesi, nullipare, BCS di almeno 3.5, assenza di malattie soprattutto a carico dell'apparato genitale, ciclicità regolare.

Lo studio è stato effettuato nel Settembre 2017-Giugno 2018.

Ciascuna donatrice veniva visitata 10 giorni dopo un calore manifesto. Si escludevano nuovamente alterazioni del tratto genitale esterno e interno. Ecograficamente (Draminski, 4vet mini, sonda lineare endocavitaria 7 MHz) veniva esclusa la presenza di liquido in utero. Si studiava anche la conformazione

dei corni per la scelta successiva del catetere da utilizzare per il *flushing* in termini di lunghezza e diametro. A carico delle ovaie si valutava la presenza di un corpo luteo fisiologico. Con l'ecografo, venivano contati sul monitor i follicoli antrali di 2-3 mm per avere una stima della risposta superovulatoria. Se erano presenti 1 o 2 follicoli dominanti, questi venivano aspirati con una siringa aspiracisti.

Dopo 2 giorni veniva iniziato il protocollo di superovulazione da giorno 12 a giorno 16, con 9 somministrazioni decrescenti di FSH (Pluset, Bio98), per raggiungere una dose totale di 500 UI (gruppo sperimentale) o di 1000 UI (gruppo controllo). Il giorno 15 si effettuava una doppia somministrazione di cloprostenolo (Estrumate, MSD Animal Health) distanziate di 12h in concomitanza delle punture di FSH del 4° giorno, per indurre un calore la mattina del giorno 17.

Si effettuavano in totale 3 fecondazioni con seme congelato di tipo convenzionale, di cui la prima 12h dopo la comparsa del calore e a seguire la seconda dopo 6-8h e la terza dopo altre 6-8h.

Dopo 7-7,5 giorni dalla prima fecondazione si effettuava il *flushing*, preceduto o seguito da una valutazione ecografica delle

ovaie per stimare il numero di corpi lutei.

Parallelamente venivano preparate le riceventi attraverso una prostaglandina alla cieca effettuata giorno 14 (un giorno prima della donatrice), per far andare le manze (cicli a 3 ondate follicolari) in calore giorno 17, lo stesso giorno della donatrice. Le riceventi che non mostravano il calore venivano escluse. Eventuali altre riceventi in calore spontaneo giorno 17 venivano aggiunte al gruppo. Poco prima o subito dopo il *flushing* le riceventi venivano visitate attentamente. Si attenzionavano le dimensioni dell'utero, la presenza di eventuali fluidi patologici nel lume, le dimensioni della cervice, la presenza del corpo luteo e la sua qualità (dimensione, consistenza). Le manze senza corpo luteo venivano escluse.

Veniva annotato con un tampone colorato il lato dell'ovaia contenente il corpo luteo, al fine di facilitare le successive operazioni di trapianto.

	DONATRICE	RICEVENTI
Giorno 0	Calore rilevato	
Giorno 10	Verificare presenza CL + conta follicoli di 2-3 mm + aspirazione follicoli dominanti >8 mm	
Giorno 12	FSH ore 7 - 3,5 ml im FSH ore 19 - 3 ml im	
Giorno 13	FSH ore 7 - 2,5 ml im FSH ore 19 - 2,5 ml im	
Giorno 14	FSH ore 7 - 2 ml im FSH ore 19 - 2 ml im	2,5 ml PG
Giorno 15	FSH ore 7 - 1,5 ml im+ 3,5 ml PG im FSH ore 19 - 1,5 ml im + 3,5 ml PG im	
Giorno 16	FSH ore 7 - 1,5 ml im	
Giorno 17	Calore previsto mattina 12h dopo 1° FA	Calore riceventi
Giorno 18	8h dopo 2° FA 8h dopo 3° FA	
Giorno 23	Valutazione numero CL	
Giorno 24	Pomeriggio – <i>flushing</i>	Controllo CL e trapianto

Tab 1. Protocollo della MOET in donatrici e riceventi.

Per il *flushing*, la donatrice veniva posta in un travaglio in piano o leggermente inclinato verso l'operatore, in un ambiente tranquillo privo di stress, al fine di facilitare la manipolazione

della stessa. La lettiera veniva mantenuta pulita ed una pedana era in genere posizionata per mantenere più sollevato l'operatore e staccato dalla lettiera. Se il posteriore della bovina era imbrattato di feci, si procedeva ad una pulizia preliminare con acqua tiepida.

Preliminarmente si riscaldava a bagnomaria almeno 1l di soluzione tampone di lavaggio, avendo cura, una volta estratto dal bagnomaria, di asciugare con carta assorbente le pareti esterne e di non contaminare il sito di prelievo della soluzione.

Si preparava il catetere più appropriato, inserendo il mandrino conforme alla misura del catetere, precedentemente lavato con passaggio a 2 step: isobetadine/alcol – soluzione fisiologica sterile. Il catetere veniva poi rivestito con una guaina trasparente morbida per FA e riposto in un guanto da esplorazione rettale, per essere trasportato sul sito del *flushing*.

Alla donatrice, veniva effettuata un'epidurale con 7,5 ml/animale di procaina/adrenalina (Aticain, Ati), previa tricotomia e scrub (alcol e isobetadine). Si utilizzava un ago rosa 18 G inserito a 45° nel I spazio intercoccigeo (C1-C2). Lo spazio intervertebrale era individuato effettuando dei movimenti

dorsoventrali della coda e palpando contestualmente un'area di depressione tra le rispettive vertebre (dove la coda sollevata sembra che si spezzi). Per essere certi di trovarsi nello spazio epidurale (oltre alla minima resistenza all'inoculazione), una goccia di lidocaina era posizionata sull'ago e aspirata dalla pressione negativa presente nel canale. Se condotta correttamente, si accertava la paralisi della coda dopo 1,5 minuti circa.

L'operatore, a questo punto, si posizionava sulla pedana e, con il braccio protetto da un guanto da esplorazione rettale, svuotava l'ampolla rettale e prendeva contatto con la cervice e le corna uterine. Grazie all'aiuto operatore, si realizzava una pulizia accurata del perineo e delle labbra vulvari, con passaggi alternati di acqua tiepida e isobetadine, avendo cura di rimuovere la totalità di isobetadine con un ultimo passaggio di acqua; quindi si terminava con un'accurata asciugatura dello sfintere anale, della vulva e del perineo, con carta assorbente effettuando singoli passaggi per ogni strappo.

Si dilatavano le labbra vulvari e si inseriva un catetere (IMV o Bioniche) a 2 vie, con un mandrino interno che lo rendeva

rigido, protetto da una camicia sanitaria a bustina (IMV). La camicia sanitaria si rompeva all'entrata della cervice e, una volta entrato il catetere in utero, si estraeva del tutto. Se la cervice era particolarmente difficile da attraversare, veniva dilatata con uno specifico dilatatore in acciaio. Si portava il catetere a circa metà del corno, quindi si estraeva il mandrino gradualmente con movimenti rotatori, cercando di far fare ancora al catetere qualche centimetro per seguire l'andamento curvilineo del corno uterino. Il mandrino estratto veniva posizionato in un guanto da esplorazione con qualche ml di tampone, per mantenerlo pulito, in caso di riutilizzo.

Un assistente innestava alla valvola di gonfiaggio del palloncino una siringa vuota, della capacità di 20 ml circa (con stantuffo tirato indietro fino a 15 ml), insufflando gradualmente 5 ml di aria per volta e, contemporaneamente, l'operatore monitorava il grado di insufflazione per via trans-rettale. L'obiettivo era quello di ottenere una dilatazione tale da garantire la perfetta adesione del palloncino con le pareti del corno uterino; pertanto tirando indietro il catetere si verificava che questo era ben aderente e che non tendeva a retrocedere; nel caso in cui

questo indietreggiava si procedeva con l'insufflazione di 1-2 ml di aria fino all'ottenimento di una perfetta adesione. La via del palloncino, se non provvista di valvola, veniva chiusa con una pinza atraumatica (in genere protetta da due tubicini di gomma per non danneggiare il catetere).

Attraverso la via principale (quella del mandrino) si collegava una siringa da 50 ml riempita dall'aiuto operatore con tampone preriscaldato (*Embryo flush*) e si effettuava il primo lavaggio, seguito dal primo recupero. L'instillazione era delicata mentre il recupero era energico, al fine di liberare gli embrioni intrappolati nel muco. In genere, il primo lavaggio non consentiva di recuperare molto liquido, in quanto questo si distribuiva nel corno; tuttavia in un buon *flushing*, per ogni lavaggio, la quantità di liquido instillata doveva essere recuperata. La fase di instillazione e scarico del fluido di lavaggio veniva attentamente monitorata dall'operatore, in modo tale da garantire un'espansione costante dell'intero corno, durante il riempimento; non appena il corno era sufficientemente teso e tonico alla palpazione, si procedeva con il recupero del liquido di lavaggio. Il recupero era facilitato dal massaggio del

corno dall'apice alla base, prendendo come punto di riferimento la posizione del palloncino insufflato. Il ripristino di una consistenza flaccida del corno indicava che il corno era sufficientemente svuotato. Si effettuavano 8-10 lavaggi (max 500 ml per corno) avendo cura, quando si sostituiva la siringa, di sigillare a monte il catetere con la pinza atraumatica. Per velocizzare la procedura, l'aiuto operatore preparava 3-4 siringhe che ciclicamente svuotava nel filtro e riempiva nuovamente col tampone. Il liquido di raccolta veniva messo in un filtro conico per embrioni, poggiando l'apice della siringa sulla parete per non creare schiuma. Il filtro conteneva già 1 cm circa di tampone di raccolta, non doveva mai andare a secco mentre, se troppo pieno, doveva essere svuotato da sotto dall'apposita valvola.

Si procedeva al lavaggio prima in un corno poi nell'altro. Per estrarre il catetere si sgonfiava il palloncino, si collegava la via principale con una siringa da 50 ml e si estraeva il catetere aspirando con la siringa il liquido residuo (sporco di muco), che veniva poi raccolto e osservato separatamente dal contenuto del filtro. Il catetere, se imbrattato di muco, veniva lavato con tampone e rimontato con mandrino e camicia sanitaria.



Fig. 5. Realizzazione del *flushing* in una bovina Modicana.

Terminate le operazioni, la donatrice veniva lasciata nel travaglio, per essere sottoposta ad un'eventuale nuovo *flushing* in caso di nessun recupero di embrioni; viceversa veniva trattata con prostaglandina.

Il filtro con il liquido di raccolta, proveniente dal lavaggio di entrambi i corni, veniva poi trasportato in laboratorio per la ricerca e la classificazione degli embrioni.

Il laboratorio veniva allestito in un ambiente adiacente al luogo del *flushing* e al suo interno era mantenuta una temperatura di 20-22°C, verificata con un termometro ambientale. Ciò, soprattutto nei mesi freddi, richiedeva l'utilizzo di un sistema di riscaldamento. Il laboratorio era fornito di uno

stereomicroscopio, una piastra riscaldante a 37°C su cui venivano poste piastre, capsule, liquidi di lavaggio, puntali e di un criocongelatore.

Il filtro conico veniva aperto e le pareti lavate con PBS mediante una siringa sterile, quindi il liquido di lavaggio veniva scaricato su una piastra di ricerca grigliata quadrata.

Dopo un periodo d'attesa necessario alla sedimentazione degli embrioni, si procedeva con l'osservazione diretta dell'intera piastra, soffermandosi su ciascun campo della stessa. Al fine di facilitare la ricerca, frustoli di muco e bolle d'aria erano eliminati con l'ausilio di una siringa sterile.

Le piastre si osservavano allo stereomicroscopio, l'ingrandimento ottimale è quello che consente di inquadrare un quadrato sotto il campo. Lo stereomicroscopio (Optika SZM2) era stato adattato all'uso con l'utilizzo di luce fredda a LED ed un sistema di riflessione della luce, realizzato con uno specchietto inclinato a 45°. Ciò consentiva di vedere gli embrioni scuri e leggermente tridimensionali.

Gli embrioni venivano raccolti con una pipetta automatica (10-20 microlitri) e trasferiti in capsule preriscaldate contenenti il

medium di mantenimento o *holding* (IMV). Gli embrioni venivano lavati 10 volte, ma non venivano tenuti più di 30-45' in *holding* per evitare l'evaporazione.

La classificazione veniva effettuata impostando lo stereomicroscopio al massimo ingrandimento e consisteva nell'assegnazione di un punteggio allo stadio di sviluppo (S) e al grado di qualità (G), secondo le linee guida IETS.

Gli embrioni di grado 4 venivano scartati e processati per la ricerca di agenti patogeni, invece gli embrioni di ottima qualità (4.1 o 5.1) di preferenza erano avviati al processo di congelamento e stoccaggio in azoto liquido. I restanti venivano preferibilmente trasferiti a fresco.

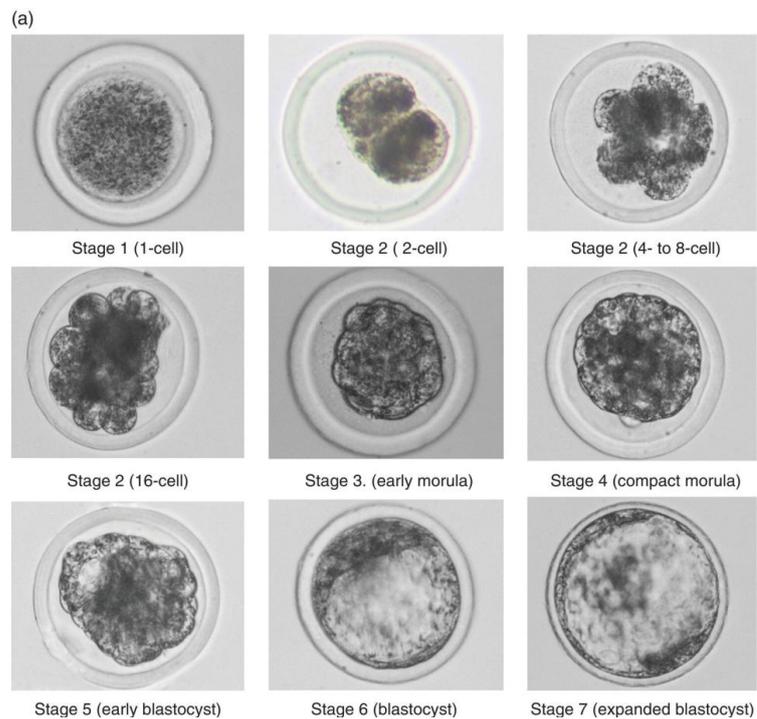


Fig. 6. Differenti stadi di sviluppo degli embrioni: **S1** ovocita/embrione non fertilizzato, **S2** morula 2-16 cellule, **S3** giovane morula, **S4** morula, **S5** giovane blastocisti, **S6** blastocisti, **S7** blastocisti espansa.

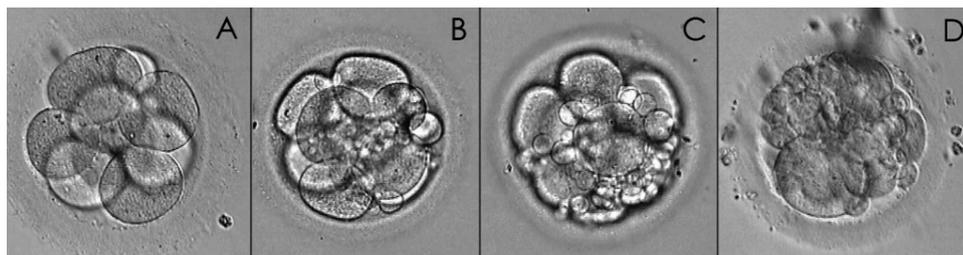


Fig. 7. Differenti gradi di qualità degli embrioni: **A** eccellente, massa embrionaria compatta con blastomeri distinti, uniformi e con uguale densità; si ammette un 15% di cellule estruse nello spazio perivitellino. La zona pellucida intatta e regolare; **B** discreto, imperfezioni minime con il 50% della massa embrionale non estrusa; **C** scarso, solo il 25% della massa embrionale è intatta; **D** degenerato o ovociti non fecondati, massa embrionaria degenerata o embrioni a 1 sola cellula.



Fig. 8. Sopra, il filtro per il liquido raccolto mediante flushing. Sotto, visualizzazione allo stereomicroscopio di diversi campi, ad ingrandimento ottimale, riportanti numerosi embrioni.



Fig. 9. Congelamento degli embrioni.

Gli embrioni da trapiantare a fresco venivano prontamente confezionati in *paillettes* trasparenti, per convenzione internazionale. Con apposito aspirapaillette (IMV) si creava una prima colonna di *holding*, poi una bolla d'aria, una seconda colonna di *holding* contenente l'embrione, una bolla d'aria ed infine una terza colonna contenente *holding*.

Gli embrioni migliori venivano invece processati per il congelamento. Per prima cosa si avviava il criocongelatore (Cryogenesis CL 8000) impostando un programma idoneo. Dopo aver introdotto l'azoto liquido nel bagno del congelatore, avendo cura di riempirlo fino a tre quarti della capienza dello stesso, si

procedeva con l'immersione molto lenta della camera. La temperatura della camera scendeva rapidamente per stabilizzarsi a -7°C .

A questo punto si trasferivano gli embrioni dall'*holding* al glicole, facendo attenzione a trasportare una quantità minima di holding (2-3 μl). A temperatura ambiente (TA) gli embrioni non dovevano superare un tempo di esposizione al glicole di 4-6 min. Se $\text{TA} < 20^{\circ}\text{C}$, il tempo di esposizione poteva essere esteso a 5-10 min. Questi passaggi venivano effettuati sotto il controllo di un timer.

Considerando i tempi così stretti, il confezionamento degli embrioni cominciava subito dopo e non venivano processati più di 5-6 embrioni per volta, lasciando eventuali altri nell'*holding*.

Il confezionamento avveniva, per convenzione internazionale, in *paillettes* (gialle) da 0,25 ml, mediante aspirazione di colonne di *holding* o *thawing*, aria, glicole, aria, glicole con l'embrione, aria, glicole, *holding* o *thawing*. Ogni *paillette* veniva chiusa con il *jonc* precompilato e posta in un portapenne al contrario con il *jonc* verso il basso (in modo da far salire l'embrione nella colonna centrale).

Nel caso in cui gli embrioni sottoposti a congelamento erano più di 5, si procedeva al trasferimento degli embrioni, così confezionati e posti al contrario, a temperatura di refrigerazione (4°C) passando a confezionare un secondo o terzo gruppo. Tutti i gruppi venivano raccolti nel portapenne, avendo cura di asciugare l'eventuale condensa creata sulle pareti delle *paillettes* messe in frigo.

Se il numero di *paillettes* lo consentiva, prima di caricare la camera del criocongelatore, allo stereomicroscopio si verificava la posizione degli embrioni nella colonna centrale e, se necessario, si spostava l'embrione dai menischi, dando dei colpetti dal lato opposto. Se l'embrione rimaneva troppo alto, il *seeding* poteva essere comunque fatto in basso.

In caso di numerose *paillettes*, una volta messe al contrario, si presupponeva che, dopo averle caricate nella camera in posizione normale (*jonc* in alto), l'embrione cadesse dalla parte superiore alla parte centrale o bassa della colonna centrale, senza tuttavia raggiungere il menisco della stessa.

Questi accorgimenti erano necessari per evitare il contatto dell'embrione con i menischi (aria) e per effettuare il *seeding*

nella posizione più lontana dall'embrione.

Le *paillettes* venivano caricate in camera con i *jonc* in alto, e, dopo circa 1-2 minuti, si procedeva con il *seeding*. Questo veniva effettuato con un supporto in acciaio inox a punta fine o con l'ausilio di un *cotton fioc*. La sede del *seeding* era la colonna dell'*holding* più alta (sotto il *jonc*) o, eventualmente, quella più lontana rispetto alla posizione dell'embrione.

Sollevando le *paillettes*, una per volta, dal *jonc* e posizionando una luce dietro, si toccava la colonna dell'*holding* per circa 3 secondi, con il mandrino in acciaio stazionato qualche secondo in azoto liquido, fino a visualizzare una zona di cristallizzazione a becco di clarino della lunghezza di circa 5 mm.

Completato il *seeding*, si attendevano 3-5 minuti e si risollevarono, una alla volta, le *paillettes* per verificare che il *seeding* avesse avviato la cristallizzazione; in caso contrario, si ripeteva il *seeding*. Gli embrioni stavano così alla temperatura (T) di *seeding* per minimo 5', mantenendo il programma di congelamento in pausa (tasto *Hold*). Solo dopo aver completato l'operazione e quindi sempre dopo 5-10', si avviava il

programma (tasto *Run*).

Il programma di congelamento aveva una curva di discesa della temperatura di 0,3°C/min fino al raggiungimento di una temperatura pari a -32°C. In base alla temperatura ambiente (TA), era spesso necessario aggiungere dell'azoto liquido nella camera, avendo cura di non bagnare internamente gli alloggi delle *paillettes*.

Dopo aver raggiunto la temperatura finale, si attendevano ancora 5-10 minuti, quindi si estraevano le *paillettes* e si immergevano in un ampio *dewar* o un contenitore di polistirolo con azoto liquido (-196°C). Dopo stabilizzazione della temperatura, si inserivano negli appositi contenitori (cani o globet) del bidone criogenico.

La tecnica di scongelamento prevedeva: estrazione della *paillette*, asciugatura, permanenza all'aria per 10'' con leggera rotazione, immersione in acqua a 25°C per 15''.

La *paillette*, sia confezionata a fresco che congelata e scongelata, veniva caricata su una *pistolette* da embrioni (più lunga e più sottile rispetto a quelle da FA). Veniva impiegata una guaina da embrioni (IMV) e il tutto rivestito con una camicia

sanitaria.

Gli embrioni venivano trasferiti in manze Modicane, preventivamente selezionate in base alla qualità del corpo luteo (dimensione ed ecogenicità). La tecnica del trapianto era sovrapponibile a quella della FA, ma l'embrione veniva deposto distalmente sul corno omolaterale al corpo luteo. L'epidurale agevolava le manipolazioni sulle riceventi. Un dilatacervice metallico era impiegato nelle manze con cervice più stretta. L'igiene era massimizzata con una buona pulizia del perineo e, come detto, dall'utilizzo della camicia sanitaria.

I dati ricavati da questo studio venivano riportati come media e deviazione standard. Un test esatto di Fisher veniva impiegato per confrontare i due gruppi (1000 UI e 500 UI di FSH). La significatività veniva fissata al 5%.

RISULTATI

Ad oggi sono stati realizzati n. 15 *flushing* in 15 bovine, di cui n. 9, impiegando per la superovulazione, una dose totale di

500 UI (gruppo sperimentale) e n. 6, impiegando 1000 UI (gruppo controllo).

Attraverso un esame ecografico, venivano contati i follicoli antrali di 2-3 mm all'emergenza della seconda ondata follicolare (giorno 12) e questi risultavano in numero di 14 ± 6 e 15 ± 5 ($p>0,05$), rispettivamente nei gruppi sperimentale e controllo.

Il giorno prima del *flushing*, l'esame ecografico veniva ripetuto per valutare il numero di corpi lutei, che risultavano 12 ± 3 nel gruppo sperimentale e 2 ± 1 nel gruppo controllo ($p=0,04$). Nel gruppo controllo venivano invece riscontrati diversi follicoli cistici, ad entrambe le ovaie, e solo 1 o 2 strutture luteiniche. L'utero presentava, inoltre, un contenuto mucoso che interferiva con le procedure di *flushing*.

Infatti nessun embrione veniva recuperato nel gruppo controllo. Il dosaggio "tradizionale" veniva pertanto abbandonato per una mancata disponibilità del proprietario.

Nel gruppo sperimentale, veniva raccolto un totale di 70 embrioni, di cui 53 trasferibili (76%). Di questi, n. 18 sono stati trasferiti come freschi e n. 35 sono stati congelati.

Il numero di embrioni recuperati e trasferibili per vacca era di 10 ± 1 e 8 ± 1 . Un'ottima correlazione lineare ($R^2=0,92$) si poteva ricavare dal confronto tra numero di follicoli, corpi lutei, embrioni recuperati ed embrioni trasferibili, come evidenziabile dal grafico 1.

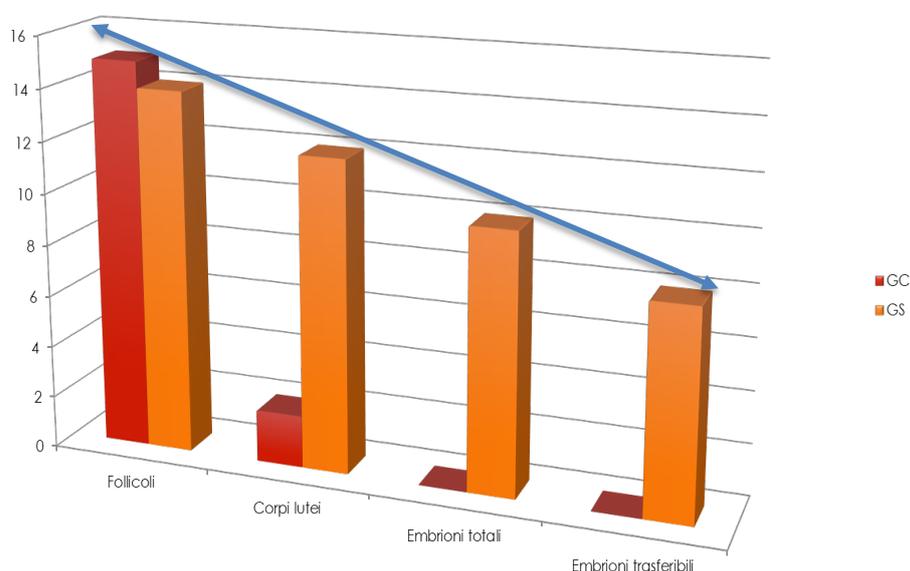
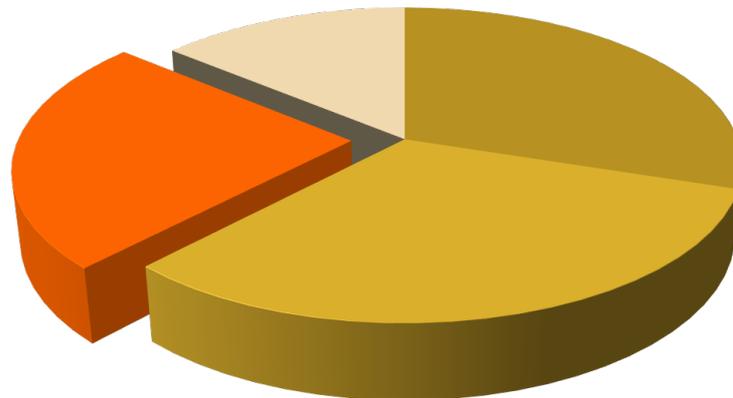


Grafico 1. Correlazione lineare tra follicoli antrali, corpi lutei, embrioni totali ed embrioni trasferibili rispettivamente nel gruppo controllo (GC) e nel gruppo sperimentale (GS).

Le blastocisti di primo grado (6.1) e le morule (4.1) erano gli embrioni più rappresentati (30 e 32%). Gli embrioni non trasferibili (24%) erano rappresentati principalmente da ovociti non fecondati (70%).



■ Blastocisti 6.1 ■ Morule 4.1 ■ Non trasferibili ■ Altri

Grafico 2. Classificazione degli embrioni raccolti e ripartizione percentuale.

I tassi di gravidanza (42 giorni) delle riceventi erano del 50% per quelle trapiantate con embrioni freschi e del 48% per quelle trapiantate con embrioni congelati ($p = 1$).

DISCUSSIONI

Questo studio ha inteso mettere a punto e aggiornare, alla luce della recente letteratura, la tecnica della MOET nella bovina di razza Modicana.

La razza è, tra l'altro, caratterizzata da un impoverimento genetico importante (Pauciullo et al 2012; Mastrangelo et al 2014; 2016; 2018) che rende indispensabili programmi di recupero e conservazione del germoplasma.

Ancora oggi, l'unico seme congelato disponibile è quello immagazzinato nel 1994 dall'Istituto Sperimentale Zootecnico per la Sicilia, quindi un seme vecchio di 24 anni. Molte aziende, di conseguenza, utilizzano il toro aziendale incrementando ulteriormente i livelli di consanguineità.

I primi *embryo transfer* nella razza Modicana risalgono a qualche decennio fa ed erano basati sull'impiego di *Pluset* a dosaggio tradizionale e di glicerolo come crioprotettore. I risultati riferiti aneddoticamente non furono soddisfacenti (Lo Magno comm pers).

Grazie ad un progetto regionale, all'azione sinergica del gruppo raccolta embrioni Corfilcarni e di alcuni allevatori fiduciosi nel progetto di recupero, si è cercato di ripartire dalla superovulazione, sperimentando un dosaggio dimezzato di FSH.

L'ipotesi di lavoro nasceva dalla constatazione di una scarsa risposta al protocollo tradizionale (1000 UI) con lo sviluppo di troppi follicoli grandi anovulatori. Questi follicoli, oltre a non produrre ovociti e quindi embrioni recuperabili, erano probabilmente responsabili di una sovrastimolazione delle ghiandole endometriali con la produzione di abbondante muco

che impediva la raccolta dei pochi embrioni, presumibilmente prodotti.

Il basso dosaggio (500UI) successivamente utilizzato consentiva invece una buona stimolazione delle ovaie con risultati, in termini di embrioni trasferibili, sovrapponibili alla letteratura (Mikkola e Taponen 2017), anzi leggermente migliori, in termini di 1 embrione in più raccolto per *flushing*, ma soprattutto in termini di una minore percentuale di ovociti non fecondati (17% contro i 25% della letteratura).

Da un punto di vista pratico, la dose dimezzata ha due grandi vantaggi. Uno tecnico, nella preparazione della soluzione, poiché si realizza, sciogliendo in 10 ml, il contenuto liofilizzato di una delle due boccette di *Pluset*; rispetto ad altri dosaggi intermedi, evita errori tecnici nella preparazione della soluzione finale. Uno economico, poiché consente di preservare la seconda boccetta e di effettuare due *flushing*, anche in tempi diversi con un'unica confezione, considerato che il farmaco ha un costo abbastanza importante (138 euro).

Nel suo piccolo, questo studio ha confermato una forte correlazione tra conta dei follicoli antrali all'emergenza

dell'ondata follicolare e numero di embrioni trasferibili, che conferma come la prima possa essere impiegata come importante criterio per la selezione della donatrice, per poter predire la risposta alla MOET (Singh et al 2004).

In conclusione, i nostri dati, sebbene limitati numericamente poiché limitata è la disponibilità di donatrici in questa razza, suggeriscono che una bassa dose di FSH è efficace per i protocolli MOET nella razza Modicana.

La razza Modicana può pertanto essere considerata una buona produttrice di embrioni tra le razze bovine da latte.

Linea di ricerca 2

MONITORAGGIO DI UN CASO DI TUMORE A CELLULE DELLA GRANULOSA: CONSIDERAZIONI CLINICHE ED ORMONALI

(Marino G; Pruiti Ciarello F; La Spisa M; Zanghì A. (2016). Long-standing granulosa-theca cell tumour in a cow. Joint Meeting of the 20th Annual Conference of the European-Society-for-Domestic-Animal-Reproduction (ESDAR) / 13th Conference of the Spanish-Association-for-Animal-Reproduction (AERA), Lisbon, Portugal 27-30 October. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 51 suppl 2, 113-114. ISSN: 0936-6768. DOI: 10.1111/rda.12801.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12801/full>.)

XX Conference ESDAR Lisbon 27-29 October 2016

LONG-STANDING GRANULOSA-THECA CELL TUMOUR IN A COW

G. Marino, F. Pruiti Ciarello, M. La Spisa and A. Zanghì
Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Polo Universitario Annunziata, 98168 Messina, Italy
marino@unime.it

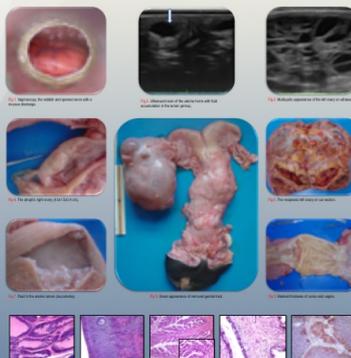
Introduction: Granulosa-theca cell tumours (GTCTs) are the most common ovarian neoplasms in cattle. Presumptive diagnosis may be made based upon clinical presentation, ultrasound, endocrine assay. Cows with GTCT are generally slaughtered or undergo ovariectomy to restore fertility.

Case Report: A 6-year Friesian cow was followed from 95 to 780 days post partum. During this period the cow had irregular heats. Cystic ovarian disease at the left ovary (10x12 cm) was firstly diagnosed. After unsuccessful treatments, a GTCT was strongly suspected. The ovary, with a multicystic appearance at ultrasound, doubled in about 3 months reaching an impressive size (22x15x12 cm). The right ovary was inactive and almost impalpable at the end of lactation (24 cm). The uterus was constantly oedematous and fluid-filled. Vaginoscopy revealed an open cervix with a slight mucous discharge. Endocrinological profile was consistent with a diagnosis of a GTCT. Considering the lack of discomfort for the cow and the average of milk production (3.8 l), the farmer gave no consent for surgery. At the end, the cow was slaughtered and genital organs were processed for pathology. The typical follicular pattern of a benign GTCT associated to atrophy of the right ovary, mucositis and marked thickness of cervix and vagina were diagnosed. Monoclonal immunohistochemistry for alpha-inhibin revealed a moderate expression in tumour cells.

Interpretation: Chronic exposure to oestrogen, resulted in mucositis and thickening of the vagina and cervix, being the mucosa in a constant oestrogen-like state. Inhibin caused the severe atrophy of the contralateral ovary. The obtained values (tab. 1) of inhibin and anti-müllerian hormone (AMH) suggested that inhibin is accumulated in large tumoural follicles, while AMH is a marker of the number and size of the antral follicles. Both are candidate marker for the diagnosis of GTCTs.

Conclusions: This case, contributing to the modest caseload of bovine GTCTs, in literature, reports the effects of the long-standing (2 years) exposition to oestrogen and inhibin in the genital tract.

References:
1. Kojima T, Sugita T, Sugiyama T, Yamaguchi K, Saito Y. 1986. Endocrinological study of granulosa cell tumours of the ovary in cattle. *Reproduction* 91: 113-118.
2. Marino G, Pruiti Ciarello F, La Spisa M, Zanghì A. 2016. Presumptive diagnosis of granulosa-theca cell tumour in a cow. *Reproduction in Domestic Animals* 51 (suppl 2): 113-114.
3. Marino G, Pruiti Ciarello F, La Spisa M, Zanghì A. 2016. Endocrinological parameters in a cow with granulosa-theca cell tumour. *Reproduction in Domestic Animals* 51 (suppl 2): 113-114.



Endocrinological parameters		
Date	Value	Range
Progesterone (ng/ml)	0.5-0.2	0.0-1.0 (0-10)
Inhibin (pg/ml)	7147	0-110
Inhibin B (pg/ml)	240.28	0.00-0.00 (0-1)
AMH (pg/ml)	284.17 (0.15)	0.00-0.00 (0-1)
AMH (pg/ml)	37.0-1.5	0.0-0.2 (0-1)
AMH (pg/ml)	0.9 (0.01)	0.00-0.00 (0-1)

Fig. 1. Representative histological images of granulosa-theca cell tumour cells. (a) Hematoxylin and eosin (H&E) stain showing the characteristic follicular pattern. (b) Immunohistochemistry for alpha-inhibin showing moderate expression in tumour cells. (c) Immunohistochemistry for alpha-inhibin showing moderate expression in tumour cells. (d) Immunohistochemistry for alpha-inhibin showing moderate expression in tumour cells.

CASO CLINICO

Una bovina Frisona Holstein di 6 anni, 470 Kg, era monitorata da 20 a 780 giorni dopo il parto (pp). La mucca aveva avuto due precedenti gravidanze con parto normale e la ripresa dell'attività ovarica si era verificata intorno ai 30-35 giorni pp. Il terzo parto era stato regolare con l'espulsione della placenta dopo 8 ore. La bovina veniva esaminata di routine a 20 e 50 giorni mediante palpazione transrettale ed esame ecografico. Non si rinveniva alcun segno di infezione uterina o di involuzione tardiva; inoltre nessuna struttura funzionale era visibile alle ovaie. Il podometro confermava l'assenza di calori nel periodo indicato. Estendendo il periodo di attesa volontaria, la mucca veniva rivalutata a 90 giorni pp, quando l'ovaio sinistro apparve aumentato di volume (10x5x3 cm) per la presenza di alcune cavità cistiche, l'ovaio destro era inattivo e l'utero era moderatamente aumentato in tono. Con una presunta diagnosi di malattia ovarica cistica (COD), la bovina veniva trattata, ma senza successo. Considerando la buona produzione di latte (media 35 l al giorno), il proprietario decideva di interrompere qualsiasi ulteriore trattamento o

indagine sperando in una ripresa spontanea della funzione ovarica. Nei mesi successivi, il profilo del podometro mostrava l'assenza di regolari picchi di attività (calori), sebbene erano rilevati alcuni picchi moderati, di forma irregolare, durata e intervallo di presentazione, senza una diminuzione della produzione di latte e dell'assunzione di cibo. Quindi, a 270 giorni pp, la bovina veniva valutata nuovamente in maniera più approfondita. La palpazione transrettale rivelava l'ovaio sinistro aumentato di volume, ovoidale con superficie irregolare, per gravità caduto in cavità addominale e appena retraibile nel bacino, trascinando con sé tutto il tratto genitale interno. L'ovaio destro era piccolo, liscio e quasi impalpabile. L'utero era moderatamente aumentato di diametro e tono. All'ecografia (Draminski, Poland, Olsztyn - 4Vet mini, sonda lineare endorettale da 4-9 MHz), l'ovaio sinistro (15x8x7 cm) presentava una struttura complessa con numerose cavità, con contenuto anecoico (Figura 1). Una di queste strutture raggiungeva 3,5 cm di diametro. L'utero era pieno di liquido.

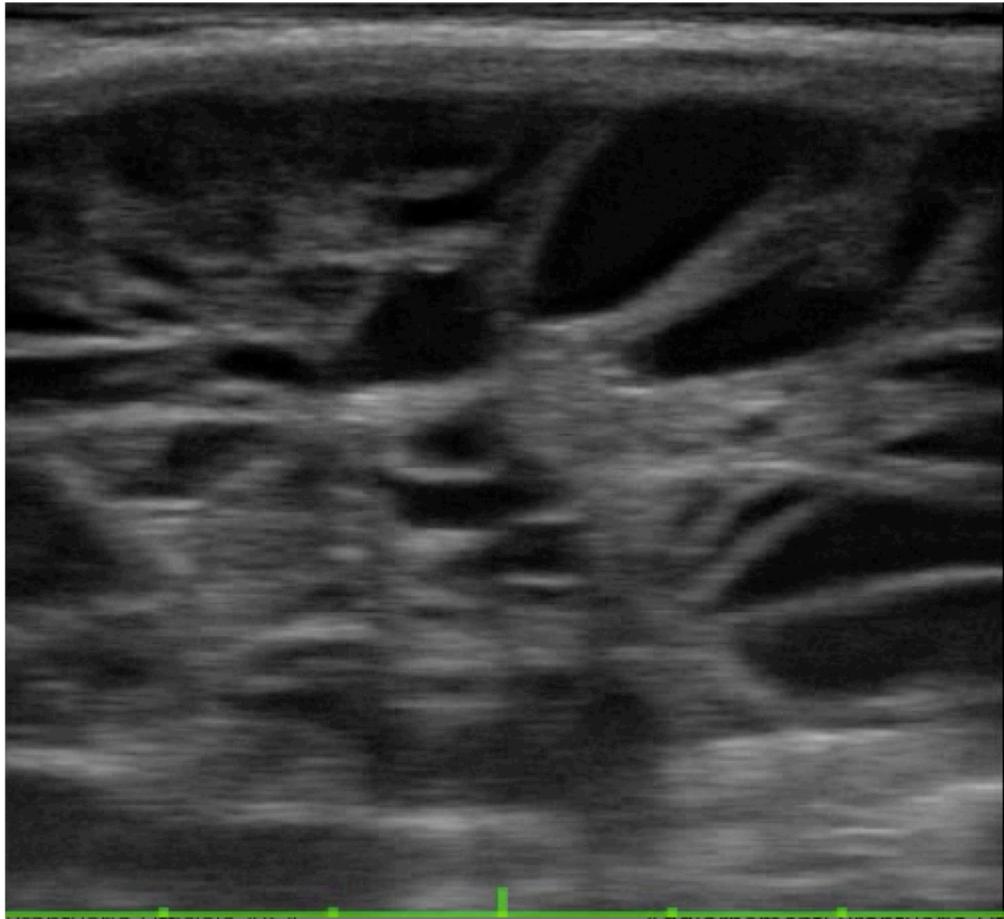


Fig. 1. Aspetto multicistico dell'ovaio aumentato di volume all'ecografia transrettale.

La vaginoscopia rinveniva uno scolo mucoso che proveniva da una cervice aperta e aumentata di volume. L'impedenziometria vaginale (Draminski, Poland, Olsztyn - Cow Estrous Detector) misurava un valore di 150 unità, compatibile con l'estro. I reperti clinici erano compatibili con un tumore stromale dell'ovaio associato a mucometra. Un campione di sangue veniva raccolto

dalla vena caudale per il profilo ematologico e biochimico e per valutare l'estradiolo 17-beta (E2), il progesterone (P4), il testosterone (T) (Biomerieux, France, Bruz – Vidas, enzyme-linked fluorescence assay), l'ormone antimülleriano (AMH) e l'inibina (INH) B (Adaltis, Italy, Milano - Personal lab, enzyme-linked immunosorbent assay). Il dosaggio ormonale rivelava un aumento dei livelli circolanti di E2 (32 pg/ml), AMH (57 ng/ml) e INH B (8 ng / ml), mentre P4 (0,5 ng / ml) e T (0,01 ng / ml) erano basali. I parametri ematici erano nel range di normalità ad eccezione di una lieve neutrofilia ed eosinopenia ($5,9 \times 10^3 / \mu\text{l}$, $0 \times 10^3 / \mu\text{l}$). Veniva raccomandata un'ovariectomia unilaterale, ma il proprietario, considerando la mancanza di manifestazioni di disagio da parte della bovina, l'età e la buona produzione di latte, non dava il consenso alla chirurgia. La bovina veniva, pertanto, monitorata ancora per più di un anno ad intervalli di 1-2 mesi. L'ovaio neoplastico raggiungeva la dimensione ultrasonografica di 17x10x8 cm a 370 giorni pp. A 780 giorni pp, la bovina presentava una significativa riduzione della produzione di latte (15 l) e veniva abbattuta. In sede di macellazione, la cavità addominale era ispezionata per escludere metastasi e il tratto

genitale era rimosso per l'esame patologico. Macroscopicamente, l'ovaio neoplastico sinistro, 22x15x12 cm e 2,5 kg, era a forma di ovoide con superficie irregolare (Figura 2).



Fig. 2. Aspetto macroscopico dell'apparato genitale interno.

La superficie di taglio rivelava la struttura multicistica dell'ovaio comprendente 2 cisti grandi predominanti, rispettivamente di 5 e 10 cm contenenti fluido acquoso da giallastro a rosso bruno; aree solide giallastre erano interposte a strutture cavarie (Figura 3). Il peduncolo ovarico mostrava vasi grandi fino a 10 mm di diametro.



Fig. 3. L'ovaio sinistro neoplastico alla superficie di taglio.

Dalle cavità cistiche veniva raccolto il liquido per testare gli steroidi sessuali, l'INH B e l'AMH; il dosaggio ormonale confermava un significativo accumulo di E2 (1301 pg/ml), P4 (43 ng/ml) e INH B (287 ng/ml), mentre T (1,25 ng/ml) e AMH (69 ng/ml) erano paragonabili ai livelli circolanti. L'ovaio destro era piccolo (4 x 1,5 x 0,4 cm) e appiattito, 3 g di peso, senza corpo luteo o follicoli apprezzabili. L'utero era debolmente aumentato di dimensioni (lunghezza del corpo uterino 3 cm,

diametro del corno uterino 4 cm, lunghezza 20 cm), edematoso e conteneva discrete quantità di fluido mucoso (mucometra). La cervice (10x7 cm) era aumentata nella porzione posteriore (1° e 2° anello cervicale); le prime pieghe ad anello apparivano aumentate di volume, edematose e leggermente iperemiche (Figura 4). La vagina era corta (22 cm), contratta con pieghe molto ispessite.



Fig. 4. Ispessimento marcato della cervice e della vagina.

Campioni rappresentativi venivano fissati in formalina tamponata al 10% e inclusi in paraffina con metodi di routine; sezioni di 5

μm venivano colorate con ematossilina ed eosina. Istologicamente, l'ovaio neoplastico era caratterizzato da strutture cistiche similfollicolari di dimensioni variabili, rivestite da strati multipli di cellule della granulosa neoplastiche, che a volte riempivano completamente le cavità (Figura 5). Aree solide di tessuti fibrovascolari separavano le strutture follicolari. Le cellule della granulosa neoplastiche di forma rotonda o ovale possedevano nuclei abbastanza uniformi e nucleoli prominenti. Si osservavano cellule sparse in mitosi. Le cellule della teca erano abbondanti nelle aree stromali. I risultati confermavano la diagnosi di tumore a cellule della granulosa (GTCT) benigno.

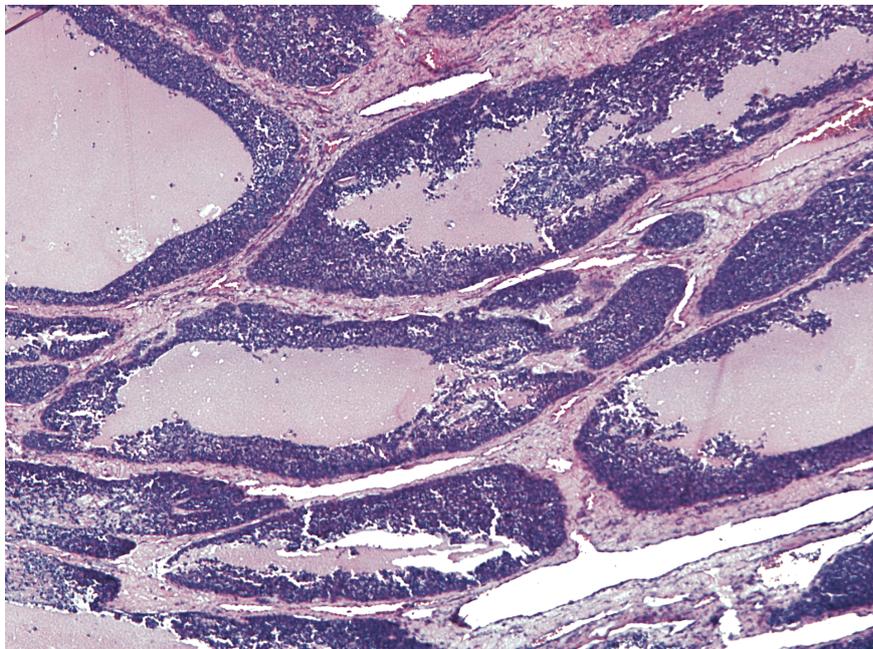


Fig. 5. Ovaio sinistro, pattern follicolare del GTCT. Ematossilina-eosina. Obiettivo 5x.

L'ovaio controlaterale mostrava, anche in sezioni seriali, solo due follicoli cavitari in degenerazione. L'utero mostrava una leggera proliferazione delle ghiandole endometriali senza alterazioni iperplastiche e metaplastiche. In alcune aree si notava un'inflammazione linfocitaria superficiale dell'endometrio con disepitelizzazione. La cervice mostrava un significativo invaginamento della mucosa e un tipico epitelio secretivo estrale. La vagina presentava una mucosa con epitelio multistratificato senza alterazioni patologiche. Veniva eseguita un'indagine immunostochimica per la rilevazione della subunità alfa dell'INH (Serotec, UK, Oxford - Mouse clonal antibody clone R1, diluizione 1:100) e dell'AMH (Dako, UK, Hithwycomb - Rabbit clone 13H4, diluizione 1:500) utilizzando il complesso avidina-biotina-perossidasi (Vector Labs, CA-USA, Burlingame -Vectastain ABC Elite Kit). Una positività moderata per l'INH alfa e per l'AMH è stata rilevata nell'ovaio neoplastico. Nelle strutture di tipo follicolare, le cellule della granulosa neoplastiche degli strati più esterni mostravano una positività più marcata. Le cellule della teca e quelle stromali erano negative per entrambi gli antigeni (figure 6 e 7).

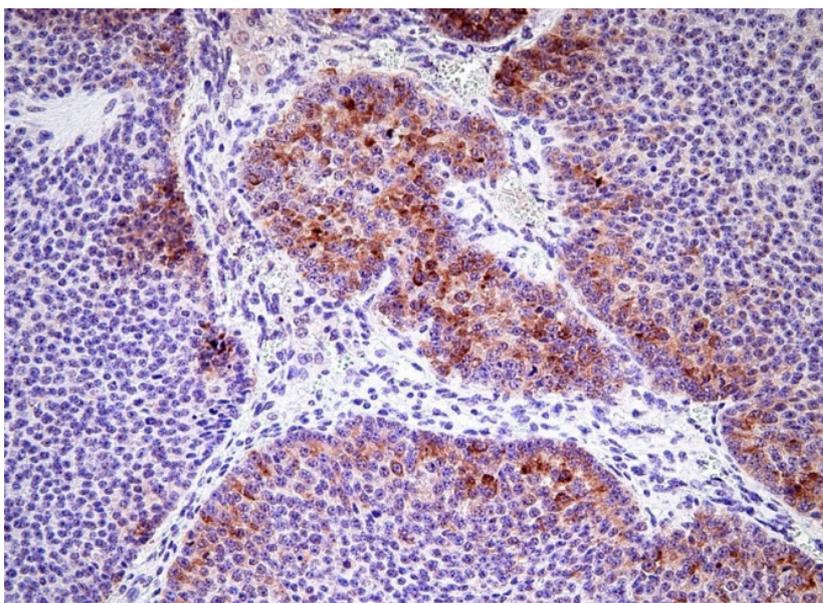


Fig. 6. Espressione focale dell'INH alfa nelle cellule della granulosa neoplastiche. ABC & ematossilina di Mayer, 20x.

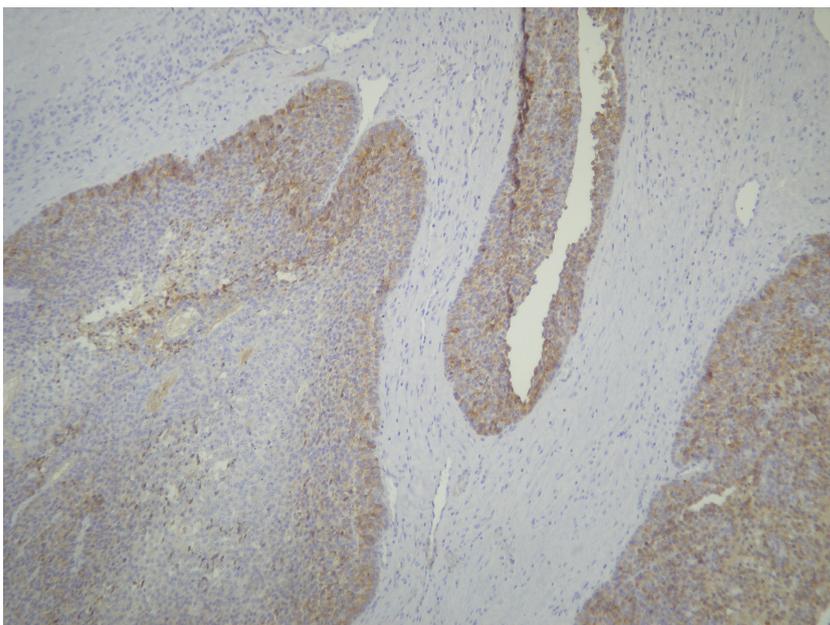


Fig. 7. Espressione focale dell'AMH nelle cellule della granulosa neoplastiche. ABC & ematossilina di Mayer, 10x.

DISCUSSIONI

Il GTCT è la neoplasia ovarica più comune nei bovini, sebbene la prevalenza sia stata stimata attorno allo 0,74% (Pérez-Martínez et al 2004). È stato riportato in vacche da 0 a 11 anni di razze diverse, tra cui la Frisona sembra essere quella più colpita (Pérez-Martínez et al 2004; Short et al 1963; Kanagawa et al 1964; Niizeki et al 1992; Sartin et al 1996; Hostetler et al 1997; Masseur et al 2004; Kitahara et al 2012; Dobson et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2013; Roberts et al 2015; Okawa et al 2017) probabilmente solo perché è la razza più diffusa al mondo. La diagnosi clinica parte dal rinvenimento di un ovaio aumentato di volume associato a inattività dell'ovaio controlaterale (Short et al 1963; Hostetler et al 1997; Meganck et al 2011; Kitahara et al 2012; Dobson et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2015; Gunn e Reader, 2015; Roberts et al 2015; Okawa et al 2017). I segni clinici possono includere anaestro (Hostetler et al 1997; Roberts et al 2015; Okawa et al 2017), cicli estrali irregolari (Meganck et al 2011; Gunn e Reader, 2015) ninfomania (Meganck et al 2011) e virilismo (Short et al 1963; Hostetler et al 1997). I casi maligni presentano generalmente

segni sistemici più manifesti dovuti alla disseminazione di metastasi (Sartin et al 1996; Masseau et al 2004; Trösch et al 2015). Lo sviluppo della ghiandola mammaria e la produzione di latte è stata segnalata nelle giovenche affette da GTCT (Short et al 1963; Gunn e Reader, 2015) Nel caso segnalato, la mucca presentava calori irregolari, la maggior parte dei quali silenti e rivelati principalmente dal pedometro, suggerendo una prevalente produzione di E2 da parte del tumore. Inoltre, la produzione lattea è stata mantenuta per un lungo periodo (2 anni) con una buona media (35 l al giorno). Il meccanismo che promuove la lattopoiesi, nella mucca e nelle giovenche affette da GTCT, non è ben compreso, ma è stato proposto che l'aumento di E2 possa svolgere un ruolo determinante (Gunn e Reader, 2015). L'ecografia è molto utile quando rivela il tipico pattern del tumore: multicistico con aree solide (Hostetler et al 1997; Kitahara et al 2012; Dobson et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2013; Roberts et al 2015; Okawa et al 2017; Meganck et al 2011; El-Sheikh Ali et al 2015; Gunn e Reader, 2015), ma il GTCT può essere totalmente solido (Kitahara et al 2012; El-Sheikh Ali et al 2013; Okawa et al 2017). Considerando che i GTCT precoci

possono rinvenirsi in ovaie di dimensioni normali, i sintomi e gli ultrasuoni non sono sempre in grado di escludere la COD. Non sorprende che molte anamnesi, inclusa quella del caso segnalato, riportano diagnosi differenziali di COD e talvolta trattamenti infruttuosi, prima di arrivare alla diagnosi di GTCT (Niizeki et al 1992; Hostetler et al 1997; Meganck et al 2011; El-Sheikh Ali et al 2015; Gunn e Reader, 2015; Okawa et al 2017). La valutazione endocrina degli ormoni steroidei (E2, P4, T) può fornire elementi utili per la diagnosi. Grandi quantità di E2 sono generalmente prodotte dal tumore, con un intervallo riportato di 2-75 pg/ml (Inokuma et al 2006; Meganck et al 2011; Kitahara et al 2012; Dobson et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2015). Il limite per diagnosticare un GTCT è stato stimato in 2,3 pg/ml con l'88,9% di sensibilità (El-Sheikh Ali et al 2013). Valori elevati di E2 possono essere trovati anche nella COD rendendo il parametro da solo insufficiente per diagnosticare un GTCT (Kitahara et al 2012; El-Sheikh Ali et al 2013). Nelle vacche affette da GTCT, gli intervalli riportati di T e P4 erano rispettivamente di 0,1-1,6 e 0,1-7 ng/ml (Hostetler et al 1997; Inokuma et al 2006; Meganck et al 2011; Dobson et al

2013; El-Sheikh Ali et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2015; Gunn e Reader, 2015); ciò significa che, nella maggior parte dei casi, i valori di entrambi gli ormoni sono nell'intervallo fisiologico: 0,1-0,5 e 0,2-14,2 ng/ml, rispettivamente (El-Sheikh Ali et al 2013). Nel caso riportato, P4 e T non erano aumentati mentre i valori ottenuti di E2 (32 pg/ml) erano significativamente più alti di quelli osservati durante il ciclo estrale. Le cellule della granulosa neoplastiche erano la fonte degli steroidi sessuali, come dimostrato dall'accumulo di tali ormoni nel liquido prelevato dalle cavità tumorali, con i seguenti valori: E2 180-2695 pg/ml; T 0,23-0,74 ng/ml; P4 6,8-1256 ng/ml (Meganck et al 2011; El-Sheikh Ali et al 2015). Nel caso riportato, le cavità tumorali accumulano grandi quantità di E2 e P4, confermando la loro produzione tumorale. L'INH immunoreattiva che include l'INH A, INH B e la pro α C INH, è stata riportata aumentata nelle vacche affette da GTCT con un intervallo di 0,01-3,72 ng/ml (Meganck et al 2011; El-Sheikh Ali et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2015; Roberts et al 2015; Okawa et al 2017) rispetto ad un intervallo fisiologico di 0,01-0,88 ng/ml (El-Sheikh Ali et al 2013). Il cut off per diagnosticare un GTCT è stato stimato in

0,69 ng/ml con il 77,8% di sensibilità, sebbene il test non sia in grado di escludere la COD (El-Sheikh Ali et al 2013). Nonostante l'INH B non sia stata pienamente convalidata nelle bovine, un valore di 8 ng/ml è stato riportato in questo studio. Questo valore è significativamente più alto dell'intervallo fisiologico per l'INH immunoreattiva, che include l'INH B. Un test ormonale fondamentale nei casi di GTCT è quello dell'AMH, un ormone glicoproteico sintetizzato dalle cellule della granulosa. L'intervallo riportato nel GTCT bovino è di 0,4-481,1 ng/ml (Kitahara et al 2012; El-Sheikh Ali et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2015; Gunn e Reader, 2015; Okawa et al 2017) rispetto a un intervallo fisiologico di 0,04-0,21 ng/ml (El-Sheikh Ali et al 2013). Il cut-off stimato per diagnosticare un GTCT è stato stimato in 0,36 ng/ml con il 99,2% di accuratezza e il 100% di sensibilità ed è in grado di distinguere la COD (El-Sheikh Ali et al 2013). Utilizzando, infine, un panel diagnostico costituito da AMH, INH ed E2 la sensibilità e la precisione raggiunge il 100% (El-Sheikh Ali et al 2013). Nel nostro studio, il valore ottenuto di AMH combinato con E2 e INH risultava molto indicativo per la diagnosi di GTCT. L'ovariectomia è il trattamento elettivo per il

GTCT; le principali indicazioni sono la prevenzione dell'emorragia in vitam, i casi maligni, il benessere della bovina e il recupero della fertilità negli animali giovani e di valore genetico (Niizeki et al 1992; Hostetler et al 1997; Masseur et al 2004; Meganck et al 2011; Kitahara et al 2012; Dobson et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2015; Roberts et al 2015; Trösch et al 2015; Okawa et al 2017). Il recupero funzionale dell'ovaio controlaterale è stato segnalato entro 1 mese, indipendentemente dalle dimensioni del tumore ovarico (Hostetler et al 1997; El-Sheikh Ali et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2015; Okawa et al 2017). GTCT maligni sono stati segnalati solo occasionalmente (Meganck et al 2011; Trösch et al 2015). La transizione verso la malignità non è stata dimostrata; invece, in un caso, è stata riportata una guarigione spontanea (El-Sheikh Ali et al 2015). L'emorragia fatale dell'arteria ovarica è stata descritta tra le complicanze dell'ovariectomia (Meganck et al 2011). Nel caso segnalato, il proprietario non dava il consenso per l'intervento chirurgico per l'assenza di disagio della bovina, per l'età e la buona produzione di latte; quindi, il tratto genitale veniva valutato solo dopo la macellazione. Si rinveniva un tipico

ovaio neoplastico con cisti multiple e aree solide (Short et al 1963; Kanagawa et al 1964; Niizeki et al 1992; Sartin et al 1996; Hostetler et al 1997; Masseur et al 2004; Meganck et al 2011; El-Sheikh Ali et al 2013; Okawa et al 2017), anche se questi tumori possono essere solidi (Pérez-Martínez et al 2004; El-Sheikh Ali et al 2013) o anche uniloculari (El-Sheikh Ali et al 2015). Istologicamente, il GTCT può mostrare un pattern trabecolare, diffuso o follicolare, anche se è frequente una combinazione di diversi pattern (Pérez-Martínez et al 2004; Short et al 1963; Kanagawa et al 1964; Niizeki et al 1992; Sartin et al 1996; Hostetler et al 1997; Masseur et al 2004; Meganck et al 2011; Kitahara et al 2012; Dobson et al 2013; El-Sheikh Ali et al 2013; Okawa et al 2017). Analizzando il fluido dalle cavità tumorali, sono state trovate grandi quantità di E2, P4, INH B che confermano la produzione di tali ormoni e il massiccio stoccaggio nelle cavità tumorali (Meganck et al 2011; El-Sheikh Ali et al 2015), come normalmente accade nelle cavità follicolari. È interessante notare che l'AMH era rilevabile con valori paragonabili ai valori circolanti. L'AMH è stato proposto come marcatore del numero di follicoli cavitari, mentre nessuna

relazione sembra esserci con la dimensione delle cavità follicolari (Batista et al 2014). Il livello di AMH nel GTCT può essere concorde con il numero di cavità tumorali e, in ultima istanza, con il volume totale della massa (El-Sheikh Ali et al 2013). Mediante immunistochemica, i GTCT bovini sono stati riportati esprimere AMH, antigene nucleare di proliferazione cellulare/PCNA, recettore β dell'estrogeno, E2 e T (Pérez-Martínez et al 2004; Niizeki et al 1992; Sartin et al 1996; Kitahara et al 2012). In questo studio, l'immunolocalizzazione della subunità alfa di INH è stata verificata in cellule della granulosa neoplastiche con lo stesso pattern dell'AMH. Un panel che include questi antigeni è proposto come sufficiente per fornire la diagnosi definitiva di GTCT. Sono state riportate poche descrizioni patologiche dell'ovaio controlaterale tipicamente inattivo (Short et al 1963; Kanagawa et al 1964). In questo studio, le sezioni seriali dell'ovaio destro hanno dimostrato l'assenza di strutture funzionanti (follicoli e corpo luteo) con l'eccezione di rari follicoli preantrali. È probabile che il GTCT abbia compromesso la funzionalità dell'ovaio controlaterale. Ciò potrebbe essere dovuto alla soppressione del rilascio di FSH

dall'ipofisi per l'azione diretta dell'INH prodotta dal GTCT (Inokuma et al 2006). D'altro canto, l'AMH riduce la reattività all'FSH del follicolo cavitario (Campbell et al 2012). Quindi, entrambi gli ormoni possono spiegare la ben nota inattività dell'ovaio controlaterale in corso di GTCT (El-Sheikh Ali et al 2013). Le patologie uterine riportate in corso di GTCT includono: iperplasia cistica, endometrite purulenta e mucometra (Pérez-Martínez et al 2004), mentre non sono disponibili descrizioni di eventuali turbe alla cervice e alla vagina. Nel caso clinico descritto, le ghiandole endometriali non erano iperplastiche, ma producevano abbondante muco che distendeva l'utero (mucometra) e fluiva dalla cervice aperta. La cervice e la vagina erano ispessite; la vagina era contratta in lunghezza, come un probabile effetto della lunga (2 anni) esposizione agli estrogeni prodotti dal GTCT. Questo studio, riportando un nuovo caso di GTCT, ha permesso di approfondire l'approccio diagnostico clinico, endocrinologico e patologico. L'ecografia e la valutazione di E2, INH e AMH sono stati confermati altamente utili per confermare la diagnosi di GTCT nella specie bovina.

Linea di ricerca 3

**RESYNCH IN BUFALE SICILIANE: DATI
PRELIMINARI**



INTRODUZIONE

Il Bufalo domestico o water buffalo (*Bubalus bubalis*) è un ruminante artiodattilo, a mantello grigio scuro uniforme, con corna appiattite e ricurve all'interno; appartiene alla famiglia dei Bovidi e viene distinto nel bufalo di palude (swamp) e nel bufalo di fiume (river). Il bufalo di palude ha 48 cromosomi ed è originario del Sud-Est asiatico (Indonesia, Malesia, Thailandia e Australia); ha unghioni pantofolati, un peso di 450-700 kg e un'altezza variabile compresa tra 121 e 180 cm; per la scarsa produzione latte è utilizzato principalmente come animale da lavoro in agricoltura e da carne ed è allevato in condizioni estensive simili a quelle del bovino da carne. Il bufalo di fiume ha 50 cromosomi, un temperamento più mite e si differenzia per colore, conformazione e andamento delle corna (brevi, rivolti all'indietro, a spirale); raggiunge un peso di 600-1000 kg e l'altezza è variabile in base alla razza; ricordiamo le razze Murrah e Surti (India, Pakistan) e altre razze presenti nei Paesi del Mediterraneo. Il bufalo di fiume è utilizzato per il latte (Noakes et al 2001).

Vengono segnalati complessivamente oltre 174 milioni di capi (FAO 2007), distribuiti in tutti i continenti, di cui oltre il 97% presente in Asia. L'allevamento bufalino si è diffuso in America latina e nell'area mediterranea approdando anche nell'Italia meridionale. La maggior parte dei bufali da fiume è allevata in piccoli allevamenti familiari, a gestione tradizionale ma esistono grandi allevamenti destinati alla produzione industriale di latte con buoni risultati, grazie al controllo dell'attività produttiva e riproduttiva. Il patrimonio zootecnico italiano comprende circa 400.000 capi, di cui oltre il 90 % è concentrato in Campania, Lazio, Puglia e Lombardia. Anche la Sicilia ha seguito questo orientamento con la creazione di diverse aziende bufaline, in particolare nelle provincie di Ragusa, Enna e Palermo, con iscrizione al Libro Genealogico dell'ANASB (Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina). Già dal 2000 è riconosciuta la razza "Mediterranea Italiana" presente in Italia.

Gli organi genitali della bufala, struttura e posizione, sono simili a quelli della bovina, ma di dimensioni più piccole. Le labbra vulvari sono meno strette e il clitoride più sviluppato; la

cervice è meno sviluppata e presenta 4-5 anelli; il corpo dell'utero è molto più corto (1-2 cm) e le corna uterine sono più piccole con un n. di caruncole inferiore; anche le ovaie sono più piccole, di forma più allungata, localizzate nella pelvi e contengono meno follicoli primordiali (Perera 2011). Drost (2007) segnala le dimensioni più piccole della cervice, la presenza mediamente di 3 anelli e di un canale cervicale più tortuoso rispetto alla bovina, responsabile di una minore dilatazione dell'orifizio esterno durante l'estro.

L'età alla pubertà è estremamente variabile nei diversi Paesi e compresa in un range tra 16-22 e 36-40 mesi; in condizioni favorevoli la pubertà si manifesta a 15-18 mesi nella bufala di fiume e 21-24 mesi in quella di palude (Noakes et al 2001; Perera 2011). Essa è influenzata da numerosi fattori quali: razza, stagione, clima, nutrizione, management; come nella bovina il peso corporeo dell'animale è il fattore più importante. Il primo concepimento avviene ad un peso corporeo medio di 250-275 kg, raggiunto generalmente a 24-36 mesi (Jainudeen 1986).

La fecondazione può essere naturale o artificiale (FA), nonostante per la seconda la percentuale di attecchimento sia

inferiore al 50%; in Italia viene commercializzato seme congelato di tori di alto valore genetico, che viene usato per creare nuovi tori aziendali, limitando in tal modo il rischio di consanguineità. Nella bufala di palude il numero di monte/FA per ottenere una gravidanza è di $3,5 \pm 2,5$ (Chaikhun et al 2012). La gestazione, più lunga della bovina, dura in media 310-330 gg (305-320 gg nel bufalo di fiume e 320-340 gg nel bufalo di palude); nella bufala di razza Murrah ad esempio, il periodo di gestazione è più breve (315 gg).

L'età media al primo parto è di 3-4 anni, ma talvolta le bufale partoriscono per la prima volta anche in età più avanzata; viene segnalata un'età media di 1053 ± 120 gg per razze Murrah, Mediterranea, Carabao, Baio (Camargo et al 2012) e di 1416 ± 243 gg per bufale di palude in Thailandia (Chaikhun et al 2012). La bufala, al picco di lattazione, può produrre dai 10 ai 12 kg/g di latte, con una produzione media per capo di 2.168 kg/lattazione; le % di grasso e di proteine sono di gran lunga superiori al latte vaccino raggiungendo rispettivamente valori dell'8% e del 4.4 %. Valori più elevati (2.500 l/lattazione) sono riportati per bufale Nili-Ravi, considerate le migliori produttrici

di latte nel mondo (Warriach et al 2008). La durata media della lattazione è di 270 gg. Valori molto più bassi sono riportati per le bufale di palude in Thailandia; la durata media della lattazione è di 127 ± 105 gg, la produzione giornaliera di latte è di $2,0\pm 0,9$ kg/bufala e di 255 ± 209 kg/lattazione (Chaikhun et al 2012).

L'interparto dovrebbe essere di 400-410 gg ma in realtà ha una durata variabile, compresa tra 400 e 600 gg; più precisamente viene segnalato un interparto di 400 ± 24 gg per bufale di fiume da latte (Camargo et al 2012) e di 486 ± 72 gg per bufale di palude (Chaikhun et al 2012). Fattori stagionali, nutrizionali e manageriali svolgono un ruolo importante. Il concepimento tra gennaio e marzo porta ad un interparto più breve mentre quello tra ottobre e dicembre ad un interparto più lungo. Nel bufalo di fiume la prima ovulazione post-partum avviene a 55gg circa e l'intervallo parto-concepimento dovrebbe essere di 90 gg; se la bufala allatta il vitello, il 1° estro può manifestarsi a 130 gg o anche oltre, se le condizioni climatiche o nutrizionali risultano particolarmente sfavorevoli. Nel bufalo di palude l'intervallo parto-concepimento è di 166 ± 70 gg

(Chaikhun et al 2012). Notevole è la durata della carriera produttiva della bufala, fino a 18-20 anni con 15-16 lattazioni

La bufala di palude è ciclica tutto l'anno, anche se sono state osservate variazioni stagionali della ciclicità, strettamente correlate al tipo di alimentazione disponibile. La bufala di fiume ha invece una riproduzione stagionale che inizia a luglio e si protrae fino a febbraio. La bufala è considerata poliestrale tendenzialmente stagionale, a giorno breve. La diminuzione delle ore di luce e le temperature ambientali più fresche favoriscono l'attività riproduttiva mentre le giornate più lunghe e le temperature più elevate (estate) la riducono; se la nutrizione ed il management sono ottimali la bufala può riprodursi tutto l'anno (Noakes e al 2001). La stagionalità è dovuta, nelle regioni tropicali, a cambiamenti nella caduta delle piogge che favoriscono la disponibilità di foraggio o allo stress da temperature elevate che porta ad un aumento dei livelli di PRL e, nei climi temperati, a cambiamenti nel fotoperiodo e nella secrezione di melatonina. Nel sub-continente indo-pakistano la massima attività riproduttiva si osserva da settembre a febbraio e la minima da marzo a ottobre; la maggior parte dei parti si

verifica tra luglio e settembre e molto pochi tra febbraio e giugno (Ahmad et al 1981; Warriach et al 2008). In Thailandia l'attività riproduttiva si manifesta nel periodo dicembre-febbraio, subito dopo la stagione dei raccolti, quando gli animali pascolano liberamente nelle risaie. Nella bufala la riproduzione è dunque influenzata dalla stagione ed il fattore luce controlla l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi e la fertilità (Perera 1999; Singh et al 2000).

Condizioni di ipoglicemia o elevate concentrazioni di urea nel siero, osservate in estate, sono associate a bassi livelli di fertilità (Quereshi et al 1999). I livelli di progesterone (P4) sono inversamente correlati alla temperatura ambientale e più bassi in estate (Rao e Pandey 1982), mentre i livelli di prolattina (PRL) sono più elevati (Kaker et al 1982). Bassi livelli di levotiroxina nel sangue riducono l'assorbimento di cibo ed il metabolismo corporeo (Noakes et al 2001).

La bufala mediterranea italiana mostra fluttuazioni stagionali dell'attività riproduttiva, maggiormente pronunciate negli animali adulti rispetto alle manze (Borghese e al 1995). Come conseguenza, nelle aziende di bufale i parti sono registrati

tutti i mesi, ma sono maggiormente concentrati alla fine dell'estate ed in pieno inverno (Borghese e al 1995).

La durata media del ciclo estrale è di 19-20 gg nella bufala di palude e di 21-22 gg nella bufala di fiume (Singh et al 2000). Cicli estrali brevi (6-14 gg) sono osservati con un'incidenza del 15,5% (Chohan et al 1992).

La fase estrale dura 12-30h e l'ovulazione si osserva 10-18h dopo la fine dell'estro. In uno studio realizzato in bufale con calore indotto da PGF2 α , similmente alla bovina, l'ovulazione si manifestava circa 30h dopo l'inizio del calore (Warriach et al 2008). I segni dell'estro sono meno evidenti rispetto alla bovina e pertanto più difficilmente rilevabili; occasionale è il comportamento omosessuale che si manifesta normalmente nella bovina durante l'estro, mentre l'attesa di essere montata da un toro (riflesso di immobilità/accettazione del maschio) è considerato il segnale tipico dell'estro nella bufala. Altri segni fisici o comportamentali (edema della vulva, perdite vulvari di muco chiaro, spontanea fuoriuscita di latte, muggiti, irrequietezza, aumentata frequenza della minzione, coda sollevata) variano per frequenza e intensità e non sono molto

significativi ai fini della identificazione dell'estro (Noakes et al 2001). A tale scopo viene più proficuamente impiegato il maschio vasectomizzato con dispositivo di rilevatore di monta o con il rilevamento visivo effettuato 2 volte al giorno (Alonso et al 1992). Corni uterini turgidi e arrotolati esprimono la massima tonicità tipica dell'estro. Come nella bovina, lo sviluppo follicolare durante il ciclo estrale è caratterizzato da 1 a 3 ondate follicolari. Nella maggior parte dei cicli estrali (63.3%) si hanno 2 ondate follicolari, meno frequenti i cicli a 3 ondate (33.3%) e occasionali ad 1 ondata (3.3%) (Manik et al 2001; Ali et al 2003). Nella maggior parte delle manze si osservano cicli a 2 ondate follicolari. Il n. di ondate follicolari condiziona la durata del ciclo estrale; se a 2 ondate, cicli di 21gg (da $21,2 \pm 0,1$ a $22,4 \pm 2,3$), mentre se a 3 ondate, cicli più lunghi di 24gg (da $22,8 \pm 0,1$ a $26,8 \pm 2$); il diametro massimo del follicolo ovulatorio è di $16,03 \pm 3,30$ mm (Awasthi 2013).

La fase luteinica è più lunga nelle bufale a 3 ondate follicolari (12.6 ± 2.9 vs 10.4 ± 2.1 gg) (De Rensis e López-Gatius 2007). Il corpo luteo (CL) in via di sviluppo (2-7gg) è morbido e difficile da palpare, mentre lo è il CL maturo (8-16 gg), che

misura 10-15 mm, quindi più piccolo rispetto alla bovina nella quale normalmente il diametro del CL è compreso tra 12 e 25 mm. Nella bufala spesso il CL è inglobato nel parenchima ovarico e privo di una vera corona, che rende più difficile l'identificazione attraverso la palpazione rettale. L'assetto endocrino è sovrapponibile a quello della bovina, ma generalmente il numero delle cellule luteiniche e i livelli di P4 sono più bassi suggerendo una carenza luteinica innata (Baithalu et al 2013).

L'efficienza riproduttiva è il principale fattore che condiziona la produttività. Nella specie bufalina essa appare alquanto modesta per il tardivo raggiungimento della pubertà, per il periodo di anaestro stagionale riscontrato in estate, per la lunga durata dell'anaestro post-partum ed il conseguente prolungamento dell'interparto (Singh et al 2000). Ulteriore complicazione deriva dalla relativa frequenza di bufale con estri silenti (Singh et al 2000), in una specie animale i cui segni dell'estro sono meno evidenti e pertanto il periodo estrale facilmente passa inosservato.

La stagionalità contrasta con il mercato, che richiede latte e mozzarella in estate. Gli allevatori tendenzialmente utilizzano l'effetto maschio, introducendo i tori alla fine dell'inverno o inizio della primavera e rimuovendoli alla fine dell'estate (Borghese e al 1995; Presicce, 2007).

Per questo motivo la FA, importante tecnica riproduttiva utilizzata negli animali domestici per ottenere un sensibile miglioramento genetico e un controllo sanitario, ha avuto inizialmente una limitata applicazione nella bufala (Ohashi 1994). Altri fattori che hanno influito negativamente sulla diffusione della FA sono la durata variabile dell'estro (4-64h) e dell'intervallo di tempo tra il picco dell'LH e l'ovulazione (Seren et al 1995) e la conseguente difficoltà di una corretta previsione del momento ovulatorio (Baruselli 2001) e, infine, le percentuali di concepimento più basse rispetto alla monta naturale. Con la FA, il tasso di gravidanza è del 50-60% con seme refrigerato e del 25-45% con seme congelato (Jainudeen 1986).

Al fine di migliorare l'efficienza riproduttiva della specie e superare, almeno in parte, le difficoltà esistenti nell'applicazione della FA, anche in funzione di una maggiore diffusione di questa

tecnologia riproduttiva, sono stati applicati alcuni dispositivi, in uso nell'allevamento bovino, utili per migliorare il rilevamento dei calori. L'impiego di podometri si è rivelato efficace, ma oneroso, soprattutto per piccoli allevamenti; inoltre l'applicazione di rivelatori di monta sono risultati di scarsa utilità nella bufala per la rarità con cui si manifesta il comportamento omosessuale durante l'estro, a differenza della bovina. Inoltre, anche al fine di consentire un intervento fecondativo a tempi prestabiliti, sono stati applicati vari protocolli farmacologici, ampiamente utilizzati nella bovina, per ottenere la sincronizzazione degli estri e dell'ovulazione, con risultati incoraggianti. Da una disamina della letteratura sull'argomento si evince che anche il grado di sincronizzazione dell'estro e dell'ovulazione appare alquanto variabile (30-50%) in relazione a fattori stagionali, nutrizionali, di management etc. A differenza della bovina, le % di gravidanze, sia con l'uso di progesterone (PRID/CIDR) o progestinici (CRESTAR), sia con l'uso di prostaglandine, risultano modeste, soprattutto se il trattamento si applica in periodi di anaestro stagionale o di attività riproduttiva marginale (Perera 2011). Risultati migliori sono stati ottenuti in

questi ultimi anni con altri protocolli a base di ormoni esogeni (GnRH, eCG, hCG, prostaglandine, estradiolo), che consentono una più precisa manipolazione dello sviluppo follicolare e pertanto una migliore sincronizzazione e una maggiore fertilità (De Rensis e López-Gatius 2007).

Il trattamento con progesterone o progestinici per indurre e sincronizzare gli estri nella bufala rappresenta ancora oggi un valido e interessante ausilio farmacologico. Possono essere utilizzati sia dispositivi intravaginali impregnati di progesterone (PRID-CIDR) (Barile et al 2001; Neglia et al 2003; Presicce et al 2005a) sia impianti sottocutanei auricolari a lento rilascio contenenti norgestomet (CRESTAR), un progestinico di elevata efficacia (Singh et al 1988; Hattab et al 2000; Bartolomeu et al 2002; De Rensis e López-Gatius 2007). Valutando i primi risultati riportati in letteratura emerge chiaramente che nella bufala il trattamento con progesterone/progestinici sembra essere meno efficace per la sincronizzazione degli estri e soprattutto dell'ovulazione, in quanto questi ormoni non sembrano controllare lo sviluppo follicolare, come segnalato per la specie bovina. Tale trattamento è stato integrato successivamente con

estradiolo o GnRH all'inizio e con eCG/PMSG e/o prostaglandine alla fine del trattamento, con buoni risultati. L'estradiolo, come pure il GnRH, è utile per ottenere un adeguato turnover follicolare e migliorare il tasso di concepimento, mentre l'uso di eCG/PMSG è risultato particolarmente vantaggioso soprattutto in bufale in anaestro. I protocolli a base di progesterone/progestinici offrono il vantaggio di poter ingravidare animali in anaestro che altrimenti sarebbero improduttivi, ma l'ampio intervallo di tempo che intercorre tra la rimozione del PRID e l'ovulazione comporta la realizzazione di più FA, almeno due a 72h e a 96h (Presicce et al 2005a). Neglia et al (2003), associando il PRID provvisto di capsula contenente estradiolo benzoato (10mg) x10gg ad una dose luteolitica di PGF₂ α per indurre luteolisi nelle bufale cicliche e PMSG (1000 UI) alla rimozione del PRID ed effettuando la doppia FA, a 60 e 84h dopo PG, hanno ottenuto il 28.2% di gravidanze in bufale Mediterranee pluripare del Sud Italia, trattate a 182 \pm 82 gg post-partum in gennaio, periodo in cui molte bufale sono acicliche per l'aumento delle ore di luce (anaestro stagionale). Una percentuale di gravidanza, a 25-30 gg

dopo FA, del 70.5% (12/17 bufale) è riportata da Presicce et al (2005a) in bufale in anaestro (Marzo-Aprile), trattate con PRID ed estradiolo benzoato (10 mg) per 10 gg e PMSG (1000 UI) al 7° g, con doppia FA al 3° e 4° g dopo rimozione del PRID. Buone % di gravidanza sono state ottenute anche da Carvalho et al (2013), in una sperimentazione realizzata in bufale in anaestro, utilizzando un dispositivo vaginale contenente P4 ed estradiolo benzoato (2mg) all'inizio del trattamento, prostaglandine (cloprostenolo 0.53 mg) ed eCG (400UI) alla rimozione a giorno 9, e infine somministrando GnRH (buserelin acetato 10 µg) a giorno 11 e FA 16h dopo il GnRH; gli Autori hanno valutato gli effetti positivi dell'utilizzo di eCG sulla crescita follicolare, sulla funzione luteinica durante il diestro successivo e sulla fertilità (tasso di gravidanza del 52.7% vs 39.4% dei controlli).

Un ulteriore e interessante contributo, realizzato successivamente dagli stessi Autori (Carvalho et al 2014), ha accertato che è possibile riutilizzare i dispositivi vaginali senza alterare la successiva fertilità; in questo studio, in 350 bufale in anaestro, venivano applicati dispositivi vaginali contenenti P4, nuovi o già utilizzati una o due volte, applicando lo stesso

protocollo già descritto in precedenza. Il tasso di gravidanza a 30gg non differiva tra i gruppi (55,9% per i dispositivi nuovi, 55,4% per quelli usati una volta, 48,3% per quelli utilizzati due volte). Lo studio ha messo in evidenza che livelli di P4, anche bassi ($1,10 \pm 0,04$ ng/ml per i dispositivi già utilizzati in precedenza per due volte o $1,52 \pm 0,05$ ng/ml per quelli utilizzati una sola volta) sono sufficienti a controllare la crescita follicolare e non influenzano le percentuali di gravidanza rispetto ai controlli ($P4 2,47 \pm 0,07$ ng/ml per i dispositivi nuovi).

La sensibilità del CL all'azione luteolitica delle prostaglandine esogene a partire dal 5°g del ciclo estrale, come nella bovina, ha consentito l'induzione dell'estro entro 2-6 gg con una singola dose di $PGF2\alpha$ in bufale cicliche in cui preliminarmente è accertata la presenza del CL, ma ancora meglio con la doppia somministrazione distanziata di 11-14gg (Singh et al 2000; De Rensis e López-Gatius 2007). L'intervallo trattamento PG-estro sembra essere di 48-144h, anche se la maggior parte delle bufale manifesta il calore 72-96h dopo il trattamento; l'intervallo trattamento-ovulazione è compreso tra 60 e 156h con la maggior parte (80%) delle ovulazioni entro 84-

108h dall'iniezione di PG. L'elevata variabilità osservata tra l'inizio dell'estro ed il momento dell'ovulazione ricalca quanto già noto per la bovina e pertanto è consigliabile effettuare la FA dopo l'osservazione dell'estro e non a tempi predefiniti. Il successo del doppio trattamento con PGF2 α può essere solo parziale in quanto alcune bufale possono essere in anaestro soprattutto se il protocollo è utilizzato nei mesi caratterizzati da un aumento delle ore di luce (Zicarelli 1997). L'efficacia delle PGF2 α nell'indurre luteolisi e nel sincronizzare gli estri e l'ovulazione secondo Brito et al (2002) è strettamente dipendente dalle dimensioni del CL, dai livelli di P4 e dallo sviluppo follicolare all'inizio del trattamento. Inoltre, gli Autori hanno riscontrato che nelle bufale che non ovulavano il P4 rimaneva elevato, >1 ng/ml a 48 h dal trattamento, ipotizzando in tal caso un'incompleta luteolisi.

Il trattamento con PG in stagione riproduttiva è efficace nel 60-80% degli animali trattati ed il tasso di gravidanza può raggiungere il 45-50%, paragonabile al tasso di gravidanza ottenuto con l'estro naturale. Complessivamente nella bufala la risposta estrale ed il tasso di fertilità sembrano essere inferiori

rispetto alla bovina, presumibilmente attribuibile alla inadeguata body condition score (BCS) spesso riscontrata nel post-partum e alla nota difficoltà nella rilevazione dell'estro. Il trattamento con PG tuttavia viene considerato ancora oggi un metodo valido e di facile applicazione per garantire buoni risultati con la FA e per migliorare l'efficienza riproduttiva della specie.

Warriach e Ahmad (2007), in bufale Nili-Ravi, osservando le ondate follicolari durante cicli estrali, spontanei o indotti da PG, hanno confermato che nei 3 gg che precedono l'estro non ci sono differenze nelle dinamiche follicolari tra bufale con cicli spontanei e bufale trattate con PGF2 α .

In bufale cicliche in lattazione del Bangladesh, trattate con la doppia PGF2 α a 11 gg di distanza, Rahman et al (2012) hanno ottenuto il 55,3% di gravidanze a 45 gg post-ovulazione; gli Autori hanno potuto osservare che maggiori tassi di concepimento si hanno con una BCS compresa tra 2,5 e 3,5, con un diametro follicolare maggiore all'estro ($13,7\pm 0,3$ vs $11,2\pm 0,5$ mm) e un CL di diametro maggiore a 5 gg post-ovulazione ($15,6$ vs $11,8$ mm).

Pandey et al (2012) hanno valutato l'effetto del trattamento con un progestinico (norgestomet), somministrato tra il 4° ed il 10°g post-ovulazione in bufale sincronizzate con una doppia somministrazione di PGF2 α , a distanza di 11 giorni e inseminate, dopo identificazione dell'estro, 2 volte a distanza di 24 h. Gli Autori hanno osservato che non ci sono differenze tra soggetti trattati e gruppo di controllo nella % di gravidanza e nel \emptyset del CL ma si riscontra invece un aumento dei livelli di P4 nei soggetti trattati. Successivamente gli stessi Autori (Pandey et al 2013) hanno valutato gli effetti di un analogo del GnRH (buserelin) o dell'hCG somministrati al 12° g post-ovulazione di un estro sincronizzato con la doppia somministrazione di PGF2 α . Gli Autori hanno accertato che il diametro del CL ed i livelli di P4 risultavano più elevati nei soggetti trattati, come pure le % di gravidanza (52,9% vs 28,6%); accertavano altresì la formazione di CL accessori nel 58,8% e nel 70,6% delle bufale trattate rispettivamente con buserelina e hCG. Anche Neglia et al (2001) avevano riscontrato risultati migliori (48,8 vs 45% di gravidanza) con la somministrazione di GnRH realizzata al momento dell'inseminazione. In conclusione, con la somministrazione di

GnRH che controlla lo sviluppo follicolare e induce ovulazione o luteinizzazione del follicolo dominante si ottengono effetti positivi sul tasso di gravidanza sia che la molecola sia somministrata al momento della FA sia al 12°g post-ovulazione.

Per superare i problemi legati all'identificazione visiva degli estri il protocollo Ovsynch è stato applicato in bufale cicliche con buoni risultati (Baruselli et al 1999; De Araujo Berber et al 2002; Neglia et al 2003; Paul e Prakash 2005). Il protocollo classico prevede una somministrazione di GnRH (giorno 0), una somministrazione di PGF2 α (giorno 7), una 2° somministrazione di GnRH (giorno 9) e una FA alla cieca dopo 16h circa. La doppia FA, eseguita a 12-18h e 24h dopo il 2° trattamento con GnRH, sembra fornire risultati migliori (Neglia et al 2003; Paul e Prakash 2005). L'Ovsynch sincronizza lo sviluppo follicolare, la regressione del CL e l'ovulazione in modo tale da praticare la FA a tempi prefissati senza necessità di identificare l'estro; con la 2° somministrazione di GnRH è garantito un supporto endogeno di LH, importante per la crescita follicolare, l'ovulazione e la formazione del CL in una specie come la bufala che vive solitamente in zone con temperature ambientali elevate che

incidono negativamente sulla loro performance riproduttiva (stress da calore). Al fine di migliorare le % di gravidanza, nella selezione degli animali da sottoporre al trattamento Ovsynch, può essere utile preliminarmente effettuare un esame ultrasonografico per accertare la presenza di un CL attivo e di un follicolo dominante oppure effettuare la presincronizzazione ormonale applicando la doppia somministrazione di PGF2 α a distanza di 11-14gg (Presynch) prima di effettuare la 1° iniezione di GnRH dell'Ovsynch per garantire la presenza di un CL all'inizio del trattamento (Moreira et al 2001). La fase del ciclo estrale rappresenta un importante fattore che condiziona il successo del trattamento sincronizzante; nella bovina è stato dimostrato che le % di gravidanza sono più basse se il protocollo è iniziato prima del 5°g o dopo il 13°g del ciclo estrale (Vasconcelos et al 1999; Moreira et al 2000); un maggiore successo invece se il trattamento è realizzato in piena fase luteinica (6°-12°g), quando di solito è presente un follicolo dominante (Moreira et al 2000).

Con il protocollo Ovsynch sono segnalate differenze significative nel tasso di gravidanza ottenuto nei differenti

periodi stagionali. Tassi di gravidanza del 50% (Baruselli et al 1999) e del 56,5% (De Araujo Berber et al 2002) sono riportati per bufale da carne incrocio Murrah x Mediterranea, trattate durante la stagione riproduttiva. Analoghi risultati, complessivamente soddisfacenti, si registrano con una singola FA a tempi fissi (Baruselli et al 2003a; Presicce et al 2005a; De Rensis et al 2005; De Rensis e López-Gatiús 2007). Paul e Prakash (2005) ottengono con 2 FA un tasso di concepimento simile a quello osservato con una singola FA, eseguita dopo identificazione dell'estro. Recentemente, Nazir et al (2013) riportano un tasso di concepimento a 63gg post-fecondazione del 66,7% in bufale con un supplemento della dieta rispetto al 31,2% dei controlli. Già in precedenza Baruselli et al (1999) aveva sottolineato l'importanza di una buona BCS (>3.5) per avere risultati migliori, oltre al trattamento in piena stagione riproduttiva.

Tassi di gravidanza più bassi (36%) sono segnalate da Neglia et al (2003) nella bufala Mediterranea Italiana, durante il periodo di transizione all'anaestro stagionale (gennaio) con il protocollo Ovsynch e la doppia FA a 18 e 42h dopo la 2°

iniezione di GnRH. Ali e Fahmy (2007) riportano percentuali più basse in bufale in anaestro rispetto alle bufale ciclanti (37.5% vs 60%). Anche Warriach et al (2008) riportano tassi di gravidanza del 30,4% vs 36,3% in bassa stagione riproduttiva (marzo-agosto) con FA a 12h e a 24h dopo la seconda somministrazione di GnRH rispetto alla stagione riproduttiva (settembre-febbraio)

Un interessante studio è stato condotto da Sianturi et al (2012) i quali mettono a confronto il trattamento Ovsynch (con FA a 18 e 24h dopo la 2° somministrazione di GnRH, cioè 66 e 72 h dopo iniezione di PGF2 α), con la doppia somministrazione di PGF2 α (FA a 72h dopo PG) e con il protocollo Select-Synch (GnRH + PGF2 α) (FA a 72h dopo PG), protocollo che prevede una sola somministrazione di GnRH. Le percentuali di gravidanza sono risultate del 64,71, del 77,14 e dell'83,87% rispettivamente per Ovsynch, doppia PG e Select-Synch e non c'erano differenze significative ($P>0,05$) tra i tre protocolli. Lo studio mette in evidenza ancora una volta la possibilità di realizzare la FA a tempi prestabiliti, dopo sincronizzazione dell'estro.

Sono state proposte delle varianti all'Ovsynch quali l'associazione Ovsynch-CIDR. Visti i risultati ottenuti nella bovina (Kawate et al 2004), l'Ovsynch è stato integrato con progesterone esogeno applicando una sola FA a 16-20h dalla 2° somministrazione di GnRH e ottenendo così un significativo incremento delle % di gravidanze nelle bufale acicliche (30% vs 4.7%) ma non nelle bufale cicliche (51.5% vs 35.7%) (De Rensis et al 2005). Gli Autori hanno anche accertato che la presenza di un follicolo ≥ 10 mm all'inizio del trattamento è il fattore determinante per il successo della sincronizzazione dell'ovulazione (44% vs 8% di gravidanze), anche se altri fattori (età, intervallo post-partum, etc) possono influenzare queste % di gravidanza. Già Baruselli et al (2003b) avevano riportato risultati positivi con l'associazione del progesterone al protocollo Ovsynch. Anche recentemente Ghuman et al (2012), mettendo a confronto 3 metodi di sincronizzazione, Ovsynch tradizionale, Ovsynch associato al CIDR per 7 gg e Ovsynch con sostituzione del secondo GnRH con hCG (3000 UI im), con FA a 72 e 96 h ottengono risultati migliori in bufale in anaestrosi e in lattazione con il secondo protocollo (Ovsynch + CIDR).

Nazir et al (2013) utilizzano Ovsynch + CIDR, iniziando il trattamento sincronizzante in bufale Murrah in lattazione al 35°g con una integrazione alimentare a base di acidi grassi omega-3 per 60gg. L'integrazione alimentare sembra determinare un aumento plasmatico del colesterolo, della alanina transaminasi, del P4 e soprattutto un tasso di concepimento al 63°g post-inseminazione del 66,7% vs 31,2% dei controlli.

Recentemente Mirmahmoudi e Prakash (2012) utilizzano in bufale Murrah, cicliche e in anaestro, il Doublesynch che prevede una dose di PGF2 α somministrata 2 gg prima dell'Ovsynch, senza tenere conto della fase del ciclo (PGF2 α g0, GnRH g2, PGF2 α g9, GnRH g11) e FA a 16h e 24h dopo la 2° somministrazione di GnRH, ottenendo il 60% ed il 55 % di gravidanze rispettivamente in bufale cicliche e in anaestro vs il 27,3 % di gravidanze per bufale cicliche inseminate dopo estro spontaneo. Gli Autori, da valutazioni effettuate su 10 bufale cicliche, ogni 2h fino all'ovulazione, dopo la somministrazione del 1° e del 2° GnRH, hanno osservato che 9/10 bufale ovulavano dopo il 1° GnRH a 22,2 \pm 1,2h e 10/10 bufale ovulavano dopo il 2° GnRH a 23,2 \pm 1h. Il protocollo

Doublesynch pertanto sincronizza l'ovulazione sia dopo il 1° che dopo il 2° GnRH, indipendentemente dalla fase del ciclo estrale, aumentando significativamente il tasso di gravidanza rispetto ai controlli.

Successivamente gli stessi Autori (Mirmahmondi et al 2014) hanno proposto il protocollo Estradoublesynch che prevede la sostituzione del 2° GnRH con Estradiolo (PGF2 α g0, GnRH g2, PGF2 α g9, estradiolo benzoato-EB g10) in bufale Murrah cicliche o in anaestro con ottimi risultati. Su 12 bufale cicliche gli Autori hanno ottenuto i seguenti parametri: 1) ovulazione in 12/12 bufale a 48,5 \pm 1,6h (range 38-56) dopo il trattamento con EB; 2) picco di LH a 18,3 \pm 0,8h (range 14-22) dopo il trattamento con EB; 3) picco di estrogeni totali di 50,8 \pm 6,9 pg/ml (range 32,3-82,7) si osservava 5,7 \pm 1h (range 2-14) dopo EB; 4) diametro follicolare all'ovulazione 12,9 \pm 0,4mm (range 11-15). Il protocollo Estradoublesynch applicato a 14 bufale cicliche e a 11 in anaestro con la TAI a 48 e 60h dopo il trattamento con EB e a 58 bufale cicliche con FA dopo estro spontaneo, portava rispettivamente a tassi di gravidanza di 62%, 64% e 34,5%. Anche con questo protocollo gli Autori ottenevano

risultati soddisfacenti con la TAI, sia in bufale cicliche che in anaestro.

SCOPO DEL LAVORO

Scopo di questo lavoro è stato quello di applicare un protocollo di resincronizzazione (Resynch) in un allevamento di bufale siciliane. Parallelamente è stata condotta un'analisi per vedere se le percentuali di gravidanza subivano o meno interferenze con il mese dell'anno, in termini di ore di luce, temperatura massima e minima e i valori di urea nel latte di mandria.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato svolto in un'azienda sita nella provincia di Ragusa, con una consistenza numerica di circa 250 bufale di razza Mediterranea Italiana, iscritte al Libro Genealogico (ANASB). L'azienda, ufficialmente indenne da brucellosi, tubercolosi e leucosi, è affidata ad un veterinario aziendale essenzialmente per il controllo degli aspetti riproduttivi ed a personale laico, responsabile del management quotidiano. Le bufale sono stabulate in ampi paddock coperti e scoperti e raggruppati secondo l'età e il periodo produttivo. L'alimentazione è basata su fieno ed insilati di erba (45% SS) e concentrati (55% SS). L'azienda gode di un ottimo management ed alti standard di welfare.

La linea produttiva è essenzialmente quella del latte che viene trasformato in un caseificio aziendale, con picchi di domanda nel periodo estivo in concomitanza con una maggiore richiesta di mozzarella di bufala. Tuttavia, l'azienda produce anche carne che viene conferita direttamente in esercizi di compravendita al dettaglio.

La fertilità oscilla tra il 40 e il 60%. Per l'anno precedente la sperimentazione non sono state osservate malattie podaliche ma una percentuale significativa di prolassi dell'utero (3-5%). Casi di anaestro e di mastiti venivano segnalati in particolare nel periodo estivo e casi di endometriti generalmente osservati nel post-partum.

La sincronizzazione degli estri delle bufale è stata realizzata nel periodo maggio-ottobre, su un complessivo numero di 218 soggetti di età compresa tra i 2 e i 4 anni. Il protocollo utilizzato prevedeva la formazione di gruppi di 15-20 animali in buone condizioni di salute, con BCS superiore a 3, dopo almeno 50 giorni dal parto, e che, all'esame particolare dell'apparato genitale, mostravano una normale involuzione uterina e un'adeguata ripresa dell'attività ovarica.

Prima di procedere al trattamento sincronizzante, le bufale venivano valutate mediante esplorazione rettale per accertare la presenza di un CL maturo, confermato anche con l'ausilio di un ecografo ultraportatile (Easyscan, BCF technology), equipaggiato con sonda lineare endocavitaria da 4,5-8,5 MHz.

Alle bufale così selezionate veniva applicato il protocollo Ovsynch tradizionale in cui al giorno 0 si effettuava la somministrazione di un analogo del GnRH (10 mcg di buserelina; Receptal, Intervet), al 7° giorno una prostaglandina di sintesi (500 mcg di cloprostenolo; Estrumate, Intervet), al 9° giorno 12 mcg di buserelina, e quindi a distanza di 18-22 ore si effettuava l'FA, supportata anche dall'evidenziazione dei segni del calore (muco da calore, dimensioni del follicolo preovulatorio, tonicità dell'utero) e si somministrava un'ultima dose di GnRH; per la FA veniva utilizzato seme congelato, proveniente da bufali di provata fertilità. Dopo 33 giorni, su tutto il gruppo si realizzava un'ulteriore somministrazione di GnRH (10 mcg di buserelina) ed un primo check ecografico. A 40 giorni, si effettuava la diagnosi ecografica di gravidanza ed una scansione ovarica per verificare la presenza di corpi lutei accessori.

Gli animali gravidi venivano trasferiti in un apposito paddock e iscritti nel gruppo Ovsynch + GnRH. Gli animali non gravidi venivano sottoposti a resincronizzazione (gruppo Resynch 1) con un nuovo Ovsynch e quindi nello stesso giorno,

in considerazione del GnRH fatto 7 giorni prima, venivano nuovamente trattati con prostaglandina e dopo altri 2 giorni con GnRH, realizzando dopo 18-22 ore la FA. Dopo 33 giorni, anche in tutto questo gruppo, si somministrava nuovamente la buserelina e, a 40 giorni, si procedeva alla diagnosi di gravidanza.

Gli animali gravidi venivano trasferiti in un apposito paddock. Gli animali non gravidi, venivano nuovamente trattati con prostaglandina e, inseriti in un nuovo Resynch, in modo da formare i gruppi Resynch 2 e ancora Resynch 3.

Le percentuali di gravidanza nei gruppi Ovsynch + GnRH, Resynch 1, Resynch 2 e Resynch 3 venivano analizzate statisticamente attraverso un test chi-quadro con correzione di Yates. Valori di P inferiori a 0,05 venivano considerati statisticamente significativi.

Con lo scopo di valutare l'influenza delle ore di luce decimalizzate, della temperatura massima e minima media registrata, dei valori di urea (mg/dl) nel latte le percentuali di gravidanza del gruppo Ovsynch + GnRH di cui sopra venivano, per mese, confrontati statisticamente mediante la correlazione tau

di Kendall. Valori di P superiori a 0,95 venivano considerati statisticamente significativi.

Le ore di luce e le temperature medie sono stati presi dalla più vicina stazione metereologica. I valori di urea sono stati analizzati presso l'IZS di Ragusa.

RISULTATI

I risultati della FA del gruppo Ovsynch + GnRH, nei differenti mesi utilizzati per la sincronizzazione sono riassunti nella tabella 1.

Mese	Luce (h)	T (°C)		Urea (mg/dl)	N. FA	Gravidanza (%)
		T. effettiva	T. minima			
Maggio	13,87	25	15	37,85	38	63
Giugno	14,68	22	13	33,03	32	50
Luglio	14,63	29	19	37,00	28	11
Agosto	13,48	28	19	42,15	34	35
Settembre	12,38	26	18	36,43	70	31
Ottobre	11,20	26	12	32,20	26	54
Totale					218	41

Tabella 1. Valutazione mensile dei livelli di urea nel latte e degli esiti della FA, confrontati con i valori medi di temperatura massima e minima e di ore di luce.

La massima fertilità è stata raggiunta nel mese di maggio con percentuali di successo del 63%, la minima nel mese di luglio con una percentuale dell'11%. Complessivamente il tasso di gravidanza ottenuto nel periodo maggio-ottobre è stato del 41%. Tra ore di luce e percentuale di gravidanza è stata registrata una correlazione significativa ($p=1$, coefficiente di Kendall: -

0,0667), mentre nessuna correlazione si registrava con le temperature e con i valori di urea del latte.

I risultati della resincronizzazione, raggruppando tutti i dati nei vari mesi, sono presentati nella tabella 2, dove le percentuali indicano la quota di animali risultati gravidi.

	Ovsynch + GnRH	Resynch 1	Resynch 2	Resynch 3
Animali trattati	218	98	32	12
Animali gravidi	89	42	8	2
Animali non gravidi	129	56	24	10
% di efficacia del trattamento	41	43	25	17
% di efficacia del trattamento + i precedenti	41	67	75	79

Tabella 2. Valutazione dell'efficacia del protocollo Resynch.

Con il primo trattamento (Ovsynch + GnRH) il 41% delle bufale rimaneva gravido. Con il secondo trattamento (Resynch 1) un ulteriore 43% delle restanti bufale resincronizzate risultava positivo alla diagnosi di gravidanza, portando complessivamente il tasso delle bufale gravide in questa fase al 67% di quelle inizialmente trattate.

Con il terzo trattamento (Resynch 2) un ulteriore 25% di bufale resincronizzate per la seconda volta rimaneva gravido,

portando complessivamente la percentuale di efficacia dei protocolli combinati ad un valore del 75%. Con il quarto trattamento (Resynch 3) un ulteriore 17% di bufale resincronizzate per la terza volta si ingravidava, portando complessivamente la percentuale di efficacia dei protocolli combinati ad un valore del 79%. Tuttavia, l'efficacia del trattamento Resynch 2 era significativamente più basso di quello ottenuto con il Resynch 1 (25 vs 43%) e quello del Resynch 3 lo era persino rispetto al Resynch 2 (25 vs 17%).

Il controllo ecografico a 33 giorni consentiva di accertare un 22% circa di falsi positivi (morte embrionale tardiva) ed un 9% di falsi negativi (gravidanze erroneamente non rilevate). Solo il 24% degli animali presentava un CL accessorio al controllo ecografico a 40 gg.

DISCUSSIONI

Lo studio effettuato ha voluto preliminarmente confermare l'influenza del fotoperiodo (n. ore di luce) sulla fertilità della bufala. Si registra un sensibile calo della fertilità nel periodo luglio-settembre. In questo stesso periodo, a causa di un problema di razionamento, si sono anche registrati incrementi dei livelli di urea nel latte di massa. Questi due effetti non sono separabili in questo studio ed entrambi possono avere avuto un ruolo nel calo di fertilità registrato, come già ampiamente documentato in letteratura (Perera 1999; Quereshi et al 1999; Singh et al 2000). Tuttavia, i valori di urea di per sé non sono significativamente correlati con i tassi di gravidanza. È noto infatti che la bufala è più tollerante a variazioni dei livelli di urea rispetto alla bovina da latte.

In questo studio è stato applicato il Resynch alla bufala Mediterranea in Sicilia. Il Resynch è stato sviluppato nella bovina da latte e prevede un Ovsynch tradizionale seguito da una somministrazione di GnRH a 19 o 26 o 33 giorni dalla fecondazione, negli ultimi due casi il trattamento è omesso nelle bovine risultate gravide alla diagnosi di gravidanza ecografica

precoce (Fricke et al 2003). Il trattamento nasce con lo scopo di ridurre l'intervallo parto-concepimento nelle bovine fecondate che non concepiscono, inserendole in un nuovo Ovsynch, con una tempistica che assicura la presenza di un corpo luteo attivo al momento della somministrazione del GnRH. In particolare, i Resynch 26 o 33 sembrano più efficaci del Resynch 19 (Fricke et al 2003).

L'applicazione della tecnica nella bufala è interessante, perché l'intervallo parto-concepimento in questa specie tende a superare i 90gg e sono richiesti 3-5 atti fecondativi per avere una gravidanza (Chaikhun et al 2012).

Solo recentemente sono stati descritti i risultati di un'ampia sperimentazione di un Resynch 20 in bufale Mediterranee in Campania (Neglia et al 2018). Il protocollo molto spinto prevedeva un GnRH a 20 gg post TAI ed una diagnosi di gravidanza a 27 gg. Il protocollo è risultato molto efficace ed ha prodotto un tasso di gravidanza dell'89% dopo 6 cicli consecutivi.

Nel nostro studio parallelo è stato preferito un Resynch 33 perché consente di spostare la diagnosi di gravidanza a 40gg,

periodo in cui si è già formata la placenta e la gravidanza si è assestata. L'incidenza della morte embrionale nella bufala raggiunge valori del 45% e ci sono indicazioni a supporto che essa si verifichi tra i 25 e i 40 gg, ossia dopo il riconoscimento materno della gravidanza (morte embrionale tardiva) (Campanile et al 2005). Per questo motivo una diagnosi precoce di gravidanza, oltre a presentare difficoltà nel rilevamento ecografico, deve, in questa specie, necessariamente essere confermata oltre i 40 gg. Anche dopo questa data è possibile la morte fetale precoce e l'aborto nella bufala, ma con incidenza minore (Vecchio et al 2010). Nel nostro studio sommando i due fattori (morte embrionale tardiva e errore di rilevamento) un 30% di animali sarebbero stati erroneamente gestiti.

La bufala, rispetto alla bovina, ha corpi lutei piccoli, con un minore numero di cellule luteiniche e più bassi livelli di P4, suggerendo una carenza luteinica innata (Baithalu et al 2013). L'elevata incidenza di morte embrionale ha probabilmente questa come principale base eziopatogenetica (Campanile et al 2005). A tale scopo diversi Autori hanno suggerito di supplementare la gravidanza con farmaci quali progesterone e progestinici, hCG,

GnRH. In particolare, gli ultimi 2 favorirebbero anche la formazione di corpi lutei accessori (Pandey et al 2013), che innalzerebbero i livelli di P4 ematico. Diversi lavori si sono concentrati tra 5 e 14 gg, ottenendo incrementi di percentuale di gravidanza e ipotizzando come la supplementazione di P4 svolgesse un ruolo nel favorire il riconoscimento materno fetale della gravidanza (Campanile et al 2007; Pandey et al 2013). Altri Autori, dopo aver avuto risultati contrastanti nel periodo precoce della gravidanza hanno spostato gli interventi (P4, GnRH, hCG) a 25 gg, dimostrando anche in questo caso un aumento di percentuale di gravidanza negli animali trattati, paragonabili tra i vari trattamenti e ipotizzando un ruolo della supplementazione nell'annidamento e impianto dell'embrione (Vecchio et al 2010). Anche in questi ultimi lavori la supplementazione ha ridotto, ma non eliminato la morte embrionale tardiva, sempre presente con incidenze elevate (21%) e la morte fetale.

Combinando i dati di questi recenti lavori con il Resynch 33, abbiamo ritenuto opportuno somministrare il GnRH anche alle bufale gravide, ossia, in pratica, alla cieca, in tutte le bufale trattate. Con i limiti del rilevamento ecografico, nel nostro studio,

nel 24% di animali è stata indotta la formazione di corpi lutei accessori; ciò ha verosimilmente innalzato i livelli di P4 e la gravidanza ne ha sicuramente beneficiato.

L'efficacia dei primi due trattamenti sincronizzanti (41%) insieme alla percentuale di gravidanza raggiunta (67%), incoraggia la pratica del Resynch nell'allevamento bufalino. I dati riportati supportano l'importanza di un secondo trattamento per ottenere una gravidanza (Resynch 1), per migliorare l'efficienza riproduttiva e la redditività dell'allevamento.

Il secondo e terzo Resynch hanno una minore resa (25 e 17%), probabilmente perché le bufale che rientrano in questi gruppi sono già bufale problema. Ciò nonostante la resa totale del trattamento al quarto ciclo raggiunge il valore finale del 79% (più che soddisfacente). I dati di questo studio non supportano, tuttavia, l'utilizzo del Resynch 1 e 2. Il gruppo rimasto vuoto dopo un Resynch 1 dovrebbe essere valutato attentamente (BCS, produzione latte, urea, patologie pregresse, utero ed ovaio) e probabilmente gestito con protocolli a base di progesterone, più efficace negli animali con condizioni di anaestro, anziché nuovamente con un Ovsynch.

Anche nel Resynch 20 (Neglia et al 2018), il gruppo resincronizzato con CIDR ha ottenuto risultati migliori dopo il secondo ciclo resincronizzante. Tuttavia, anche questi Autori condividono la non efficacia dei trattamenti resincronizzanti oltre il terzo ciclo, dove probabilmente un'ultima chance potrebbe essere rappresentata dall'utilizzo del toro aziendale per ingravidare quelle bufale non responsive ai vari protocolli.

Questo studio ha valutato l'applicazione delle tecniche di resincronizzazione nell'allevamento di bufala in Sicilia e giacché la latitudine, il clima ed il management sono fattori fondamentali dell'efficienza riproduttiva, i dati di questo studio sono molto preziosi per l'ottimizzazione dell'allevamento di questa specie nella nostra regione.

RINGRAZIAMENTI

- Dipartimento di Scienze Veterinarie (Prof.ssa Zanghì, Prof. Catone Giuseppe, Santo Cristarella, Gabriele Marino, Marco Quartuccio)
- Regione Sicilia, Assessorato Regionale dell'Agricoltura, dello Sviluppo Rurale e della Pesca Mediterranea.
- Consorzio di Ricerca Filiera Carni (CorfilCarni), Messina (Prof. Vincenzo Chiofalo).
- Misura 4.1.2 - PO FESR 2007/2013. Linea 4.1.A. – Azione a). Centro per l'innovazione dei sistemi di qualità, tracciabilità e certificazione dell'agroalimentare (AGRIVET).
- Gruppo di raccolta embrioni Ragusa (Dr Giorgio Lo Magno, Dr Vincenzo Firrincieli).
- Istituto zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Ragusa (Dr Giuseppe Cascone)
- Scuola di Scienze veterinarie di Camerino (Prof Gian Enrico Magi)
- DRAMIŃSKI S. A., 10-860 Olsztyn Poland.

- Azienda Bubalus srl, Ragusa
- Azienda Mezzasalma Daniela, Ragusa

BIBLIOGRAFIA

- Abdel ARL, Khalil AAY, Abdel-Wahab A, Hassan NY, Abdel-Hamied E, Kasimanickam RK: Relationship among circulating anti-Müllerian hormone, insulin-like growth factor 1, cadmium and superovulatory response in dairy cows. *Theriogenology* 100:72-9, 2017.
- Adams GP: Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 41:19–24, 1994.
- Ahmad N, Chaundhry RA, Khan BB: Effect of month and season of calving on the length of subsequent calving interval in Nili-Ravi buffaloes. *Anim Reprod Sci* 3:301-6, 1981.
- Ali A, Abdel-Razek AK, Abdel-Ghaffar S, Glatzel PS: Ovarian follicular dynamics in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Reprod Domest Anim* 38:214-8, 2003.
- Ali A, Fahmy S: Ovarian dynamics and milk progesterone concentrations in cycling and non-cycling buffalo-cows (*Bubalus bubalis*) during Ovsynch program. *Theriogenology* 68:23-8, 2007.
- Alonso JC., Campo E., Gil A., Caral J.: Evaluation of three methods of oestrus detection in water buffaloes. *Revista de Salud Animal* 14:215-6, 1992.
- Alvarez RH, Carvalho JBP, Carvalho MIAAB: Embryos retained in the oviduct as a factor of variation on the final recovery rate after uterus flushing in superovulated cows. *Boletim de Ind Anim* 56:89–93, 1999.
- Awasthi MK: Follicular dynamics in female buffaloes In: *Bubaline Theriogenology*, Purohit G.N. and Borghese A. (Eds). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org): A5704.0613, 2013.
- Baithalu RK, Singh SK, Gupta C, Raja AK, Saxena A, Kumar Y, Singh R, Agarwal SK: Cellular and functional characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Anim Reprod Sci* 140:138-46, 2013.
- Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ.

Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*. 53:1239–50, 2000.

- Barile VL, Galasso A, Marchiori E, Pacelli C, Montemurro N, Borghese A: Effect of PRID treatment on conception rate in Mediterranean buffalo heifers. *Livestock Prod Sci* 68: 283-7, 2001.
- Bartolomeu CC, Del Rei AJM, Madureira EH, Souza AJ, Silva AO, Baruselli PS: Timed insemination using synchronization of ovulation in buffaloes using CIDR-B, CRESTAR and Ovsynch. *Anim Breed Abstr* 70:332, 2002.
- Baruselli PS, Madureira EH, Visintin JA, Barnabe VH, Barnabe RC, Amaral R: Timed insemination using synchronization of ovulation in buffalo. *Rev Bras Reprod Anim* 23: 360-2, 1999.
- Baruselli PS: Control of follicular development applied to reproduction biotechnologies in buffalo. *Atti 1st Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, Eboli (Italia)* pp 128-146, 2001.
- Baruselli PS, Madureira EH, Barnabe VH, Barnabe RC, De Araujo Berber RC: Evaluation of synchronization of ovulation for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Bras J Vet Res Anim Sci* 40: 431-42, 2003a.
- Baruselli PS, Cervahi NAT, Henriquez CEP, Amarat R, Nichi M, Reichert RH: Use of progesterone associated to Ovsynch protocol for timed artificial insemination in buffalo (*Bubalus Bubalis*). *Atti 2nd Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo* pp 265-8, 2003b.
- Batista EO, Macedo GG, Sala RV, et al: Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reprod Domest Anim* 49:448-52, 2014.
- Biancucci A, Sbaragli T, Comin A, Sylla L, Monaci M, Peric T, Stradaoli G: Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenology* 85:914-21, 2016.
- Bò GA, Guerrero DC, Adams GP: Alternative approaches

to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 69:81-7, 2008.

- Bò GA, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ: Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. *Theriogenology* 42:963-75, 1994.
- Borghese A, Barile VL, Terzano GM, Pilla AM, Parmeggiani A: Melatonin trend during season in heifers and buffalo cow. *Bubalus bubalis* 1:61-4, 1995.
- Brito LFC, Satrapa R, Marson EP, Kastelic JP: Efficacy of PGF2 α to synchronize estrus in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) is dependent upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment. *Anim Reprod Sci* 73:23-35, 2002.
- Bungartz L, Niemann H: Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil* 101:583–91, 1994.
- Camargo RNC, Marques JRF, Marcondes CR, Araujo CV, Aguiar JF, Marques LC, Rodrigues AE: Indices of reproductive efficiency of buffaloes of the Brazilian Eastern Amazon. *Arq Bras Med Vet Zoo* 64:796-803, 2012.
- Campanile G, Neglia G, Gasparri B, Galiero G, Prandi A, Di Palo R, D'Occhio MJ, Zicarelli L: Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology* 63:2334-40, 2005.
- Campanile G, Di Palo R, Neglia G, Vecchio D, Gasparri B, Prandi A, Galiero G, D'Occhio MJ: Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology* 67:1393-8, 2007.
- Campbell BK, Clinton M, Webb R: The role of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (sheep). *Endocrinology* 153:4533-43, 2012.
- Carvalho NAT, Soares JG, Porto RM, Gimenes LU, Souza DC, Nichi M, Sales JS, Baruselli PS: Equine chorionic

gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. *Theriogenology* 79:423-8, 2013.

- Carvalho NAT, Soares JG, Souza DC, Vannucci FS, Amaral R, Maio JRG, Sales JNS, Sa MF, Baruselli PS: Different circulating progesterone concentrations during synchronization of ovulation protocol did not affect ovarian follicular and pregnancy responses in seasonal anestrous buffalo cows. *Theriogenology* 81:490-5, 2014.
- Chaikhun T, Hengtrakunsin R, De Rensis F, Techakumphu M, Suadsong S: Reproductive and dairy performances of thai swamp buffaloes under intensive farm management. *Thai J Vet Med* 42:81-5, 2012.
- Chohan KR, Iqbal J, Asghar AA, Chaudhary MA: Fertility of liquid and frozen semen in Nili-Ravi buffaloes. *Pak Vet J* 12:4-5, 1992.
- Castro Neto AS, Sanches BV, Binelli M, Seneda MM, Perri SH, Garcia JF: Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology* 63:1249-55, 2005.
- De Araujo Berber RC, Madureira EH, Baruselli PS: Comparison of two Ovsynch protocols (GnRH versus LH) for fixed-timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 57:1421-30, 2002.
- De Rensis F, Ronci G, Guarneri P, Bui XN, Presicce GA, Huszenicza G, Scaramuzzi RJ: Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 63:1824-31, 2005.
- De Rensis F, López-Gatius F: Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. *Theriogenology* 67:209-16, 2007.
- Diaz T, Pancarci SM, Drost M, Schmitt EJ, Ambrose JD, Fredriksson WE, et al: Effects of the persistent dominant follicle on the ability of follicle stimulating hormone to induce follicle development and ovulatory responses. *J Dairy Sci* 84:88-99, 2001.

- Dobson H, Kerby MJ, Chantrey J, et al: Long-term outcome for two heifers with a granulosa-theca cell tumour. *Vet Rec* 172:581, 2013.
- Drost M: Bubaline versus bovine reproduction. *Theriogenology* 68:447-9, 2007.
- El-Sheikh Ali H, Kitahara G, Nibe K: Plasma anti-Müllerian hormone as a biomarker for bovine granulosa-theca cell tumors: comparison with immunoreactive inhibin and ovarian steroid concentrations. *Theriogenology* 80:940-9, 2013.
- El-Sherry TM, Matsui M, Kida K, Miyamoto A, Megahed GA, Shehata SH, Miyake YI: Ovarian stimulation with follicle-stimulating hormone under increasing or minimal concentration of progesterone in dairy cows. *Theriogenology* 73:488-95, 2010.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations): FAOSTAT Agriculture Data. <http://www.fao.org/dad.it>, 2007.
- Ferré L, Bogliotti Y, Chitwood J, Kjelland M, Ross P: Hormonal follicle stimulation in Holstein cows for in vitro embryo production using sperm sorted by flow cytometry. *Reprod Fertil Dev* 28:248, 2016.
- Fricke PM, Caraviello DZ, Weigel KA, Welle ML: Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J Dairy Sci* 86: 3941-50, 2003.
- Garcia Guerra A, Tribulo A, Yapura J, Adams GP, Singh J, Mapletoft RJ: Lengthened superstimulatory treatment in cattle: Evidence for rescue of follicles within a wave rather than continuous recruitment of new follicles. *Theriogenology* 84:467-76, 2015.
- Ghuman SPS, Honparkhe M, Singh J, Dhama DS, Kumar A, Nazir G, Ahuja C: Fertility response using three estrus synchronization regimens in lactating anaestrous buffaloes. *Indian J Anim Sci* 82:162-6, 2012.
- Guarneri P: Embryo transfer: stato dell'arte e prospettive. In: Sali G: Gestione clinica della riproduzione bovina. Point Veterinaire Italie, 2013.
- Guilbault LA, Grasso F, Lussier JG, Rouillier P, Matton P:

Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* 91:81-9,1991.

- Guimaraes CR, Oliveira ME, Rossi JR, Fernandes CA, Viana JH, Palhao MP: Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. *Theriogenology* 84:237-41, 2015.
- Gunn AJ, Reader J: Spontaneous lactogenesis and galactopoiesis in a virgin dairy heifer with evidence of a granulosa theca cell tumour. *N Z Vet J* 63:345-6, 2015.
- Hattab SA, Kadoom AK, Palme R, Bamberg E: Effect of CRESTAR on estrus synchronization and the relationship between fecal and plasma concentrations of progestagens in buffalo cows. *Theriogenology* 54:1007-17, 2000.
- Hirayama H, Naito A, Fukuda S, Fujii T, Asada M, Inaba Y, Takedomi T, Kawamata M, Moriyasu S, Kageyama S: Long-term changes in plasma anti-Müllerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese Black cattle. *J Reprod Dev* 63:95-100, 2017.
- Hostetler DE, Sprecher DJ, Yamini B, et al: Diagnosis and treatment of a malignant granulosa cell tumor in a Holstein nulligravida: a case study. *Theriogenology* 48:11-7,1997.
- Inokuma M, Osawa T, Hara S, et al: Endocrinological characteristics in two Japanese black cows with granulosa cell tumor. *J Jpn Vet Med Assoc* 59:746-9, 2006.
- Jainudeen MR: Reproduction in the water buffalo. In: Morrow DA. *Current therapy in theriogenology*. WB Saunders Company, 1986.
- Kaimio I, Mikkola M, Lindeberg H, Heikkinen J, Haster JF, Taponen J: Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology* 80:950-4, 2013.
- Kaker MI, Razdan MN, Galhotra MM: Serum prolactin levels of non cycling Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 17:469, 1982.
- Kanagawa H, Kawaka Nakoo N, et al: A case of granulosa cell tumor of the ovary in a newborn calf. *Jap J Vet Res* 12:7-11, 1964.

- Kanazawa T, Seki M, Ishiyama K, Araseki M, Izaike Y, Takahashi T: Administration of gonadotropin-releasing hormone agonist on Day 5 increases luteal blood flow and improves pregnancy prediction accuracy on Day 14 in recipient Holstein cows. Division of Microscopic and Developmental Anatomy, Department of Anatomy, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan. 63:389-99, 2017.
- Kanazawa T, Seki M, Ishiyama K, Kubo T, Kaneda Y, Sakaguchi M, Izaike Y, Takahashi T: Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows. *Theriogenology* 86:1436-44, 2016.
- Kasimanickam RK, Hall JB, Estill CT, Kastelic JP, Joseph C, Abdel Aziz RL, Nak D: Flunixin meglumine improves pregnancy rate in embryo recipient beef cows with an excitable temperament. Department of Veterinary Clinical Sciences, Washington State University, Pullman, WA, USA 107:70-7, 2018.
- Kawate N, Itmi T, Choushi T, Saitoh T, Wada T, Matsuoka K, et al: Improved conception in timed-artificial insemination using a progesterone-releasing intravaginal device and Ovsynch protocol in post-partum suckled Japanese Black beef cows. *Theriogenology* 61:339-406, 2004.
- Kayacik V, Polat B, Ozluer A, Salmanoglu MR: Evaluation of the corpus luteum size throughout the cycle by ultrasonography and progesterone assay in cows. *Turk J Vet Anim Sci* 29:1311-16, 2005.
- Kim IH, Son DS, Yeon SH, Choi SH, Park SB, Ryu IS, et al: Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 55:937-45, 2001.
- Kitahara G, Nambo Y, El-Sheikh Ali H, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH) profiles as a novel biomarker to diagnose granulosa-theca cell tumors in cattle. *J Reprod Dev* 58:98-104, 2012.

- Kitahara G, Torisu S, et al. Evidence of spontaneous recovery of granulosa-theca cell tumour in a heifer: a retrospective report. *Reprod Domest Anim* 50:696-703. 2015.
- Kudláč E, Konecny J, Cermak J: Progesterone concentrations in milk of superovulated cows. *Acta Vet Brno* 60:171-79, 1991.
- La Spisa M, Marino G, Zanghì A, Chiofalo V: First data of multiple ovulation and embryo transfer in Modicana cows. *SISVET Torino* 20-22 Giugno 2018.
- Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskeep EK: Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J Anim Sci* 63:176–83, 1986.
- Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ: Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online* 7:623-33, 2003.
- Looney CR: Superovulation in beef females. In: *Proceedings of 5th Annual Convention of AETA*, Fort Worth, Texas 16-29, 1986.
- Manik RS, Palta P, Singal SK, Sharma V: Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. *Reprod Fertil Dev* 14: 315-25, 2001.
- Marino VM, Schadt I, La Terra S, Manenti M, Caccamo M, Licitra G, Carpino S: Influence of season and pasture feeding on the content of α -tocopherol and β -carotene in milk from Holstein, Brown Swiss and Modicana cows in Sicily. *Dairy Sci Technol* 92:501-13, 2012.
- Masseur I, Fecteau G, Desrochers A, et al. Hemoperitoneum caused by the rupture of a granulosa cell tumor in a Holstein heifer. *Can Vet J* 45:504-506; 2004.
-
- Mastrangelo S, Sardina MT, Tolone M, Di Gerlando R, Sutera AM, Fontanesi L, Portolano B. Genome-wide identification of runs of homozygosity islands and associated genes in local dairy cattle breeds. *Animal*. 26:1-9; 2018.
- Mastrangelo S, Saura M, Tolone M, Salces-Ortiz J, Di

- Gerlando R, Bertolini F, Fontanesi L, Sardina MT, Serrano M, Portolano B. The genome-wide structure of two economically important indigenous Sicilian cattle breeds. *J Anim Sci.* 92:4833-42; 2014.
- Mastrangelo S, Tolone M, Di Gerlando R, Fontanesi L, Sardina MT, Portolano B. Genomic inbreeding estimation in small populations: evaluation of runs of homozygosity in three local dairy cattle breeds. *Animal.* 10:746-54; 2016.
 - Meganck V, Govaere J, Vanholder T, et al. Two atypical cases of granulosa cell tumours in Belgian Blue heifers. *Reprod Domest Anim* 2011;46:746–749. El-Sheikh A H,
 - Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59:651-74, 2003.
 - Mikkola M, Taponen J. Embryo yield in dairy cattle after superovulation with Folltropin or Pluset. *Theriogenology* 88:84–8, 2017.
 - Mirmahmoudi R, Prakash BS: The endocrine changes, the timing of ovulation and the efficacy of the Doublesynch protocol in the Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*). *Gen Comp Endocr* 177: 153-159, 2012.
 - Mirmahmoudi R, Souri M, Prakash BS: Endocrine changes, timing of ovulation, ovarian follicular growth and efficacy of a novel protocol (Estradoublesynch) for synchronization of ovulation and timed artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 81:237-42, 2014.
 - Monteiro PL Jr, Siqueira LG, Torres CA, Souza ED, Arashiro EK, Camargo LS, Fernandes CA, Viana JH: Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized. *Theriogenology* 72:949-58, 2009.
 - Moreira F, De la Sota RL, Diaz T, Thatcher WW: Effect of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J Anim Sci* 78:1568-76, 2000.
 - Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW: Effects of presynchronization and bovine

somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 84:1646-59, 2001.

- Nabenishi H, Sugino F, Konaka R, Yamazaki A. Conception rate of Holstein and Japanese Black cattle following embryo transfer in southwestern Japan. *Anim. Sci J.* 89:1073-78; 2018.
- Nazir G, Ghuman SPS, Singh J, Honparkhe M, Ahuja CS, Dhaliwal GS, Sangha MK, Saijpaul S, Agarwall SK: Improvement of conception rate in postpartum flaxseed supplemented buffalo with Ovsynch plus CIDR protocol. *Anim Reprod Sci* 137: 15-22, 2013.
- Neglia G, Midea D, Caracciolo di Brienza V, Rossi N, Zicarelli F: Associazione del GnRH alle prostaglandine nella inseminazione strumentale della bufala Mediterranea Italiana. *Atti 1st Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, Eboli (Italia)* pp 337-40, 2001.
- Neglia G, Gasparrini B, Di Palo R, De Rosa C, Zicarelli L, Campanile G: Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 60:125-33, 2003.
- Neglia G, Capuano M, Balestrieri A, Cimmino R, Iannaccone F, Palumbo F, Presicce GA, Campanile G: Effect of consecutive re-synchronization protocols on pregnancy rate in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers out of the breeding season. *Theriogenology* 113:120-6, 2018.
- Niizeki H, Hmhimotos N, Ishino S, et al: A case of bovine sex cord tumour with annular tubules. *J Comp Pathol* 106:423-7, 1992.
- Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW.: *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, W.B. Saunders, 2001.
- Ohashi OM: Estrous detection in buffalo cow. *Buff J* 10: 61-4, 1994.
- Okawa H, Tomiki M, Ischida T. Clinical diagnosis of bovine granulosa cell tumour in a Holstein cow using plasma anti-Müllerian hormone concentration: a case report. *J Appl Anim Res* 45:529-32, 2017

- Pandey AK, Dhaliwal GS, Ghuman SS, Singh J, Kumar A, Agarwal SK: Impact of norgestomet supplementation during early luteal phase on subsequent luteal profiles and conception rate in buffalo: a preliminary study. *Trop Anim Health Pro* 45:293-8, 2012.
- Pandey AK, Ghuman SPS, Dhaliwal GS, Kumar A., Agarwal SK: Impact of buserelin acetate or hCG administration on day 12 post ovulation on subsequent luteal profile and conception rate in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Reprod Sci* 136: 260-7, 2013.
- Pauciullo A, Nicodemo D, Peretti V, Marino G, Iannuzzi A, Cosenza G, Di Melo GP, Ramunno L, Iannuzzi L, Rubes J, Di Berardino D: X-Y aneuploidy rate in sperm of two "minor" breeds of cattle (*Bos taurus*) by using dual color fluorescent in situ hybridization (FISH). *Theriogenology*. 78:688-95, 2012.
- Paul VP and Prakash PS: Efficacy of the Ovsynch protocol for synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 64: 1049-60, 2005.
- Perera BMAO: Reproduction in water buffalo: comparative aspects and implications for management. *J Reprod Fert* 54: 157-68, 1999.
- Perera BMAO: Reproductive cycles of buffalo. *Anim Reprod Sci* 124:194-9, 2011.
- Pérez-Martínez C, Durán Navarrete AJ, García-Fernández RA, et al: Biological Characterization of Ovarian Granulosa Cell Tumours of Slaughtered Cattle: Assessment of Cell Proliferation and Oestrogen Receptors. *J Comp Path* 130:117-123, 2004.
- Presicce GA, Senatore EM, De Santis G, Bella A: Follicle turnover and pregnancy rates following oestrus synchronization protocols in Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reprod Dom Anim* 40: 443-7, 2005a.
- Presicce GA. Reproduction in the water buffalo. *Reprod Domest Anim* 42:24-32, 2007.
- Purcell SH, Beal WE, Gray KR. Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of

- embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. *Theriogenology*. 64:867-78, 2005.
- Quereshi MS, Samad HA, Habib G, Usmani RH, Siddiqui MM: Asian-Aust. J Anim Sci 12:1019, 1999.
 - Rahman MS, Shohag AS, Kamal MM, Bar FY, Shamsuddin M: Preovulatory follicular and subsequent luteal size pregnancy success in Water Buffaloes. *J Reprod Develop* 58:219-22, 2012.
 - Rao LV, Pandey RS: Seasonal changes in plasma progesterone concentrations in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *J Reprod Fert* 66: 57-61, 1982.
 - Rico C, Fabre S, Médigue C, Clemente N, Clemente F, Bontoux M, Touzé JL, Dupont M, Briant E, Rémy B, Beckers JF, Monniaux D: Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod* 80:50-9, 2009.
 - Roberts JN, Carleton CL, Conley AJ, et al: *Theriogenology* Question of the Month. Enlarged ovary due to granulosa theca cell tumor. *J Am Vet Med Assoc* 247:153-5, 2015.
 - Rodrigues M, Bonotto A, Acosta D, Boligon AA, Correa MN, Brauner CC: Effect of oestrous synchrony between embryo donors and recipients, embryo quality and state on the pregnancy rate in beef cattle. *Reprod Domest Anim* 53:152-6, 2018.
 - Sartin EA, Guillermo AH, Elizabeth MW, et al. Malignant ovarian tumors in two heifers *J V et Diagn Invest* 8:265-7, 1996.
 - Sartori R, Suárez-Fernández CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJM, Wiltbank MC: Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 60:1319-30, 2003.
 - Seidel GE Jr: Overview of sexing sperm. *Theriogenology*. 68:443-6, 2007.
 - Seren E, Parmeggiani A, Campanile G: The control of ovulation in Italian buffaloes. *Proceeding of the XXX Simposio Internazionale di Zootecnia (Reproduction and*

Animal Breeding: Advances and Strategy), September 11-13. Milano, Italia, pp 265-275, 1995.

- Shaw DW, Good TE: Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 53:1521-8, 2000.
- Short RV, Shorter DR, Linzell JL: Granulosa cell tumour of the ovary in a virgin Heifer. *J Endocrinol* 27:327-32, 1963.
- Sianturi RG, Purwantara B, Supriatna I, Situmorang AP: Optimizing artificial insemination on swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) through synchronization of estrus and ovulation. *Indonesian Anim Vet Sci*, 17: 2012.
- Singh G, Singh GB, Sharma RD, Nanda AS: Ovarian and uterine response in relation to Norgestomet-PMSG treatment in the true anoestrous buffalo. *Anim Reprod Sci* 60-61: 593-604, 1988.
- Singh J, Nanda AS, Adams GP: The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Anim Reprod Sci* 60-61: 593-604, 2000.
- Singh J, Dominguez M, Jaiswala R, Adams GP: A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62:227-43, 2004.
- Stringfellow D, Givens MD: Manual of the International embryo transfer Society. Fourth edition. Savoy, IL: IETS, 2010.
- Subramaniam A, Devarajan KP, Mohanan M: Repeat flushing and embryo recovery (RFER) in cross-bred donors cows (*Bos indicus* x *Bos taurus*). *Theriogenology* 35:277, 1991.
- Tahir MN, Bajwa MA, Latif M, Mushtaq M, Shah MH: Effects of insemination dose and season on conception rates in buffaloes. *Pak Vet J* 1:161-3, 1981.
- Tamboura D, Saumande J, Chupin D: Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with number of ovulations and of embryos collected. *Theriogenology* 23:719-31, 1985.

- Trösch L, Muller K, Brosinski, et al: Haemoabdomen and haemothorax in a cow with metastatic granulosa cell tumor. *Shweiz Arch Tierheilkd* 157:339-43, 2015.
- Utt MD, Johnson GL 3rd, Beal WE. The evaluation of corpus luteum blood flow using colorflow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology* 71:707-15, 2009.
- Vasconcelos JLM, Dilcox RW, Rosa GJM, Pursley JR, Wiltbank MC: Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rates after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52:1067-78, 1999.
- Vecchio D, Neglia G, Di Palo R, Prandi A, Gasparrini B, Balestrieri A, D'Occhio MJ, Zicarelli L, Campanile G: Is a delayed treatment with GnRH, hCG or progesterone beneficial for reducing embryonic mortality in buffaloes? *Reprod Domest Anim* 45:614-8, 2010.
- Warriach HM and Ahmad N: Follicular waves during the oestrus cycle in Nili-Ravi buffaloes undergoing spontaneous and PGF2 α - induced luteolysis. *Anim Reprod Sci* 101:332-7, 2007.
- Warriach HM, Channa AA, Ahmad N: Effect of oestrus synchronization methods on oestrus behaviour, timing of ovulation and pregnancy rate during the breeding and low breeding seasons in Nili-Ravi buffaloes. *Anim Reprod Sci* 107:62-67, 2008.
- Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH, Buckner PJ: Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 113:247, 1951.
- Wilmut I, Rowson LE: Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 30:686-90, 1973.
- Zicarelli L: News on buffalo cow reproduction. *Proceedings of the 5th World Buffalo Congress, Caserta (Italia)* pp 124-41, 1997.