

## EMBRYO TRANSFER NEL BOVINO

Scuola di Specializzazione in Fisiopatologia della Riproduzione degli Animali Domestici

### **Applicazione di biotecnologie riproduttive in animali in allevamento intensivo**

**Dr Davide Monaco**

Con l'aumento della popolazione globale, per poter rimanere competitivi e fronteggiare la domanda crescente, gli allevamenti devono aumentare le loro produzioni in maniera efficiente aumentando la produttività totale senza che questo infici sui costi, e mantenendo la qualità del prodotto.

L'aumento della produttività per capo è stato quindi il target di qualsiasi allevamento di bestiame. L'incrocio selettivo per importanti tratti produttivi che era tradizionalmente basato sulla sui dati fenotipici (e che adesso è basato sulla selezione genomica) ha prodotto animali dall'alto valore genetico e le tecnologie riproduttive che avevano lo scopo di aumentare la l'efficienza riproduttiva sono state ottimizzate in parallelo al miglioramento genetico.

La fecondazione artificiale rimane il metodo più efficace per il miglioramento genetico delle popolazioni di bovini. Il mercato globale del seme congelato è ancora molto forte. Ogni anno milioni di bovini nascono mediante inseminazione artificiale e vengono trasferiti più di mezzo milione di embrioni.

La fecondazione artificiale è stata la prima tecnologia di riproduzione assistita utilizzata commercialmente per il miglioramento genetico degli animali a metà del XIX secolo.

I vantaggi della inseminazione artificiale sono evidenti in termini di: controllo delle malattie, di importazione ed esportazione del seme congelato, della disponibilità di registri e di eliminazione di tori pericolosi.

L'inseminazione artificiale è diventata la base per ulteriori protocolli di sincronizzazione degli estri, per il trasferimento di embrioni per la produzione di embrioni in vitro per l'utilizzo del seme sessato. La fecondazione artificiale nei bovini è diventata così routinaria che ad oggi viene praticata dai produttori o da coloro che gestiscono la mandria; lo svantaggio è che questi ultimi spesso non raggiungono sufficiente familiarità con la tecnica per mantenere tassi di gravidanza accettabili. Un successo commerciale superiore alla fecondazione artificiale è stato il trasferimento di embrioni il quale accelerando la proliferazione di materiale genetico dalle vacche e dai tori e la capacità di congelare trasportare embrioni bovini in tutto il mondo ha reso questa tecnica di grande diffusione

per il controllo delle patologie e per la bio-sicurezza, per il salvataggio genetico di individui di valore e per lo sviluppo di nuove linee di razze di bestiame.

Il trasferimento di embrioni è un processo che dipende da una serie di passaggi orchestrati in sequenza. Un errore in uno qualsiasi di questi passaggi inficia i tassi di successo quindi inficia il numero di vitelli ottenuti.

### **Selezione delle donatrici**

La selezione delle donatrici è basata su due maggiori criteri: il merito genetico (determinato dal proprietario) basato sulle sue performance, e l'esame riproduttivo (accertato dal veterinario).

La donatrice deve essere in buone condizioni e con un buon Body Condition Score; deve essere sana essere libera da patologie, deve ciclare regolarmente ed essere almeno 50-60 giorni post-partum. Vacche con una anamnesi di problemi o patologie riproduttive non costituiscono buone donatrici.

Le donatrici devono essere valutate per determinare l'assenza di adesioni o di lesioni palpabili in cervice utero e ovaie. E' importante verificare la regolarità del canale cervicale con un dilatatore cervicale per verificare il passaggio del catetere per la raccolta degli embrioni.



Specialmente se la donatrice è una manza o un incrocio con Zebù (*Bos indicus*) questo accorgimento previene la frustrazione dell'incapacità di passare la cervice dopo una serie di costosi trattamenti ormonali. Deve essere effettuata la vaccinazione per malattie locali e vanno effettuati prelievi di sangue della donatrice del toro, al momento del recupero degli embrioni, per la successiva identificazione della progenie (obbligatori in caso di esportazione degli embrioni).

Embrioni singoli o multipli possono essere raccolti da vacche che abbiano ovulato naturalmente o che siano state sottoposte a protocolli di superovulazione. Per una maggiore efficienza devono essere trattate da due a quattro donatrici contemporaneamente e queste devono essere sincronizzate con le rispettive riceventi.

La superovulazione rimane il passaggio meno prevedibile nel processo della produzione di embrioni. Nella bovina si osservano variazioni molto ampie nella risposta ai protocolli di superovulazione a seconda dell'età della razza della curva di lattazione dello stato nutrizionale della stagione e dello stadio del ciclo al quale durante il quale il trattamento viene cominciato. L' FSH (ormone follicolo stimolante) ha un'emivita molto breve deve essere iniettato due volte al giorno durante un periodo di 4 o 5 giorni il trattamento viene cominciato a metà della fase luteale e prima dell'inizio di una nuova ondata di crescita follicolare quindi all'8 o al 12 giorno del ciclo della donatrice. Vengono utilizzate anche le prostaglandine per sincronizzare il ciclo delle donatrici e della riceventi. Il trattamento può essere cominciato anche il giorno 16 o 17 del ciclo della donatrice.

**TABLE 63-1**

**Superovulation Treatments with Follicle Stimulating Hormone in the Bovine\***

Treatment Day	Treatment 1	Treatment 2
-27	25 mg (5.0 cc) PGF2 $\alpha$ <sup>†</sup>	25 mg (5.0 cc) PGF2 $\alpha$
-17	25 mg (5.0 cc) PGF2 $\alpha$	25 mg (5.0 cc) PGF2 $\alpha$
-14	Estrus	Estrus
-4 AM	80 mg (4.0 cc) FSH <sup>‡</sup>	50 mg (2.5 cc) FSH
PM	80 mg (4.0 cc) FSH	50 mg (2.5 cc) FSH
-3 AM	60 mg (3.0 cc) FSH	50 mg (2.5 cc) FSH
PM	60 mg (3.0 cc) FSH	50 mg (2.5 cc) FSH
-2 AM	40 mg (2.0 cc) FSH	50 mg (2.5 cc) FSH
	35 mg (7.0 cc) PGF2 $\alpha$	25 mg (5.0 cc) PGF2 $\alpha$
PM	40 mg (2.0 cc) FSH	50 mg (2.5 cc) FSH
	25 mg (5.0 cc) PGF2 $\alpha$	25 mg (5.0 cc) PGF2 $\alpha$
-1 AM	20 mg (1.0 cc) FSH	50 mg (2.5 cc) FSH
PM <sup>§</sup>	20 mg (1.0 cc) FSH	50 mg (2.5 cc) FSH
0	Estrus and AI <sup>§</sup>	Estrus and AI <sup>§</sup>
7	Embryo recovery, transfer, and freezing	Embryo recovery, transfer, and freezing

\*Treatment 1 (decreasing dosage of FSH) as preferred by most ET practitioners, Treatment 2 (level dosage of FSH) as recommended by the manufacturer.

<sup>†</sup>PGF2 $\alpha$ , Prostaglandin F2 $\alpha$ ; Lutalyse, Pfizer Animal Health, New York; IM Injections.

<sup>‡</sup>FSH, Follicle stimulating hormone; Folltropin-V, Bioniche Animal Health USA, Inc., Athens, GA; IM Injections.

<sup>§</sup>FSH treatment is discontinued when the donor comes into estrus early. If the donor does not come into estrus, FSH treatment may be continued 1 additional day at the dosage level of the last scheduled day. Artificial Insemination (AI) of donor at 4 to 6 hours after onset of estrus, repeated once 10 to 12 hours later.

Le prostaglandine (25-35 mg di pgf2alfa o 500 microgrammi di prostaglandina analoga i.m) vengono somministrate al momento della 5° e 6° iniezione di FSH di un trattamento di 4 giorni che, se normalmente seguito, determina estro in 2 giorni ed ovulazione in tre giorni. L'intervallo dalle prostaglandine all'inizio dell'estro è normalmente più corto di 12 o 24 ore degli animali superovulati che nelle vacche o nelle manze che ovulano spontaneamente di conseguenza alle riceventi devono essere somministrate le prostaglandine 24 ore prima delle donatrici se viene utilizzato questo metodo di sincronizzazione. Normalmente le donatrici possono sviluppare una risposta ottimale (20 o più follicoli) oppure nulla (1 o 2 follicoli) con una media di 8-10 follicoli. Non c'è una grande differenza in risposta tra un trattamento di 4 giorni e un trattamento di 5 giorni. Normalmente le manze richiedono una dose totale di FSH inferiore mentre le vacche più anziane richiedono una dose superiore.

Molti veterinari che praticano l'embryo transfer utilizzano progesterone esogeno oppure dispositivi a rilascio controllato di progesterone intravaginali come una parte della trattamento di super ovulazione; questo approccio può essere utile a sincronizzare un gruppo di donatrici in maniera da cominciare il trattamento approssimativamente 10 giorni dopo la sincronizzazione dei Calori. In alternativa le donatrici possono essere super ovulate con i CIDR inseriti secondo quanto riportato nella tabella 63.2. Il vantaggio di quest'ultimo approccio è che le donatrici possono essere utilizzate durante qualsiasi momento del loro ciclo.

**TABLE 63-2**

**Superovulation Treatment with Follicle Stimulating Hormone and CIDR without Regard to the Day of the Donor's Estrous Cycle**

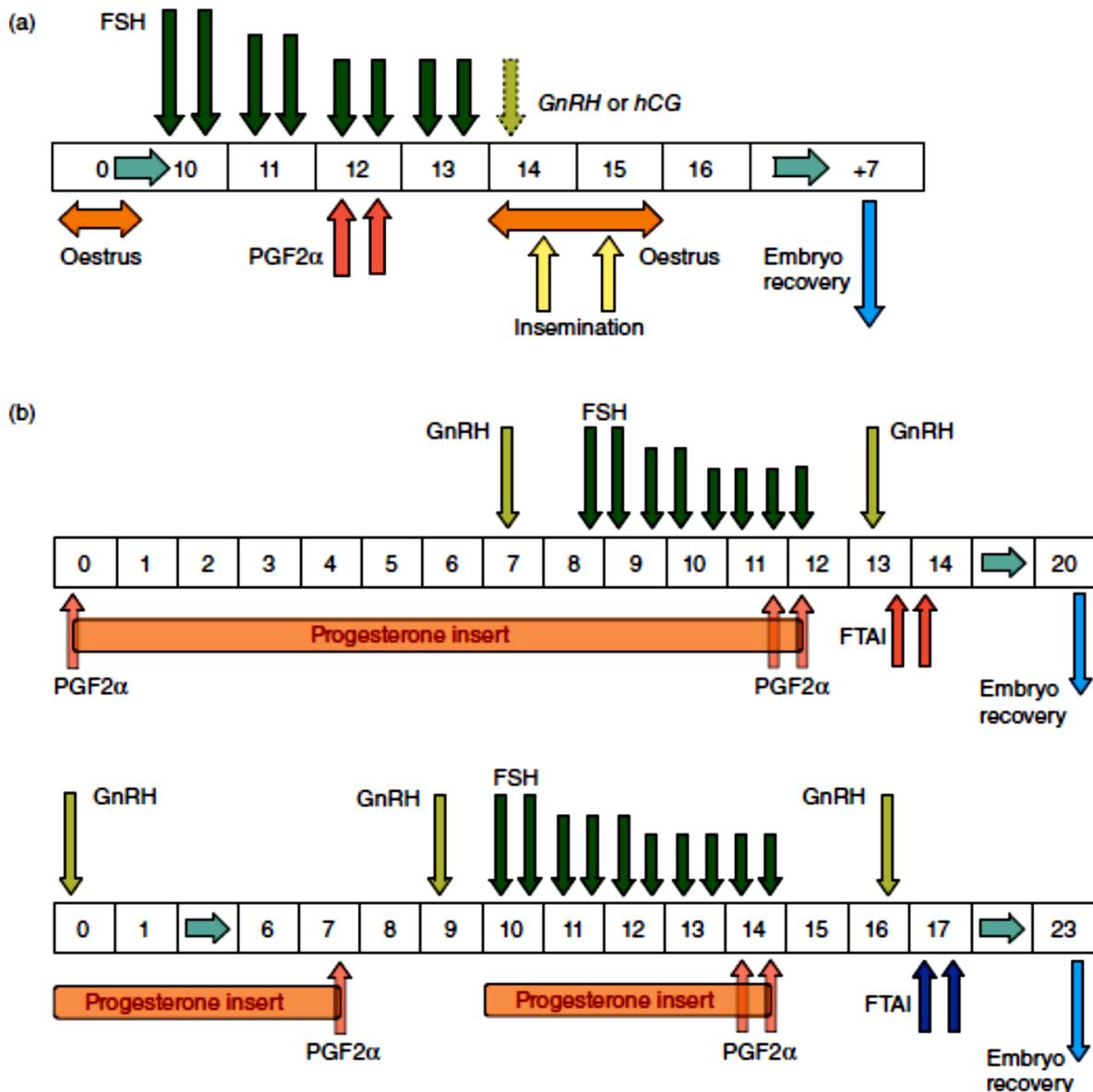
Treatment Day	Treatment
0	CIDR* Inserted vaginally
2 PM	100µg GnRH <sup>†</sup>
4 PM	60mg (3.0cc) FSH <sup>‡</sup>
5 AM	60mg (3.0cc) FSH
PM	60mg (3.0cc) FSH
6 AM	50mg (2.5cc) FSH
PM	50mg (2.5cc) FSH
7 AM	40mg (2.0cc) FSH
PM	40mg (2.0cc) FSH, 35mg (7.0cc) PGF2α <sup>§</sup>
8 AM	40mg (2.0cc) FSH, 25mg (5.0cc) PGF2α CIDR out
9 AM	Estrus and AI
PM	Estrus and AI
16	Embryo recovery, transfer, and freezing

\*CIDR, Controlled internal drug release; EAZI-BREED CIDR progesterone insert, InterAg Company, Hamilton, NZ, or Pfizer Animal Health, New York.

†GnRH, Gonadotropin releasing hormone; Cystorelin (Gonadorelin), Merial Limited, Iselin, NJ; IM Injection.

‡FSH, Follicle stimulating hormone; Follitropin-V, Bioniche Animal Health USA, Inc., Athens, GA; IM Injections.

§PGF2α, Prostaglandin F2α; Lutalyse, Pfizer Animal Health, New York; IM Injections.



La gestione delle donatrici può essere migliorata dall'utilizzo dell'ecografia. Infatti in aggiunta alla valutazione accurata della normalità del tratto riproduttivo incluso lo stato delle ovaie, può essere determinata anche la presenza di un follicolo dominante. La presenza di un follicolo dominante può ridurre il tasso di ovulazione anche del 40% l'ablazione del follicolo dominante prima del trattamento con FSH permette alle donatrici di andare incontro al trattamento sulla base delle esigenze piuttosto che sulla base del loro ciclo estrale.

L'ecografia è di grande ausilio per determinare la potenziale risposta super ovulatoria il giorno prima dell'ovulazione o al momento della fecondazione artificiale quando si osserva solo uno o pochi follicoli. Si può selezionare un toro meno costoso rispetto ad un toro molto costoso per la fecondazione artificiale.

L'ecografia e la palpazione delle ovaie per via trans-rettale sono ugualmente accurate per la determinazione del numero dei corpi lutei al momento del recupero degli embrioni. Tuttavia il numero di follicoli anovulatori può essere determinato con maggiore accuratezza attraverso l'ecografia e questa informazione può essere di aiuto per spiegare al proprietario una scarsa risposta del trattamento.

La determinazione dell'estro è di grande importanza non soltanto per l'inseminazione a tempo fisso delle donatrici ma anche per determinare il grado di sincronizzazione dell'estro e delle ovulazioni tra le donatrici e le riceventi. Inoltre lo stadio dell'embrione è calcolato infatti dall'inizio del calore passivo. Vengono effettuate 2 inseminazioni a distanza di 10 o 12 ore cominciando tra la quarta e la sesta ora dopo l'inizio dell'estro per poter coprire il lasso di tempo durante il quale le ovulazioni possono presentarsi. A seconda della qualità del seme congelato può essere utilizzata una dose doppia di inseminazione durante ciascuna inseminazione. Deve essere utilizzata una doppia dose soprattutto nelle vacche con un utero largo e pendulo.

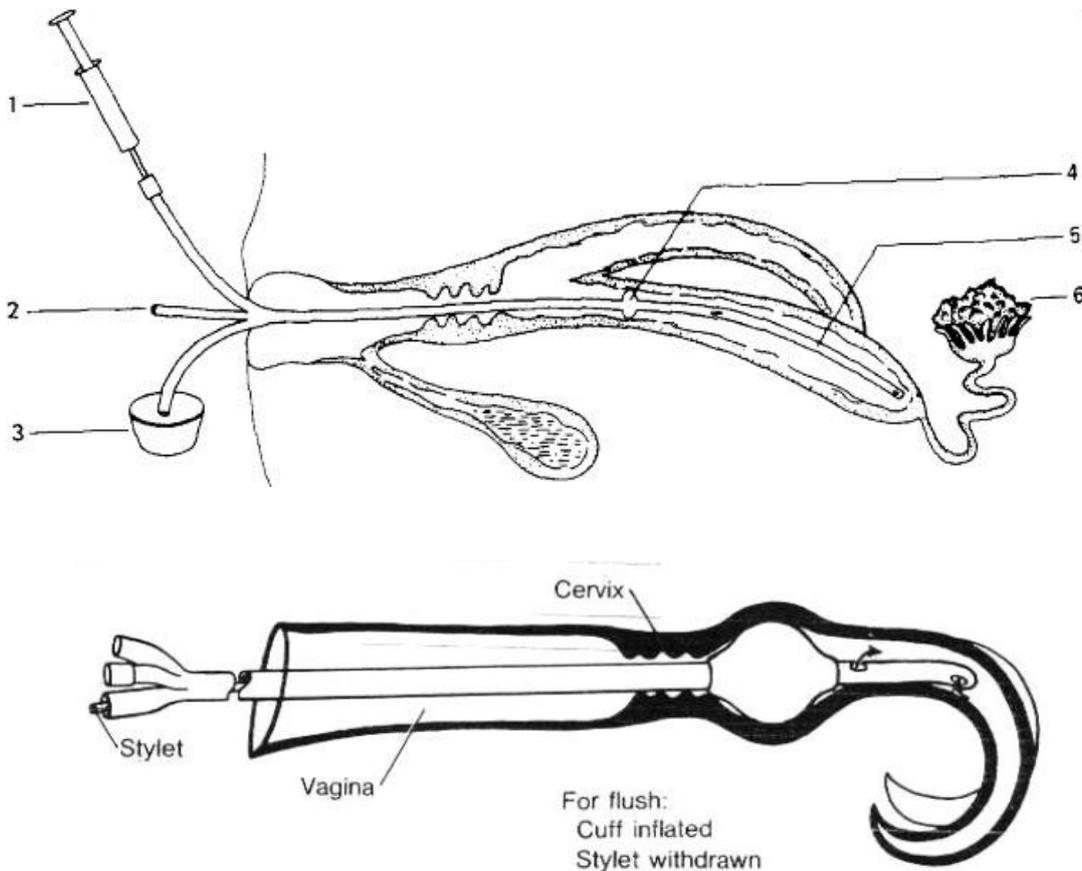
Gli embrioni bovini discendono nell'utero circa 4 giorni e mezzo e perdono la zona pellucida tra l'8 e il 10 giorno dopo l'inizio dell'estro (considerato il giorno 0) di conseguenza il recupero non chirurgico degli embrioni viene effettuato tra il 6 e l'8 giorno.

Viene utilizzato un catetere a due vie misura in F16-24 con un palloncino gonfiabile di 30 millilitri. Il catetere ha due vie; un canale per il gonfiaggio della cuffia ed un canale singolo per l'ingresso e l'uscita del liquido di lavaggio. Viene inoltre utilizzato uno stiletto sterile inserito per tutta la lunghezza del catetere per renderlo sufficientemente rigido e permettere l'introduzione nell'utero attraverso la manipolazione trans-rettale.

La donatrice viene mantenuta in un travaglio; gli animali nervosi possono essere sedati con 5 o 10 mg di acepromazina oppure un altro sedativo. Le feci vengono rimosse dal retto per evitare l'aspirazione di aria e viene stimato il numero delle ovulazioni mediante palpazione e/o ecografia trans-rettale. Si effettua un'anestesia epidurale di 4 o 6 millilitri di lidocaina al 2% per prevenire la defecazione e le spinte rettali; possono essere sedati con anestesia epidurale con una combinazione di xilazina 30 mg e soluzione fisiologica per un totale di 7 millilitri. Gli Zebu sono maggiormente sensibili all'azione della xilazina e devono ricevere soltanto 20 mg in una sufficiente quantità generalmente 7 millilitri di soluzione fisiologica l'aria può essere rimossa dal retto con un tubo una sonda gastrica attaccata a una pompa per aspirazione.

La vulva il perineo vengono lavate con acqua e asciugate la coda viene legata se la cervice è piccola e tortuosa si può utilizzare un dilatatore cervicale ed una pinza cervicale per allargare e tirare il canale cervicale. Gli strumenti devono essere coperti con una guaina sanitaria prima di essere introdotti nella

vagina questa guaina protettiva viene perforata appena prima che gli strumento entri nel canale cervicale esterno. Il dilatatore cervicale, rigido e appuntito, dev'essere utilizzato con estrema attenzione perché può facilmente perforare la parete uterina quando viene spinto con forza attraverso il canale cervicale. Le labbra della vulva sono dilatate e il catetere con lo stiletto vengono inseriti nella vagina e fatti avanzare nel lume della cervice successivamente viene manipolato nel corno uterino fino a che il palloncino non viene posizionato alla base del corno uterino il pallone e quindi gonfiato lentamente con 15-20 millilitri di aria o di soluzione di lavaggio o 10-15 millilitri di aria nelle manze.



L'endometrio può essere facilmente danneggiato dall'iperdistensione il che risulta in un'emorragia e nella fuoriuscita della soluzione di lavaggio nel mesometrio dal quale non può essere recuperato.

Quando il catetere è in posizione lo stiletto viene rimosso e il catetere viene connesso attraverso una giunzione a y con tubi sterili alla sacca del medium di lavaggio di un litro. La rimanente porzione della giunzione a y viene connessa a una parte libera di tubi connessa ad un filtro per embrioni. Il flusso del liquido di lavaggio nel sistema di tubi è controllato da pinze (mollette) a facile rilascio. Quando il tubo esterno è chiuso la soluzione di lavaggio entra l'utero per gravità. Il corno dell'utero

viene esteso alzando la giunzione utero tubarica e spostandolo anteriormente; quando il flusso interno si ferma i tubi vengono chiusi e viene aperto il tubo di fuoriuscita il fluido viene canalizzato direttamente dentro un filtro per embrioni con i pori dal diametro di 75 micrometri.

Negli animali più anziani e con utero pendulo la manipolazione della cervice e dell'utero può essere facilitata dalla retrazione della cervice nella vagina con pinze cervicali. Se il fluido di recupero è rossastro i globuli rossi possono essere lavati attraverso il filtro attraverso l'apertura di entrambe le mollette tra la bottiglia della soluzione di lavaggio e del filtro. Il filtro non deve mai essere lasciato secco esponendo gli embrioni all'aria.

Negli animali sottoposti a superovulazione la procedura viene ripetuta per il corno opposto utilizzando un altro catetere sterile. E' molto pericoloso inserire lo stiletto nel catetere mentre si trova nell'utero perché la punta appuntita può utilizzare può uscire da una delle aperture e perforare la parete uterina. Alcuni operatori preferiscono posizionare il catetere con il palloncino appena anteriormente all'ostio cervicale interno nel corpo dell'utero; questo permette di lavare i due corni contemporaneamente. Negli animali più anziani il palloncino è frequentemente si sposta dalla base del Corno in questa posizione.

La soluzione più frequentemente utilizzata per il recupero degli embrioni è il PBS al quale vengono aggiunti 10 ml di siero bovino trattato termicamente. Il PBS può essere utilizzato a temperatura ambiente. Il siero è una fonte di proteine per la crescita dell'embrione e la stabilizzazione delle membrane. Inoltre rende l'embrione meno appiccicoso. Al posto del siero può essere utilizzato lo 0.04% di BSA (albumina sierica bovina) per il liquido di lavaggio e lo 0,4 % per il medium di mantenimento. Può essere aggiunto al liquido di lavaggio il 10 o il 20% di siero per creare un medium di mantenimento. Il medium di lavaggio deve essere sterilizzato attraverso filtrazione tramite un filtro da 22 micrometri bisogna utilizzare solamente siringhe senza silicone.

Le piastre di mantenimento dovevano essere coperte per minimizzare la contaminazione e l'evaporazione. Cambiare le piastre o il medium ogni due ore (negli embrioni mantenuti) diminuisce l'effetto della contaminazione e dell'evaporazione del liquido. E fondamentale che venga effettuato un controllo qualità di ogni soluzione ed attrezzatura che viene in contatto con gli embrioni, per questo motivo è fortemente consigliato l'utilizzo di prodotti commerciali.

L'identificazione e valutazione degli embrioni è uno degli aspetti maggiormente difficili con i quali il praticante del trasferimento di embrioni, specialmente se principiante, deve confrontarsi.

La qualità degli embrioni e tecniche di manipolazione inadeguate possono inficiare le percentuali di gravidanza. Una volta rimossi dall'ambiente protettivo dell'utero gli embrioni devono essere

maneggiati con cura in relazione a: temperatura, pH, osmolarità, contaminazione e da tutti i fattori che possono influenzare la sua sopravvivenza.

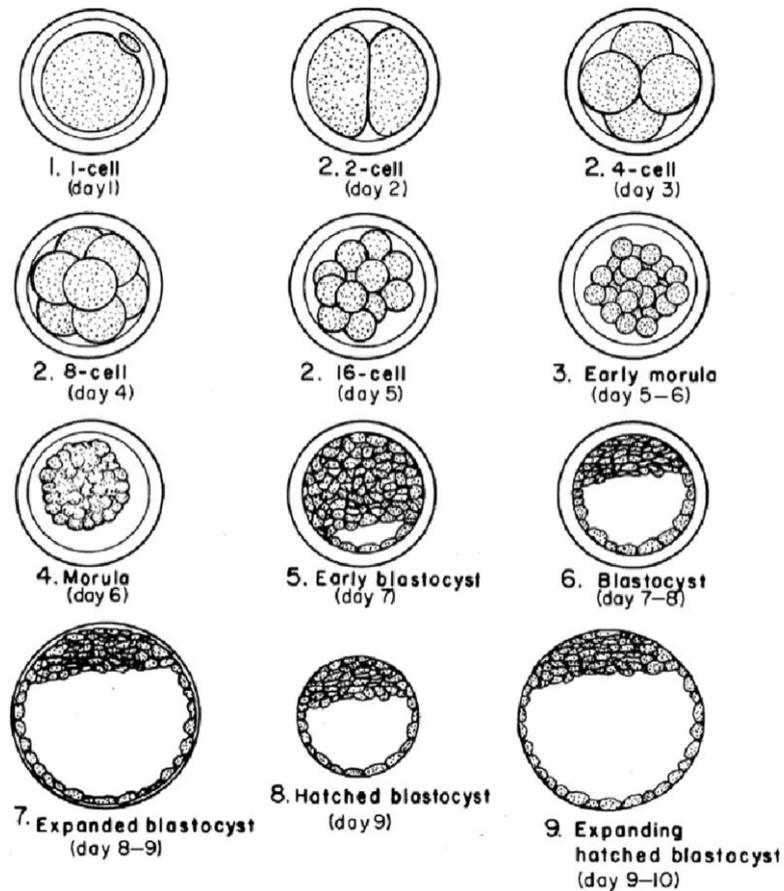
Gli embrioni dipendono completamente dal liquido di mantenimento; possono essere mantenuti a temperatura ambiente per diverse ore senza che i tassi di gravidanza riducano anche se il mantenimento degli embrioni in incubatori portatili con temperatura controllata sono raccomandati per il trasporto a lunghe distanze. I tassi di gravidanza non risultano compromessi se gli E. sono mantenuti a queste temperature per 12 o 24 ore. Tuttavia, temperature superiori a 39 °C sono deleterie. Il range fisiologico del pH per gli embrioni è da 7,1 a 7,3 quindi il pH del fluido di lavaggio e di mantenimento deve essere mantenuto in questo range.

Anche piccoli cambiamenti nella concentrazione di soluti (l'osmolarità) possono ridurre significativamente la sopravvivenza degli embrioni di conseguenza se il PBS viene preparato da una preparazione in pastiglie o polvere bisognerà fare molta attenzione nell'aggiungere la giusta quantità e qualità di acqua. L'osmolarità del fluido uterino è tra 270 e 300 milli-osmoli. L'esposizione dell'embrione ai raggi ultravioletti per un periodo prolungato può causare la morte cellulare; dev'essere evitato l'utilizzo di insetticidi nella stanza di embriologia. L'insufficiente areazione dopo aver utilizzato l'ossido di etilene per la sterilizzazione dell'attrezzatura è deleteria per le cellule.

La valutazione degli embrioni nel liquido di lavaggio uterino è basata dall'identificazione di diverse caratteristiche morfologiche utilizzando microscopio ottico.

L'embrione è di forma sferica è composto da cellule (blastomeri) circondati da una capsula simile a gelatina chiamata zona pellucida. La zona pellucida assolve ad una serie di funzioni fino a che l'embrione non fuoriesce da essa ed è quindi un chiaro segno identificativo degli embrioni. La ZP è sferica e traslucida e quindi è facilmente distinguibile dai residui cellulari. A causa della sua forma l'embrione tende a precipitare sulla base della piastra di ricerca

Il diametro degli embrioni bovini è compreso tra 150 e 180 micrometri ( $\mu\text{m}$ ) incluso lo spessore della zona pellucida di 12 o 15 micrometri. Il diametro rimane costante fino a quando non comincia l'espansione della blastocela il colore della morula è della blastocisti inoltre facilita l'identificazione poiché l'embrione è generalmente più scuro degli altri detriti uterini. Conoscere l'età degli embrioni quindi il numero dei giorni dopo l'inizio dell'estro è inoltre importante per localizzare l'embrione nella piastra di ricerca. La blastocisti completamente espansa possiede una zona pellucida più traslucida.



In sostanza criteri più importanti di identificazione degli embrioni sono la forma dell'embrione la presenza di una zona pellucida la dimensione il colore e la conoscenza dell'età degli embrioni. Durante lo sviluppo embrionale il numero delle cellule aumenta in maniera regolare fino allo stadio di 16 cellule. Dopodiché la divisione cellulare diventa asincrona e ciascuna cellula possiede il suo proprio ciclo cellulare. Le cellule che compongono gli embrioni sono chiamate blastomeri e sono facilmente identificate fino a allo stadio di 16 cellule come cellule sferiche; dopo lo stadio di 32 cellule la morula l'embrione va incontro alla compattamento come risultato le cellule individuali nell'embrione sono difficili da identificare come risultato le cellule sono difficili da individuare la manifestazione morfologica maggiormente evidente durante il compattamento e la perdita di un bordo cellulare e l'embrione si sviluppa l' iner cell mass (massa cellulare interna) mentre il trofodectoderma comincia a crescere per formare l'ectoderma corionico della placenta.

Una volta che viene identificato un embrione nella piastra di ricerca questo viene immediatamente trasferito in una piastra più piccola contenente soluzione di mantenimento "fresca" e sterile. Embrioni possono essere classificati semplicemente come trasferibili e non trasferibili e possono essere segnati sul coperchio della piastra per permettere il riconoscimento del numero totale degli embrioni recuperati. Gli E. vengono quindi lavati in serie, in almeno tre differenti piastre contenenti soluzione

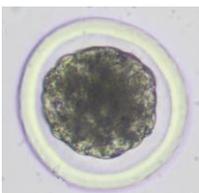
sterile, utilizzando una pipetta sterile per ogni passaggio. Alla fine vengono trasferiti in una piastra dove aspetteranno per il trasferimento o per il congelamento. In alcune circostanze, come ad esempio l'esportazione, gli embrioni devono essere lavati attraverso dieci differenti piastre contenenti medium sterile ed esposte alla tripsina.

Le piastre devono essere mantenute coperte per evitare contaminazione e anche evaporazione quando poste in incubatore. L'evaporazione di piccoli volumi di medium in una piastra crea soluzioni ipertoniche dannose per gli embrioni.

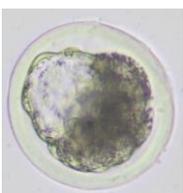
Gli embrioni raccolti tra 5 e 8 giorni dopo l'estro sono classificati morfologicamente nei seguenti gruppi. A seconda dello stadio di sviluppo la valutazione richiede lo spostamento degli embrioni sul fondo della piastra. **Nella morula** i blastomeri sono di forma rotondeggiante e non sono strettamente connessi l'uno all'altro blastomeri individuali sono difficili da distinguere l'uno dall'altro la massa dell'embrione occupa la maggior parte dello spazio perivitellino.



Nella **Morula compatta** che nella parte più esterna è leggermente ondulata a causa della sua compattezza i blastomeri individuali non sono facilmente distinguibili la massa dell'embrione occupa da 60 il 70% dello spazio perivitellino

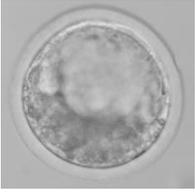


**Giovane blastocisti:** comincia identificarsi uno spazio trasparente che contiene fluido quest'aria è l'inizio della blastocele l'embrione occupa il 70 all 80% dello spazio perivitellino

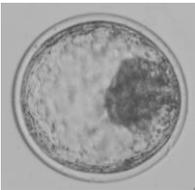


**Blastocisti:** la cavità blastocele occupa il 70% del volume dell'embrione si riconoscono due gruppi di cellule che sono riconoscibili come lo strato del trofoblasto che si trova sotto la zona pellucida e

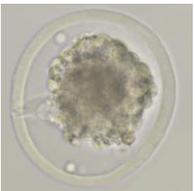
l'inner cell mass che occupa una parte dell'embrione. Lo spazio perivitellino può essere visibile ma è molto piccolo.



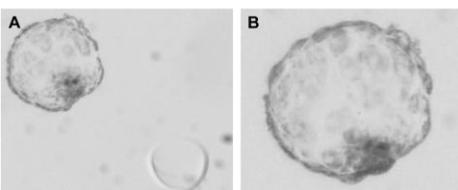
**Blastocisti in espansione o espansa:** non c'è più spazio perivitellino tra lo strato delle cellule trofoblastiche e la zona interna della zona pellucida. La zona pellucida diventa più sottile man mano che la blastocisti si espande, si osserva una piccola e molto compatta Inner Cell Mass posizionata da un lato dell'embrione. Il colore dell'embrione è chiaro a causa del grande quantitativo di fluido presente al suo interno.



**Blastocisti collassata** c'è uno spazio per il vitellino con una zona pellucida molto sottile la blastocisti può essere parzialmente collassata con una piccola blastocele cavità o completamente collassata e con l'apparenza di una morula compatta



**Blastocisti espansa:** alla fine la blastocisti si espande al punto di rottura e l'embrione esce dalla zona liscata. La blastocisti espansa può essere sferica con un blastocele ben definita o può essere collassata e quindi somigliante a detriti. L'identificazione degli embrioni a questo stadio può essere difficile per l'operatore inesperto quando vengono raccolte blastocisti espansa e c'è un grande rischio di danneggiamento dovuta la manipolazione.



Inoltre le blastocisti espanse sono appiccicose possono aderire alla vetreria o ai tubi. Non bisogna utilizzare filtri per embrioni quando c'è la possibilità di recuperare embrioni e blastocisti espanse quindi dopo 7 giorni e mezzo dall'estro.

Gli embrioni quindi possono essere classificati secondo la qualità a seconda dell'apparenza morfologica quindi eccellenti buoni discreti e scarsi solo gli eccellenti o i buoni possono essere congelati.

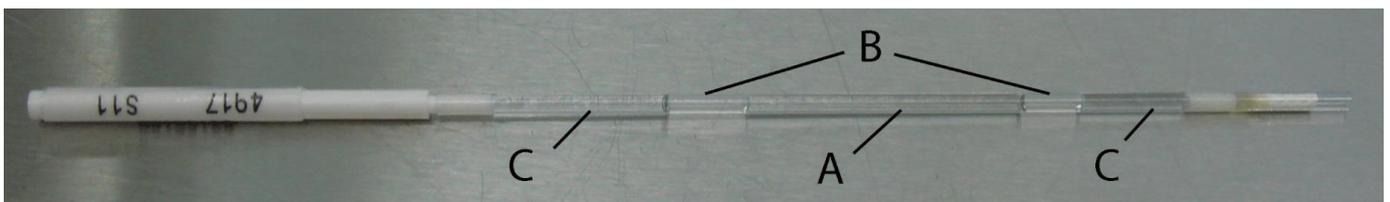
Codice 1: Eccellente o buono, la massa dell'embrione deve essere simmetrica e sferica e i blastomeri devono essere uniformi in dimensione colore e densità. L'embrione è adeguato a quella che è la sua età si presentano irregolarità minime e l'85% della massa delle cellule rappresentata deve essere di forma intatta. La zona pellucida dev'essere liscia e non avere concavità o irregolarità.

Codice 2: Discreto, moderate irregolarità nella forma della massa embrionale o nelle dimensioni nel colore o nella densità delle cellule individuali almeno il 50% del materiale deve essere costituito da una massa di cellule embrionali.

Codice 3: Scarso, maggiori irregolarità nella forma nella dimensione o nel colore o nella densità delle cellule almeno il 25% del materiale cellulare deve essere costituito da Massa embrionale intatta e viva.

Codice 4: morto o degenerato, embrioni in degenerazione ovociti o embrioni ad una cellula sono invitato

Prima del trasferimento non chirurgico gli embrioni sono caricati individualmente in paillettes da 0,25 ml. L'embrione è aspirato dalla piastra di mantenimento nella paillette con l'aiuto di una siringa da 1 ml attaccata ad un lato della paillette. All'inizio si aspira una colonna di 3 cm di medium, successivamente mezzo cm di una colonna d'aria quindi 3 cm di colonna di medium contenente l'embrione seguito da un'altra bolla d'aria. La rimanenza della paillette è riempita con il Medium a fino a che il medium non bagna lo stantuffo di cotone.



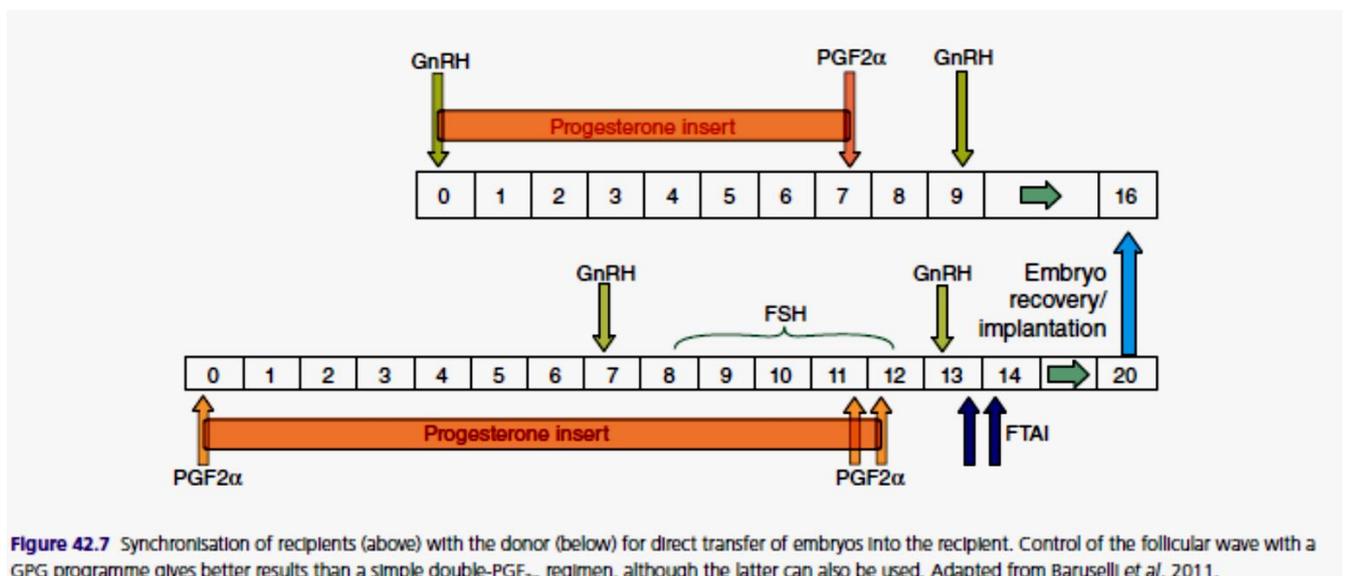
## Gestione e sincronizzazione delle riceventi

Le riceventi devono essere vacche adulte, mature, giovani vacche o manze in buone condizioni corporee. Devono essere stati osservati almeno due cicli estrali prima che vengano sincronizzate con prostaglandine o che vengano selezionate. Nei programmi di trasferimento embrionale selezionate è comune sovrastimare la quantità delle riceventi. Le riceventi e il loro mantenimento costituiscono il maggiore costo in un programma commerciale di trasferimento di embrioni. Bovine scartate da un allevamento, animali in scarse condizioni e animali nel primo periodo post-partum non possono essere utilizzate come riceventi. Le riceventi non devono essere grasse e devono ingrassare massimo 0,1-0,2 kg al giorno; devono inoltre essere vaccinate per le principali malattie abortigene.

Le riceventi sincronizzate possono essere prodotte in tre modi:

Selezione da un grande pool di animali che ciclano (considerato che normalmente il 5% di una mandria dovrebbe essere in calore in un giorno qualsiasi).

I cicli estrali di riceventi possono essere sincronizzati con prostaglandine o suoi analoghi o con dispositivi rilascianti di progesterone intravaginale per presentare il calore lo stesso giorno o al massimo il giorno dopo la donatrice.



L'importanza della sincronizzazione tra l'età e lo stadio di sviluppo dell'embrione e lo Stato endocrino dell'endometrio della recipiente deve essere enfatizzato. I tassi di gravidanza a seguito di embryo transfer sono migliori quando la ricevente è in Estro da 36 ore prima a 12 ore dopo la donatrice

La media delle donatrici bovine superovulate fornisce da 6 a 8 embrioni trasferibili di conseguenza 8 recipienti riceventi è il numero ragionevole da preparare. Quando vengono palpate le riceventi con i corpi lutei bisogna palpare circa 12 riceventi per identificare almeno 8 con corpi lutei attivi. Considerato che non tutte le donatrici rispondono al trattamento superovulatorio o forniscono embrioni trasferibili per un'efficienza ottimale due o quattro donatrici devono essere superovulate allo stesso tempo il che permette di suddividere le riceventi preparate per evitare spiacevoli sorprese quando si prepara una sola donatrice

Talvolta è difficile localizzare identificare un corpo luteo al momento del trasferimento in una ricevente sincronizzata. L'ecografia può aiutare l'identificazione di un corpo luteo di 12 mm o un corpo luteo concavità con almeno 3 mm di tessuto luteale che circonda la cavità centrale. Non tutte le riceventi devono essere esaminate con l'ecografo ma se c'è il dubbio la presenza del corpo luteo deve essere confermata mediante ecografia.

Gli embrioni vengono normalmente trasferiti 7 giorni dall'inizio dell'estro, le riceventi non gravide e occasionalmente anche le gravide mostreranno l'estro 14 giorni dopo il trasferimento: questi animali possono essere esaminati tramite palpazione trans-rettale, valutazione del progesterone o ecografia per confermare la presenza di un calore vero e l'assenza del corpo luteo.

L'identificazione precoce delle riceventi non gravide permette un'efficiente ed economico riutilizzo degli animali. Delle vacche diagnosticate gravide utilizzando l'ecografia a 28 giorni dopo l'inseminazione artificiale il 13,5% vai incontro riassorbimento embrionale precoce entro i 50 giorni dal trasferimento di conseguenza le vacche che sono state determinate gravide a 28 giorni di gestazione da ecografia devono essere riesaminate 60 giorni dopo. Questo inoltre è un ottimo periodo per effettuare il sessaggio fetale (tra i 55 e i 70 giorni).

Gli embrioni vengono trasferiti direttamente attraverso la cervice in maniera simile alla fecondazione artificiale. E' molto importante ridurre le contaminazioni dell'utero poiché questo è molto più suscettibile alle infezioni durante la fase luteale. Vengono rimosse le feci dal retto e viene determinato l'ovaio che contiene il corpo luteo; si può effettuare un'anestesia epidurale per prevenire le spinte e la defecazione. Si lava l'area perineale e si asciuga la vulva. La paillette viene inserita sulla pistola per il trasferimento e tagliata. Si utilizza una guaina sanitaria sulla pistola e si aggiunge una camicia sanitaria in plastica morbida. Si inserisce la pistola in vagina e quando viene posta la punta sull'ostio cervicale esterno della cervice si rompe la guaina di plastica prima che la pistola venga inserita nel canale cervicale e gentilmente nel corpo uterino dal lato del corpo luteo. L'embrione viene quindi

depositato delicatamente ad un terzo della via del corno uterino ipsilaterale al corpo luteo e la pistolette viene estratta lentamente.

E' stata dimostrata una correlazione negativa tra il tempo speso per la manipolazione della cervice e del corno uterino ed i tassi di gravidanza. Inoltre, i traumi al delicato endometrio, che determinano la presenza di sangue sono embriocidi. L'insuccesso è spesso inizialmente determinato dalla mancata praticità ed i tassi di gravidanza migliorano con l'esperienza.

È una pratica comune trattare le donatrici con prostaglandine dopo la raccolta degli embrioni. Le ovaie infatti sono generalmente molto allargate dal numero eccessivo di corpi lutei. Il trattamento con prostaglandine non solo ridurrà le dimensioni delle ovaie ma terminerà qualsiasi gravidanza indesiderata nel caso in cui siano rimasti degli embrioni nell'utero. E' è preferibile non inseminare la vacca nel calore determinato dalle prostaglandine inoltre il calore indotto avrà un effetto sulla salute uterina nel caso in cui si sia verificata una contaminazione al momento della raccolta degli embrioni.

Le vacche possono essere super ovulate 3 volte ad intervalli di circa due mesi, senza nessuna riduzione del tasso di recupero degli embrioni.

Le riceventi gravide vengono gestite come le altre vacche gravide. Devono essere evitati gli eccessivi ingrassamenti. Quando le riceventi hanno raggiunto 21/24 giorni del loro ciclo quindi (14-17 giorni dopo il trasferimento dell'embrione (a 7 giorni dall'estro) può essere effettuata una diagnosi di gravidanza sulla base della palpazione del corpo luteo o sulla misurazione del progesterone (Siero o latte). Il conceptus può essere identificato tramite ecografia il giorno 26 o 27. La diagnosi gravidanza definitiva viene effettuata a 5 settimane dal trasferimento e viene ulteriormente confermata a tre mesi dalla palpazione trans-rettale.

Il congelamento degli embrioni offre importanti vantaggi economici e pratici.

Innanzitutto poiché normalmente due o più donatrici vengono superovulate e lavate allo stesso tempo per cui ci può essere un eccesso di embrioni per il numero di riceventi disponibili. Inoltre quando il numero delle riceventi preparate eccede il numero degli embrioni freschi possono essere utilizzati embrioni congelati e scongelati piuttosto che mantenere un elevato numero di riceventi non gravide per un lungo periodo di tempo. Gli embrioni congelati possono essere venduti direttamente dal proprietario della donatrice evitando la spedizione delle riceventi gravide. L'importazione e l'esportazione di embrioni congelati è un'importante metodo di controllo delle patologie.

Le maggiori conseguenze fisiche e chimiche del congelamento sono la rimozione dell'acqua che risulta nella formazione di cristalli e nell'incremento della concentrazione dei soluti. Questi processi sono influenzati dal tipo di soluzione di congelamento dal osmolarità e dal pH così come dalla velocità di

raffreddamento. Gli embrioni vengono danneggiati dalla formazione di cristalli, dalla concentrazione di ioni e dall'interazione tra questi due fattori fisici di conseguenza vengono utilizzati crioprotettori che normalmente sono piccole molecole che penetrano nelle cellule come il glicerolo o il glicole etilenico oppure crioprotettori che non penetrano nelle cellule (molecole di peso molecolare superiore) come il sucrosio.

Il primo requisito di successo per ogni metodo di congelamento è la selezione di embrioni di qualità 1 le morule stadio avanzato e le blastocisti hanno il maggior tasso di sopravvivenza gli embrioni di qualità inferiore normalmente hanno già un numero di cellule morte e di conseguenza un numero insufficiente di cellule che possono sopravvivere il processo di congelamento. Gli embrioni devono essere congelati entro tre o quattro ore dopo il recupero.