

INDICE

RIPRODUZIONE NEI RUMINANTI

<u>CONFRONTO TRA GnRH ED hCG PER LA TERAPIA DELLE CISTI OVARICHE NELLA BOVINA DA LATTE</u> <i>Mollo A., Tramontano A., Stelletta C., Cairoli F.</i>	Pag. 1
<u>TERAPIA DELLE CISTI FOLLICOLARI DELLA BOVINA CON GnRH ASSOCIATO A CALCIO E NALOXONE PER VIA EPIDURALE</u> <i>Cinone M., Coronati D., Minoia G., Guaricci A.C., Minoia R., De Cosmo A.M., Robbe D.</i>	4
<u>CISTI FOLLICOLARI NELLA BOVINA: SOMMINISTRAZIONE DI LECIRELINA PER VIA EPIDURALE E VALUTAZIONE DELLA RENINA E DELLA VASCOLARIZZAZIONE OVARICA</u> <i>Manca R., Minoia G., Spedicato M., Mutinati M., Rizzo A., Sciorsci R.L.</i>	7
<u>COLLASSO PUERPERALE NELLA BOVINA: TERAPIA CON CALCIO/NALOXONE E DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI ACETILCOLINA</u> <i>Minoia G., Ceci E., Manca R., Spedicato M., Mutinati M., Roscino M.T., Rizzo A., Sciorsci R.L.</i>	10
<u>EFFETTI IN VITRO DEL ROSIGLITAZONE, UN ANTAGONISTA PPARγ, SULLA CONTRATTILITÀ DI MIOMETRIO BOVINO</u> <i>Spedicato M., Cosola C., Minoia G., Valentini L., Masciopinto V., Manca R., Rizzo A., Sciorsci R.L.</i>	14
<u>LIVELLI DI OSSIDO NITRICO IN GRAVIDANZA. STUDIO PRELIMINARE SULLA BOVINA DA LATTE</u> <i>Minoia R., Pavone L., Bozzo G., Aiudi G.</i>	17
<u>CONSERVAZIONE IN SITU DEL GERMOPLASMA DELLA RAZZA TAURINA SOMBA: PRIME ESPERIENZE DI RACCOLTA E VALUTAZIONE DEL MATERIALE SEMINALE</u> <i>Semita C., Trucchi G., Nervo T., Codjia V., Gbaguidi Alia M., Cristofori F.</i>	20
<u>FREEMARTINISMO OVINO: VARIAZIONI STAGIONALI DELLA TESTOSTERONEMIA E DEL COMPORTAMENTO</u> <i>Zedda M.T., De Amicis I., Rosati I., Bogliolo L., Ledda S., Santucciu C., Fois S., Carluccio A.</i>	23
<u>INDICI DI CORRELAZIONI TRA PARAMETRI DI MONITORAGGIO DEL PERIODO ESTRALE DI PECORE DI RAZZA SARDA</u> <i>Mayorga Munoz I.M., Stelletta C., Masia F., Mara L., Romagnoli S., Dattena M.</i>	26
<u>INDUZIONE E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ GONADICA IN BECCHI TRATTATI CON GnRH E CALCIO E NALOXONE E CONSEGUENTE FERTILITÀ NELLE CAPRE</u> <i>Binetti F., Aiudi A., Matarrese R., Guaricci A.C., Minoia R., Lacalandra G.M.</i>	29

RIPRODUZIONE NELLA SPECIE CANINA E FELINA

<u>IMPIEGO DEL VACCINO CONTRO HERPESVIRUS CANINO IN ALLEVAMENTI DI CANI: RISULTATI PRELIMINARI</u> <i>Rota A., Milani C., Mollo A.</i>	32
<u>RILIEVI ECOTOMOGRAFICI ED ISTOPATOLOGICI A CARICO DELLE GONADI MASCHILI IN CORSO DI IPOTIROIDISMO PRIMARIO CANINO: DESCRIZIONE DI UN CASO CLINICO</u> <i>Di Loria A., Maccauro M., Prisco M., Cortese L.</i>	35
<u>CORRELAZIONE TRA PROGESTERONEMIA E RESISTENZA ELETTRICA DEL MUCO VAGINALE DURANTE IL CICLO ESTRALE: NUOVE PROSPETTIVE NELLA GESTIONE DELLA RIPRODUZIONE CANINA</u> <i>Sica A., Cocchia N.,</i>	38

<i>Abbronzino I., Russo M., Tortora G.</i>	
<u>PROGESTERONEMIA PERIOVULATORIA E PREVISIONE DELLA DATA DEL PARTO NELLA CAGNA</u> <i>Groppetti D., Pecile A.M., Cremonesi F.</i>	41
<u>DOSAGGIO DEL PROGESTERONE EMATICO PER IL MONITORAGGIO DELL'OVULAZIONE NELLA CAGNA: CONFRONTO FRA METODICHE RIA, ELISA E CLIA</u> <i>Robbe D., Tosi U., Valentini L., De Amicis I., Contri A., Carluccio A.</i>	44
<u>UN VERO CASO DI PROLASSO VAGINALE NELLA CAGNA IN FASE ESTRALE</u> <i>Ferrari L., Bigliardi E., Parmigiani E., Morini G., Bresciani C., Di Ianni F., Di Ciommo F.</i>	47
<u>PROLASSO VAGINALE IN GRAVIDANZA NELLA CAGNA</u> <i>Rosati I., Zedda M.T., Ledda S., Bogliolo L., Ariu F., Pau S.</i>	50
<u>PROPOSTA DI "GRADING" PER LA VALUTAZIONE CLINICA DELLA CAGNA AFFETTA DAL COMPLESSO IPERPLASIA CISTICA ENDOMETRIALE PIOMETRA (ICE-P)</u> <i>Bigliardi E., Parmigiani E., Morini G., Ferrari L., Di Ianni F., Bresciani C., Vecchi I.</i>	53
<u>EFFETTI IN VITRO DELL'OMOCISTEINA SULLA CONTRATTILITÀ UTERINA DELLA CAGNA</u> <i>Cosola C., Trisolini C., Spedicato M., Minoia G., Manca R., Mutinati M., Rizzo A., Sciorsci R.L.</i>	57
<u>INFERTILITÀ NEL CANE MASCHIO: EFFETTI DELL'ALLOPURINOLO SULLA SPERMATOGENESI E SUL METABOLISMO DEL TESTOSTERONE</u> <i>Cassata R.B., Zarbo P., Iannuzzi A.</i>	60
<u>MONITORAGGIO ECOGRAFICO IN CANI VASECTOMIZZATI PER VIA LAPAROSCOPICA</u> <i>Russo M., Cozzolino A., Spada A., Tortora G., Catone G.</i>	63
<u>ANALISI COMPUTERIZZATA E METODICA CLASSICA A CONFRONTO PER LA VALUTAZIONE DI MATERIALE SEMINALE CANINO REFRIGERATO SECONDO DIVERSI PROTOCOLLI</u> <i>Ponzio P., Semita C., Nervo T., Sferlazzo A.</i>	66
<u>SERTOLIOMA CON SINDROME FEMMINILIZZANTE E TORSIONE DEL FUNICOLO SPERMATICO IN DUE CANI CRIPTORCHIDI</u> <i>Quartuccio M., Garufi G., Barna A., Di Pietro M., Marino G., Zanghì A., Cristarella S.</i>	70
<u>SOMMINISTRAZIONE QUINDICINALE DELLA VINCRISTINA PER IL TRATTAMENTO DEL TUMORE VENEREO TRASMISSIBILE DEL CANE</u> <i>Marino G., Barna A., Quartuccio M., Cristarella S., Ajello A., Zanghì A.</i>	73
<u>INFLUENZA DEL DILUITORE E DELLA TEMPERATURA SULLA CONSERVAZIONE A BREVE TERMINE DELLO SPERMA DI GATTO</u> <i>Zambelli D., Cunto M., Merlo B.</i>	76
<u>OVULAZIONE INDOTTA NELLA GATTA MEDIANTE SOMMINISTRAZIONE INTRANASALE DI GnRH</u> <i>De Sandro Salvati A., Aiudi G., Cinone M.</i>	79
RIPRODUZIONE NELLA SPECIE EQUINA	
<u>RIPRESA DELLA CICLICITÀ NELLA CAVALLA IN TRANSIZIONE PRIMAVERILE TRAMITE SOMMINISTRAZIONE DI UN ANTAGONISTA DELLA DOPAMINA O DI UN PROGESTINICO: RISULTATI SPERIMENTALI E CLINICI</u> <i>Panzani D., Marmorini P., Zicchino I., Rota A., Vannozzi I., Crisci A., Camillo F.</i>	82
<u>IMPIEGO DI SEME SESSATO NELLA SPECIE EQUINA: RISULTATI PRELIMINARI</u> <i>Mari G., Rizzato G., Iorio F., Iacono E., Bucci D., Galeati G., Spinaci M.</i>	85
<u>STUDIO DELLA VASCOLARIZZAZIONE TESTICOLARE DELLO STALLONE</u>	88

<u>MEDIANTE ECO COLOR DOPPLER: RISULTATI PRELIMINARI</u>	<i>Zelli R.</i>	
<u>EFFETTI DEL SODIO DODECIL SOLFATO SULLA CRIOCONSERVABILITÀ DELLO SPERMA EQUINO</u>	<i>Ranzenigo G., Gambarotta L., Pecile A. M., Cremonesi F.</i>	91
<u>VALUTAZIONE MORFOMETRICA COMPUTERIZZATA DELLA TESTA DEGLI SPERMATOZOI DI STALLONE</u>	<i>Acierno C., Peretti V., Ciotola F., Lorizio R.</i>	94
<u>VALUTAZIONE DEL SEME E DEGLI ORMONI STEROIDEI IN STALLONI CON ASTENOSPERMIA GRAVE TRATTATI CON CALCIO E NALOXONE</u>	<i>Nicassio M., Matarrese R., Aiudi G., De Sandro Salvati A., Maggi A., Lacalandra G.M.</i>	97
<u>EFFICIENZA RIPRODUTTIVA DI CAVALLE TRATTATE CON INFUSIONE ENDOUTERINA DOPO FECONDAZIONE STRUMENTALE ED OVULAZIONE</u>	<i>Parmigiani E., Bigliardi E., Morini G., Di Ianni F., Bresciani C., Ferrari L., Vecchi I., Buddemejer I., Di Ciommo F.</i>	100
<u>CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE DELLA PLACENTA A TERMINE NELL'ASINA DI MARTINA FRANCA</u>	<i>Carluccio A., Panzani S., Riccaboni P., Contri A., Rondena M., Veronesi M.C.</i>	103
<u>INFLUENZA DELLA STAGIONE E DEL DILUITORE SULLA CONSERVABILITÀ DEL MATERIALE SEMINALE ASININO REFRIGERATO</u>	<i>Contri A., Tosi U., De Amicis I., Veronesi M.C., Panzani S., Carluccio A.</i>	106
RIPRODUZIONE IN ALTRE SPECIE		
<u>INQUINAMENTO DI URINE NEL SEME CUNICOLO</u>	<i>Macchia G., Cocchia N., Paino S., Silvestre F., Mangano N., Boni R.</i>	109
<u>INDAGINI ECOGRAFICHE IN CORSO DI GRAVIDANZA NEL CONIGLIO NANO: STUDIO PRELIMINARE</u>	<i>Gelli D., Mollo A., Stelletta C., Falomo M., Milani C., Tramontano A., Romagnoli S.</i>	112
<u>VALUTAZIONE DELLA TESTOSTERONEMIA DOPO TEST DI STIMOLAZIONE CON GnRH IN ESEMPLARI ADULTI DI ORSO NERO ASIATICO (Ursus thibetanus)</u>	<i>Gelli D., Aiudi G., Laricchiuta P., Ferrari V., Bucci F.A., Lacalandra G.M., Romagnoli S.</i>	115
<u>TECNICA DELL'HACKING E PROGRAMMI DI CONSERVAZIONE EX SITU DEL CAPOVACCAIO (NEOPHRON PERCNOPTERUS) IN ITALIA: NOTE PRELIMINARI</u>	<i>Ceccolini G., Cenerini A., Lacalandra G.M., Aebischer A., Andreotti A., Gustin M., Bedin M., Sigismondi A., Giacoia V., Bellini F., Barberio F., Costantini V.</i>	118
<u>VALUTAZIONE DEL LIQUIDO SEMINALE, REFRIGERAZIONE E INSEMINAZIONE ARTIFICIALE NEL COLOMBO VIAGGIATORE (Columba livia)</u>	<i>Costantini V., Nicassio M., Bucci F.A., Binetti F., Lacalandra G.M.</i>	121
<u>SESSAGGIO DEL GRILLAIO (Falco naumanni) MEDIANTE PCR RFLP DA PIUMA</u>	<i>Costantini V., Guaricci A.C., Inglese G., La Gioia G., D'Onghia T., Lacalandra G.M.</i>	124
<u>IMPIEGO DI DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI CPA E TEMPI DI ESPOSIZIONE PER LA VITRIFICAZIONE DI OOCITI IVM DI GATTO</u>	<i>Ariu F., Bogliolo L., Fois S., Rosati I., Zedda M.T., Pau S., Ledda S.</i>	127
<u>ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE MITOCONDRIALE IN OVOCITI DI CAGNA ESAMINATI AL PRELIEVO E DOPO MATURAZIONE IN VITRO</u>	<i>Valentini L., Iorga A.I., De Santis T., Ambruosi B., Leoci R., Caira M., Dell'Aquila M.E.</i>	130
<u>ESPRESSIONE DEL RECETTORE MU PER GLI OPIOIDI IN UTERO DI CAGNA IN PIOMETRA</u>	<i>Valentini L., Guaricci A.C., Caira M., Zarrilli A., Albrizio M.</i>	133
<u>CONFIGURAZIONE NUCLEARE, MICROFILAMENTI E GRANULI CORTICALI</u>		136

<u>COME ESPRESSIONE DELLA MATURITÀ NUCLEARE E CITOPLASMATICA IN OVOCITI COMPATTI EQUINI DOPO INIBIZIONE MEIOTICA CON ROSCOVITINA</u>	
<i>Lange Consiglio A., Arrighi S., Bosi G., Cremonesi F.</i>	
<u>ESPRESSIONE, LOCALIZZAZIONE E FUNZIONI DEL CALCIUM SENSING RECEPTOR (CaSR) IN OVOCITI EQUINI</u>	141
<i>De Santis T., Guerra L., Goudet G., Dalbiès-Tran R., Casavola V., Dell'Aquila M.E.</i>	
<u>STUDIO FUNZIONALE SUI CANALI VOLTAGGIO DIPENDENTI DI TIPO L NEGLI SPERMATOZOI EQUINI</u>	144
<i>Micera E., Surdo N., Nicassio M., Albrizio M., Zarrilli A.</i>	
<u>DISTRIBUZIONE MITOCONDRIALE IN OVOCITI UMANI IN RELAZIONE AL REGIME DI STIMOLAZIONE OVARICA CONTROLLATA</u>	147
<i>Ambruosi B., De Santis T., Iorga A.I., Cho Y.S., Dell'Aquila M.E.</i>	
<u>VALUTAZIONE STRUTTURALE DI SPERMATOZOI UMANI MEDIANTE BIRIFRANGENZA E IMPLICAZIONE SUGLI ESITI DELLA METODICA DI INIEZIONE INTRACITOPLASMATICA DELLO SPERMATOZOO (ICSI)</u>	150
<i>Filannino A., Dell'Aquila M.E., Gianaroli L., Ferraretti A.P., Magli M.C.</i>	
<u>SVILUPPO EMBRIONALE DI OOCITI DI OVINO DOPO ICSI: EFFETTO DELL'ATTIVAZIONE E DEL TRATTAMENTO DEL MATERIALE SEMINALE</u>	153
<i>Bogliolo L., Ariu F., Fois S., Rosati I., Zedda M.T., Pau S., Ledda S.</i>	

<u>GIORNATA DI STUDIO SU “STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELL’EFFICIENZA RIPRODUTTIVA NEGLI OVINI”</u>	156
<u>ASPETTI CLINICO PATOLOGICI DELL’ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA NELL’ARIETE</u> <i>Zedda M.T.</i>	158
<u>TECNOLOGIE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE: PRELIEVO, VALUTAZIONE E CONSERVAZIONE DEL MATERIALE SEMINALE</u> <i>Gallus M.</i>	163
<u>TECNOLOGIE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE: ESPERIENZE DI CAMPO IN SARDEGNA</u> <i>Petretto G.</i>	170
<u>TECNOLOGIE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE: INSEMINAZIONE ARTIFICIALE INTRAUTERINA ED EMBRYO TRANSFER NEI PICCOLI RUMINANTI: SVILUPPI TECNICI E POSSIBILITÀ APPLICATIVE NELLA PECORA DI RAZZA SARDA</u> <i>Rosati I.</i>	174
<u>DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE PIÙ FREQUENTI PATOLOGIE INFETTIVE CHE CONDIZIONANO LE PERFORMANCES RIPRODUTTIVE DELL’OVINO IN SARDEGNA</u> <i>Masala G.</i>	181
<u>INDAGINI ECOGRAFICHE DEL TRATTO RIPRODUTTIVO DELL’OVINO: METODOLOGIE E PROSPETTIVE APPLICATIVE</u> <i>Ledda S.</i>	184
<u>TECNOLOGIE RIPRODUTTIVE IN VITRO NEI PICCOLI RUMINANTI: SVILUPPI RECENTI E PROSPETTIVE APPLICATIVE</u> <i>Bogliolo L.</i>	188

CONFRONTO TRA GnRH ED hCG PER LA TERAPIA DELLE CISTI OVARICHE NELLA BOVINA DA LATTE
COMPARISON BETWEEN GnRH AND hCG FOR OVARIAN CYSTIC DISEASE TREATMENT IN DAIRY COWS

Mollo A., Tramontano A., Stelletta C., ¹Cairolì F., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova; ¹Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Milano*

Parole Chiave: Bovine da latte, Cisti ovariche, hCG, GnRH.
Key Words: Dairy cows, Ovarian Cysts, hCG, GnRH.

SUMMARY - The aim of this study was to compare the efficacy of GnRH and hCG treatment of ovarian cystic disease (COD) in dairy cows. Two groups animals were treated either with 20 µg of GnRH analogue (n=67) or with 10000 UI of hCG (n=50), in single im administration immediately after ultrasonographic diagnosis of COD. There were no significant differences in the percentage of cows showing estrus within 30 days from treatment, in conception rate at first AI and in average time between treatment and estrus in successfully treated cows. Hence GnRH remains the first choice treatment for COD due to its lower cost and reduced side effects.

INTRODUZIONE - La degenerazione cistica dell'ovaio rappresenta una delle più comuni patologie riproduttive del postpartum nella bovina da latte. Nonostante la ricaduta manageriale ed economica di questa patologia sia ben nota ed abbia prodotto nei decenni una importante letteratura, l'eziopatogenesi non può certo dirsi chiarita ed una azione preventiva mirata non è ancora possibile. La terapia resta quindi l'approccio più comune e sicuro per la gestione delle cisti ovariche. La definizione classica di cisti ovarica fa riferimento ad una struttura similfollicolare, anovulatoria, con un diametro >20 mm, persistente per almeno 7 giorni, in assenza di corpo luteo¹. La tradizionale classificazione delle cisti in follicoliniche e luteiniche non pare essenziale ai fini del trattamento, poiché questo sfrutta comunque un effetto luteinizzante^{2,3}. Inoltre sono disponibili studi che hanno dimostrato l'assenza di differenze significative tra i due tipi di cisti in seguito alla terapia⁴. Tra le diverse terapie proposte nel corso degli anni, i trattamenti ormonali trovano attualmente larga applicazione, con particolare interesse per l'impiego del GnRH e dell'hCG.

Il presente lavoro ha lo scopo di confrontare gli effetti dei suddetti trattamenti sulla ripresa dell'attività ciclica e sulla conseguente fertilità, tenendo in considerazione anche i tempi di risposta alla terapia.

MATERIALI E METODI - L'indagine ha interessato 117 bovine di razza Frisone Italiana, allevate in 58 aziende dislocate nelle province del nord-est, affette da degenerazione cistica dell'ovaio. La diagnosi di cisti ovariche è stata formulata sul riscontro ecografico, secondo la definizione classica¹, a partire dalla settima settimana postpartum (PP). I soggetti sono stati randomizzati in due gruppi di trattamento.

Il primo gruppo, composto da 67 animali, è stato trattato con 20 µg di buserelin (analogo del GnRH); il secondo gruppo, di 50 animali, ha ricevuto 10.000 UI/ capo di hCG. Entrambi i trattamenti sono stati somministrati per via intramuscolare il giorno della diagnosi.

L'efficacia della terapia è stata identificata nella comparsa di un ciclo estrale regolare entro 30 giorni dal trattamento. Le bovine in estro, con normali condizioni dell'apparato genitale, sono state sottoposte ad IA 12 ore dopo la comparsa delle manifestazioni

estrali, con materiale seminale di provata fertilità. La diagnosi di gravidanza è stata eseguita ecograficamente a partire da 30 giorni dopo l'IA.

Per ciascuno dei due gruppi sono stati rilevati i seguenti dati:

- tasso di successo, inteso come rapporto tra le bovine in estro entro 30 giorni dal trattamento e bovine trattate;
- tempi di guarigione, considerati come i giorni intercorsi tra il trattamento e la comparsa dell'estro;
- tasso di concepimento, inteso come rapporto tra bovine gravide e bovine inseminate all'estro indotto dal trattamento.

Al fine di evidenziare differenze statisticamente significative tra i trattamenti, i dati riferiti al tasso di successo ed al tasso di concepimento sono stati confrontati mediante il test del χ^2 , mentre i tempi di guarigione sono stati elaborati mediante analisi della varianza (ANOVA) ad una via.

RISULTATI - I dati relativi al tasso di successo, ai tempi di guarigione ed al tasso di concepimento delle bovine con cisti ovariche, sottoposte ai due diversi trattamenti, sono riportati in tabella 1.

Tab. 1 - Dati relativi al tasso di successo, ai tempi di guarigione (media \pm DS) ed al tasso di concepimento delle bovine con cisti ovariche sottoposte ai due diversi trattamenti

	Trattate n	Tasso di successo n (%)	Tempi di guarigione gg	Tasso concepimento n (%)
GnRH	67	43 (64,2)	17,14 \pm 5,03	19 (45,2)
hCG	50	25 (50)	17,75 \pm 4,19	14 (56)

Il test del χ^2 applicato ai tassi di successo (2,36 - p=0,12), ha dimostrato l'assenza di differenze statisticamente significative tra i due gruppi di trattamento, così come l'analisi della varianza, applicata ai tempi di guarigione, non ha mostrato differenze statisticamente significative tra le due terapie (F=1,87, p>0,05).

Nel gruppo delle bovine trattate con GnRH, 1 delle 43 bovine con risposta positiva ha presentato endometrite e pertanto non è stata inseminata; nel gruppo trattato con hCG tutte le bovine in estro, viste le normali condizioni dell'apparato genitale, sono state sottoposte ad IA. Il test del χ^2 , applicato al tasso di concepimento, ha fornito un valore di 0,73 (p=0,39), evidenziando l'assenza di differenze significative.

DISCUSSIONE - La distinzione tra cisti follicolari e luteiniche non è stata considerata sostanziale ai fini del nostro studio, in quanto entrambe le terapie prese in considerazione sono volte alla luteinizzazione della cisti od all'ovulazione dei follicoli compresenti. Il considerare le cisti luteiniche un'evoluzione di quelle follicolari⁷ potrebbe far presumere un vantaggio, in termini di tempi di risposta, dall'applicazione di una terapia luteolitica, in termini pratici però questo vantaggio è messo in dubbio dal margine di errore nella diagnosi, che, pur diminuito a seguito dell'introduzione della diagnosi ecografica, resta rilevante⁸.

La scelta di prendere in considerazione solo le cisti diagnosticate dopo il 40° giorno PP, oltre ad accordarsi con il periodo di attesa volontario degli allevatori, ha permesso di ridurre il rischio di esiti positivi non ascrivibili al protocollo terapeutico intrapreso. Infatti è noto che le cisti ovariche abbiano una tendenza alla regressione spontanea molto più pronunciata (>50%) nelle prime settimane postpartum⁵.

Allo scopo di ridurre ulteriormente la possibilità di includere guarigioni spontanee, abbiamo deciso di considerare come successo terapeutico la ripresa della ciclicità solo se ottenuta entro i 30 giorni dal trattamento. Per lo stesso motivo, affinché il tasso di

concepimento fosse quanto più possibile in relazione con il successo terapeutico, abbiamo deciso di analizzare soltanto i risultati della prima IA post trattamento. Infatti, allontanandosi dall'intervento terapeutico, l'interferenza di altri fattori (sanitari, ambientali, manageriali) sull'esito della IA tende ad aumentare.

I risultati relativi ai tassi di successo e di concepimento sono paragonabili con i dati riportati in bibliografia, considerando solo gli studi con le medesime condizioni preliminari da noi adottate¹. Anche per quanto riguarda i tempi di risposta alla terapia i nostri risultati si accordano con quelli presenti in bibliografia, sia in lavori recenti⁶ che in studi più datati³. Una teoria recente⁹ associa l'insorgenza delle cisti ad una incapacità dell'ipofisi anteriore di rispondere con un picco di LH all'aumento preovulatorio dell'estradiolo. In questo caso l'hCG, con la sua elevata attività LH simile, od il GnRH, con il rilascio dell'LH endogeno, riuscirebbero in maniera diversa a superare questa incapacità. La terapia con hCG, nonostante venga a volte consigliata in caso di insuccesso del trattamento con GnRH, non si dimostra quindi maggiormente efficace, quando impiegata come primo intervento. Questo, d'altra parte, può essere facilmente spiegato considerando che entrambe le molecole promuovono la luteinizzazione della cisti, seppur agendo a due livelli diversi dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, e quindi nella maggior parte dei casi ottengono risultati analoghi.

In conclusione, secondo i nostri risultati, il singolo trattamento con GnRH e quello con hCG non appaiono differire in maniera significativa in nessuno dei parametri considerati, confermando l'opinione che, sia per il costo che per le caratteristiche farmacologiche, il GnRH costituisca il farmaco di prima scelta nella terapia delle cisti ovariche nelle bovine.

BIBLIOGRAFIA - 1. Lopez-Gatius, F., Lopez-Bejar, M., Reproductive performance of dairy cows with ovarian cysts after different GnRH and cloprostenol treatments. *Theriogenology*, 58: 1337-1348, (2002). 2. Elmore, R.G., Bovine ovarian cysts. *In Current veterinary therapy*, 2: 779-781, Ed. Howard, (1986). 3. Youngquist, R.S., Cystic follicular degeneration in the cow. *In Current therapy in theriogenology*, 2: 243-246, Ed. Morrow D.A., (1986). 4. Veronesi, M.C., Battocchio M., Cairoli, F., Comin, A., Isola, M., Recovery rate and recovery time with luteal and follicular ovarian cysts after treatment with buserelin. *Veterinary Research Communications*, 27 suppl., 1: 631-633, (2003). 5. Peter, A.T., Infertility due to abnormalities of the ovaries. In: *Current therapy in large animal theriogenology*, Youngquist R.S., Editor. Philadelphia: WB Saunders Co., p. 349-354, (1997). 6. Peter, A.T., An Update on Cystic Ovarian Degeneration in Cattle. *Reprod Dom Anim*, 39: 1-7, (2004). 7. Garverick, H. A., Ovarian follicular cysts in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80: 995-1004, (1997). 8. Farin, P.W., Youngquist, R.S., Parfet, J. R., Garverick, H. A., Diagnosis of luteal and follicular ovarian cysts in dairy cows by sector scan ultrasonography. *Theriogenology*, 34: 633-642, (1990). 9. Silvia, W.J., Hatler, T.B., Nugent, A.M., Laranja da Fonseca, L.F., Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 167-177, (2002).

TERAPIA DELLE CISTI FOLLICOLARI DELLA BOVINA CON GnRH ASSOCIATO A CALCIO E NALOXONE PER VIA EPIDURALE
TREATMENT OF OVARIAN FOLLICULAR CYSTS IN DAIRY COWS WITH EPIDURAL GnRH AND CALCIUM/NALOXONE ADMINISTRATION

Cinone M.¹ **Coronati D.**,² **Minoia G.**,² **Guaricci A.C.**,² **Minoia R.**,³ **De Cosmo A.M.**,⁴ **Robbe D.**, *Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise*; ¹*Cirio Agroalimentari, Azienda Fagianeria, Piana di Monte Verna (CE)*; ²*Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari*; ³*Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Camerino*; ⁴*Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Teramo*

Parole Chiave: Cisti Follicolare, Bovina, GnRH, Calcio/Naloxone
Key Words: Follicular Cysts, Cattle, GnRH, Calcium/Naloxone

SUMMARY - Cystic ovarian disease (COD) are anovulatory follicular like dynamic structures that occur in 5 to 30% of dairy cows. Their development is likely associated with altered hypothalamic-hypophysial-ovarian function. In any type of stress, β -endorphins increase and interplay with metabolic processes. In COD, it has been reported that β -endorphins are linked to the gonadotropin receptors and block GnRH and LH pulse. In order to directly remove endogenous opioids linked to the ovary, by activating hypogastric plexus at lombo sacral level, we used an epidural administration of GnRH and calcium /naloxone.

INTRODUZIONE - Il miglioramento genetico delle bovine da latte altamente produttive e lo sviluppo delle condizioni manageriali negli allevamenti intensivi hanno consentito un aumento di produttività a discapito della fertilità di mandria prolungando l'intervallo parto-concepimento¹. Le cisti follicolari della bovina o *Cystic Ovarian Disease* (COD), la cui eziopatogenesi è polifattoriale, sono strutture ovariche anovulatorie con diametro >2,5 cm che persistono per oltre 10 gg. con tendenza a recidivare o regredire spontaneamente; esse rappresentano una tecnopatia di più frequente riscontro (5-30%) negli allevamenti di bovine ad alta produzione latte². Tra le cause d'insorgenza delle COD, la più importante è la disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio attribuita ad anomalie del metabolismo *post-partum*. L'alterazione primaria è la carenza di LH preovulatorio e di GnRH, in risposta all'aumento degli estrogeni³. L'insorgere di patologie endorfino-mediate nel *post-partum* possono essere determinate da variazioni di legami nel sistema ormone-recettore e sono in rapporto con l'aumento degli oppioidi endogeni ed alterato *turnover* del calcio⁴. L'esistenza di un controllo oppioidergico sul sistema neuroendocrino ipotalamico-ipofisario può essere antagonizzato ottenendo un aumento dei *pulses* di GnRH e conseguente aumento della secrezione di LH⁵. Qualsiasi condizione di stress comporta un aumento di ACTH, cortisolo, catecolamine, oppioidi endogeni ed asincronia nell'induzione dei recettori per l'LH sulle cellule della granulosa e della teca durante la maturazione follicolare⁶. Sulla base di tali acquisizioni, al fine di ottenere un'azione terapeutica nel ripristino funzionale di bovine con COD, abbiamo somministrato l'associazione farmacologica GnRH e calcio/naloxone per via epidurale.

MATERIALI E METODI - La prova sperimentale è stata effettuata nell'allevamento di bovine da latte pezzata nera olandese, "La Fagianeria" a Piana di Monte Verna (CE), con un incidenza annua di cisti ovariche del 10-15%. L'alimentazione preparata con sistema *unifeed*, era costituita da fieno di erba medica, cotone, insilato di mais e di loietto, integratori vitaminici ed oligo minerali (426kg/capo/die; umidità 48%; 0,83

U.F./kg s.s.; 17,5% proteine s.s.). La produzione media di latte era di 36 l (grasso 3,6%; proteine 3,21%). Le bovine suddivise in base alla fase riproduttiva ed allevate a stabulazione semi-permanente, erano monitorate per la gestione della mandria (calori e produzione) con sistema computerizzato Afimilk[®] v3.0 2D (SAE Afikim) programmato per tre mungiture giornaliere. Alla visita ginecologica, sono state individuate 40 bovine di 3-9 anni, con peso medio di 600 kg in buone condizioni di nutrizione (BCS=3), che presentavano su una o entrambe le ovaie, formazioni similfollicolari di diametro >2,5 cm, persistenti per almeno 10 gg., in assenza di corpo luteo funzionante, con un intervallo parto-concepimento di 2-10 mesi. La diagnosi di COD è stata confermata mediante esame ecografico (ScannerVet 480, sonda lineare transrettale 5-7,5 MHz, PieMedical). Le bovine sono state suddivise in 2 gruppi in base al differente trattamento farmacologico. Gruppo A: somministrazione per via epidurale sacro-coccigea di 2 ml di GnRH (25 ng/ml lecirelina Dalmarelin[®], Fatro) e 3 ml di calcio e naloxone (0,6 mg naloxone cloridrato, Diosynt disciolti in 3 ml di calcio gluconato al 20%, Calcio pH[®], Fatro) in 30 bovine al 10° gg dalla diagnosi di COD. Dopo 21 gg in assenza di calore, è stata determinata in allevamento la concentrazione plasmatica del progesterone (P4) con kit semiquantitativo ELISA (Ovulation test, BVT Diagnostic Veterinaire) e in presenza di P4<1 ng/ml si è ripetuto il trattamento suddetto. Gruppo B: 10 bovine di controllo trattate con 5 ml di soluzione fisiologica (0,9 % NaCl) /capo per via epidurale. Tutte le bovine sono state sottoposte a prelievi ematici dalla vena coccigea con provette (Vacutainer) da siero e da plasma con K₃E + aprotinina (Sigma-Aldrich, Italia) mantenute a 4°C e centrifugate con centrifuga refrigerata a 2500 rpm x 10'; le aliquote sono state stoccate a -20°C fino al momento dell'analisi in laboratorio. Per il dosaggio della β -endorfina, i prelievi ematici sono stati effettuati al giorno 0 (visita clinica con sospetto di COD), 10° (conferma di COD e trattamento), 11°, 12°, 17°, mentre per valutare l'LH, sono stati eseguiti prelievi al tempo 0, 30', 60', 120', 180' dal trattamento farmacologico (G 10). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica con *t* di Student. Il dosaggio della β -endorfina è stato effettuato mediante uno spettrofotometro a micropiastra (Brio Radim, Italia) usando un kit EIA (β -endorfin, Peninsula Lab.) e per l'LH ematico un kit ELISA (LH Detect, INRA, Francia). Le bovine in calore dopo trattamento sono state visitate e fecondate con seme proveniente da centri specializzati per la conservazione (Semex). La risposta farmacologica è stata considerata positiva quando la bovina ha manifestato l'estro (tasso e tempo di guarigione) seguito dal rilievo ecografico di un corpo luteo, in assenza di strutture cistiche. Dopo 30 e 60 gg si è proceduto alla diagnosi clinica di gravidanza manuale ed ecografia (tasso di gravidanza).

RISULTATI - Dopo il trattamento con GnRH+Ca/Nx, 9/30 (30 %) bovine con COD (Gruppo A) hanno presentato un calore dopo 18±3 giorni. Al 21° giorno dal trattamento, 21/30 (70 %) bovine non hanno mostrato alcun segno di calore, di queste 6/21 bovine hanno presentato un valore del progesterone <1ng/ml, per cui sono state ritratte con GnRH+Ca/Nx e hanno manifestato un estro dopo 29±7,5 giorni dal primo trattamento. Le altre 15/21 bovine hanno presentato un tasso di progesterone >2ng/ml. Le gravidanze nei soggetti del Gruppo A sono state del 66 % (10/15). Nelle bovine del Gruppo B non sono state osservate modificazione delle cisti. La scelta di sottoporre a trattamento anche le bovine che presentavano COD recidivanti è stata dettata dalla necessità di recuperare la fertilità dei soggetti con cisti ovariche ribelli al trattamento farmacologico classico con GnRH o HCG per via i.m.. Risultati di particolare rilievo sono stati ottenuti sul dosaggio dell'LH delle bovine con COD dopo trattamento con GnRH+Ca/Nx (Graf. 1). I prelievi sequenziali effettuati nel protocollo sperimentale hanno permesso di tracciare una curva di secrezione dell'LH che da 0,33±0,13 ng/ml (T0) ha raggiunto 1,98±1,35 (T30') 3,12±1,68 (T60') e 8,74±5,02 (T120') ed infine 10,1±4,98 ng/ml

(T180') tutti dati altamente significativi ($p < 0,001$). Il dosaggio della β -endorfina ha permesso di rilevarne un singolare incremento subito dopo il trattamento con GnRH+Ca/Nx (Graf. 2). Da un valore iniziale di $0,76 \pm 0,31$ ng/ml (G0) si è raggiunto $1,88 \pm 1,02$ (G10°) per poi decrescere fino a $0,73 \pm 0,36$ (G12°) e $0,53 \pm 0,2$ ng/ml (G17°) valori che comparati fra di loro sono risultati altamente significativi ($p < 0,001$).

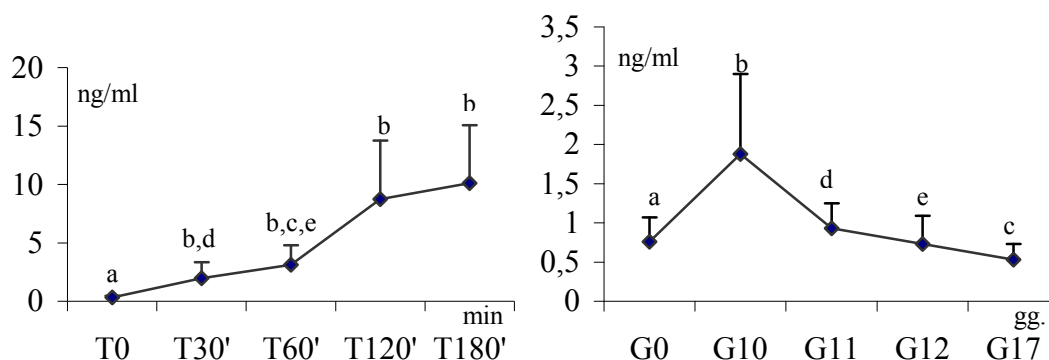


Grafico 1 - Concentrazione dell'LH in bovine con cisti follicolari dopo trattamento con GnRH e Ca/Nx (t di Student a,b; b,d; b,e $P < 0,001$. b,c $P < 0,05$).

Grafico 2 - Concentrazione di β -endorfina in bovine con cisti follicolari dopo trattamento con GnRH e Ca/Nx (t di Student a,b; b,c; b,e $P < 0,001$. c,d $P < 0,01$. a,c; b,d $P < 0,05$).

DISCUSSIONE - Lo schema terapeutico proposto è finalizzato al ristabilimento di un ciclo normale, attraverso la formazione di un nuovo corpo luteo funzionante che consegue alla luteinizzazione della cisti follicolare in risposta allo stimolo dell'LH. Il controllo oppioidergico sul sistema neuroendocrino ipotalamico-ipofisario può essere antagonizzato con la somministrazione di Ca/Nx, ottenendo un aumento dei pulses di GnRH e conseguente aumento della secrezione di LH, come è stato confermato dal dosaggio dell'LH. L'aumento notevole della β -endorfina, in particolare della frazione legata, determina un blocco dei gates per il calcio, con conseguente blocco degli scambi di ioni Ca^{++} attraverso la membrana cellulare. Precedenti studi clinici condotti dall'Unità di Bari avevano già confermato l'efficacia del trattamento GnRH+Ca/Nx per via epidurale nelle COD, dimostrando il ruolo prioritario svolto dal plesso ipogastrico nel modificare l'attività dei recettori ovarici per il GnRH e le gonadotropine⁷. Non sono riportati in letteratura dati sui peptidi oppioidi endogeni nelle patologie ovariche. Questo è il primo studio che riporta una valutazione della β -endorfina in corso di cisti ovariche prima e dopo trattamento farmacologico con GnRH+Ca/Nx, evidenziando il legame esistente tra oppioidi endogeni e pulsatilità dell'LH dopo somministrazione di GnRH+Ca/Nx.

BIBLIOGRAFIA - 1. Romagnoli, S., Stress e Fertilità. In Sali, G., *Manuale di Teriogenologia bovina*. Edagricole, Bologna, 345 - 373, (1996). 2. Parkinson, T.J., Infertility in the cow. In Noakes, D.E. et al., *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*, W.B. Saunders, London, 8thEd., 431-443, (2001). 3. Silvia, W.J., Hatler T.B., Nugent, A.M., Laranja da Fonseca, L.F., Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 23(1-2): 167-177, (2002). 4. Minoia, P., Sciorsci, R.L., Metabolic control through L calcium channel, PKC and opioid receptors modulation by an association of naloxone and calcium salts. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.*, 1(2): 131-7, (2001). 5. Sciorsci, R.L., Bianchi, P., Minoia, P., High levels of endorphin and related pathologies of veterinary concern. A review. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 22(4): 575-626, (2000). 6. Vanholder, T., Opsomer, G., De Kruif, A., Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.*, 46: 105-119, (2006). 7. Robbe, D., D'Ottavio, M., Sciorsci, R.L., Terapia delle cisti follicolari della bovina. *Obiett. Doc. Vet.*, 7/8: 19-24, (2002).

CISTI FOLLICOLARI NELLA BOVINA: SOMMINISTRAZIONE DI LECIRELINA PER VIA EPIDURALE E VALUTAZIONE DELLA RENINA E DELLA VASCULARIZZAZIONE OVARICA

BOVINE FOLLICULAR CYSTS: EFFECT OF EPIDURAL LECIRELIN ADMINISTRATION ON RENIN CONCENTRATION AND OVARIAN VASCULARIZATION

Manca R., Minoia G., Spedicato M., Mutinati M., Rizzo A., Sciorsci R.L.,
Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari.

Parole chiave: Lecirelina, Vascolarizzazione Ovarica, Renina, Cisti Follicolari.

Key words: Lecirelin, Ovarian Vascularization, Renin, Follicular Cysts.

SUMMARY - The objective of this study was to evaluate the effects of epidural lecirelin administration on plasmatic renin concentration and ovarian vascularization, in cows with ovarian Follicular Cyst. In the 70% of treated group lecirelin induced a significant increase in ovarian vascularization 48 hours after drug administration. The test used for renin determination did not permit its evaluation.

INTRODUZIONE - Il rimodellamento ciclico del tessuto ovarico, nella bovina, è associato a profonde modificazioni vascolari^{1,2}. Tali alterazioni sono alla base di patologie di interesse riproduttivo, come evidenziato in campo umano nella policistosi ovarica³. L'emodinamica ovarica varia in relazione alla biosintesi delle prostaglandine, degli ormoni steroidei (soprattutto estrogeni), delle gonadotropine e dei peptidi vasoattivi e nell'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAS)^{4,5}. In particolare, il RAS è coinvolto nella crescita follicolare, nella steroidogenesi³, nella maturazione dell'oocita³, nel processo di ovulazione⁶ e, infine, nel supporto vascolare del corpo luteo in formazione⁷.

Scopo del presente lavoro è valutare, in bovine affette da cisti follicolari, gli effetti della somministrazione epidurale di lecirelina sulla vascolarizzazione ovarica e sulle concentrazioni plasmatiche di renina.

MATERIALI E METODI - La sperimentazione è stata condotta su 20 bovine di razza Frisone, in tre allevamenti della provincia di Bari, in post-partum da almeno 60 giorni ed affette da Cisti Follicolari (CF). Le bovine erano di età compresa tra 5 e 8 anni, con una produzione latte giornaliera pro-capite di 26,4 kg, ed alimentate con sistema unifeed.

La diagnosi di CF è stata effettuata in seguito a riscontro di strutture simil-follicolari persistenti da più di 10 giorni, con diametro superiore ai 17 mm, con parete di dimensioni inferiori ai 3 mm e progesteronemia inferiore ad 1 ng/ml. Il dosaggio quantitativo del progesterone è stato eseguito su siero, mediante il kit Progesterone EIA WELL[®] (Radim S.p.A., Italia) (sensibilità: 0,05 ng/ml; specificità: 100%).

Gli animali sono stati suddivisi a random in due gruppi: gruppo A, costituito da 10 soggetti, trattati con 2 ml di Dalmarelin[®] (Fatro, Italia) (Lecilerina 25 µg/ml), per via epidurale sacro-coccigea; gruppo B: costituito da 10 soggetti, trattati con 2 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9 %), per via epidurale sacro-coccigea.

In tutti i soggetti del gruppo A e B sono stati effettuati dei prelievi ematici per il dosaggio della renina, immediatamente prima (T₀), a 24 ore (T₁), 48 ore (T₂) e a 10 giorni (T₃) dal trattamento farmacologico. I prelievi, effettuati mediante sistema vacutainer dalla vena coccigea in provette addizionate con EDTA, preventivamente refrigerate, sono stati subito trasferiti in laboratorio (entro 20±10 minuti) a +4°C, centrifugati a 1620 x g a +4°C per 10 minuti e stoccati in eppendorf, a -20°C.

La determinazione della renina è stata eseguita mediante test immunoenzimatico LIAISON® Direct Renin (DiaSorin S.p.A., Italia) (sensibilità: 0,13-0,53 µU.I./ml; specificità: β₂-microglobulina 5-7%; catepsina D 1,5-6,9%; tripsina 1,6-4,2%; plasmina 0,8%).

In tutti i soggetti dei gruppi A e B, contestualmente ai prelievi, è stato valutato il flusso ematico, mediante metodica Power-Doppler, utilizzando un ecografo SonoAce PICO Mycolor 2002® (Medison Co., Korea) con una sonda lineare da 7,5 MHz (Medison Co., Corea) e filtro settato a 100 Hz. Dopo aver selezionato l'immagine con il numero più alto di pixel colorati e senza artefatti, la stessa è stata digitalizzata mediante hardware Satellite 101® (Toshiba, Tokyo) e software Adobe Photoshop® versione 7,0 per la determinazione del numero totale di pixel colorati, parametro utilizzato come indicatore semiquantitativo della vascolarizzazione ematica⁸. Per quanto riguarda gli effetti del trattamento con lecirelina sulla risoluzione delle CF, i risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante test del chi-quadro. Le concentrazioni medie di renina e il valore medio dei pixel colorati rilevati a T₀, T₁, T₂, T₃ in entrambi i gruppi, sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante one-way ANOVA e test post-hoc di Tukey-Kramer. Il confronto statistico tra i valori ottenuti nei diversi tempi nei gruppi A e B è stato effettuato mediante t di Student. I valori sono stati considerati significativi per p<0,05 e altamente significativi per p<0,01.

RISULTATI - In tutti i soggetti non si sono evidenziati effetti collaterali in seguito alla somministrazione epidurale. Il trattamento con lecirelina ha indotto la risoluzione delle cisti nel 70% dei soggetti del gruppo A.

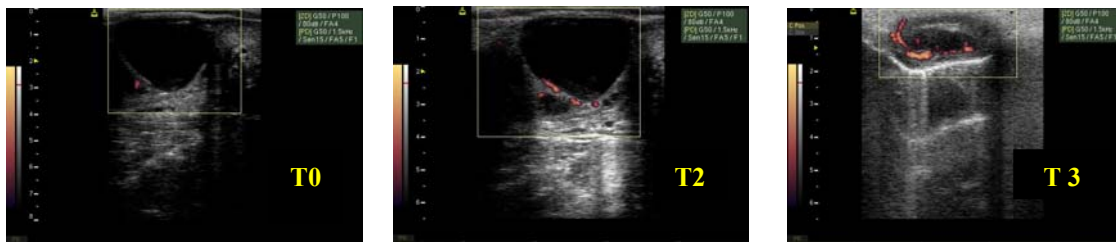
A T₀, 8 bovine del gruppo A e 6 bovine del gruppo B, con cisti di diametro compreso tra i 17-30 mm, hanno evidenziato all'esame Power Doppler strutture cistiche con flusso ovarico rilevabile. I soggetti con cisti follicolari di diametro superiore ai 30 mm (2 appartenenti al gruppo A e 4 al gruppo B), invece, hanno evidenziato una vascolarizzazione scarsa o assente. Il numero totale medio di pixel colorati ottenuto dalla digitalizzazione delle immagini ecografiche, nei soggetti di entrambi i gruppi, è riassunto nella tabella 1.

GRUPPI	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
A	105±50 ^{aA}	324±76 ^{A*}	1069±110 ^{b*}	2324±156 ^{aB*}
B	146±67	179±89 [*]	194±98 [*]	168±91 [*]

Tabella 1 - Media ± d.s. del numero di pixel dei gruppi A e B. One-way ANOVA test sulla riga: a,b: p<0,05; A,B: p<0,001. Student's t-test sulla colonna: *: p<0,001.

Nel 70% dei soggetti del gruppo A (diametro CF <30 mm), il trattamento con lecirelina ha indotto, nelle 48 ore seguenti, un significativo incremento (p<0,05) della vascolarizzazione. In queste bovine, a 10 giorni, si è riscontrata la luteinizzazione della struttura cistica. Negli altri soggetti del gruppo A e in tutti i soggetti del gruppo B non sono state evidenziate significative modificazioni morfologiche e vascolari in seguito al trattamento.

Il test immunoenzimatico adoperato per la determinazione della renina è risultato poco sensibile e non specifico per la bovina. Il 90% dei campioni ha presentato, infatti, un valore non determinabile.



Ecografia 1 - Modificazioni vascolari (Power-Doppler) e morfologiche osservate in un soggetto del gruppo A in seguito a somministrazione, per via epidurale, di lecirelina. Le dimensioni della cisti sono 2,58 x 2,30 cm. T₀: basale, presenza di strutture vascolari poco rilevanti; T₂: 48 h dopo il trattamento, incremento della vascolarizzazione ovarica; T₃: tessuto luteinico in formazione con imponente vascolarizzazione.

CONCLUSIONI - I risultati ottenuti con la nostra ricerca riconfermano l'efficacia del trattamento per via epidurale con lecirelina, nell'indurre la risoluzione delle cisti follicolari nella bovina⁹. Essi evidenziano, inoltre, l'influenza del GnRH sulla vascolarizzazione ovarica, fattore importante nel rimodellamento ciclico del tessuto ovarico^{5,7}.

Il test LIAISON[®] Direct Renin, purtroppo, non ci ha permesso di valutare le concentrazioni di renina e, pertanto, con questo studio è impossibile stabilirne una correlazione con le modificazioni emodinamiche riscontrate in seguito al trattamento. Il test, infatti, utilizzando anticorpi monoclonali anti-renina umana, potrebbe non aver riconosciuto la renina bovina, per differenze specie-specifiche. Un'altra ipotesi è che nei ruminanti le concentrazioni di renina siano notevolmente inferiori a quelle dell'uomo (2,8-46,1 μ U.I./ml) e, pertanto, al di sotto dei limiti di sensibilità del kit (0,13-0,53 μ U.I./ml). La valutazione ecografica mediante Power-Doppler e, in particolare, la determinazione del numero medio dei pixel colorati, ha permesso di osservare un incremento della vascolarizzazione delle CF, già 48 ore dopo il trattamento (T₂) con lecirelina. Ciò evidenzia sia l'importanza di un adeguato flusso vascolare nel processo di luteinizzazione delle cisti, sia l'utilità dell'ecografia Doppler in campo buiatrico, nel rilevare precocemente l'evoluzione delle cisti follicolari, in seguito a trattamento farmacologico.

BIBLIOGRAFIA - 1. Miyamoto, A. et al., Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 29, 329-339, (2005). 2. Miyamoto, A. et al., A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: new observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. *J. Reprod. Dev.*, 52, 153-160, (2006). 3. Battaglia, C., Artini, P. G., D'Ambrogio, G., Genazzani, A. D., Genazzani A.R., The role of color doppler imaging in the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 172(1), 108-113, (1995). 4. Yoshimura, Y., The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front. Neuroendocrinol.*, 18(3), 247-291, (1997). 5. Acosta, T.J., Miyamoto, A., Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim.Reprod.Sci.*, 82-83, 127-140, (2004). 6. Acosta, T.J. et al., Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol. Reprod.* 61, 1419-1425, (1999). 7. Collins, W., Jurkovic, D., Bourne, T., Kurjak, A., Campbell, S., Ovarian morphology, endocrine function and intra-follicular blood flow during the peri-ovulatory period. *Human Reprod.*, 6, 319-324, (1991). 8. Bollwein, H., Weber, F., Kolberg, B. Stolla, R., Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 65, 2129-2138, (2002). 9. Robbe, D., D'Ottavio, M., Sciorsci, R.L., Terapia delle cisti follicolari della bovina. *ODV* 19, 2002.

Progetto finanziato con i fondi COFIN PRIN 2005

COLLASSO PUERPERALE NELLA BOVINA: TERAPIA CON CALCIO/NALOXONE E DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI ACETILCOLINA

MILK FEVER IN THE COW: CALCIUM/NALOXONE THERAPY AND DETERMINATION OF THE PLASMATIC LEVELS OF ACETYLCHOLINE

Minoia G., ¹Ceci E., Manca R., Spedicato M., Mutinati M., Roscino M.T., Rizzo A., Sciorsci R.L., *Dipartimento di Produzione Animale; ¹Dipartimento Sanità e Benessere degli Animali, Università degli Studi di Bari*

Parole chiave: Collasso Puerperale, Calcio, Naloxone, β -Endorfine, Acetilcolina.

Key words: Milk Fever, Calcium, Naloxone, β -Endorphins, Acetylcholine.

SUMMARY - In cows affected by milk fever syndrome, the administration of Calcium/Naloxone association induced a fast recovery of the muscular activity. The plasmatic levels of acetylcholine obtained after the pharmacological treatment, probably induce the reactivation of the neuromuscular transmission.

INTRODUZIONE - Il collasso puerperale della bovina è una patologia del puerperio conseguente ad uno squilibrio metabolico che si manifesta con il quadro dell'ipocalcemia acuta. L'ipocalcemia compromette la trasmissione nervosa per ridotta esocitosi dell'acetilcolina (Ach). Si osserva, quindi, una mancata attivazione della placca motrice, associata ad una riduzione dell'attività contrattile muscolare, con conseguente paralisi flaccida. Tra i fattori patogenetici, le β -endorfine (β -end) rivestono una notevole importanza¹; infatti, l'aumento fisiologico di tali neuromodulatori al momento del parto e nell'immediato post-partum, oltre a svolgere una funzione analgesica, determina un blocco dei canali del calcio, con conseguente alterazione del potenziale di membrana e di tutte le funzioni correlate^{2,3,4,5,6,7}.

Obiettivo del presente studio è quello di verificare se l'impiego dell'associazione farmacologica Calcio e Naloxone (Ca/Nx) sia in grado di modificare, in bovine in collasso puerperale, le concentrazioni plasmatiche di Ach, e di indurre il ripristino della normale trasmissione nervosa a livello di placca neuromuscolare.

MATERIALI E METODI - La sperimentazione è stata condotta su 20 bovine pluripare, di razza Frisona, di età compresa tra 5 e 8 anni. 10 bovine erano in collasso puerperale conclamato (gruppo collasso) e 10 in puerperio fisiologico (gruppo controllo). Entrambi i gruppi sono stati trattati entro 48 ore dal parto con 500 ml di Calcio Borogluconato al 20% e.v. procapite, nei quali è stato disciolto Naloxone Cloridrato alla dose di 1,2 mg/100 kg/pv. Da altre sperimentazioni in bovine in collasso, non si sono osservate variazioni significative delle concentrazioni di Ach, in seguito alla classica terapia con calcio borogluconato, inoltre, in precedenti lavori¹, è stato descritto un peggioramento delle condizioni cliniche, dovuto alla somministrazione del solo Naloxone. In funzione di tali dati, si è omessa volutamente la valutazione dei livelli di Ach, in un gruppo sperimentale trattato o con solo calcio borogluconato o con solo Naloxone.

Il latte dei soggetti di entrambi i gruppi sperimentali è stato destinato all'alimentazione dei vitelli per 15 giorni dopo il trattamento farmacologico. Sia per il gruppo collasso, che per quello controllo, si è provveduto ad effettuare dei prelievi ematici nei tempi T₀ (prima della somministrazione), T₁₅ (15 minuti dopo la somministrazione), T₃₀ (30 minuti dopo la somministrazione), per la determinazione dei livelli di Ach, β -end e calcio totale. I prelievi per il dosaggio dell'Ach sono stati effettuati con provette vacutainer da 3,5 ml, contenenti Litio Eparina, con l'aggiunta di 2,5 mmol di

fisostigmina. I campioni sono stati centrifugati a 1620 xg per 10 minuti a +4°C ed il plasma ottenuto è stato stoccato a -20°C, in eppendorf da 1,5 ml, con l'aggiunta di 0,25 mmol di fisostigmina. I prelievi per il dosaggio delle β -end sono stati eseguiti con provette vacutainer da 3,5 ml con EDTA, previa aggiunta di 500 kU.I. di aprotinina. I campioni sono stati centrifugati a 1620 xg per 10 minuti a +4°C ed il plasma ottenuto è stato stoccato a -20°C in eppendorf da 1,5 ml contenenti 50 k U.I. di aprotinina. I prelievi per il dosaggio del calcio totale sono stati effettuati con provette vacutainer da siero da 4 ml, centrifugati a 1620 xg per 10 minuti a +4° C. Il siero ottenuto è stato stoccato a -20°C in eppendorf da 1,5 ml, fino al momento della determinazione analitica. Per tutti i prelievi sono state utilizzate provette pre-refrigerate, trasportate in laboratorio (entro 60 minuti) a +4°C. La determinazione dell'Ach è stata eseguita mediante metodica cromatografica HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) con colonna ad altissima efficienza 8 mpos Deadh and Path (Superchrom, Milano, Italia). Per la determinazione delle β -end è stata utilizzata la metodica immunoenzimatica (EIA), con kit Peninsula (Laboratories Inc., USA), specifico per la specie bovina (100%), sensibilità 0,03-0,06 ng/ml, con l'ausilio di un apparecchio automatico BRIO (*Basic Robotic Immunoassay Operator 4,54*) della Radim (Pomezia, Italia). La determinazione del calcio totale è stata eseguita mediante metodica colorimetrica utilizzando il kit Seac (*metodo cresoftaleina complexone*) della Radim Company (Firenze, Italia), sensibilità 6 mg/dl.

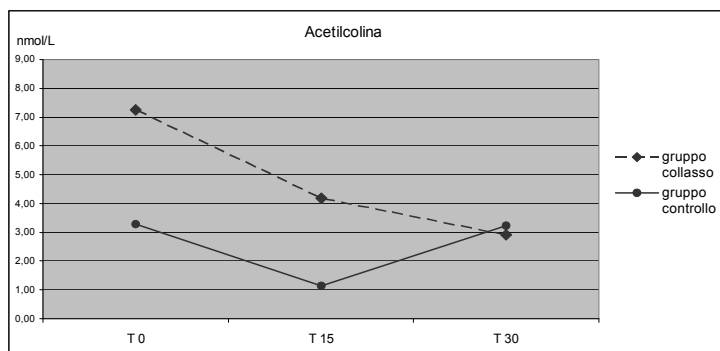
I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante ANOVA ad una via e post-test Tukey-Kramer. È stato, inoltre, utilizzato il test di Spearman per correlare i valori di Ach, β -end e calcio, nei diversi tempi. I valori sono stati considerati significativi per $p < 0,05$ e altamente significativi per $p < 0,001$.

RISULTATI - In entrambi i gruppi di bovine non si sono manifestati effetti collaterali in seguito alla somministrazione dell'associazione Ca/Nx. Le bovine del gruppo collasso, dopo trattamento farmacologico, hanno assunto la stazione quadrupedale, con completa remissione della sintomatologia, in un tempo medio di 20 ± 10 minuti dal trattamento, non manifestando recidive. I valori medi (\pm d.s.) dei livelli di Ach, β -end e calcio totale, nei gruppi collasso e controllo, sono riportati rispettivamente nelle tabelle 1, 2 e 3 e rappresentati nei grafici 1, 2 e 3.

Tabella 1 - Concentrazioni di Ach nmol/L nel gruppo collasso e nel gruppo controllo. In riga A,B: $p < 0,001$; B,C: $p < 0,05$. In colonna a,b: $p < 0,001$.

Acetilcolina (nmol/L) media \pm d.s.			
Gruppi	T ₀	T ₁₅	T ₃₀
Collasso	7,24 \pm 1,12 ^{Aa}	4,19 \pm 1,16 ^{aB}	2,92 \pm 0,85 ^{BC}
Controllo	3,28 \pm 0,49 ^{Ab}	1,13 \pm 0,30 ^{bB}	3,22 \pm 0,71 ^A

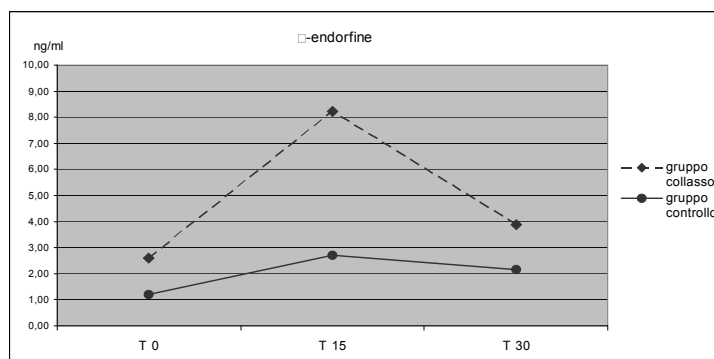
Grafico 1 - Andamento delle concentrazioni di Ach nei gruppi sperimentali.



Tab. 2 - Concentrazioni di β -end (ng/ml) nel gruppo collasso e nel gruppo controllo. In riga A,B: $p<0,001$; C,D: $p<0,05$. In colonna a,b: $p<0,001$.

β-endorfine (ng/ml) media \pm d.s.			
Gruppi	T₀	T₁₅	T₃₀
Collasso	2,61 \pm 0,98 ^{aAC}	8,23 \pm 0,99 ^{aB}	3,88 \pm 0,87 ^{aAD}
Controllo	1,20 \pm 0,26 ^{Ab}	2,70 \pm 0,42 ^{bBC}	2,17 \pm 0,56 ^{bBD}

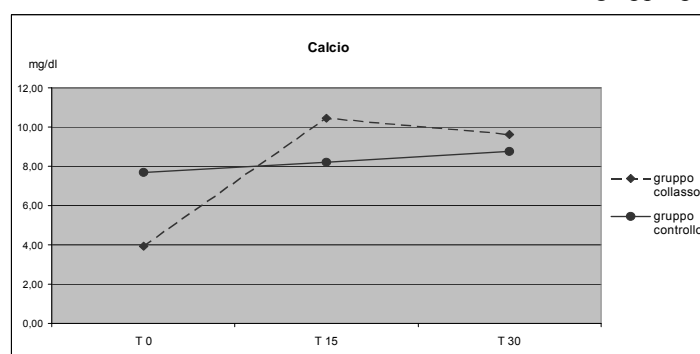
Grafico 2 - Andamento delle concentrazioni di β -end nei gruppi sperimentali.



Tab. 3 - Concentrazioni di Calcio totale mg/dl nel gruppo collasso e nel gruppo controllo. In riga A,B: $p<0,001$; C,D: $p<0,01$. In colonna a,b: $p<0,001$; c,d: $p<0,05$.

Calcio totale (mg/dl) media \pm d.s.			
Gruppi	T₀	T₁₅	T₃₀
Collasso	3,92 \pm 0,68 ^{Aa}	10,45 \pm 0,81 ^{aB}	9,64 \pm 0,89 ^{Bc}
Controllo	7,69 \pm 0,55 ^{bC}	8,22 \pm 0,75 ^b	8,75 \pm 0,65 ^{dD}

Grafico 3 - Andamento delle concentrazioni di calcio totale nei gruppi sperimentali.



È stata riscontrata una correlazione positiva ($p<0,05$) solo tra i livelli di Ach e calcio totale a T₁₅.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI - I risultati ottenuti dalla nostra sperimentazione confermano l'efficacia del trattamento con l'associazione farmacologica Ca/Nx, come riportato in precedenti ricerche^{1,7}. Il blocco dei canali del calcio, determinato dal legame β -end-recettore μ , compromette le normali fluttuazioni del calcio intracitoplasmatico, inficiando l'attività cellulare, la trasmissione nervosa e la contrazione muscolare^{4,5,6,7}. A T₀, i valori medi delle β -end nel gruppo collasso, risultano essere più elevati rispetto a quelli riscontrati nel gruppo controllo (2,61 \pm 0,98 ng/ml vs 1,20 \pm 0,26 ng/ml; $p<0,001$), ciò conferma la maggiore concentrazione di β -end libere nel gruppo delle bovine in collasso. Nel gruppo collasso le concentrazioni di β -end aumentano notevolmente 15

minuti dopo la somministrazione di Ca/Nx ($8,23 \pm 0,99$ ng/ml), in relazione alla capacità del Naloxone cloridrato di spiazzarle dai recettori specifici, aumentandone, così, la quota in circolo⁸. Da quanto osservato si evince un'elevata concentrazione di β -end libere e legate nel gruppo collasso. È inoltre ipotizzabile che il calo delle β -end, riscontrato a 30 minuti dopo la somministrazione di Ca/Nx ($3,88 \pm 0,87$ ng/ml), possa essere imputato all'attività delle proteasi endogene che le degradano⁹. Le concentrazioni plasmatiche di Ach, a T₀, nelle bovine in collasso, risultano essere notevolmente più alte rispetto a quelle riscontrate nel gruppo controllo ($7,24 \pm 1,12$ nmol/l vs $3,28 \pm 0,49$ nmol/l; $p < 0,001$). L'Ach potrebbe essere, dunque, rilasciata dalle vescicole presinaptiche a livello di placca neuromuscolare, ma potrebbe non esserci una responsività recettoriale postsinaptica adeguata a causa dell'inattivazione indotta dalle β -end. A T₁₅, si osserva una riduzione dei livelli medi di Ach sia nel gruppo collasso ($4,19 \pm 1,16$ nmol/l) che nel gruppo controllo ($1,13 \pm 0,13$ nmol/l). È ipotizzabile che la somministrazione di Ca/Nx, spiazzando le β -end, favorisca l'interazione dell'Ach con i recettori specifici, giustificandone, quindi, la sua riduzione in circolo. In seguito, a T₃₀, i tassi plasmatici del neurotrasmettitore hanno subito un calo ($p < 0,05$), nel gruppo collasso, raggiungendo le concentrazioni del gruppo controllo. Ciò trova riscontro, dal punto di vista clinico, nel recupero della stazione quadrupedale e, quindi, nella risoluzione della patologia. I valori medi della calcemia riscontrati a T₀ nel gruppo collasso ($3,92 \pm 0,68$ mg/dl) rispecchiano lo stato di ipocalcemia acuta, già evidenziata in altri studi^{10,11} che, in seguito alla somministrazione, rientrano nei range fisiologici. La nostra è una sperimentazione clinica che ha messo in evidenza l'importanza delle β -end nel controllo della trasmissione nervosa, in corso di collasso puerperale. Tuttavia, prescinde dalla definizione del reale meccanismo d'azione. I risultati ottenuti suggeriscono l'ipotesi che, in una condizione stressogena e di ipocalcemia, l'Ach venga comunque, rilasciata, ma non possa legarsi agli specifici recettori postsinaptici. Il nostro studio, pertanto, pone le basi per approfondimenti successivi, volti alla definizione del metabolismo dell'Ach e del ruolo delle β -end nell'inattivare i recettori colinergici.

BIBLIOGRAFIA - 1. Minoia, P., Sciorsci, R.L., Studio del collasso puerperale. Contributo casistico. Ulteriore valutazione eziopatogenetica. *Atti XXVII Società Italiana di Buiatria*, (1995). 2. Minoia, P., Sciorsci, R.L., Il ruolo del calcio nelle patologie endorfino-mediate. Meccanismi biologici. Possibilità diagnostiche. Orientamenti terapeutici. *Accademia Pugliese delle Scienze*, Ed. Grafischena, Fasano, (1994). 3. Minoia, P., Sciorsci, R.L., Metabolic control through L calcium channel, PKC and opioid receptors modulation by an association of naloxone and calcium salts. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.*, 1(2), 131-137, (2001). 4. Kearns, I.R., Morton, R.A., Bulters, D.O., Davies, C.H., Opioid receptor regulation of muscarinic acetylcholine receptor-mediated synaptic responses in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 41(5), 565-573, (2001). 5. Mayerhofer, A., Fritz, S., Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microsc. Res. Tech.*, 59, 503, (2002). 6. Kim, O.M., Lim, G.H., Lim, D.Y., Influence of naloxone on catecholamine release evoked by nicotinic receptor stimulation in the isolated rat adrenal gland. *Arch. Pharm. Res.*, 28(6), 699-708, (2005). 7. Sciorsci, R.L., Dell'Aquila, M.E., Minoia, P., Effects of Naloxone on calcium turnover in cows affected by milkfever. *J. Dairy Sci.*, 84, 1627-1631, (2001). 8. Minoia, P., Sciorsci, R.L., Somministrazione epidurale di calcio gluconato e naloxone. Attività terapeutica in vari processi fisiopatologici. *Atti LIII Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, (1999). 9. Paoletti, R., Nicosia, S., Clementi, F., Fumagalli, G., *Neuropsicofarmacologia*, Ed. UTET, Torino, (1998). 10. Goff, J.P., Macromineral disorders of the transition cow. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 20, 471-494, (2004). 11. Klimiené, I., Spakauskas, V., Matusевичius, A., Correlation of different biochemical parameters in blood sera of healthy and sick cows. *Vet. Res. Commun.*, 29 (2), 95-102, (2005).

EFFETTI IN VITRO DEL ROSIGLITAZONE, UN AGONISTA PPAR- γ , SULLA CONTRATTILITÀ DI MIOMETRIO BOVINO
IN VITRO EFFECTS OF ROSIGLITAZONE, A PPAR- γ AGONIST, ON BOVINE MYOMETRIUM CONTRACTILITY

Spedicato M., Cosola C., Minoia G., Valentini L., Masciopinto V., Manca R., Rizzo A., Sciorsci R.L., *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari*

Parole chiave: Rosiglitazone, Bovina, Miometrio, Contrattilità.
Key words: Rosiglitazone, Cow, Myometrium, Contractility.

SUMMARY - Thiazolidinediones, PPAR γ agonists, are able to increase intracellular calcium concentration in myometrial cells. The aim of this study was to evaluate the in vitro effects of rosiglitazone, a PPAR γ agonist, on bovine myometrium contractility.

INTRODUZIONE - La contrazione uterina, nei mammiferi, è un meccanismo complesso che vede coinvolti sia stimoli neuronali che ormonali¹, associati alla presenza di ioni calcio (Ca²⁺) e ad una quota sufficiente di energia¹. I Tiazolidindioni sono dei farmaci usati per il trattamento del Diabete Mellito non Insulino-Dipendente². Essi agiscono tramite l'attivazione dei recettori nucleari Peroxisome Proliferators-Activated Receptors gamma (PPAR γ)³. Tali recettori sono presenti anche a livello di miometrio della donna⁴ e la loro attivazione comporta un aumento delle concentrazioni intracellulari di Ca²⁺, tramite rilascio dal reticolo sarcoendoplasmatico⁵. I PPAR γ sono anche noti per essere regolatori dell'omeostasi energetica^{6,7}, favorendo l'utilizzazione del glucosio³. Obiettivo del nostro lavoro è valutare gli effetti, in vitro, del rosiglitazone (R), un tiazolidindione, sulla contrattilità di strip di miometrio bovino, nelle diverse fasi del ciclo estrale.

MATERIALI E METODI - Gli uteri sono stati ottenuti da bovine macellate in un mattatoio locale. La fase del ciclo è stata definita primariamente durante la visita ante-mortem e confermata mediante dosaggio del P₄. Dopo l'abbattimento, il tratto genitale e le strutture funzionali ovariche sono state attentamente esaminate per un'ulteriore conferma della fase del ciclo. La sperimentazione è stata condotta su tredici uteri, di cui 7 provenienti da bovine in estro e 6 in diestro. Da ciascun corno è stata prelevata una porzione trasversale a tutto spessore, posta immediatamente in flask contenenti una soluzione di Krebs modificata, e trasportata al nostro laboratorio in circa 30 minuti. Dalle predette sezioni sono stati tagliati strip di 1,5 cm di lunghezza e 0,5 cm di larghezza, e sospesi in un bagnetto d'organo isolato (Ugo Basile, Italia), contenente 30 ml di soluzione di Krebs a pH 7,4, mantenuta a 37° C e continuamente carbossigenata con una miscela di 95% O₂ e 5% CO₂. Lo strip è stato connesso ad un trasduttore isometrico di tensione (Ugo Basile, Italia), bilanciato con un peso da 1 g e lasciato equilibrare per circa 120 minuti. L'attività spontanea è stata registrata con un poligrafo (Ugo Basile, Italia). Per determinare gli effetti del rosiglitazone (Cayman Chemical, USA) sulla contrattilità spontanea del miometrio, gli strip sono stati esposti al farmaco (10⁻¹¹-5x10⁻⁵ M), disciolto in dimetilsolfossido, per 30 minuti. Tutte le somministrazioni di rosiglitazone sono state seguite da "wash-out" con 30 ml di soluzione di Krebs. Le risposte contrattili sono state valutate in base ai cambiamenti di tensione, rispetto all'attività contrattile spontanea e riportate come grammi di tensione. La frequenza delle contrazioni è stata valutata facendo riferimento a periodi di 20 minuti prima (basale) e dopo la somministrazione di rosiglitazone. I risultati (media±S.E.M.) sono stati

sottoposti a test ANOVA e T di Student per valori appaiati, e considerati significativi per $p < 0,05$.

RISULTATI - La dose minima di principio attivo in grado di influenzare significativamente la contrattilità spontanea è risultata pari a $10^{-6}M$, per cui abbiamo focalizzato la nostra attenzione su tale concentrazione.

Su strip in estro, il R ha determinato, dopo circa 8 minuti, un aumento della tensione rispetto al tono basale ($0,51 \pm 0,06g$ vs $0,24 \pm 0,04g$; $p < 0,01$), ma non un aumento della frequenza ($8,75 \pm 1,55$ vs $9,25 \pm 2,89$) (Fig. 1). Su strip in diestro, il rosigitazione ha determinato un incremento sia della tensione ($0,89 \pm 0,09g$ vs $0,47 \pm 0,12g$; $p < 0,05$) che della frequenza ($19,75 \pm 0,25$ vs $15,50 \pm 0,29$; $p < 0,01$) (Fig. 2), rispetto all'attività contrattile di base. Questi effetti si sono manifestati rapidamente (2-5 minuti) e si sono protratti per circa 50 minuti.

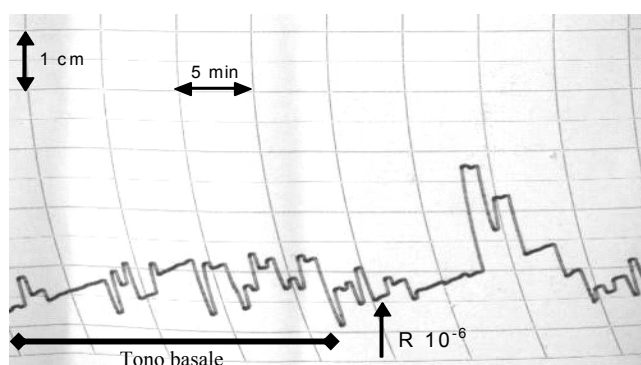


Fig. 1 - Tracciato di strip di miometrio bovino (estro), prima e dopo la somministrazione di $10^{-6}M$ di rosigitazione (R).

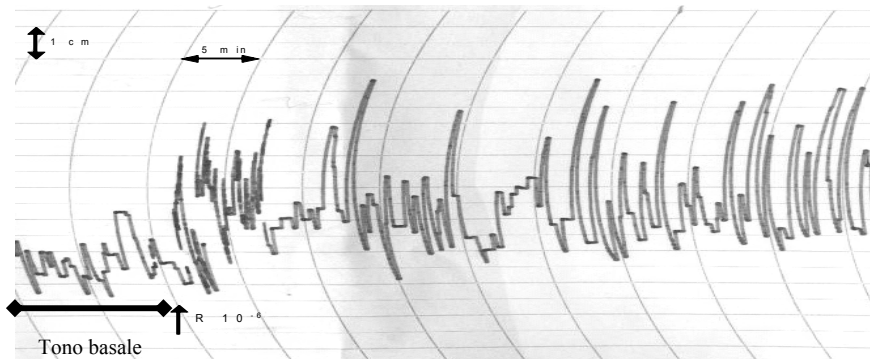


Fig. 2 - Tracciato di strip di miometrio bovino (diestro), prima e dopo la somministrazione di $10^{-6}M$ di rosigitazione (R).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI – Il nostro lavoro ha evidenziato la capacità del rosigitazione di influenzare la contrattilità spontanea del miometrio bovino. Questo effetto è, probabilmente, dovuto ad un aumento delle concentrazioni intracellulari di calcio. Infatti, l'attivazione dei PPAR γ è in grado di elevare la $[Ca^{2+}]_i$ nel miometrio di donna, attraverso l'aumento del suo rilascio dal reticolo sarcoendoplasmatico⁵. È probabile che tale fenomeno si realizzi anche nelle cellule miometriali bovine. Un'altra ipotesi è che l'effetto del R sulla contrattilità sia da imputare ad una maggiore efficienza nell'utilizzazione energetica da parte del miometrio. Infatti, i PPAR γ sono noti regolatori dell'omeostasi energetica e dell'utilizzazione del glucosio⁸, perciò è possibile che il R abbia migliorato l'uptake di glucosio dalla soluzione di Krebs da parte degli strip uterini, aumentando, in tal modo, l'energia utilizzabile per la contrazione.

Dalla nostra sperimentazione è emerso, anche, che il R ha un diverso effetto sul miometrio, in base alla fase del ciclo estrale. Infatti, gli strip uterini provenienti da bovine in diestro hanno mostrato una maggiore risposta alla molecola rispetto a quelli in estro. In diestro, si è avuto un aumento sia dell'ampiezza, che della frequenza delle contrazioni e tale effetto è stato costante per tutto il periodo d'osservazione. In estro, invece, il R ha aumentato l'ampiezza delle contrazioni, ma non ne ha modificato la frequenza, con una durata d'azione più breve rispetto agli strip in diestro.

E' ipotizzabile, quindi, che gli ormoni steroidei sessuali (estrogeni e progesterone) possano indurre una differente espressione dei PPAR γ nel miometrio bovino o modificare l'affinità degli agonisti per tali recettori.

Alcuni lavori hanno dimostrato che i PPAR γ hanno la capacità di legarsi agli 'estrogen response elements' e possono agire da inibitori competitivi⁹. Possono, inoltre, inibire l'espressione dell'aromatasi e, quindi, la sintesi di estrogeni¹⁰. Data questa relazione negativa, è probabile che durante la fase estrale, quando gli estrogeni sono più alti, il miometrio bovino esprima una minore concentrazione dei PPAR γ , ed è anche possibile che tali recettori non siano attivabili.

Per quanto riguarda la correlazione tra progesterone e PPAR γ non esistono dati in letteratura. Possiamo, pertanto, solo ipotizzare che durante la fase luteale ci sia un'aumentata espressione di tali recettori, a livello di miometrio bovino e, quindi, un'amplificazione della risposta al R, come da noi osservato.

Il nostro lavoro dimostra l'influenza dei recettori PPAR γ sulla contrattilità dell'utero bovino e, indirettamente, la loro differente espressione in base alla fase del ciclo estrale. In particolare, una maggiore espressione di tali recettori, durante la fase luteale, potrebbe avere il significato biologico di favorire una maggior utilizzazione del glucosio da parte del miometrio, importante nelle fasi precoci dello sviluppo embrionale. Durante l'estro, invece, altri meccanismi potrebbero favorire la contrattilità uterina, senza la necessità dell'attivazione dei PPAR γ .

Sicuramente, il nostro studio necessita di ulteriori approfondimenti per accertare la presenza di tali recettori sul miometrio bovino e per meglio delucidare l'esatto meccanismo d'azione degli agonisti dei PPAR γ , nell'incrementare la contrazione miometriale.

BIBLIOGRAFIA - 1. Shmygol, A., Gullam, J., Blanks, A., Thornton, S., Multiple mechanisms involved in oxytocin-induced modulation of myometrial contractility. *Acta Pharm. Sin.*, 27(7), 827-832, (2006). 2. Staels, B., Fruchart, J.C., Therapeutic use of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*, 54, 2460-2470, (2005). 3. Froment, P. et al., Peroxisome proliferators-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J. Endocrinol.*, 189, 199-209, (2006) 4. Tsibris, J.C.M. et al., Human uterine leiomyomata express higher levels of peroxisome proliferator-activated receptor γ , retinoid X receptor α , and all-*trans* retinoic acid than myometrium. *Cancer Res.*, 59, 5737-5744, (1999). 5. Kim, B.Y. et al., Ciglitazone inhibits cell proliferation in human uterine leiomyoma via activation of store operated Ca²⁺ channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288, 389-395, (2005). 6. Desvergne, B., Wahli, W., Peroxisome proliferators-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.*, 20, 649-688, (1999). 7. Auwerx, J., Cock, T.A., Knouff, C., PPAR-gamma: a thrifty transcription factor. *Nucl. Recept. Signal.*, 1, 1-3, (2003). 8. Picard F., Auwerx J., PPAR (gamma) and glucose homeostasis. *Ann. Rev. Nutr.*, 22, 167-197, (2002). 9. Nunez S.B. et al., Retinoid X receptor and peroxisome proliferators-activated receptor activate an estrogen responsive gene independent of the estrogen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 127(1), 27-40, (1997). 10. Qin, C. et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists induce proteasome dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, 63(5), 958-966, (2003).

LIVELLI DI OSSIDO NITRICO IN GRAVIDANZA. STUDIO PRELIMINARE SULLA BOVINA DA LATTE
NITRIC OXIDE LEVELS DURING PREGNANCY. PRELIMINARY STUDY ON DAIRY COW

Minoia R., Pavone L., ¹Bozzo G., Aiudi G., *Dipartimento di Produzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari; ¹Dipartimento di Economia e Politica Agraria, Estimo e Pianificazione rurale, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Bari.*

Parole chiave: Ossido Nitrico, Gravidanza, Bovina
Key words: Nitric Oxide, Pregnancy, Cattle

SUMMARY - Many studies showed that Nitric Oxide (NO) is an important regulatory agent in various female reproductive processes, such as ovulation, implantation, pregnancy maintenance, labor and delivery. Clinical trials have demonstrated that NO-donors are effective tocolytics. NO-production in the cervix is low during gestation and becomes upregulated once pregnancy advances to term. NO-donors are effective and safe cervical ripening agents. In blood vessels, NO is a potent vasodilator and platelet-aggregation-inhibitor. Lack of NO during gestation was related to the development of pregnancy-induced hypertension and preeclampsia¹. The objective of the current study is to evaluate the systemic levels of NO throughout bovine gestation. Blood samples from non-pregnant and post partum cattle were also analysed. An understanding of this pattern may contribute to control the NO level in order to prevent infertility problem such as failure in embryo implantation, fetal resorption and/or abortion.

INTRODUZIONE - L'ossido di azoto (NO) o ossido nitrico, è una specie chimica reattiva, un radicale dell'azoto che è stato individuato come uno dei più potenti mediatori biochimici che gli organismi viventi producono al loro interno al fine di controllare molte delle loro funzioni. L'NO è una sostanza ubiquitaria prodotta a partire dall'amminoacido L-arginina in una reazione multi-step catalizzata dall'enzima ossido nitrico sintetasi. Quest'ultimo esiste in numerose isoforme, alcune costitutive (cellule endoteliali, piastrine, sistema nervoso) ed altre inducibili (macrofagi, leucociti polimorfonucleati, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, epatociti), e ciò dà ragione dell'ampia distribuzione dei siti di produzione dell'importante mediatore negli organismi². Nei sistemi biologici, l'NO agisce come un importante messaggero intra ed inter-cellulare regolando numerosissime funzioni, *in primis* quella dell'endotelio vascolare, in parte, raggiunge la sottostante muscolatura liscia vascolare inducendone il rilascio con conseguenti effetti anti-aggreganti, anti-infiammatori ed anti-ipertensivi³. Condizioni di aumentato stress ossidativo comportano la conversione dell'NO in perossinitrito, una forma radicalica alla quale è legata la tossicità del mediatore primario⁴. I cataboliti dell'NO, quali i nitriti ed i nitrati, si accumulano, in funzione della quantità del mediatore primario prodotto, nel sangue ed in altri fluidi extracellulari per poi essere definitivamente escreti attraverso le urine. L'NO rappresenta, quindi, uno dei maggiori mediatori paracrini ed un importante agente di regolazione in vari processi fisiologici, tra cui quelli riproduttivi, quali l'ovulazione, l'impianto embrionale, il mantenimento della gravidanza e il parto ed inoltre, influenza la contrattilità uterina inibendola durante la gravidanza e promuovendola al termine di essa¹. Nel ratto e nella donna è stato dimostrato che la forma inducibile dell'ossido nitrico sintasi (iNOS) incrementa la produzione di NO a livello di cervice a fine gravidanza⁵. Vonnahme et al. (2005)⁶, in uno studio condotto sulle pecore, hanno dimostrato che la concentrazione di NO nei soggetti gravidi esprime un pattern di

incremento bifasico. Nelle prime fasi della placentazione, i valori di NO sono più elevati rispetto a quelli degli animali non gravidi, successivamente si registra un decremento di tali valori sino a raggiungere livelli simili a quelli dei soggetti non gravidi; per poi innalzarsi fino al termine della gravidanza. La produzione di NO incrementa il flusso sanguigno uterino ed è elevata durante la gestazione in pecore con più feti. Considerato il coinvolgimento di questo mediatore biochimico nel corso della gravidanza, l'obiettivo della nostra ricerca è stato di valutare la concentrazione di NO, durante i nove mesi di gestazione nella bovina da latte.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto su 72 bovine pluripare, di razza frisona italiana, clinicamente sane. Sono stati valutati soggetti vuoti (prima dell'intervento fecondativo), gravidi e nel primo mese post-partum. I campioni di sangue venoso ottenuti mediante puntura della vena coccigea, sono stati trasportati in contenitori termici fino al laboratorio. Sono stati quindi centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti e stoccati a -20°C fino al momento del dosaggio dell'NO. L'ossido nitrico è stato determinato con metodica colorimetrica dosando indirettamente i nitrati che vengono trasformati in nitriti dalla nitrato-reduttasi e leggendo l'assorbanza a 550 μM dopo trattamento con reattivo di Griess. La lettura è stata effettuata con apparecchio BRIO (Basic Robotic Immunoassay Operator; RADIM, Italia). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA Test).

RISULTATI - Le medie dei valori ottenuti ($\pm\text{DS}$), per ciascun mese di gravidanza, sono riportati nel grafico 1.

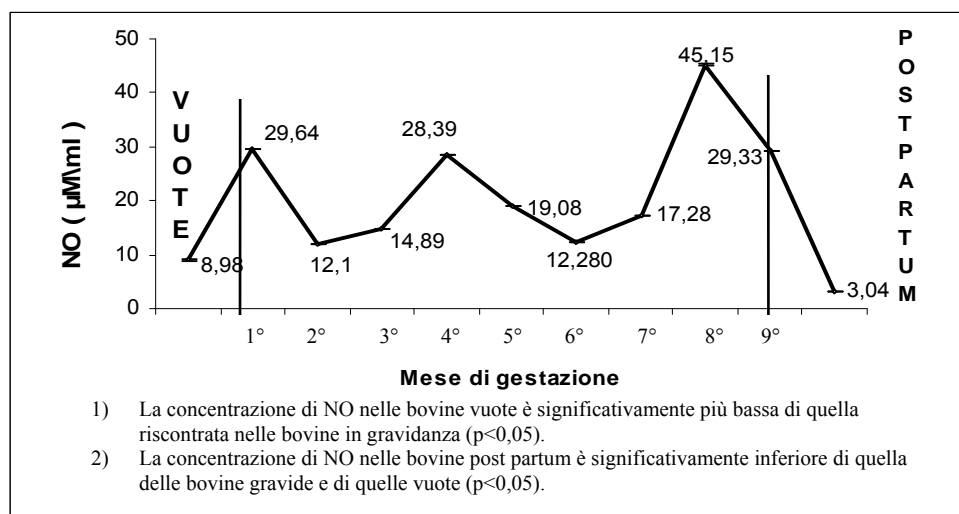


Grafico 1 - Concentrazioni di NO su sangue periferico durante la gravidanza.

Le concentrazioni di NO su sangue periferico, descrivono una linea spezzata: i soggetti non gravidi (vuoti - post-partum) presentano basse concentrazioni di NO; Nel primo mese di gravidanza le concentrazioni di NO si innalzano fino a valori pari a 29,64 μM seguita da un abbassamento dei valori fino a raggiungere una concentrazione di 12,10 μM , nel secondo mese. La concentrazione di NO aumenta nel terzo mese per seguire un pattern bifasico con due picchi in corrispondenza del quarto e dell'ottavo mese di gestazione, per poi decrescere in prossimità del parto e raggiunge livelli basali durante il primo mese post-partum. Nel primo, quarto e ottavo mese di gravidanza la concentrazione di NO si eleva in modo statisticamente significativo rispetto ai dosaggi relativi agli altri momenti della gestazione, ai soggetti vuoti e ai soggetti nel post-partum. Tali valori elevati possono essere correlati con momenti cruciali della gestazione, infatti, durante il primo mese si registra un'elevata concentrazione di NO

(29,64 μM) che Maul et al. (2003)¹, nella donna, hanno correlato col momento dell'impianto embrionale; nella restante parte del primo trimestre, i valori di NO decrescono. Al quarto mese le concentrazioni di NO si elevano sino a 28,39 μM ; tale aumento, in umana, è stato associato ad una precoce modificazione dell'apparato cardiovascolare⁶. Il picco più alto, che si registra all'ottavo mese (45,15 μM), invece, è strettamente correlato con la maturazione cervicale (cervix ripening)^{5,6}.

DISCUSSIONE - Studi effettuati sulle pecore hanno messo in evidenza una correlazione tra le concentrazioni periferiche di NO e lo stadio di gravidanza⁶. Altri autori riportano elevate concentrazioni di NO a livello di utero durante la gravidanza e basse a livello di cervice, in quanto l'azione tocolitica del NO è necessaria a garantire un miorilassamento a livello uterino ed, al contrario, a livello cervicale un'efficace chiusura^{1,7,8}. Nel primo mese di gestazione sono indispensabili valori alti di NO, per l'attecchimento embrionale, nel secondo e terzo mese i valori sono basali così come osservato nella donna dove inducendo un innalzamento dei livelli di NO in questo periodo, si facilita la dilatazione cervicale aumentando i rischi di un aborto⁹. Durante l'ultimo trimestre di gravidanza si registra un ulteriore picco in corrispondenza dell'ottavo mese (45,15 μM), tale aumento è correlato alla maturazione cervicale¹⁰. Prima del parto, si avvia il rimodellamento della struttura cervicale mediante cambiamenti nell'integrità delle fibre collagene, grazie ad un'alterazione nel contenuto di acqua, proteoglicani e acido ialuronico. Questi cambiamenti morfologici sono associati ad una serie di pathways biochimici tra cui reazioni proinfiammatorie che comprendono la sintesi della forma inducibile di NOS. In seguito, le concentrazioni di NO decrescono durante il nono mese di gestazione e sono ulteriormente basse durante il primo mese post-partum. L'interesse clinico di questa ricerca verte sulla possibilità, attraverso il controllo dei livelli di NO, di prevenire alcune patologie della gravidanza e/o di risolvere i problemi di infertilità legati all'impianto dell'embrione, al riassorbimento e/o all'aborto.

BIBLIOGRAFIA - 1. Maul, H., Longo, M., Saade, G.R., Garfield, R.E., Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des.*, 9(5):359-80, (2003). 2. Förstermann, U., Boissel, J.P., Kleinert, H., Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.*, 12: 773-790, (1998). 3. Brennan, P.A., Moncada, S., From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer. *Ann R Coll Surg Engl.*, 84(2): 75-78, (2002). 4. Channon, K.M., Qian, H.S., George, S.E., Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury. Insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20: 1873-1881, (2000). 5. Aalberts, M., van Dissel-Emiliani, F.M., van Tol, H.T., Taverne, M.A., Breveld-Dwarkasing, V.N., High iNOS and protein levels during early third trimester suggest a role for NO in prelabor cervical ripening in the bovine. *Mol Reprod Dev.*, Mar, 74(3): 378-85, (2007). 6. Vonnahme, K. A., Wilson, M.E., Li, Y., Rupnow, H.L., Phernetton, T.M., Ford, S.P., Magness, R.R. Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. *J Physio.*, May 15; 565(Pt 1): 101-109, (2005). 7. Goodrum, L.A., Saade, G.R., Belfort, M.A., Moise, K.J. Jr, Jahoor, F., Arginine flux and nitric oxide production during human pregnancy and postpartum. *J Soc Gynecol Investig.*, Oct;10(7):400-5 (2003). 8. Yallampalli, C., Garfield, R.E., Byam-Smith, M., Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology*, by The Endocrine Society, 133, 4, (1993). 9. Facchinetti, F., Venturini, P., Blasi, I., Giannella, L., Changes in the cervical competence in preterm labour. *BJOG*, Mar;112 Suppl 1:23-7, (2005).

**CONSERVAZIONE *IN SITU* DEL GERMOPLASMA DELLA RAZZA
TAURINA SOMBA: PRIME ESPERIENZE DI RACCOLTA E VALUTAZIONE
DEL MATERIALE SEMINALE**

***IN SITU* CONSERVATION OF TAURINE SOMBA CATTLE GERMOPLASM:
FIRST TRIALS OF SEMEN COLLECTION AND EVALUATION**

Semita C., Trucchi G., Nervo T., ¹Codjia V., ²Gbaguidi Alia M., Cristofori F.

Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Via Leonardo da Vinci, 44, 10095 Grugliasco (TO); ¹Direction de l'Élevage du Bénin, 03 B.P. 2036, Cotonou, Bénin; ²Direction de la Réglementation et du Contrôle, CeRPA/Atacora-Donga, Natitingou, Bénin.

Parole Chiave: Bovino Somba (*Bos Taurus*), Germoplasma, Seme, Bénin.

Key Words: Somba Cattle (*Bos Taurus*), Germoplasm, Bull Semen, Bénin.

SUMMARY - Aiming to improve and preserve in its birthplace Somba cattle (*Bos taurus*), a trypanotolerant small West African Shorthorns breed, semen analysis was performed. The bull was trained to semen collection with an artificial vagina. After collection, raw semen was evaluated and, after dilution, the percentage of progressive motile spermatozoa was assessed on chilled semen. The obtained results of these first trials are encouraging, even if further investigations are necessary.

INTRODUZIONE - La razza bovina Somba, tra le più antiche razze autoctone di ceppo taurino dell'Africa Occidentale, classificata a corna corte, è allevata nel Pays Somba (o Tamberna), zona geografica a cavallo delle regioni nord delle Repubbliche del Bénin e del Togo, delimitate dalla catena montuosa dell'Atacora, ove risiede un gruppo etnico, noto anch'esso con il nome di Somba. La razza, malgrado la ridottissima taglia (altezza media di 96,6 cm e peso corporeo di 172 ± 13 Kg), la scarsa produttività (età media al primo parto: 65,5 mesi; intervallo interparto: 18,49 mesi; tasso di fertilità: 60,9%¹; produzione latte stimata: 1-2 kg/giorno per 150-180 giorni di lattazione; percentuale di materia grassa del latte: 5,5-6,5%²), è ben adattata all'ambiente ed ha significativa importanza per ragioni socio-culturali e biologiche. In seno ad un'economia di sussistenza, il possesso di tali animali è simbolo di prestigio e rappresenta una forma di tesaurizzazione del patrimonio. I capi sono destinati per lo più ad autoconsumo in occasione di cerimonie tradizionali, ma possono potenzialmente rappresentare una fonte di reddito, a fronte del costante aumento della domanda di prodotti di origine animale che si verifica in Africa. Dal punto di vista biologico, l'interesse per la razza è determinato dalla sua tolleranza all'infezione da tripanosoma, parassita ematofago veicolato da glossine, uno tra i maggiori impedimenti al miglioramento dell'allevamento bovino in Africa. Molte zone di pascolo, lussureggianti, ma contaminate, sono impraticabili agli Zebù, più produttivi, ma estremamente suscettibili alla malattia, mentre vi sopravvivono i bovini di ceppo taurino che, pur infestati, conservano una certa performance produttiva e riproduttiva. La tripanotolleranza, pur acquisibile con il prolungato contatto con il parassita, rappresenta anche un carattere ereditario. La salvaguardia del patrimonio genetico della razza oltre a garantire la conservazione della biodiversità, potrebbe dunque consentire di migliorarne anche la produttività, tramite la selezione di tale carattere.

In questa direzione è orientato lo studio degli AA., che si svolge con il finanziamento della Regione Piemonte, che, a partire dall'anno 2004, ha incluso tra i paesi beneficiari del programma di cooperazione decentrata di "Lotta alla povertà e Sicurezza alimentare nei paesi del Sahel" anche il Bénin. Da un recente censimento³, la consistenza numerica della popolazione bovina Somba nella zona di Boukoumbé (1.006 tori e 8.711 femmine) rappresenta il 91,8% dei bovini presenti sul territorio: malgrado ciò, la razza è

considerata a rischio di estinzione, a causa del crescente meticciamento con bovini di ceppo zebuino - determinato da ragioni di tipo prevalentemente climatico (ricerca di zone di pascolo da parte di popolazioni nomadi), ma non di rado politiche ed economiche - che ne provoca un costante decremento numerico.

MATERIALI E METODI - Oggetto dello studio sono cinque soggetti, un toro e quattro femmine, di cui tre manze, di età compresa tra 14 mesi e 3 anni, fenotipicamente corrispondenti allo standard di razza, che costituiscono il primo nucleo di una mandria pilota. Essi sono allevati con sistema di tipo semi-estensivo, tipico della zona: sono condotti al pascolo nelle ore diurne e custoditi in recinti o nelle tipiche abitazioni (*tata*) durante la notte. Tutti i soggetti sono vaccinati contro Pasteurellosi, PPCB e Carbonchio ematico e sottoposti a regolari trattamenti antiparassitari per endo- ed ectoparassiti. Su questi soggetti, nei mesi di gennaio e febbraio 2006 (stagione secca), sono stati eseguiti prelievi di sangue per valutare ematocrito e numero di eritrociti e di leucociti. Inoltre, è stata eseguita la ricerca dei tripanosomi nel sangue periferico, attraverso allestimento di strisci secondo la tecnica del buffy coat. L'addestramento del toro al prelievo del materiale seminale è iniziato gradualmente, attraverso assuefazione del soggetto alla presenza degli operatori, facendogli successivamente compiere il percorso verso il luogo del prelievo, e compensandolo all'arrivo con somministrazione di alimento. Trascorsi pochi giorni, ne è stata valutata la libido, in presenza di una vacca in calore naturale, procedendo, poi, alla raccolta del materiale seminale tramite vagina artificiale. Sono stati effettuati prelievi a giorni alterni in 4 giornate, per un totale di 5 prelievi (di cui due effettuati a distanza di 15'). Dopo il prelievo, il materiale seminale è stato valutato qualitativamente e quantitativamente in laboratorio, registrandone colore, volume, concentrazione (camera di Bürker), motilità di massa ed individuale, vitalità e presenza di anomalie spermatiche dopo allestimento di strisci colorati con eosina-nigrosina. Il seme è stato, quindi, diluito utilizzando Laiciphos 488® (IMV Technologies, L'Aigle, France) contenente il 20% di tuorlo d'uovo, ottenendo una concentrazione finale di 40×10^6 spermatozoi/ml e condizionato a +4°C. Sono, inoltre, state eseguite prove di resistenza attraverso valutazione della motilità del seme posto in termostato a 37°C ad intervalli di due ore e di quello refrigerato, osservato ogni 6 ore.

RISULTATI - I valori medi dei parametri dell'emocromo presi in considerazione sono riportati in Tabella 1. La ricerca dei tripanosomi su sangue periferico è risultata negativa su tutti i cinque soggetti esaminati. L'addestramento del toro al prelievo del seme con una vagina artificiale è avvenuto in tempi molto brevi; il soggetto ha mostrato di possedere una libido elevata, manifestando dopo pochi giorni dall'inizio del condizionamento automatismo nell'eccitazione, tanto che è stato possibile effettuare il prelievo di seme anche in assenza di vacche in calore. Il materiale seminale, le cui caratteristiche qualitative e quantitative sono riportate in Tabella 2, si è sempre presentato, al momento della raccolta, di colore bianco opalescente.

Tab. 1 - Risultati dell'emocromo.

PARAMETRO	MEDIA ± DS
Eritrociti	5.096.000 ± 834.913
Leucociti	40.680 ± 3.962
HCT (%)	36,80 ± 8,38

Tab. 2 - Valutazione del materiale seminale

PARAMETRO	MEDIA ± DS
Volume (ml)	1,80 ± 1,01
Conc. ($\times 10^6$ spz/ml)	1.655 ± 893,78
MM (0-5, Mortimer)	3,25 ± 0,87
MI (%)	82,50 ± 0,05
Vitalità (%)	77,50 ± 8,01
SPZ anomali (%)	4,75 ± 1,54

Per quanto riguarda le prove di termoresistenza, le aliquote di materiale seminale refrigerato hanno presentato movimenti spermatici fino a 72 ore dalla diluizione, con una motilità individuale del 50% alla 18[^]-20[^] ora, come rappresentato nel grafico 1. Invece, nei campioni non refrigerati e conservati in termostato a 37°C, è stata registrata

assenza di movimenti spermatici tra le 14 e le 18 ore dall'inizio della valutazione, come indicato nel grafico.

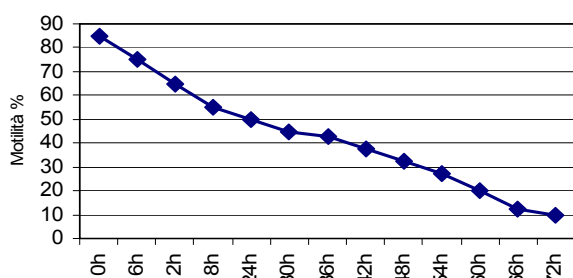


Grafico 1 - Termoresistenza del materiale seminale conservato a +4°C.

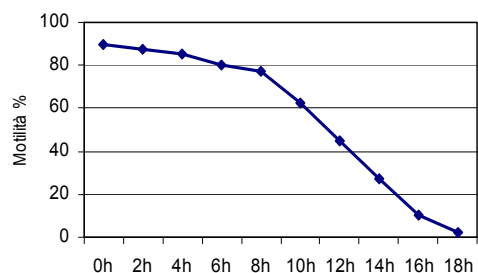


Grafico 2 - Termoresistenza del materiale seminale conservato a 37°C.

DISCUSSIONE - Le raccolte di materiale seminale qui riportate risultano essere in assoluto le prime effettuate nella Regione dell'Atacora. In letteratura non esistono dati riferiti alla libido e alle caratteristiche del materiale seminale della razza oggetto di studio: in una precedente esperienza volta alla raccolta di embrioni di Somba⁴, tuttavia, gli AA. avevano riscontrato che soltanto uno su tre tori di razza Somba acquisiti per essere adibiti al prelievo per l'I.A. delle donatrici, aveva dimostrato attitudine alla monta sufficiente e prodotto sperma di qualità accettabile (volume: 1 ml; M.M.: 3,5; concentrazione: $14,7 \times 10^6$ spz/ml; anomalie: 24%; M.I. dopo scongelamento: 50%)⁵. Pertanto, il risultato ottenuto in questa occasione è da ritenersi soddisfacente, anche quando confrontato con i dati relativi agli eiaculati di altre razze taurine dell'Africa Occidentale: nella Borgou, a fronte di un volume superiore, sono segnalate concentrazione e motilità individuale inferiori⁶, nella Baoulé concentrazione e motilità lievemente ridotte⁶. Alla luce di questo confronto, la Somba non si discosterebbe dalle altre razze locali. La docilità dell'animale e la relativa semplicità del *dressage* hanno reso possibile anche l'inizio dell'addestramento dei tecnici locali, che hanno potuto familiarizzarsi con le manualità della tecnica, onde poter autonomamente effettuare i prelievi, in assenza dell'équipe italiana nel luogo dell'esperienza. Il valore dell'ematocrito è considerato un parametro indicativo della capacità dell'animale di contrastare l'anemia, causata dall'infestazione da tripanosomi, e parallelamente del grado di acquisizione di tripanotolleranza⁷. Nei soggetti considerati in questa sede, pur a fronte di una leucocitosi, sulla quale sarà opportuno indagare, tale valore non soltanto risulta compreso nei *range* fisiologici, ma appare superiore a quello di altri animali testati sul territorio. Ciò potrebbe far pensare che l'animale prescelto possa essere idoneo all'utilizzo per la prosecuzione del progetto, soprattutto se si confermerà valido il tasso di fertilità da I.A., dato questo, ovviamente non ancora disponibile. Inoltre, considerando tali risultati, supportati dai riscontri delle esperienze personali degli AA. in altre situazioni, si ritiene di poter garantire un servizio di I.A. con seme refrigerato e condizionato, anche in questo contesto geografico.

BIBLIOGRAFIA - 1. Adanléhoussi, A. et al., Les performances de la race bovine Somba en milieu paysan. *Tropicicultura*, 21(3), 135-141, (2003). 2. Rege, J.E.O., et al., Shorthorn cattle of West and Central Africa. IV. Production characteristics. *World Animal Review*, 78 (1), 33-48, (1994). 3. Gbaguidi, A.M., et al., Rapport du recensement et du diagnostic sur l'élevage de la race bovine Somba dans la Commune de Boukombè. MAEP, CeRPA Atacora/Donga, Rép. du Bénin, (2006). 4. Cristofori, F., et al., Essais de Production et de collecte d'embryons chez la vache Somba. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 54 (3-4), 263-268, (2001). 5. Cristofori, F., et al., Dati personali non pubblicati, (1999). 6. Adamou N'Diaye, et al., Caractéristiques du sperme et potentiel d'utilisation par insémination artificielle des taureaux de race Borgou. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, 49 (2), 174-177, (1996). 7. Naessens, J. Bovine trypanotolerance: A natural ability to prevent severe anemia and haemophagocytic syndrome? *Int. J. Parasitol.*, 36, 521-528, (2006).

**FREEMARTINISMO OVINO: VARIAZIONI STAGIONALI DELLA
TESTOSTERONEMIA E DEL COMPORTAMENTO**
OVINE FREEMARTINISM: SEASONAL LEVEL OF TESTOSTERONE AND
BEHAVIOURAL STUDIES

**Zedda M.T.,¹ De Amicis I., Rosati I., Bogliolo L., Ledda S., Santucciu C., Fois S.,
¹Carluccio A.,** *Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi
di Sassari;* *¹Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina
Veterinaria, Università degli Studi di Teramo.*

Parole chiave: Intersessualità, Freemartinismo Ovino, Testosterone, Comportamento
Sessuale

Key words: Intersex, Ovine Freemartins, Testosterone, Sexual Behaviour.

SUMMARY - Seven “male-type” freemartins, 34-38-month old were described. The gonads were situated in three cases in the abdominal cavity, in one case in the inguinal canal and in the other three subcutaneously. The freemartins with gonads in the subcutaneous exhibited masculinised behaviour and the circulating concentration of testosterone were significantly higher ($P < 0.001$). Fluctuation were not detect in the secretory patterns of testosterone in the freemartins while a fluctuation characteristic of seasonal influence was evident in the control rams ($P < 0.01$)

INTRODUZIONE - L'intersessualità è la più frequente causa di infertilità nell'ovino per malformazioni congenite dell'apparato genitale. Un particolare intersesso è il freemartin: individuo geneticamente femmina, nato da gravidanza gemellare con gemello maschio, che presenta nel sangue e nel midollo osseo un chimerismo degli eterocromosomi (XX/XY) conseguente agli scambi cellulari attraverso le anastomosi placentari¹. Sulla base dei riscontri anatomopatologici ed istopatologici Smith et al. (2003) hanno classificato i freemartins ovini in “*tipo maschile*” e “*tipo indifferenziato*”. Il “*tipo maschile*” è caratterizzato da gonadi localizzate in addome, nel canale inguinale o sottocute in regione pubica. Le gonadi del “*tipo indifferenziato*” sono, invece, molto più piccole, prive di differenziazione fra corticale, midollare e cordoni sessuali; talvolta sono presenti strutture follicolari così come si osserva nell'ipoplasia ovarica. Scarse sono, a tutt'oggi, le conoscenze sull'attività endocrina delle gonadi dei freemartins ovini. Alte concentrazioni di testosterone sono state osservate da Bosu e Basrur (1984); anche Parkinson et al. (2001) riportano in freemartins ovini, durante la stagione riproduttiva significative quantità di testosterone circolante. Controverse sono invece le osservazioni, riscontrate sulla fluttuazione della testosteronemia in funzione del fotoperiodo³. A differenza dei freemartins bovini, nell'ovino si osserva un comportamento sessuale mascolino nei confronti delle pecore in estro^{3,6}. Con la nostra ricerca si sono voluti studiare i livelli della testosteronemia di ovini freemartins di tipo maschile nel corso dell'anno e il loro comportamento in presenza di soggetti adulti normali.

MATERIALI E METODI - Lo studio ha interessato 7 ovini freemartins, 5 di razza Sarda x Lacaune dell'età di 34-38 mesi e 2 di razza sarda di pari età; tutti con mosaicismismo linfocitario degli eterocromosomi (XX/XY) e gonadi di tipo maschile diagnosticate mediante accertamenti ecografici e/o laparoscopici. Durante la ricerca, gli animali vivevano in paddock all'aperto (41°N) senza usufruire di luce artificiale. Su tutti i soggetti e in 3 arieti normali di tre anni, sono stati effettuati, nell'arco di un anno, prelievi di sangue con cadenza quindicinale; il siero è stato stoccato a -20°C e il dosaggio del testosterone è stato effettuato con tecnica immunoenzimatica su

micropiastre di terza generazione, mediante un analizzatore automatico PersonalLAB™ ADALTIS Italia S.p.a., Casalecchio di Reno (BO). I valori della testosteronemia sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante analisi della varianza e test dei confronti multipli di Turkey. Sono state, inoltre, osservate le manifestazioni comportamentali in presenza di pecore in calore e nei confronti di maschi normali. In due soggetti con gonadi sottocute è stato effettuato l'esame istologico delle stesse, previa fissazione in formalina al 10% tamponata, allestimento e colorazione dei preparati con Ematossilina-Eosina.

RISULTATI - In tre soggetti le gonadi avevano sede addominale, in altri tre sottocutanea (regione pubica sottomammaria) ed inguinale nel settimo; tutti sono stati quindi classificati come freemartins di "tipo maschile". L'aspetto mascolino della testa (profilo montonino) era più marcato nei soggetti con gonadi localizzate sottocute che presentavano, inoltre, uno sviluppo di testicoli ed epididimi sensibilmente maggiore rispetto a quelli con gonadi più interne. In tutti i casi, le mammelle erano di tipo infantile ma la localizzazione delle gonadi in posizione sottomammaria conferiva all'insieme l'aspetto di una mammella discretamente sviluppata. L'esame ecografico ha evidenziato un'architettura tipica testicolare ed epididimo ben sviluppato; tuttavia, rispetto ai quadri ecografici di gonadi normali di soggetti impuberi, il parenchima si presentava nel complesso disomogeneo, con vaste aree iperecogene. I quadri istologici delle gonadi erano pressoché sovrapponibili nei due soggetti esaminati. Il parenchima testicolare era disomogeneo: nel suo contesto spiccavano nidi di tubuli seminiferi, più sviluppati rispetto ad altri meno evoluti, sparsi in un tessuto connettivale dominante. La spermatogenesi era assente ed il lume di alcuni tubuli seminiferi era tappezzato da un unico strato cellulare. Le cellule di Leydig, presenti in tutti i campi, erano più numerose in concomitanza degli addensamenti di tubuli seminiferi. In tabella 1 sono riportati i valori medi mensili nel corso dell'anno della testosteronemia in relazione alla localizzazione delle gonadi. L'osservazione del comportamento dei freemartins nel gregge non ha evidenziato atteggiamenti di tipo femminile mentre, al contrario, i soggetti con gonadi localizzate sottocute mostravano aggressività nei confronti degli arieti sino a competere con questi anche esibendo tipici atteggiamenti maschili con le pecore sino al "salto" di quelle in calore.

ARIETI												
	gennaio	febbraio	marzo	aprile	maggio	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre	dicembre
	4,33 ± 4,33	4,74 ± 3,55	6,05 ± 8,17	5,71 ± 4,26	5,54 ± 4,80	7,50 ± 5,08	7,92 ± 4,70	10,92 ± 2,05	10,64 ± 1,35	11,5 ± 1,98	7,17 ± 3,85	7,62 ± 5,51
INTERSESSI												
	gennaio	febbraio	marzo	aprile	maggio	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre	dicembre
a	6,06 ± 3,12	3,52 ± 1,00	4,84 ± 4,07	3,84 ± 1,75	5,04 ± 2,86	3,31 ± 1,73	5,1 ± 2,26	5,45 ± 2,28	5,4 ± 2,59	5,31 ± 2,41	6,91 ± 4,01	3,6 ± 2,47
b	0,30 ± 0,17	0,57 ± 0,02	1,01 ± 0,84	0,67 ± 0,03	0,96 ± 0,31	0,80 ± 0,22	0,94 ± 0,27	1,06 ± 0,33	0,70 ± 0,23	0,69 ± 0,34	0,41 ± 0,15	0,30 ± 0,12
c	0,59 ± 0,42	1,16 ± 0,64	0,99 ± 0,48	0,85 ± 0,12	1,00 ± 1,06	1,46 ± 1,41	1,12 ± 0,90	1,23 ± 1,27	1,14 ± 1,03	0,70 ± 0,54	0,56 ± 0,45	0,92 ± 0,71

Tab. 1 - Media e deviazione standard della testosteronemia (ng/ml) nel corso dell'anno

a – testicoli sottocutanei

b – testicoli inguinali

c – testicoli addominali

OSSERVAZIONI E CONCLUSIONI - Il riscontro costante di cellule del Leydig all'esame istologico lascia supporre la capacità delle gonadi a sintetizzare androgeni. L'esame istologico conferma inoltre la disomogeneità del parenchima testicolare evidenziata dall'esame ecografico; le aree di parenchima più ipoecogeno sono riferibili ai "nidi" di tubuli seminiferi. I valori della testeronemia, al di sopra del minimo dosabile in tutti i campioni dei freemartins oggetto della ricerca, evidenziano ulteriormente la capacità delle gonadi di questi soggetti di produrre testosterone. Tuttavia, i valori medi della testeronemia annuale ($0,977 \pm 0,753$ nei soggetti con testicoli addominali, $0,668 \pm 0,183$ nei soggetti con testicoli inguinali e $4,865 \pm 2,546$ in quelli con testicoli sottocute) evidenziano che i soggetti con gonadi sottocute sono in grado di produrre maggiori quantità di androgeni ($P < 0,001$). Tale osservazione sarebbe confermata, tra l'altro, anche dalle caratteristiche maschiline di questi soggetti più accentuate rispetto a quello dei freemartins con testicoli localizzati in cavità addominale o nel canale inguinale. Le differenze della testeronemia, per queste ultime tipologie di soggetti non sono significative. I valori medi, in tutti i freemartins, sono, comunque, significativamente più bassi ($P < 0,001$) rispetto a quelli degli arieti normali ($7,470 \pm 4,136$). Le variazioni della testeronemia nel corso dell'anno non presentano variazioni significative per gli intersessi, mentre lo sono negli arieti ($P < 0,01$) dove la curva è più alta da agosto ad ottobre con valori massimi in quest'ultimo mese; i valori minimi si riscontrano a gennaio. Manunta et al. (1981) riportano un andamento della testeronemia relativamente simile in arieti di razza sarda, allevati nelle stesse condizioni. Per quanto riguarda i freemartins, l'analisi dei risultati del testosterone plasmatico nel loro complesso non evidenzia una variabilità legata al fotoperiodo nella sintesi e rilascio degli androgeni. Dai nostri riscontri risulta evidente che, nella maggior parte dei casi, una diagnosi clinica di intersessualità maschile non è possibile sulla base dell'esame dell'apparato genitale esterno e dell'ispezione vaginale. Infatti l'impervietà della vagina, caratteristica di questi soggetti, può essere comune ad altri tipi di malformazioni dell'apparato genitale. È quindi evidente che, in assenza di accertamenti clinici dell'apparato genitale interno, la diagnosi di intersessualità certa può essere emessa solo per i soggetti con testicoli localizzati sottocute. Questi ultimi, considerate le loro spiccate caratteristiche maschiline, potrebbero essere impiegati come soggetti teaser al posto degli arieti deferentectomizzati.

BIBLIOGRAFIA - 1. Pau, S., Biolatti, B. Apparato genitale femminile. Da Guarda G. e Mandelli G., *Trattato di Anatomia Patologica Veterinaria*, Ed. UTET, Torino, 619-652 (2002). 2. Smith, K.C. et al., Morphological, histological and histochemical studies of the gonads of ovine freemartins. *Vet. Rec.*, 152, 164-169, (2003). 3. Bosu, W.T.K., Basrur, P.K., Morphological and hormonal features on a ovine and a caprine intersex. *Can. J. Comp. Med.*, 48, 402-409, (1984). 4. Parkinson, T.J. et al., Inter-relationships among gonadotrophins, reproductive steroids and inhibin in freemartin ewes. *J. Reprod. Fert.*, 122, 397-409, (2001). 5. Saba, N., Cunningham, N.F., Boarer, C.D., Plasma gonadotropin and androgen concentrations in a freemartin ewe and its male sibling. *J. Reprod. Fert.*, 51, 113-117, (1977). 6. Smith K.C. et al., Anatomical, cytogenetic and behavioural studies of freemartin ewes. *Vet. Rec.*, 146, 574-578, (2000). 7. Santucci, C., Iannuzzi, L., Fogu, G., Bonelli, L., Iannuzzi, L., Bogliolo, L., Rosati, I., Ledda, S., Zedda, M.T., Pau, S., Clinical and cytogenetic studies in intersex ewes, *Caryologia*, 59, 67-74, (2006). 8. Manunta, G., Floris, B., Cappai, P., Attività circannuale delle gonadi nell'ariete di razza Sarda. *Arch. Vet. It.*, 32, 117-123, (1981).

INDICI DI CORRELAZIONI TRA PARAMETRI DI MONITORAGGIO DEL PERIODO ESTRALE DI PECORE DI RAZZA SARDA
CORRELATION INDICES AMONG MONITORING PARAMETERS DURING ESTROUS IN SARDA EWES

Mayorga Munoz I.M., Stelletta C.,¹Masia F.,¹Mara L., Romagnoli S.,¹Dattena M., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova;*
¹IZSC, Sardegna

Parole chiave: Sincronizzazione Estrale, Ormoni, Ecografia Ovarica, Comportamento
Keywords: Estrus Synchronization, Hormones, Ovarian Ultrasonography, Behaviour

SUMMARY - Estrus synchronization is up today an intriguing aspect of the flock management. Correlations indices between oestrus behaviour, ovary ultrasonography, hormonal assay and mucus impedance were evaluated in 19 sarda ewes. Nine ewes were treated for 14 days with FGA sponges and PMSG, group (T) and 10 ewes were untreated, group (C). The observations of parameters were carried out every 12 hours from sponge removal in group (T) and from oestrus detection in group (C) until the AI. AI was performed with chilled semen (at 4°C stored for 24h) at 55h from sponges withdrawal in group (T) and at 24 h from onset of oestrus in group (C). Results indicate that there is correlation among parameters in both groups for animals with positive pregnancy diagnose.

INTRODUZIONE - La sincronizzazione degli estri è una tecnica in grado di migliorare la produttività aziendale. Il trattamento di sincronizzazione dell'estro può influenzare la procreanza, l'accettazione e la recettività della femmina^{1,2}, di conseguenza è possibile stimare la sua efficacia attraverso rilievi comportamentali. Inoltre il pattern comportamentale dipende dall'estradiolo prodotto dai follicoli di diverse dimensioni. L'estradiolo a sua volta influenza la resistenza elettrica del muco vaginale che può essere misurata attraverso l'uso di una sonda intravaginale³. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare in due gruppi di animali (T,C) le correlazioni esistenti tra gravidanza dopo fecondazione artificiale e diversi parametri quali: oestrus behaviour (OB), ultrasonografia ovarica(UO), livelli ematici di progesterone (P₄) ed estradiolo (E₂) e resistenza elettrica del muco vaginale (RE) monitorati durante l'estro.

MATERIALI E METODI - Sono state considerate 19 pecore di razza Sarda, in età adulta. Nove trattate con spugnette vaginali (FGA 40 mg) per 14 giorni e PMSG (400 U.I. im) all'asportazione della spugna. (gruppo T) e dieci pecore non trattate (gruppo C). La FA è stata eseguita, a 55 h dalla rimozione delle spugne nel gruppo T ed a 24 h dall'inizio dell'estro nel gruppo C, utilizzando seme refrigerato a 4°C conservato per 24 ore⁴. Sono stati considerati cinque parametri (OB), (UO), (P₄), (E₂), (RE). Il monitoraggio veniva effettuato ogni 12 ore dall'asportazione della spugna nel gruppo (T) e dal rilevamento del calore nel gruppo (C) fino alla FA. Il (P₄) è stato dosato solo al momento della FA e dopo 7 giorni.

Per i rilievi comportamentali (OB) sono state prese in considerazione quattro classi di intensità (0-3) dei diversi atteggiamenti della femmina in presenza del maschio vasectomizzato: ricerca del maschio (RM); movimento della coda (MC); annusamento del maschio (A); spostamento laterale della testa (SLT); riflesso di immobilità (RI); permissione del salto (PS). I rilievi ecografici sulle ovaie sono stati effettuati utilizzando una sonda transrettale prostatica da 7,5 Mhz prendendo in considerazione il numero (NF) e il diametro (DF) dei follicoli uguali e superiori a 2 mm di diametro. I dati

raccolti sono stati analizzati prendendo in considerazione il singolo follicolo osservato all'interno della popolazione follicolare (730 osservazioni).

La concentrazione di (E_2) e del (P_4) è stata dosata su plasma ottenuto da sangue periferico con metodica RIA. La RE è stata rilevata mediante sonda intravaginale (Draminsky) contestualmente ai rilievi ecografici.

Gli indici di correlazione di Pearson sono stati ottenuti per tutti i parametri considerati utilizzando il software SIGMASTAT 2.03. Sono stati valutati soltanto indici con un $r \geq 0,3$ con $P < 0,05$.

RISULTATI - La percentuale di animali gravidi era del 55,5 % (5/9) e del 20,0% (2/10) nel T e nel C rispettivamente a 80 giorni dalla FA.

Nella figura 1 e 2 sono riportati gli indici di correlazione di Pearson del gruppo T e C rispettivamente per i parametri RM, MC, A, SLT, RI, PS, RE ed E2 tra le pecore gravide e le non gravide. Negli istogrammi sono invece indicati il numero dei follicoli e i loro diametri in rapporto ai livelli estrogenici.

La correlazione tra il diametro follicolare ed il numero di follicoli ha un $r > -0,4$ per entrambi i protocolli utilizzati sia per le pecore gravide che per quelle non gravide.

Il numero di osservazioni dei follicoli considerate nell'analisi del gruppo T, è stato pari a 310 per gli animali risultati non gravidi e a 240 per gli animali risultati gravidi. Per il gruppo C sono stati analizzati 147 osservazioni per gli animali risultati non gravidi e 33 osservazioni per quelli animali risultati gravidi.

La progesteronemia dopo 7 giorni della FA è risultata essere correlata con i livelli di estradiolo e con RM negli animali gravidi di entrambi i protocolli.

Nel gruppo T si evidenzia la presenza di correlazione tra RM e gli altri parametri comportamentali (PS, RI, STL, MC), mentre RM e RE sono correlati solo nelle pecore gravide. Il parametro A è correlato con E_2 negli animali gravidi e con RM negli animali non gravidi. Nel gruppo C sono presenti correlazioni negative tra RM, SLT, RI, PS, E_2 ed RE solo negli animali gravidi. Il parametro MC non è correlato con gli altri parametri negli animali gravidi.

DISCUSSIONE - Dai risultati ottenuti con il gruppo T si può evidenziare che la RM è un parametro che è presente nelle femmine gravide. Tale risultato indica la procettività della femmina come indice di una sincronizzazione tra fattori centrali e periferici che gestiscono il comportamento estrale. Nel gruppo C le relazioni esistenti tra SLT, RI, PS, RE ed ES identificano la validità del metodo di valutazione comportamentale e danno informazioni sull'effetto centrale dell'estradiolo. Precedenti esperimenti hanno dimostrato che esistono differenze genetiche nella risposta ipotalamica ed ipofisaria alla presenza di estradiolo⁵. Tali differenze possono essere attribuite a diversi fattori tra cui l'esperienza della femmina alla presenza del maschio e, soprattutto, il tempo che impiegano i centri ipotalamici a recepire le informazioni derivanti dai follicoli preovulatori². La velocità di risposta può incidere sul tasso di ovulazione. I livelli più elevati di estrogeni corrispondono al maggiore valore di rapporto tra diametro follicolare e numero di follicoli. Tale riscontro è in accordo con precedenti lavori che indicano la selezione e differenziazione follicolare come evento dipendente dalla stretta relazione esistente tra informazioni centrali (ipotalamo-ipofisi) e periferiche (cellule della teca e della granulosa)^{6,7} e che qualsiasi altro fenomeno alterante lo stimolo, dato naturalmente dall'FSH, determina un comportamento anomalo nella produzione di estradiolo⁸. Le caratteristiche fisiche del muco vaginale (RE) essendo correlate con le variazioni comportamentali possono essere considerate per lo studio dell'ottimizzazione del momento di FA.

Figura 1 - Gruppo T: Indici di correlazione di Pearson ($r \geq 0,3$ con $P < 0,05$) tra i parametri considerati (RM, MC, A, SLT, I, PS, RE, E2) suddivisi per esito della FA e rappresentazione grafica del rapporto tra numero di follicoli, diametro follicolare ed estradiolo.

	GRAVIDE ↓							
	RM	MC	A	SLT	RI	PS	RE	E2
E2	-	-	.35	-	.31	-	-	-
RE	-.39	-.33	-	-.38	-.38	-.40	-	-.30
PS	.41	.57	-	.64	.97	-	-.42	-
RI	.47	.55	-	.62	-	.97	-.42	-
SLT	.52	.70	.36	-	.84	.80	-.40	-
A	-	-	-	.44	-	.32	-	-
MC	.55	-	-	.88	.85	.81	-.41	-
RM	-	-	.71	.38	.31	.35	-	-

NON GRAVIDE ↑

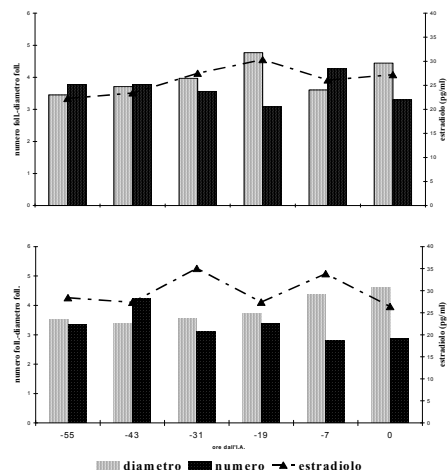
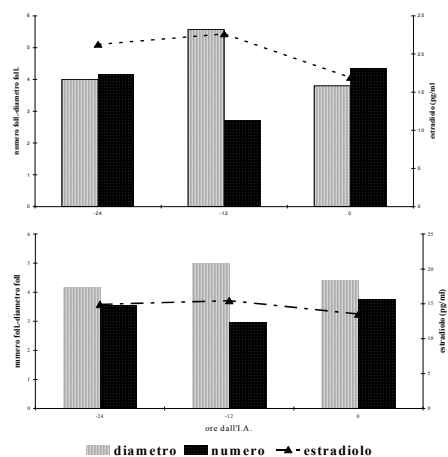


Figura 2 - Gruppo C: Indici di correlazione di Pearson ($r \geq 0,3$ con $P < 0,05$) tra i parametri considerati (RM, MC, A, SLT, RI, PS, RE, E2) suddivisi per esito della F.A nel C e rappresentazione grafica del rapporto tra numero di follicoli, diametro follicolare ed estradiolo.

	GRAVIDE ↓							
	RM	MC	A	SLT	RI	PS	RE	E2
E2	-	-	-	.65	.75	.75	-.55	-
RE	-.57	-	-	-.80	-.82	-.82	-	-
PS	.43	-	-	.95	-	-	-.30	-
RI	.43	-	-	.95	-	.91	-	-
SLT	.34	-	-	-	.79	.81	-	-
A	-	-	-	-	.34	.37	-	.40
MC	-	-	-	.49	.46	.50	-	.34
RM	-	.53	-	.73	.66	.77	-.53	-

NON GRAVIDE ↑



BIBLIOGRAFIA – 1. Fabre-Nys, C., Steroid control of monoamines in relation to sexual behaviour. *Rev. Reprod.*, 3:31-41, (1998). 2. Gelez, H., et al., Role of experience in the neuroendocrine control of ewes' sexual behaviour. *Horm. Behav.*, 45:190-200, (2004). 3. Bartlewsky, P.M. et al., Ovarian antral follicular dynamics and their relationship with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fert.*, 115:111-124, (1999). 4. Mara, L. et al., Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertilità: a preliminary study. *Theriogenology*, 63:2243-2253, (2005). 5. Ben Said, S. et al., Differential Estradiol Requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biol. Reprod.*, 76:673-680, (2007). 6. Markström, E., Svensson, E.C., Shao, B., Svanberg, B., Billig, H., Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123:23-30, (2002). 7. Hunter, M.G., Robinson RS, Mann GE, Webb R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83: 461-477, (2004). 8. Dobson, H., Ghuman, S., Prabhakar, S., Smith, R., A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction*, 125:151-163, (2003).

INDUZIONE E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ GONADICA IN BECCHI TRATTATI CON GnRH E CALCIO-NALOXONE E CONSEGUENTE FERTILITÀ NELLE CAPRE

INDUCTION AND EVALUATION OF GONADAL FUNCTION IN BUCKS TREATED BY MEANS OF GnRH, CALCIUM AND NALOXONE AND GOAT'S FERTILITY RATE

Binetti F., Aiudi G., Matarrese R., Guaricci A.C., Minoia R., Lacalandra G.M.,
Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari.

Parole chiave: Becchi, GnRH, Calcio, Naloxone

Key words: Bucks, GnRH, Calcium, Naloxone

SUMMARY - In this work we stimulated the libido and the testicular function in male goats out of the reproductive season by means of GnRH in association with calcium and Naloxone (Ca/Nx). Treated bucks received GnRH 40 µg im every 8h for 2 days, every 12h for the next 2 days and one time a day for the last 2 days + 5 ml/subject/day/im of Ca/Nx for 6 days. Behavioural, testicular, seminal and hormonal parameters, were evaluated. The significant ($P \leq 0,05$) increase of the scrotal circumference together to the positive variation of the seminal, hormonal and behavioural parameters (libido) and the fertility of mated goats, underline the efficacy of the pharmacological treatment.

INTRODUZIONE - Nella specie caprina il controllo endocrino del S.N.C. sull'attività riproduttiva è fortemente influenzato dal fotoperiodo breve (*short breeder*) tipico del periodo autunnale-invernale ma anche da fattori come razza e management aziendale. In primavera-estate (controstagione) si ha interruzione della funzione riproduttiva, particolarmente nei becchi, dove si assiste a totale assenza di libido ed impossibilità di sfruttare il cosiddetto "effetto maschio" per indurre gli estri nelle femmine. Nei becchi l'inizio della stagione riproduttiva è preceduto da una stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisario che porta all'incremento della secrezione pulsatile di GnRH e di LH-FSH e dunque di testosterone. Il GnRH legandosi ai recettori specifici ipofisari, a loro volta strettamente interconnessi ai canali del calcio presenti sulla membrana cellulare, favorisce l'ingresso di calcio extracellulare¹. Il legame calcio-calmodulina (recettore intracellulare del calcio) attiva gli enzimi calcio-dipendenti (proteinchinasi, adenilciclasti e fosfodiesterasi) necessari per la secrezione e liberazione delle gonadotropine. Tra i principali inibitori endogeni della secrezione di gonadotropine ricordiamo gli oppioidi², neuropeptidi appartenenti a tre categorie: encefaline, dinorfine, endorfine. La loro azione più nota è quella antalgica conseguente ad un loro aumento in risposta ad una condizione di stress di qualsiasi natura ed entità. Tuttavia tali sostanze inducono negli animali una serie di effetti sul sistema endocrino riproduttivo; sono in grado di bloccare i canali transmembranari del calcio alterandone gli scambi³ ed inibendo la produzione ed il rilascio del GnRH⁴. È stato dimostrato che le endorfine determinano un effetto inibente la sintesi di testosterone, probabilmente alterando la risposta all'LH delle cellule del Leydig⁵. Alti livelli di oppioidi endogeni, legandosi ai recettori μ presenti negli spermatozoi ne alterano le funzioni metaboliche⁶. Il Naloxone, antagonista degli oppioidi endogeni, si lega con alta affinità ai recettori μ ⁷, favorendo la riattivazione dei canali L del calcio e delle funzioni fisiologiche cellulari⁸. Precedenti studi hanno dimostrato l'efficacia del GnRH di sintesi e dell'associazione Calcio/Naloxone nell'aumentare la libido nei becchi⁹. In questa ricerca lo scopo è stato quello di valutare le variazioni dei parametri comportamentali, testicolari, seminali ed ormonali nei becchi in controstagione, dopo stimolazione farmacologica con GnRH e Calcio/Naloxone.

MATERIALE E METODI - La sperimentazione è stata condotta nel mese di Maggio 2006 presso un'allevamento sito in agro di San Vito dei Normanni (BR). Sono stati utilizzati 20 becchi di 1-5 anni, in buone condizioni generali e 240 capre *Jonica x Maltese* allevati con sistema misto pascolo-integrazione in stalla. In precedenza maschi e femmine sono stati separati per circa trenta giorni per escludere reciproci stimoli sessuali di tipo olfattivo, visivo e sonoro. I becchi sono stati divisi in due gruppi, trattato e controllo, ciascuno costituito da 10 soggetti. Utilizzando uno schema già descritto in precedenti note¹¹ è stato somministrato GnRH (Fertagyl[®], Intervet, Italia), 40 µg/capo i.m., ogni 8 ore il 1° e 2° giorno, ogni 12 ore il 3° e 4° giorno e ogni 24 ore il 5° e 6° giorno ed una soluzione di 5 ml/capo die i.m. per 6 giorni di Calcio Gluconato al 20% (Fatro, Italia) contenente 0,2 mg/ml di Naloxone (Naloxone hydrochloride, Dyosint, Olanda). I becchi di controllo non hanno ricevuto alcun trattamento. Il giorno successivo alla fine del trattamento, i becchi sono stati immessi in due gruppi di capre, ciascuno costituito da 120 soggetti. Al tempo 0 (giorno prima dell'inizio dei trattamenti), a fine trattamento e dopo una settimana dall'immissione dei maschi nel gruppo delle femmine, sono state effettuate misurazione della circonferenza testicolare, misurazione ecografica della distanza interparietale e parete-mediastino testicolare (ScanVet 480, 5Mhz, Pie Medical, Olanda), prelievi ematici per il dosaggio del testosterone su siero (n=5 per gruppo) con metodica ELISA (Kit testosterone, EIA WELL; Radim, Italia), prelievi di seme mediante elettroeiaculatore (IMV, France), la cui concentrazione spermatica è stata calcolata con fotometro ACCUCCEL (I.M.V., France). La diagnosi ecografica di gravidanza è stata effettuata a 50 giorni, ed infine è stata monitorata l'epoca dei parti. L'analisi statistica è stata effettuata con ANOVA test.

RISULTATI - Il quarto giorno dall'inizio del trattamento il vello dei becchi trattati è diventato sporco e maleodorante. Il giorno dell'immissione fra le femmine sono stati osservati irrequietezza, tentativi reciproci di monta e interesse verso le femmine, con tentativi di monta delle stesse; è diventato sempre più intenso il forte odore emanato dai becchi. Dopo 3-4 giorni le femmine hanno iniziato ad essere attratte dai maschi e ad accettare i corteggiamenti, senza però farsi montare. Nelle successive 24-48 ore le femmine hanno iniziato ad urinare frequentemente seguendo a loro volta i maschi belando frequentemente ed accettando la monta. La circonferenza scrotale ed i parametri rilevati ecograficamente sui testicoli sono aumentati in tutti i becchi, ma solo in quelli trattati sono risultati statisticamente significativi (Tab. 1: $P \leq 0,05$).

Tab. 1 - Misurazione (cm; X±D.S.) della circonferenza testicolare; della distanza ecografia parete-parete e tra parete e mediastino testicolare

RILIEVI	BECCHI	GG. 0	GG. 7	GG. 14
Circonferenza scrotale	Trattati	31,5 ± 1,3 ^A	34,3 ± 0,6	34,4 ± 0,7 ^B
	Controllo	31,8 ± 1,7	32,0 ± 1,6	32,1 ± 1,7
Distanza ecografia parete-parete	Trattati	5,36 ± 0,1 ^A	6,09 ± 0,5	6,27 ± 0,4 ^B
	Controllo	5,44 ± 0,7	5,58 ± 0,3	5,6 ± 0,3
Distanza ecografia parete-mediastino	Trattati	3,04 ± 0,4 ^a	3,53 ± 0,1	3,71 ± 0,2 ^b
	Controllo	3,29 ± 0,4	3,53 ± 0,5	3,66 ± 0,5

Sulla stessa riga: A≠B per $P \leq 0,01$; a≠b per $P \leq 0,05$

I parametri seminali dopo trattamento sono significativamente migliorati e nei valori medi tipici di specie (Tab. 2). Il rilievo della testosteronemia (Tab. 3) a fine trattamento e dopo 7 giorni dalla sospensione dello stesso, ha evidenziato valori in significativo incremento nei soggetti trattati. Le capre che si sono accoppiate con i soggetti trattati sono risultate gravide con una percentuale del 91,5% partorendo nell'arco di 13 giorni. La percentuale di gravidanza è risultata pressoché simile anche nel gruppo di capre fatte accoppiare con i soggetti contrattati, ma i parti si sono avuti più tardivamente e distribuiti in un periodo decisamente maggiore (30 gg).

Tab. 2 - Variazioni dei parametri seminali dopo trattamento (X±D.S.)

BECCHI	PRELIEVI	VOLUME (ml)	SPZ/ML (x10 ⁹)	MOTILITÀ
Trattati	1°	0,70 ± 0,05 ^A	2,655 ± 0,6	Onde lente
	2°	1,20 ± 0,10 ^B	3,243 ± 0,6	Vortici rapidi
Controlli	1°	0,70 ± 0,05	2,419 ± 0,7	Onde lente
	2°	0,80 ± 0,05	2,187 ± 0,5	Onde lente

Sulla stessa colonna: A≠B per P≤0,01.

Tab. 3 - Variazioni della testosteronemia (ng/ml) dopo trattamento (X±D.S.)

BECCHI	GG. 0	GG. 7	GG. 14
Trattati	0,91 ± 0,08 ^A	9,38 ± 0,10 ^{aB}	12,68 ± 0,6 ^{aB}
Controllo	0,99 ± 0,05	1,07 ± 0,06 ^b	2,05 ± 0,8 ^b

Su riga: A≠B per P≤0,01, (intragruppo) Su colonna: a≠b per P≤0,01, (fra gruppi).

DISCUSSIONE - Il trattamento combinato GnRH+Ca/Nx ha fornito buoni risultati. Ciò è sicuramente da riferirsi all'azione di antagonizzazione della β-endorfina sia a livello ipotalamo-ipofisario che a livello gonadico che consente una più efficace attività di stimolazione del GnRH sull'adenipofisi, una migliore azione delle gonadotropine ipofisarie endogene sulle cellule bersaglio testicolari. L'aggiunta del calcio, da solo o in associazione con il Naloxone, estrinseca la sua azione prevalentemente a livello metabolico. Si dimostra quindi che in questa specie la scarsa o assente attività sessuale dei becchi in controstagione vede coinvolto il sistema opioidergico come causa di minore attività cellulare al livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Il rilievo clinico più evidente, è stato l'aumento di volume dei testicoli che rappresenta il parametro fortemente indicativo della produzione di spermatozoi. Tale correlazione, già dimostrata negli arieti¹⁰ e nei becchi⁹, nella pratica viene utilizzata per valutare indirettamente la capacità e l'attitudine del maschio alla produzione di elevate quantità di spermatozoi e quindi la possibilità di utilizzarlo in maniera efficace nei programmi riproduttivi. Va segnalato che l'utilizzo degli ultrasuoni ai fini della determinazione dell'accrescimento testicolare, ha rappresentato un valido e preciso ausilio strumentale rispetto alla misurazione manuale. I risultati ottenuti avvalorano la validità di un protocollo di stimolazione con GnRH associato a Naloxone e Calcio nella induzione della libido in becchi in controstagione, requisito indispensabile per ottenere gravidanze nelle capre in controstagione.

BIBLIOGRAFIA - 1. Zorn, J.R., Bouchar, P., Fanizza, G., D'Amato, G., Induzione dell'ovulazione con triptoterina e gonadotropine. *Monografia IPSEN*, Milano, (1992). 2. Evans, W.S., Sollemberger, M.J., Vance, M.L., Ormoni ipotalamo-ipofisari. In: Brody, T.R. *et al.*, (Eds) *Farmacologia umana*. Ed. SES, Napoli. 41:544-555, (1997). 3. Minoia, P., Sciorsci, R.L., Il ruolo del calcio nelle patologie endorfino-mediate. Meccanismi biologici, possibilità diagnostiche. Orientamenti terapeutici. *Atti Accademia Pugliese delle Scienze*. Grafischena Ed. Fasano (BR), (1994). 4. Minoia, P., et al., Effetto del naloxone sul calcio e pH intracellulari in linee cellulari di origine renale. *Atti S.I.S.Vet.*, LI: 233-34, (1997). 5. Kant, P.A., Saxena, R.N., Effect of β-endorphin and naloxone on rat testicular steroidogenesis. *Indian J. Exp. Biol.*, 33 (3): 165, (1995). 6. Guaricci, A.C., Albrizio, M., Conte, A., Maritato, F., Dell'Aquila, M.E., Zarrilli, A., Sciorsci, R.L., Minoia, P., Immunofluorescence detection of mu-opioid receptor on ram and buck spermatozoa. *Reproduction in domestic animals*, 37 (4): 235, (2002). 7. Hardingam, G.E., Chawla, S., Johnson, C.M., Bading, H., Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*, 385, 260, (1997). 8. Lograno, M.D., et al., The opioid antagonist Naloxone controls L-type calcium channel activity. 1st World Congress on calcium and Vitamin D in Human life, Roma, P12, (1996). 9. Lacalandra, G.M., Minoia, P., Ben Saad, A., Stimolazione con GnRH della libido dei becchi e conseguente comparsa dei calori in capre in anestro stagionale. *Atti S.I.P.A.O.C.*, XI, 342-346, (1994). 10. Lindsay, D.R., Pellettier, J., Pisselet, C., Courot, M., Changes in photoperiod and nutrition and effect on testicular growth of rams. *J. Reprod. Fert.*, 71: 351-356, (1984).

IMPIEGO DEL VACCINO CONTRO HERPESVIRUS CANINO IN ALLEVAMENTI DI CANI: RISULTATI PRELIMINARI
USE OF CANINE HERPESVIRUS VACCINATION IN BREEDING KENNELS: PRELIMINARY RESULTS

Rota A.,¹ Milani C.,¹ Mollo A., *Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, ¹Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova*

Parole chiave: Cane, Herpesvirus, Vaccinazione
Key words: Dog, Herpesvirus, Vaccine

SUMMARY - This work investigated the use of a vaccine against Canine herpesvirus (CHV) in three breeding kennels. Sixteen estrous bitches that were mated during the course of the study were vaccinated: seroconversion was generally good, even after a single dose of vaccine. Eleven bitches resulted to have a positive antibody titre before vaccination, enough to protect newborns. Four months after vaccination, the antibody titre of the 4 checked bitches had not decreased. Only 10 bitches out of 16 resulted pregnant and neonatal mortality rate resulted very high in three kennels (51%). Post-mortem exams excluded the presence of CHV.

INTRODUZIONE - L'Herpesvirus canino (CHV) è stato isolato per la prima volta negli Stati Uniti nel 1965 da Carmichael, che lo riconobbe come causa di una malattia emorragica mortale in cuccioli neonati.¹ Si tratta di un alpha-herpesvirus, endemico nella popolazione canina,² che provoca un'infezione acuta e quasi sempre letale dei cani neonati, mentre nei soggetti di età superiore alle due settimane il decorso dell'infezione generalmente è asintomatico. I neonati si infettano per via oronasale al momento del passaggio nel canale del parto oppure per contatto con altri neonati infetti o con secrezioni oronasali o genitali materne; il virus può essere anche trasmesso per via transplacentare causando aborto in assenza di segni clinici nella fattrice.³ Nei soggetti adulti l'infezione può causare lesioni localizzate alla mucosa degli organi genitali: nella femmina vi è iperemia e iperplasia dei follicoli linfatici sottomucosi della vagina; nel maschio analoghe lesioni alla base di pene e prepuzio.³ Vi è anche il sospetto che il virus possa essere causa di infertilità.⁴ Trattandosi di un Herpesvirus, i soggetti infetti rimangono portatori latenti per tutta la vita; il virus rimane localizzato nei gangli del trigemino e lombosacrali, nelle tonsille e nella parotide.⁵ Condizioni di stress possono causare la riattivazione delle infezioni latenti e conseguentemente l'escrezione del virus.⁵ Infezioni latenti ed escrezione virale intermittente rendono di fatto impossibile eradicare il virus dagli allevamenti.

Il titolo anticorpale sierico contro CHV aumenta 2-3 settimane dopo l'infezione e rimane elevato per pochi mesi, anche se bassi titoli possono permanere per circa due anni.³ Gli anticorpi, anche a basso titolo, proteggono i cuccioli dalla malattia, ma non dall'infezione.⁶

Lo studio che qui si presenta ha preso spunto dalle osservazioni svolte in alcuni allevamenti di cani in cui si erano verificati episodi di elevata mortalità neonatale e, in concomitanza con ciò, dall'immissione in commercio di un vaccino contro CHV (EuricanHerpes205[®], Merial Animal Health). L'indagine si è posta l'obiettivo di valutare l'impiego del vaccino in condizioni di campo, analizzando risposta sierologica e parametri riproduttivi.

MATERIALI E METODI - Lo studio si è svolto in tre allevamenti di cani, due di soggetti di razza boxer (allevamento n° 1 e 2) e uno di american staffordshire e

staffordshire terrier (allevamento n° 3), tutti con un numero di fattrici compreso tra dieci e venti unità.

In tutti gli allevamenti si era verificato in passato almeno un episodio di mortalità neonatale coinvolgente la quasi totalità della cucciolata; solamente nell'allevamento N° 2 l'eziologia era, in un caso, attribuibile a CHV.

Il lavoro ha avuto inizio valutando il titolo anticorpale sierico anti-CHV in un gruppo rappresentativo di soggetti in ciascun allevamento. A tal fine si è eseguito un prelievo di sangue ed il siero è stato inviato all'Istituto Zooprofilattico del Piemonte e della Valle d'Aosta per l'esame mediante sieroneutralizzazione.

Contemporaneamente, gli allevatori avevano deciso di iniziare la profilassi vaccinale delle fattrici, con il vaccino EuricanHerpes205 (Merial Animal Health). Nel corso dello studio sono stati vaccinati 16 cani: 2 nell'allevamento N° 1; 7 nell'allevamento N° 2 e 7 nell'allevamento N° 3. Su 7 soggetti è stato utilizzato il protocollo indicato dalla ditta produttrice, che prevede due vaccinazioni, la prima entro dieci giorni dall'accoppiamento e la seconda una decina di giorni prima del parto; su 4 soggetti già in gravidanza è stata eseguita solamente la seconda vaccinazione e su 5 soggetti si è somministrata solamente la prima dose di vaccino poiché non sono risultati gravidi. Prima della vaccinazione in 14 soggetti (su16) e, circa due settimane dopo, in 16 soggetti si è eseguito un prelievo di sangue. Il siero è stato congelato in attesa delle analisi. In 4 soggetti si è valutato il titolo anticorpale dopo 3 mesi dalla vaccinazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE - I risultati relativi alle fattrici sono presentati in tabella 1.

Allevamenti Fattrici	Titolo Ac medio iniziale (media±es)	Titolo Ac Pre-vaccino	N° inoculazioni	Titolo Ac Post-vaccino	N° cuccioli vivi/Tot
ALL. N° 1	2,14 ± 0,09				
Fattrice N° 1		0,6	1 (2°)	>2,4	0/8 (Cesareo)
Fattrice N° 2		1,2	1 (2°)	2,1	3/5 (Cesareo)
ALL. N° 2	1,5 ± 0,4				
Fattrice N° 1		0,6	2	>2,4	4/4
Fattrice N° 2		2,1	2	1,5 (dopo I) 1,8 (dopo II)	2/8
Fattrice N° 3		/	2	>2,4	6/6
Fattrice N° 4		0,6	2	>2,4	0/2 (Cesareo)
Fattrice N° 5		/	2	>2,4	0/4
Fattrice N° 6		0	2	1,5 (dopo I) 0 (dopo II)	Non gravida
Fattrice N° 7		0,6	2	2,4 (dopo I) 1,8 (dopo II)	4/4
ALL. N° 3	1,41 ± 0,23				
Fattrice N° 1		2,1	1 (2°)	>2,4	3/3
Fattrice N° 2		2,1	1 (2°)	>2,4	1/3
Fattrice N° 3		2,4	1 (1°)	>2,4	Non gravida
Fattrice N° 4		2,1	1 (1°)	>2,4	Non gravida
Fattrice N° 5		1,5	1 (1°)	>2,4	Non gravida
Fattrice N° 6		0	1 (1°)	>2,4	Non gravida
Fattrice N° 7		0	1 (1°)	>2,4	Non gravida

Come si può notare dal titolo anticorpale medio, in tutti gli allevamenti è presente CHV. L'altro elemento che risulta evidente è che molto spesso sono stati vaccinati soggetti già positivi e, in molti casi (All. N° 3), con titolo anticorpale elevato, dunque probabilmente queste vaccinazioni sarebbero state inutili. Lavori precedenti hanno dimostrato che il titolo anticorpale individuale tende a permanere elevato a lungo in condizioni di

allevamento, a causa della riattivazione del virus latente e dell'escrezione virale intermittente.⁷

Il vaccino ha determinato in genere una buona sierconversione, anche dopo un'unica somministrazione, e anche nei soggetti con titolo iniziale elevato. Una risposta anomala si è avuta in alcuni soggetti dell'All. N° 2 (Fattrici N° 2, 6, 7), in cui il titolo è sceso dopo la vaccinazione; trattandosi di uno stesso lotto di vaccini, si può pensare ad una inappropriata conservazione degli stessi.

Nelle 4 fattrici esaminate dopo 3 mesi dalla vaccinazione il titolo anticorpale era rimasto invariato (>2,4).

Da approfondire le cause dell'infertilità delle 5 fattrici risultate vuote nell'allevamento N° 3, tutti soggetti di provata fertilità, e avendo comunque già escluso problemi legati ai maschi impiegati o alla gestione degli accoppiamenti.

Infine, come si può rilevare dai dati in tabella, la mortalità neonatale risulta piuttosto elevata (24 neonati morti/47); in tutti i soggetti morti è stato escluso il coinvolgimento di CHV. Questo dato deve fare riflettere perché ci indica come CHV sia solo una delle possibili cause di mortalità neonatale e come questo problema non si possa risolvere solamente con una vaccinazione.

BIBLIOGRAFIA - 1. Carmichael, L.E., Clinical and pathological features of a fatal virus disease of newborn pups. *Am.J.VetRes.*, 26, 803-814, (1965). 2. Ronsse, V., Verstegen, J., Thiry, E., Onclin, K., Aeberlé, C., Brunet, S., Poulet, H., Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology*, 64, 61-74, (2005). 3. Carmichael, L.E., Greene, C.E., Canine Herpesvirus Infection. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, W.B. Saunders, Philadelphia, 28-32, (1998). 4. Poulet, H., Guigal, P.M., Soulier, M., Leroy, V., Fayet, G., Minke, J., Chappuis Merial, G., Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams. *Vet. Rec.*, 148, 691-695, (2001). 5. Carmichael, L.E., Neonatal pup diseases. Current status of Canine herpesvirus (CHV) and Minute Virus of canines (MCV, Canine Parvovirus-type 1, CPV-1), In: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/carmichael/chapter_frm.asp, (2004). 6. Carmichael, L.E., Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. *J.A.V.M.A.*, 156, 1714-1721, (1970). 7. Ronsse, V., Verstegen, J., Onclin, K., Farnir, F., Poulet, H., Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1), *Theriogenology*, 61, 619-636, (2004).

RILIEVI ECOTOMOGRAFICI ED ISTOPATOLOGICI A CARICO DELLE GONADI MASCHILI IN CORSO DI IPOTIROIDISMO PRIMARIO CANINO: DESCRIZIONE DI UN CASO CLINICO

ECHOGRAPHIC AND HISTOPATHOLOGIC FINDINGS IN TESTICULAR TISSUE IN HYPOTHYROID DOG: CASE REPORT

Di Loria A.,¹ Maccauro M., Prisco M., Cortese L., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli;* ¹*Libero professionista, Centro Medico Veterinario, Via Venezia 9, 82100 Benevento.*

Parole Chiave: Testicoli, Cane, Ecotomografia, Ipotiroidismo, Istopatologia

Key Words: Testicles, Dog, Ecotomographic, Hypothyroidism, Histopathology

SUMMARY - A 3-y.o. male German Sheppard dog was presented with a history of lethargy and non pruriginous alopecia. The electrocardiogram showed signs reduced heart frequency and ipo voltaic QRS in all leads. The echocardiography showed a ipo echoic parenchyma of thyroid gland and miliary iperecoic lesions in testicle parenchyma. A complete biochemical and ematological analisys demonstrated the hypothyroid condition. After castration histologic examinations of testicles show a possible effect of hypothyroidism in testicular parenchyma. This is the first case report of miliary ultrasound iperechoic lesions with histologic findings of cholesterol storage and atherosclerosis in *hypothyroid* dog.

INTRODUZIONE - Nell'ambito delle patologie endocrine del cane, l'ipotiroidismo rappresenta indubbiamente la discrinia di più frequente riscontro nella pratica clinica, con un'incidenza nel pastore tedesco rispetto alle altre razze, pari al 5%¹. Sono da tempo note le influenze negative dell'ipotiroidismo sulla capacità riproduttiva del cane, in entrambi i sessi: nel maschio l'affezione è responsabile di perdita della libido, di atrofia testicolare e di oligo-azospermia. Recenti ricerche nella razza Beagle tendono comunque a ridimensionare gli effetti dell'ipotiroidismo sull'attività riproduttiva del cane. Si tratta comunque di studi osservazionali in cui viene presa in esame, la capacità riproduttiva degli animali, dal punto di vista funzionale, mentre sono scarse le informazioni sulle modificazioni strutturali delle gonadi maschili in corso di tale patologia. Nella presente nota vengono riportate le alterazioni morfostrutturali delle gonadi ed i rilievi ecotomografici ad esse associati, riscontrati in un cane Pastore Tedesco ipotiroidico, per motivi soprattutto di ordine casistico ma anche con il fine di richiamare l'attenzione dei colleghi della pratica sull'importanza della valutazione ecotomografica delle gonadi nel maschio, non solo per i possibili riscontri diagnostici che ne possono derivare, ma anche per indirizzare il clinico ad ulteriori approfondimenti.

CASO CLINICO - Nel gennaio del 2007 viene portato a visita presso gli ambulatori della Sezione di Clinica Medica del Dipartimento di Scienze Cliniche della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Napoli Federico II, un cane di razza pastore tedesco, di anni 3,5 e di 35 Kg di peso. All'anamnesi il proprietario riferisce che da circa due mesi il cane manifesta alopecia non pruriginosa, facile affaticabilità e modesta depressione del sensorio. L'esame clinico del soggetto mette in evidenza un normale sviluppo scheletrico, uno stato trofico ottimale ed un buon grado di tonicità muscolare. Il sensorio appare depresso ed il mantello presenta aree alopeciche su groppa e base della coda, con scarsa presenza di peli primari. Le mucose sono rosee, la temperatura è di 38°C, il polso di 60 bpm ed il respiro normofrequente (16 apm); le funzioni organiche si compiono regolarmente. All'esame dei diversi organi ed apparati si evidenzia: itto cardiaco affievolito con toni parafonici, addome trattabile, assenza di algia alla palpazione della loggia renale e riflessi attenuati. Nulla di rilevante all'esame

dell'apparato respiratorio e degli organi addominali. Anche i testicoli appaiono normali per dimensioni, forma, consistenza e sensibilità. Allo scopo di meglio definire la natura del processo morboso sono state effettuate indagini collaterali, sia di laboratorio che strumentali. In particolare, oltre alla valutazione dei comuni parametri ematologici ed ematochimici, è stata studiata la funzionalità tiroidea, mediante determinazione della concentrazione sierica degli ormoni fT4, T4 e del TSH, ed effettuata la ricerca di anticorpi anti-tireoglobulina (anti-Tg) sierici. Inoltre, sono stati eseguiti esami elettrocardiografici ed ecografici.

RISULTATI - L'esame emocromocitometrico ed il profilo ematochimico hanno messo in evidenza un lieve grado di anemia normocromica-normocitica ed un'alterazione del profilo lipidico, con aumento del tasso plasmatico del colesterolo totale e dei trigliceridi (Colesterolo: 689 mg/dl, range norm.: 108-300 mg/dl; Trigliceridi: 284 mg/dl, range norm.: 50-100 mg/dl). La valutazione degli ormoni tiroidei ha evidenziato un livello plasmatico dell'fT4 nettamente al di sotto della norma, mentre quelli del TSH è risultato superiore valori fisiologici di riferimento (fT4: <0,1 ng/dl, range norm.: 0,6-3,7 ng/dl; TSH: 0,78 ng/ml, range norm.: <0,5 ng/ml). La valutazione degli anticorpi antitireoglobulina ha dato esito negativo. L'ECG ha evidenziato ipovoltaggio dei complessi ventricolari associato a bradicardia (60 bpm). All'esame ecocardiografico è stato rilevato una modica riduzione della frazione di accorciamento e lieve rigurgito mitralico. L'ecografia addominale eseguita con il cane in decubito latero-laterale, non ha evidenziato anomalie a carico degli organi addominali. In entrambi i testicoli il parenchima mostra ecostruttura disomogenea con la presenza di piccole aree iperecogene miliariformi. Lungo il piano sagittale risulta apprezzabile il mediastino come interfacies iperecogena; l'epididimo, situato in posizione dorso laterale rispetto al testicolo, presenta una struttura analoga a quella del parenchima testicolare ma con ecogenicità inferiore. L'esame ecografico della tiroide ha mostrato una diffusa ipoecogenicità dei lobi ghiandolari ed assenza di lesioni focali. L'esame istologico effettuato sui testicoli dopo orchietomia (richiesta dal proprietario), analizzati in diversi piani di sezione dopo colorazione all'ematossilina-eosina, ha permesso di evidenziare in entrambe le gonadi lesioni di aspetto istologico simile. I tubuli seminiferi sono apparsi multifocalmente degenerati, con perdita, occasionalmente completa, delle cellule della linea germinale e persistenza delle sole cellule di sostegno del Sertoli. Alcuni tubuli risultano dilatati. Tra i tubuli seminiferi si è osservato un edema interstiziale discreto ed infiltrati infiammatori multifocali. Sono presenti altresì infiltrati linfoplasmocitari, spesso alla periferia dei tubuli degenerati. I tubuli seminiferi epididimari sono apparsi istologicamente normali, ma privi di spermatoцитi. I tubuli seminiferi non degenerati presentano una diminuzione della spermatogenesi. Si sono riscontrate inoltre occasionali calcificazioni intratubulari, lesioni vascolari aterosclerotiche, con ispessimento della media, infiltrati macrofagici e depositi di colesterolo. Sulla base dei dati clinici (stato trofico ottimale, depressione del sensorio, polso raro, dermatopatia non pruriginosa, QRS ipovoltati), dei risultati delle indagini di laboratorio (lieve anemia, aumento del colesterolo e dei trigliceridi, calo dei livelli plasmatici degli ormoni tiroidei ed elevata concentrazione plasmatica del TSH), è stata emessa diagnosi di ipotiroidismo primario, associato a compromissione delle gonadi. Il soggetto è stato sottoposto a terapia con L-tiroxina, alla dose di 10 µg/kg 2 volte al giorno, e a controlli periodici mensili. In risposta al trattamento terapeutico si è potuto constatare un apprezzabile miglioramento del quadro clinico, con particolare riferimento alle lesioni dermatologiche ed ai parametri di laboratorio.

DISCUSSIONE - Nonostante la diagnostica per immagini abbia raggiunto notevoli traguardi anche in Medicina Veterinaria, a tutt'oggi non si registrano in letteratura

descrizioni ultrasonografiche di anomalie del parenchima testicolare associate ad ipotiroidismo. Nell'uomo le disfunzioni testicolari apprezzate anche ad un esame ecografico, rappresentano uno degli elementi caratterizzanti delle sindromi autoimmuni polighiandolari di tipo I². In letteratura veterinaria i dati relativi all'incidenza dell'associazione tra anomalie testicolari ed ipotiroidismo risultano piuttosto frammentarie. È nota da tempo, quale disfunzione ereditaria in cani Beagle, una correlazione tra orchite linfocitaria e tiroidite linfocitaria. L'evento immunomediato è verosimilmente scatenato da lesioni in grado di creare discontinuità lungo la barriera emato-testicolare, cui può conseguire una sensibilizzazione verso gli antigeni spermatici riconosciuti come *non-self*. Tale sequela di eventi, condizionata dal tempo di esposizione degli antigeni spermatici, si renderebbe responsabile di quadri più o meno intensi di infiltrazione linfoplasmacellulare, con perdita delle cellule interstiziali, di disaggregazione dei tubuli seminiferi e di eventuali depositi di immunoglobuline³. Dal momento che le nostre indagini, per ragioni oggettive, non sono state integrate da un esame istologico della ghiandola tiroide, la presenza di infiltrati linfoplasmacellulari alla periferia dei tubuli seminiferi degenerati, ci porta solo ad ipotizzare un possibile analogo processo infiltrativo a carico della tiroide; l'assenza di anticorpi anti-Tg nel cane in oggetto non contribuisce comunque a sostenere tale assunto. A questo proposito riteniamo comunque utile sottolineare che gli ormoni tiroidei non essendo da soli in grado di stimolare una risposta immunitaria, necessitano di un substrato proteico che non sempre è rappresentato da tireoglobuline: è possibile infatti mettere in evidenza la presenza di anticorpi anti T3 e T4 in assenza di quelli anti Tg⁴. Notevole importanza assume, nel caso in esame, il rinvenimento in sede testicolare di calcificazioni intratubulari, di lesioni vascolari aterosclerotiche e di depositi di colesterolo non descritti da altri autori in corso di ipotiroidismo. Con ogni verosimiglianza le lesioni iperecogene riscontrate all'esame ecografico sono da ricondurre a calcificazioni intratubulari, espressione di lesioni degenerative associate ad una diminuzione del flusso sanguigno, come conseguenza quindi di mineralizzazioni di tipo distrofico secondario. Nel cane le lesioni aterosclerotiche si osservano di frequente in corso di ipercolesterolemia associata ad ipotiroidismo. Tali anomalie si estrinsecano sovente a livello coronarico, nei vasi cerebrali e renali⁵. Il riscontro di depositi di colesterolo e di lesioni aterosclerotiche, consente di fare nuova luce sui complessi meccanismi che coinvolgono la sfera riproduttiva nei cani ipotiroidei. L'influenza dell'ipotiroidismo sulla capacità riproduttiva si arricchisce quindi di nuovi elementi anatomico-funzionali che contribuiscono a giustificare l'infertilità maschile. Chiaramente, occorre disporre di una casistica più ampia che confermi i nostri reperti anatomico-clinici osservati a livello delle gonadi, facendo ricorso non solo a valutazioni ormonali e del liquido seminale, ma anche ad indagini ecotomografiche ed, eventualmente, istologiche. A conoscenza degli autori, il caso descritto, rappresenta la prima segnalazione di quadri ecografici ed istologici caratterizzati da depositi di colesterolo e fenomeni aterosclerotici dei vasi testicolari, in un cane adulto affetto da ipotiroidismo primario non sperimentalmente indotto.

BIBLIOGRAFIA - 1. Feldman, E.C., Nelson, R.W., Canine and Feline Endocrinology and Reproduction *W.B. Saunders Company; 2nd edition*, (1998). 2. Neufeld, M., et al., Two types of autoimmune Addison's disease associated with different polyglandular autoimmune (PGA) syndromes. *Medicine*, 60:355, (1981). 3. Olson, P.N., et al., Clinical and laboratory findings associated with actual or suspect azoospermia in dogs: 18 cases (1979-1990), *JAVMA* 201:478, (1992). 4. Thacker, E.L., et al., Prevalence of autoantibodies to thyroglobulin, thyroxine, or triiodothyronine and relationship of autoantibodies and serum concentrations of iodothyronines in dogs. *Am J Vet Res*, 53:449, (1992). 5. Manning, P.J., Thyroid gland and arterial lesions of Beagles with familiar hypothyroidism and hyperlipoproteinemia. *Am J Vet Res*, 128, (1979).

CORRELAZIONE TRA PROGESTERONEMIA E RESISTENZA ELETTRICA DEL MUCO VAGINALE DURANTE IL CICLO ESTRALE: NUOVE PROSPETTIVE NELLA GESTIONE DELLA RIPRODUZIONE CANINA
RELATIONSHIP BETWEEN PROGESTERONE SERUM CONCENTRATION AND ELECTRICAL RESISTANCE OF VAGINAL MUCUS DURING ESTROUS CYCLE: NEW CHANCES FOR REPRODUCTIVE MANAGEMENT IN THE BITCH

Sica A., Cocchia N., ¹Abbronzino I., Russo M., ²Tortora G., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Napoli Federico II, Napoli;* ¹*Azienda Sanitaria Locale Na2;* ²*Scuola di Specializzazione in Fisiopatologia della Riproduzione degli Animali Domestici, Università di Napoli Federico II, Napoli.*

Parole Chiave: Cagna, Progesterone, Muco Vaginale, Resistenza Elettrica.

Key Words: Bitch, Progesteron, Vaginal Mucus, Elettrical Resistance.

SUMMARY - The reproductive physiology of the bitch has different peculiar aspects including an interestrus interval much longer non observed in other domestic species and a non-seasonal anoestrus of variable duration after each oestrous cycle. The aim of this study was to determine the relationship between electrical resistance of vaginal mucus during the different stage of estrus cycle and to correlate the electric values with the vaginal smear and the serum progesterone levels in order to better delineate the perfect time of ovulation and to maximize success rates. Our results show a good correlation between vaginal mucus resistance and serum progesterone concentration.

INTRODUZIONE - L'accrescimento follicolare e lo sviluppo di tessuto luteale è associato a modificazioni istologiche ed istochimiche dello strato mucoso di tutti gli organi genitali, vagina inclusa. Il muco cervicale è una miscela di fluidi uterini, tubarici e follicolari, di trasudato ematico e di secrezione dell'epitelio cervicale; i suoi costituenti chimici subiscono notevoli cambiamenti durante il ciclo estrale in risposta alle diverse concentrazioni ematiche di estrogeni e progesterone, le quali condizionano la permeabilità vascolare e di conseguenza la concentrazione idrica del muco secreto. Questo si traduce in variazioni delle proprietà elettriche vaginali sincrona con le oscillazioni del rapporto estro-progestinico e tutto ciò permette di identificare le differenti fasi del ciclo estrale¹. Le modificazioni cicliche dell'impedenza elettrica della mucosa vaginale sono state rilevate e definite in differenti specie quali quella suina, bovina ed ovicaprina, ma non nei canidi². L'approfondimento delle conoscenze relative alla gestione riproduttiva dei carnivori domestici, infatti, non è rivolto esclusivamente all'incremento della fertilità nei soggetti di elevato valore genetico ma anche alla creazione di protocolli adeguati per la salvaguardia di specie affini dichiarate rare, vulnerabili o a rischio d'estinzione³. Nella specie canina, l'applicazione di tecnologie riproduttive è spesso caratterizzata da bassi livelli di efficacia a causa delle peculiarità endocrine e fisiologiche di specie nonché della notevole variabilità fra razze diverse⁴. Scopo del presente studio è quello di verificare l'esistenza di una possibile relazione tra livelli di progesterone serico e resistenza elettrica del muco vaginale. L'esistenza di una siffatta relazione potrebbe fornire un valido ausilio nel monitoraggio del ciclo estrale della cagna allo scopo di migliorare la tempistica e, di conseguenza, l'efficacia dell'intervento di inseminazione strumentale in questa specie animale.

MATERIALI E METODI - Il lavoro, condotto nel periodo maggio 2006-gennaio 2007, è stato effettuato presso l'ambulatorio della Sezione di Clinica Ostetrica del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie della Facoltà su un totale di 15 cagne di razza differente e di età compresa tra 2 e 8 anni, clinicamente sane, con anamnesi di

turbe riproduttive legate a fattori comportamentali o a cause sconosciute. Tutti i soggetti considerati in questo lavoro hanno iniziato il monitoraggio in fase di anaestro. Accanto al routinario *screening* clinico e colpocitologico sono stati eseguiti, a cominciare dalla comparsa degli scoli vulvari (primo giorno di proestro colpocitologico) prelievi per la determinazione del progesterone ematico e valutazione della resistenza elettrica del muco vaginale a giorni alterni fino al primo giorno di diestro colpocitologico. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a giorni alterni per tutta la durata dell'estro colpocitologico ad Inseminazione Strumentale con deposizione vaginale profonda di seme fresco^{5,6}. Ogni soggetto è stato sottoposto a visita clinica e dopo un accurato esame obiettivo generale per accertare il buono stato di salute è stato effettuato un attento esame dell'apparato riproduttivo mediante palpazione addominale, ispezione vaginale e controllo ultrasonografico. Contestualmente alla visita Clinica è stato effettuato un prelievo ematico per il dosaggio della progesteronemia ed esame colpocitologico. La concentrazione serica di progesterone è stata valutata presso un laboratorio veterinario ("Di.LAB Veterinaria", Napoli) mediante test immunoenzimatico per competizione associato a rilevazione in fluorescenza (ELFA). L'esame colpocitologico è stato condotto mediante tampone vaginale strisciato su vetrino, fissato in etanolo e colorato con "Hema-Color", un colorante a base di ematossilina-eosina^{7,8}. La lettura del vetrino è stata effettuata mediante esame microscopico con obiettivo a 10 e 40 x. Per la determinazione della resistenza elettrica del muco vaginale è stato utilizzato il tester "Draminsky" dotato di una sonda anatomica flessibile. Tale apparecchio fornisce una lettura istantanea della resistenza elettrica esprimendola in Ohm. L'inseminazione strumentale è stata effettuata con corneificazione vaginale prossima al 90%, livelli di progesteronemia compresi tra 3 e 5 ng/ml e resistenza elettrica muco-vaginale oscillante tra 500 e 700 unità. La diagnosi di gravidanza è stata eseguita mediante indagine ultrasonografica a partire dal ventesimo giorno di diestro colpocitologico^{9,10}. I valori ottenuti sono stati sottoposti ad analisi di correlazione multipla.

RISULTATI E DISCUSSIONE - Dei 15 soggetti seguiti, 11 hanno avuto una gravidanza normale esitata nel parto eutocico di cuccioli vivi e vitali. I soggetti divenuti gravidi e che hanno partorito normalmente hanno manifestato una proporzionalità diretta, precisa e ripetibile nel rapporto progesterone/resistenza muco vaginale, tale da permettere di prevedere il momento dell'ovulazione. Uno dei soggetti monitorati, mostrando una notevole discordanza dei parametri presi in esame (Valori elevati di P₄ già nella fase iniziale del periodo follicolare, non correlabile ad un proporzionale incremento della resistenza elettrica del muco vaginale e ad una parallela modificazione colpocitologica con scarsa cheratinizzazione cellulare e precoce comparsa di cellule schiumose) è stato escluso dal programma di inseminazione artificiale e sottoposto ad indagine ecografica a 13 gg dalla comparsa degli scoli ematici vulvari. È stata così diagnosticata una Iperplasia Cistica Endometriale che nel corso dei successivi 7gg è esitata in piometra richiedendo il repentino intervento chirurgico. Gli ultimi 3 soggetti presi in esame hanno avuto un'iniziale gravidanza (diagnosticata con indagine ultrasonografica a 20 giorni di diestro colpocitologico) interrotta però precocemente; di questi, 2 hanno manifestato una condizione di ipoluteinismo (rispettivamente 9 e 10,1 ng/ml di progesterone ematico a 25 giorni di diestro colpocitologico) ed in un caso è stato avanzato il sospetto di sterilità "*sine materia*". I soggetti che hanno portato normalmente a termine la gravidanza hanno manifestato una proporzionalità diretta nel rapporto progesterone/resistenza muco vaginale, tale da permettere di prevedere il momento dell'ovulazione. Dall'analisi statistica risulta che le medie ottenute in questi soggetti per il valore cheratinizzazione espresso in percentuale ed il valore resistenza elettrica del muco cervicale espresso in Ohm hanno una buona correlazione (0,874;

P<0,001). Per il valore progesteronemia dopo una fase iniziale di correlazione diretta, subito dopo l'ovulazione, la sua strada tende a divergere con quella degli altri due parametri.

In conclusione, la valutazione della resistenza elettrica del muco vaginale si è dimostrata una metodica sensibile ed applicabile per il monitoraggio del ciclo estrale nella cagna sulla base della precisa relazione emersa con le variazioni endocrine e citologiche che si verificano in questa specie nel corso delle modificazioni follicolari. La facilità e la rapidità di esecuzione rendono inoltre tale metodica competitiva con gli esami tradizionali consentendo una maggiore efficienza e diffusione della tecnica.

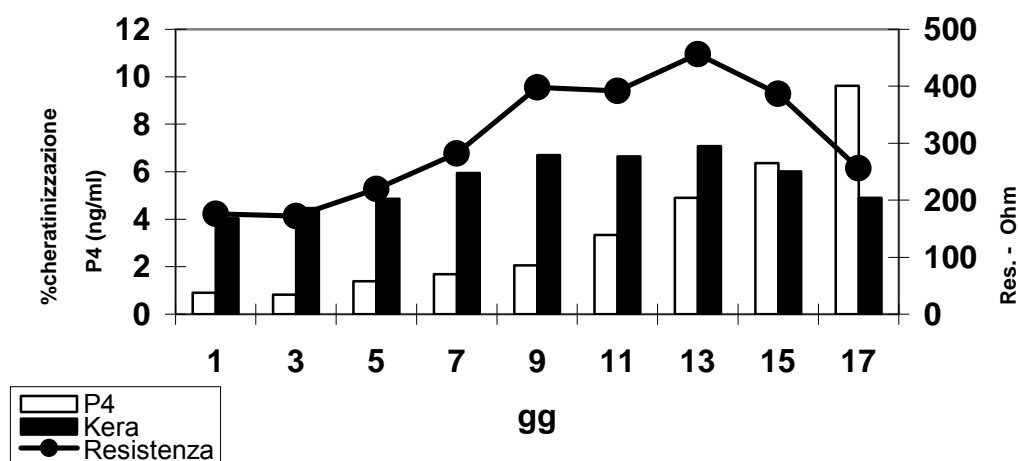


Fig. 1 - Correlazione tra le medie dei parametri presi in esame (P₄ - Progesteronemia; Kera-cheratinizzazione cellule vaginali; Resistenza elettrica muco vaginale) negli 11 soggetti che hanno portato a termine la gravidanza.

BIBLIOGRAFIA - 1. Hafez, E.S.E., Functional anatomy of reproduction in: *Reproduction in Farm Animals. Philadelphia: Lea & Febiger*, p.61, (1987). **2.** Rezac, P., Poschl, M., Krivanek, I., Effect of probe location on changes in vaginal electrical impedance during the porcine estrous cycle. *Theriogenology*, 59, 1325-1334, (2003). **3.** Durrant, B.S., Nicole, R., Spady, T., Cheng, A., New technologies for the study of carnivore reproduction. *Theriogenology* 66, 1729-1736 (2006). **4.** England, G. and Concannon, P.W., Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations. In *England G., Concannon P.W., Verstegen III J. and Linde-Forsberg C. Recent Advances in Small Animal Reproduction, (Eds.) International Veterinary Information Service, Ithaca NY*, (2002); **5.** Romagnoli, S., de Souza, F.F., Rota, A., Vannozzi, I., Prolonged interval between parturition of normal live pups in a bitch. *J Small Anim Pract.*, May; 45(5):249-53, (2004). **6.** Wilson, M.S., Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* Mar; 31(2):291-304, (2001); **7.** England, G.C., Freeman, S.L., Russo, M., Treatment of spontaneous pyometra in 22 bitches with a combination of cabergoline and cloprostenol. *Vet Rec.* Mar 3;160(9):293-6, (2007). **8.** Okkens, A.C., Kooistra, H.S. Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reprod Domest Anim.* Aug; 41(4):291-6, (2006). **9.** Luvoni, G.C., Beccaglia, M., The prediction of parturition date in canine pregnancy. *Reprod Domest Anim.*, Feb;41(1):27-32 (2006). **10.** England, G.C., Ultrasonographic assessment of abnormal pregnancy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, Jul; 28(4): 849-68, (1998).

**PROGESTERONEMIA PERIOVULATORIA E PREVISIONE DELLA DATA
DEL PARTO NELLA CAGNA**
PERIOVULATORY PROGESTERONE LEVELS AND PARTURITION
PREDICTION IN THE BITCH

Groppetti D., Pecile A.M., Cremonesi F., *Dipartimento di Scienze Cliniche
Veterinarie, Sezione di Clinica Ostetrica, Università degli Studi di Milano*

Parole Chiave: Progesterone, Picco LH, Gravidanza, Cagna

Key Words: Progesterone, LH Surge, Pregnancy, Bitch

SUMMARY – Parturition in the bitch occurs around 65 days after the LH surge¹. This study evaluated the periovulatory progesterone levels in view of establishing the optimal time of insemination and to predict accurately the time of parturition. The litter size, type and number of inseminations, age, breed and previous parturitions have been investigated as factors responsible for the gestation length.

INTRODUZIONE - Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente sviluppo dell'allevamento canino, con un interesse mirato al potenziamento della fertilità e la necessità di approfondire precisi aspetti riproduttivi. In questa ottica la misurazione del progesterone ematico riveste un ruolo importante, non solo nella determinazione del momento ottimale di inseminazione, ma anche per il monitoraggio della gravidanza, per l'identificazione di determinate condizioni patologiche in gestazione (ad esempio l'ipoluteinismo) e per la previsione della data del parto. Nella cagna il parto avviene intorno ai 64-66 giorni dopo il picco di LH ovvero 62-64 giorni dopo l'ovulazione^{2,3}. L'individuazione del picco di LH, direttamente tramite titolazione dell'ormone stesso o indirettamente con la valutazione della progesteronemia, permette di predire con accuratezza la data del parto. La durata della gestazione presenta tuttavia una certa variabilità in relazione a fattori non completamente chiariti. Obiettivo di questo studio è stato l'analisi della progesteronemia nella fase periovulatoria della cagna, per la determinazione del momento ottimale di inseminazione e per la previsione della data del parto. Abbiamo inoltre correlato il numero di cuccioli, il tipo e numero di inseminazioni, l'età, la razza e il numero di parti della madre con la durata della gravidanza.

MATERIALI E METODI - Sono stati esaminati 79 cicli riproduttivi, in un totale di 66 cagne, durante la fase periovulatoria, per determinare il picco di LH, l'ovulazione ed il momento ottimale di inseminazione. L'identificazione della fase del ciclo estrale è stata valutata con l'esame clinico e del comportamento sessuale, la citologia vaginale e con la determinazione della progesteronemia. Le cagne del nostro campione, di età compresa tra 1 e 8,5 anni, appartenevano alle seguenti razze: 33 Pastore Tedesco, 6 Labrador Retriever, 3 Carlino, 3 Golden Retriever, 2 Bovaro Bernese, 2 Boxer, 2 Leonberger, 2 Rhodesian Ridgeback, 3 Setter Inglese, 1 Bassotto Tedesco, 1 Bovaro Appenzel, 1 Cirneco dell'Etna, 1 Doberman, 1 Dogo Argentino, 1 Dogue de Bordeaux, 1 Greyhound, 1 Lagotto, 1 Schnauzer medio, 1 Siberian Husky. In base alla nostra esperienza, maturata dall'analisi a posteriori dei valori di progesterone registrati quattro (picco di LH) e due (ovulazione) giorni prima di un singolo intervento inseminativo che ha prodotto gravidanza con un numero di cuccioli superiore a 4, abbiamo considerato i valori di progesterone compresi tra 2 e 3,4 ng/ml come indicativi del picco di LH mentre quelli compresi tra 4,5 e 6,5 ng/ml come rappresentativi di ovulazione. Sulla scorta dell'elaborazione eseguita, le cagne sono state inseminate al raggiungimento di concentrazioni di progesterone superiori a 8 ng/ml. I soggetti in esame sono stati

inseminati sia con accoppiamento naturale (n° 64) che tramite inseminazione artificiale (IA), intravaginale (n° 13) ed intrauterina endoscopica (n° 2), utilizzando sempre seme fresco. La data del parto è stata prevista calcolando 65 ± 1 giorni dal picco di LH. Sono state analizzate: la correlazione tra numero di inseminazioni (da 1 a 3) e il numero di cuccioli nati, le percentuali di gravidanze ottenute a) in relazione alla modalità e al numero di inseminazioni, b) all'età al parto (<4 anni, 4-6 anni, >6 anni), c) nel Pastore Tedesco rispetto alle altre razze, d) nelle primipare rispetto alle pluripare. Analogamente sono stati indagati quali fattori responsabili della durata della gravidanza: il numero di cuccioli, il tipo e il numero di inseminazioni, l'età della madre, le cagne Pastore Tedesco rispetto alle altre razze ed il numero di parti. Abbiamo infine studiato l'eventuale dipendenza tra il numero di cuccioli e i livelli di progesterone registrati nel periodo periovulatorio.

I livelli di progesterone sono stati misurati con un test immuno-enzimatico competitivo, a rivelazione finale in fluorescenza (ELFA; miniVidas, Biomerieux) che permette la determinazione quantitativa di progesterone nei campioni di plasma.

RISULTATI - I cuccioli nati sono stati in totale 327, con una media di 5,54 per cucciolata (range compreso tra 1 e 11). Il 75,7% (28/37) delle singole inseminazioni ha avuto esito positivo, il 70% di queste con accoppiamento naturale e il 100% con IA vaginale ed intrauterina. Il 69,4 (25/36) delle doppie inseminazioni ha avuto esito positivo, di queste il 72,4% con monta naturale, il 50% con IA vaginale e il 100% con IA intrauterina. Il 100% (6/6) delle triple inseminazioni ha portato a gravidanza. L'accuratezza della previsione è stata verificata solo nelle cagne che hanno partorito naturalmente (n° 48) o che sono state sottoposte ad intervento cesareo dopo l'insorgenza dei segni prodromici di parto (n° 3). Sono stati esclusi inoltre 4 soggetti per i quali non è stato possibile conoscere la data del parto ed un'altra cagna il cui calore era stato indotto farmacologicamente. Questa valutazione è stata quindi eseguita su un totale di 46 cagne. Il 69,6% di questi animali ha partorito in un intervallo di tempo compreso tra 65 ± 1 giorni dopo il picco di LH individuato in base al range periovulatorio di progesterone compreso tra 2 e 3,4 ng/ml. Una percentuale dell'89,1% ha partorito in un intervallo di 65 ± 2 ed il 91,3% tra 65 ± 3 giorni. Il restante 9% è costituito da 2 cagne che hanno partorito rispettivamente a 57 e 60 giorni dal picco di LH. Abbiamo considerato normale i parti con numero di cuccioli compresi tra 4 e 9. L'82,4% delle cagne con cucciolata di numerosità normale ha partorito entro 65 ± 1 giorni, il 97% entro 65 ± 2 giorni. Il 91% dei cani di razza Pastore Tedesco con 4-9 cuccioli ha partorito 65 ± 1 giorni dopo il picco di LH e il 100% dopo 65 ± 2 giorni. Considerando le cagne con cucciolate di numerosità inferiore o uguale a 3 (n° 11) il 37% di queste ha partorito 65 ± 1 giorni dal picco di LH e il 62% tra 65 ± 2 giorni. Il restante 25% ha partorito 69 giorni dopo il picco di LH. Riguardo alle cagne che hanno partorito un numero di cuccioli maggiore o uguale a 10 (n° 9), il 20% ha partorito a 60 giorni, il 40% a 64 giorni e un altro 40% a 67 giorni. Delle cagne fecondate con monta naturale (38/46) il 76% ha partorito tra 65 ± 1 giorni e il 95% tra 65 ± 2 giorni. Il 33% delle cagne fecondate con IA vaginale (6/46) ha partorito a 65 ± 1 giorni, il 17% a 57 giorni, il 33% a 67 giorni e il 17% a 69 giorni. Le 2 cagne inseminate con IA transcervicale endouterina hanno partorito rispettivamente a 65 e 69 giorni. Riguardo al fattore età, abbiamo suddiviso le cagne in 3 gruppi: inferiori a 4 anni (n° 27), tra 4 e 6 anni (n° 11) e con età superiore ai 6 anni (n° 8). Il 70% dei soggetti con età inferiore a 4 anni ha partorito tra 65 ± 1 giorni, l'85% tra 65 ± 2 giorni. Le cagne di età compresa tra 4 e 6 anni hanno partorito per l'80% tra 65 ± 1 giorni e il 100% tra 65 ± 2 giorni. Il 50% delle cagne con più di 6 anni ha partorito tra 65 ± 1 giorni, l'87% tra 65 ± 2 giorni. Le cagne Pastore Tedesco hanno partorito per l'85% nell'intervallo compreso tra 65 ± 1 giorni e per il 100% tra 65 ± 2 giorni dal picco di LH. Le cagne di altra razza hanno registrato il parto nel 47% dei casi

tra 65 ± 1 giorni, nel 74% tra 65 ± 2 giorni. Abbiamo infine analizzato l'influenza del numero di parti sulla durata della gravidanza. Il 64% delle cagne primipare ha partorito tra i 65 ± 1 , l'82% tra 65 ± 2 giorni. Le cagne pluripare hanno partorito nel 82% dei casi tra 65 ± 1 e nel 100% tra 65 ± 2 giorni.

DISCUSSIONE - L'utilizzo del dosaggio del progesterone durante la fase periovulatoria ha permesso di determinare con successo il momento di inseminazione in 59 cicli riproduttivi su 79. In alcuni casi è stato possibile individuare la causa di mancata gravidanza. Abbiamo riscontrato una condizione di ipofertilità/infertilità in 6 maschi utilizzati per l'inseminazione. Una cagna presentava una vaginite da *E.Coli* e *Klebsiella*. Per gli altri soggetti non è stato possibile eseguire indagini più accurate sui riproduttori. La percentuale di successo delle inseminazioni nella razza Pastore Tedesco, pari al 69,6% è risultata minore di quella delle altre razze, 81,8%. Questa inferiore fertilità è stata imputata alla ridotta variabilità genetica di questa razza. Le percentuali di gravidanza tra accoppiamento naturale o inseminazione artificiale vaginale, rispettivamente del 73% e del 77%, sono risultate sovrapponibili. La percentuale di successo per l'inseminazione transcervicale uterina è risultata del 100% ma si riferisce a solo 2 soggetti. Un dato interessante è fornito dall'analisi delle percentuali di gravidanza ottenute con il singolo intervento inseminativo che è risultata più efficace (76%) rispetto alla doppia inseminazione (69%). Le cagne più anziane, sopra i 6 anni, hanno mostrato una riduzione della percentuale di gravidanza del 22% rispetto ai soggetti con meno di 4 anni; così come le pluripare hanno registrato il 18% di gravidanze in meno se confrontate con le primipare. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che più del 40% delle pluripare è rappresentato da cagne con più di 6 anni. La capacità di prevedere la data del parto calcolata dal picco di LH, utilizzando i valori di progesteronemia misurati nella fase periovulatoria, concorda con i risultati ottenuti dagli Autori^{1,3}. Le analisi statistiche effettuate utilizzando il test di Kruskal-Wallis e le tavole di contingenza hanno dimostrato una correlazione statisticamente significativa tra il numero di cuccioli e la durata della gestazione ($P<0,05$) in accordo con quanto descritto in letteratura^{3,4}. Non è stata evidenziata relazione significativa tra il numero di cuccioli e le variabili considerate: razza, tipo e numero di inseminazioni, età della cagna al parto e numero di parti precedenti. Non si sono osservate correlazioni tra il numero di cuccioli e i livelli di progesteronemia periovulatoria. Il monitoraggio del progesterone periovulatorio si è dimostrato uno strumento essenziale per la gestione riproduttiva della cagna permettendo di stimare il giorno del picco di LH per la scelta del momento ottimale dell'intervento di fecondazione e di prevedere la data del parto a 65 ± 1 giorni con un'accuratezza del 70%, che aumentava al 89% se considerata a 65 ± 2 giorni. La praticità di esecuzione, il costo contenuto e l'elevata accuratezza dimostrata rendono questo metodo estremamente adatto all'impiego clinico. La valutazione dei livelli ematici di progesterone è inoltre fondamentale per il monitoraggio della gravidanza, per la pianificazione del parto cesareo e per l'accertamento di fenomeni abortivi, fino a diventare un imprescindibile strumento diagnostico e di controllo terapeutico in caso di ipoluteinismo.

BIBLIOGRAFIA - 1. Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V., Olson, P. N. S., Canine and Feline Theriogenology, W.B. Saunders Company (2001). 2. Kutzler, M. A., et al., Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*, 60, 1187-1196, (2003). 3. Eilts, B. E., et al., Factor affecting gestation duration in the bitch. *Theriogenology*, 64, 242-251, (2005). 4. Okkens, A. C., et al., Influence of litter size and breed on the duration of gestation in dogs. *J R eprod Fertility, Supplement*, 57, 193-197, (2001).

DOSAGGIO DEL PROGESTERONE EMATICO PER IL MONITORAGGIO DELL'OVULAZIONE NELLA CAGNA: CONFRONTO FRA METODICHE RIA, ELISA E CLIA

PROGESTERONE CONCENTRATION IN PERIPHERAL BLOOD FOR THE OVULATION MONITORING IN THE BITCH: A COMPARISON BETWEEN RIA, ELISA, CLIA

Robbe D., Tosi U., ¹Valentini L., De Amicis I., Contri A., Carluccio A., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Teramo; ¹Dipartimento di Produzione Animale, Università di Bari*

Parole Chiave: Cagna, P₄, RIA, ELISA, CLIA.

Key Words: Bitch, P₄, RIA, ELISA, CLIA.

SUMMARY - The time of ovulation is important for canine breeding programs. In the practice, the ovulation is monitored by serum progesterone (P₄) measurements. The aim of our study is to compare canine serum progesterone levels tested with three different methods, RIA, ELISA and CLIA. Serum P₄ levels in early proestrus and at days -3, -1, ovulation (0) and +2 resulted always lower when it was measured with RIA than with ELISA and CLIA, but the trend to the increase of the progesteronemia around the ovulation was the same.

INTRODUZIONE - Nella pratica clinica veterinaria è sempre più frequente la richiesta da parte dei proprietari di individuare con certezza il momento più fertile per l'accoppiamento delle proprie cagne. Il monitoraggio del ciclo estrale nella cagna per l'individuazione dell'ovulazione si basa principalmente su rilievi clinici, comportamentali, indagine colpocitologica e determinazione del picco ematico di LH, o del progesterone (P₄). Il rilievo del picco preovulatorio di LH, pur essendo in assoluto il parametro più attendibile, è tuttavia di non semplice realizzazione in quanto spesso richiede più prelievi ematici, effettuati ad intervalli non superiori alle 10-12 ore, con maggiore impegno temporale ed economico da parte del proprietario. Pertanto, la determinazione del P₄ ematico è attualmente l'esame più utilizzato per tale finalità. I valori del P₄ riportati in letteratura sono quelli rilevati con metodo RIA (Radioimmune Assay)^{1,6} ma, attualmente, le metodiche disponibili per la determinazione di tale ormone si basano anche su tecniche determinative, come ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) e CLIA (Chelated Ligand Internalization Assay). Il nostro lavoro si è posto come primo obiettivo di confrontare queste tre metodiche per il dosaggio del P₄ ematico nella cagna. Inoltre, poiché la durata della gestazione nella cagna è di 65±1 gg dal picco di LH e di 63±1gg dall'ovulazione³, abbiamo valutato la durata della gravidanza delle cagne dal giorno da noi identificato con l'avvio delle ovulazioni, al fine di confermare l'attendibilità del dosaggio del P₄ ematico per l'individuazione di tale momento.

MATERIALI E METODI - L'indagine è stata condotta su 18 cagne di proprietà, 8 primipare e 10 pluripare, di età compresa tra i 18 mesi e i 3 anni, clinicamente sane, visitate per il monitoraggio dell'ovulazione, in previsione dell'accoppiamento. Quattro cagne presentavano anamnesi di infertilità apparente, in quanto già accoppiate nei cicli precedenti in giorni stabiliti empiricamente dal proprietario, rimanendo sempre vuote. Al momento della comparsa delle perdite ematiche vulvari è stata effettuata la visita clinica ed un esame colpocitologico, ripetuto a giorni alterni, fino al primo giorno di diestro citologico, mediante tampone sterile e colorazione con Diff Quick[®] (Dade Behring, Milano). In tutte le cagne il P₄ ematico è stato rilevato il primo giorno di visita; i prelievi successivi sono stati eseguiti quando l'esame colpocitologico mostrava un

quadro di proestro avanzato, con oltre il 70% di cellule superficiali cheratinizzate, ripetendolo giornalmente fino all'ovulazione. Un ultimo prelievo è stato effettuato due giorni dopo l'ovulazione. Per il confronto sono stati scelti i valori rilevati nei seguenti giorni: prima visita, -3, -1, 0 (ovulazione), +2. Per ogni cagna sono stati saggiati complessivamente 5 campioni.

I campioni ematici sono stati prelevati dalla vena giugulare con provette vacutainer da siero (Becton Dickinson), centrifugati a 1200 x g per 10 minuti, frazionati in 3 aliquote, e stoccati a -20°C. Per ogni campione sono stati effettuati i dosaggi del P₄ sierico, con metodiche RIA (RIA kit, Diasorin ¹²⁵I-Labelend, sensibilità di 0,09 ng/ml), ELISA (Ares-Biochem Immuno System Sri-Serono Diagnostic, Italia; sensibilità 0,05 ng/ml) e CLIA (Immulyte System; Diagnostic Products Corporation, USA; sensibilità 0,09 ng/ml). Come valori di riferimento del P₄ sono stati considerati quelli ottenuti con RIA, così come riportato in altri lavori^{1,7}, identificando come giorno dell'ovulazione quello in cui il valore del P₄ è risultato compreso fra 4-8 ng/ml³. Le cagne sono state fatte accoppiare il giorno successivo. I valori di P₄ ottenuti con le tre metodiche sono stati sottoposti a confronto statistico con test ANOVA ad un fattore e post hoc Bonferroni ed elaborati graficamente con software GraphPad Prism 4 (GraphPad software). Le differenze sono state considerate significative per P≤0,05.

La gravidanza è stata accertata tramite esame ecografico, realizzato dopo 25 giorni dall'accoppiamento. Per ogni cagna è stata registrata la data del parto, in modo da valutare la durata della gestazione dal momento dell'ovulazione.

RISULTATI - Tutte le cagne sono risultate gravide ed hanno partorito dopo 62,4 ± 0,5 giorni dall'ovulazione rilevata con la tecnica RIA. Le tecniche ELISA e CLIA hanno fornito, in tutti i tempi valori medi superiori rispetto alla metodica RIA. I valori medi del P₄ sierico, ottenuti con le tre metodiche di dosaggio, sono riportati in tabella 1.

Metodica	Inizio proestro	- 3	- 1	0 (ovulazione)	+ 2
CLIA	0,60 ± 0,31*°	2,02 ± 0,38*	4,05 ± 0,64*	9,53 ± 2,02*	19,58 ± 2,07*°
ELISA	0,65 ± 0,20*°	2,51 ± 0,32*	5,57 ± 0,96*	13,32 ± 1,52*	22,96 ± 1,63*
RIA	0,21 ± 0,08*	1,31 ± 0,16*	2,76 ± 0,39*	6,21 ± 0,97*	18,95 ± 1,45*°

Tab. 1 - Valori medi (±d.s.) del P₄ sierico (ng/ml) nei vari tempi di prelievo. Confronto fra gruppi nella stessa colonna (* P<0,001; ° P>0,05).

I livelli ovulatori di P₄ sierico ottenuti con tecnica RIA sono risultati compresi tra 4,7 e 7,8 ng/ml, con valore medio di 6,21±0,97 ng/ml, in accordo con i dati bibliografici¹⁻⁶, mentre i campioni misurati con le metodiche ELISA e CLIA hanno mostrato rispettivamente livelli medi pari a 13,32±1,52 (limiti 10,6–17,1) e 9,53±2,02 (limiti 7,4–12,6) ng/ml. I valori del P₄ rilevati all'inizio del proestro hanno mostrato una differenza altamente significativa (P<0,001) tra tecnica RIA e le metodiche CLIA ed ELISA. Differenze altamente significative (P<0,001) tra le tre metodiche sono risultate anche per i valori dei giorni -3, -1 e 0.

I valori del P₄ rilevati due giorni dopo l'ovulazione hanno mostrato una differenza altamente significativa (P<0,001) tra tecnica ELISA rispetto alle tecniche CLIA e RIA, mentre la differenza non è risultata significativa tra i valori ottenuti con metodica CLIA rispetto alla tecnica RIA.

I livelli di P₄ ematico, saggiati con le tre metodiche aumentano in maniera esponenziale così come descritto dall'equazione $Y = \text{Start} \cdot \exp(K \cdot X)$ e confermato dai valori di R² che per il RIA, CLIA ed ELISA, sono rispettivamente di 0,99, 0,99 e 0,98 (grafico 1).

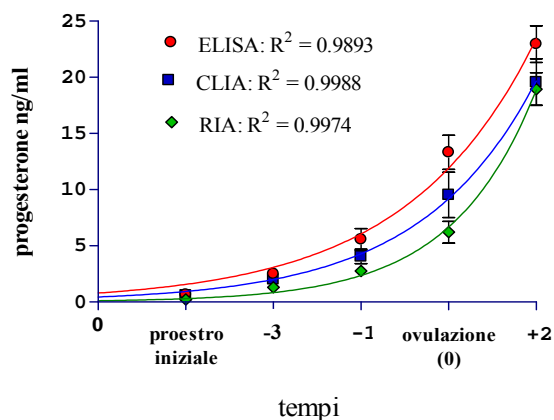


Grafico 1 - Andamento dei valori medi (\pm d.s.) delle concentrazioni di P₄ sierico.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI - Il monitoraggio dell'ovulazione nella cagna attraverso il dosaggio del P₄ ematico con metodica RIA rappresenta un parametro valido per individuare l'ovulazione, in quanto tutte le cagne da noi monitorate hanno partorito $62,4 \pm 0,5$ giorni dopo. L'esame colpocitologico si conferma un indispensabile ausilio che consente di ridurre il numero di rilievi del P₄ ematico, come riportato in bibliografia¹⁻⁶. Le concentrazioni sieriche di P₄ rilevate mediante metodiche CLIA ed ELISA si differenziano significativamente da quelle ottenute con indagine RIA, per cui nella pratica clinica risulta molto importante conoscere il tipo di tecnica utilizzata e considerare i relativi range di riferimento. I riscontri da noi ottenuti presentano una certa discrepanza con quelli riportati in un recente lavoro⁷, in cui i valori preovulatori e ovulatori del P₄, determinati con le tecniche ELISA e CLIA sono risultati sovrapponibili ai valori RIA riportati in letteratura^{1,6}. I valori di P₄ nei tempi esaminati, con le diverse metodiche analitiche, mostrano andamenti simili di tipo esponenziale, come evidenziato dai rispettivi valori di R² che sono in tutti e tre i casi molto prossimi all'unità. Pertanto, riteniamo che le tre tecniche di dosaggio del P₄ possano considerarsi tutte attendibili purché si conoscano i relativi intervalli di riferimento, in quanto le differenze tra le singole metodiche sono tali che, prendendo come riferimento i valori riportati in letteratura, definiti con tecnica RIA, si possono sovrastimare i livelli ematici del P₄ con la possibile conseguenza dell'insuccesso fecondativo.

BIBLIOGRAFIA - 1. England, G.C., Allen, W.E., Porter, D.J., A comparison of radioimmunoassay with quantitative and qualitative enzyme-linked immunoassay for plasma progesterone detection in bitches. *Vet Rec.*, 107-108, (1989). 2. Renton, J.P. et al., Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fert.*, 221-231, (1993). 3. Johnston, S.D., Il ciclo estrale. In Problemi in ostetricia, ginecologia e pediatria. 27° *Incontro SCIVAC*, 23, (1995). 4. Hase, M., Hori, T., Kawakami, E., Tsutsui, T., Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J Vet Med Sci.*, 243-248, (2000). 5. Hiemstra, M., Schaefers-Okkens, A.C., Teske, E., Kooistra, H.S., The reliability of vaginal cytology in determining the optimal mating time in the bitch. *Tijdschr Diergeneeskd.* 685-689, (2001). 6. Van Klaveren, N.J., Kooistra, H.S., Dieleman, S.J., van Lith, H.A., Schaefers-Okkens, A.C., The optimal mating time in the bitch based on the progesterone concentration in peripheral blood. A comparison of reliability between three ELISA test kits and a 125-iodine radioimmunoassay. *Tijdschr Diergeneeskd.*, 680-685, (2001) 7. Lucchetti, E., Pasquini, A., Rota, A., Cardini, G., Il dosaggio del progesterone sierico nella specie canina: tre metodi a confronto. *Progresso Veterinario*, 578-581, (2005).

**UN VERO CASO DI PROLASSO VAGINALE NELLA CAGNA IN FASE
ESTRALE**
TRUE VAGINAL PROLAPSE IN A BITCH DURING ESTRUS

Ferrari L., Bigliardi E., Parmigiani E., Morini G., Bresciani C., Di Ianni F., Di Ciommo F., *Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Clinica Ostetrica e Riproduzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma*

Parole chiave: Cagna, Prolasso Vaginale, Iperplasia Vaginale
Key Words: Bitch, Vaginal Prolapse, Vaginal Hyperplasia

SUMMARY - Vaginal hyperplasia occurs during estrus as estrogenic response of vaginal mucosa. In some cases the entire vaginal mucosa wall is interested. This communication describes a true vaginal prolapse in a 7-year-old female Boxer bitch during estrus.

INTRODUZIONE - Il prolasso vaginale nella cagna, nell'accezione corretta della definizione di prolasso, rappresenta un evento clinico piuttosto raro e si manifesta con la protrusione della vagina o parte di essa, attraverso la vulva. Tale condizione si può verificare durante il periodo proestrile ed estrile in relazione all'edema della mucosa. L'iperplasia vaginale, caratterizzata solitamente da parte di mucosa a volte pedunculata che fuoriesce dalla rima vulvare, viene spesso definita genericamente prolasso vaginale, anche se tra le due forme sussistono differenze sostanziali. Il prolasso vaginale è sempre accompagnato da un grado più o meno importante di iperplasia della mucosa, mentre l'iperplasia della mucosa vaginale tipico della reazione alla stimolazione estrogenica è di norma indipendente e si manifesta con la fuoriuscita dalla vulva della mucosa ipertrofica. In questo senso ci è sembrato interessante segnalare il caso di una cagna Boxer dell'età di 7 anni, che durante il ciclo estrile ha manifestato un'importante protrusione di parte della vagina come un vero caso di prolasso vaginale.

CASO CLINICO - Il caso clinico che intendiamo presentare si riferisce ad una cagna di razza Boxer di 7 anni, la quale è stata sottoposta alla nostra attenzione a causa di un'apparente iperplasia vaginale di ragguardevoli dimensioni (Fig. 1). Alla raccolta dell'anamnesi il proprietario riferiva che il soggetto aveva iniziato il ciclo estrile da circa 15 giorni e che durante un ciclo estrile precedente il soggetto aveva sviluppato una lieve iperplasia vaginale che si era risolta spontaneamente. La cagna mostrava abbattimento del sensorio, anoressia ed un notevole disagio con frequente lambimento della regione perineale.

Alla visita clinica il soggetto evidenziava un buono stato nutrizionale ed una lieve disidratazione; la temperatura rettale era di 40,5°C e la frequenza cardiaca e respiratoria erano aumentate. La mucosa vaginale che sporgeva dalla vulva presentava ulcerazioni ed aree necrotiche e purulente a causa dell'autotraumatismo (Fig. 2). Ad un'attenta analisi abbiamo constatato che la parte prolassata non interessava soltanto alcune pliche della mucosa vaginale, ma il vestibolo della vagina a 360° ed un tratto della vagina caudale per alcuni centimetri, infatti il lume della vagina era situato al centro della struttura. Inoltre il clitoride ed il meato uretrale si trovavano all'esterno delle labbra vulvari.

Sono stati eseguiti i seguenti esami: i parametri ematici di base (emocromo con formula e funzionalità epato-renale), il dosaggio del progesterone, del 17-β estradiolo ed un esame ultrasonografico dell'apparato riproduttore. Dagli esami ematici è emerso che la funzionalità epatica e renale erano nella norma, mentre l'emocromo evidenziava

leucocitosi e granulocitosi neutrofila; il profilo ormonale rivelava un tasso di progesterone pari a 12 ng/ml ed un tasso di 17- β estradiolo di 20 pg/ml. All'esame ultrasonografico l'utero mostrava segni di ipertrofia endometriale, compatibili con la fase estrale ed a livello ovarico erano presenti strutture follicolari e cistiche. È stata eseguita una fluidoterapia per via endovenosa con glucosio al 5% e ringer lattato, inoltre sono stati somministrati: 100 mg di testosterone propionato per via intramuscolare, 2 mg/kg di furosemide, 1 mg/kg di desametasone e 30 mg/kg di cefazolina. È stata inoltre prescritta un'antibioticoterapia con enrofloxacin (5 mg/kg/die) in associazione con amoxicillina (12 mg/kg ogni 12 ore) ed acido clavulanico (12 mg/kg ogni 12 ore). È stato inoltre raccomandato al proprietario di detergere la parte con soluzione fisiologica, lubrificarla ed idratarla con una pomata utilizzata per il trattamento delle emorroidi per l'azione decongestionante ed antiedemigena e di proteggerla da eventuali traumatismi e dal leccamento. Alla visita di controllo dopo 48 ore l'edema si era ridotto del 50% e la cagna mostrava segni di netto miglioramento con ripresa dell'alimentazione.

Ad una settimana dalla prima visita è stato eseguito l'intervento di ovarioisterectomia al fine di interrompere definitivamente la stimolazione estrogenica. Il protocollo anestesiológico adottato è stato il seguente: premedicazione con midazolam (0,2 mg/kg IM) e fentanyl (2 mcg/kg IM); induzione tramite propofol (6 mg/kg EV); mantenimento con una miscela di isofluorano ed ossigeno al 2%. In tale sede non è stato possibile intervenire chirurgicamente sulla parte di vagina prolassata a causa delle dimensioni ancora ragguardevoli, che non avrebbero consentito di eseguire la resezione della parte senza correre il rischio di un'importante emorragia.

Una settimana dopo l'intervento di ovarioisterectomia le dimensioni della porzione prolassata della vagina erano diventate tali da poterne effettuare l'exeresi. Dopo aver eseguito l'episiotomia dorsale e dopo aver posizionato un catetere uretrale per rendere facilmente identificabile il decorso uretrale per evitarne il danneggiamento, è stata utilizzata una sutura del Vacchetta a 360° sulla porzione di vagina prolassata, eseguita con Vicryl® EP 3,5 e Dexon® EP 3,5. La parte in esubero ed isolata dalla sutura è stata scontinuita tramite elettrobisturi, l'episiotomia è stata ricostruita ed infine è stata eseguita una plastica vulvare al fine di far rientrare nella sede fisiologica la vagina che aveva subito un rilassamento e pertanto sporgeva dalla rima vulvare. Alla visita di controllo eseguita una settimana dopo l'intervento si è assistito ad una completa "restitutio ad integrum".

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI - L'iperplasia vaginale può essere definita come un prolasso della mucosa vaginale che solitamente si verifica durante la fase estrogenica. Il prolasso vaginale interessa invece una parte più o meno importante della vagina a cui si associa l'iperplasia della mucosa. L'iperplasia vaginale colpisce più frequentemente soggetti molto giovani, al primo o al secondo ciclo estrale e spesso continua a ripresentarsi ad ogni ciclo successivo. Le razze maggiormente predisposte sono il S. Bernardo, il Bulldog inglese, il Boxer ed altre razze brachicefale. Si può riscontrare anche nel Danese, nel Labrador, nel Pastore tedesco e nello Springer Spaniel¹. Si manifesta in relazione ad una esagerata risposta agli estrogeni da parte della mucosa vaginale oppure ad una secrezione di estrogeni più elevata o prolungata nel tempo, con fenomeni di iperplasia ed edema¹ che si manifestano con il sollevamento di una plica segmentaria pedunculata di mucosa: tale peduncolo prende inserzione in posizione caudale rispetto alla papilla uretrale ed il tessuto ipertrofico sporge dalle labbra vulvari. Il grado di ipertrofia appare correlato all'intensità dei processi edemigeni locali, conseguenti alla stimolazione estrogenica follicolare. Nella maggior parte dei casi l'infiltrazione e l'edema sono destinati a remissione completa in modo fisiologico, col passaggio alla fase diestrale, durante la quale si assiste ad una riduzione del tasso ematico degli estrogeni, con il ritorno della mucosa allo stato fisiologico.

Il prollasso vaginale nella cagna rappresenta un evento clinico piuttosto raro, la cui eziologia è simile a quella dell'iperplasia vaginale con conseguenze significativamente diverse. Si assiste infatti all'abbassamento ed alla fuoriuscita della vagina o di parte di essa dalla rima vulvare^{2,3}. Tra le cause alcuni Autori hanno indicato un trauma a livello di organi pelvici o in seguito ad un parto particolarmente difficoltoso⁴ oppure a causa di tumori a carico della vagina. L'approccio terapeutico in corso di iperplasia vaginale è generalmente di tipo farmacologico e conservativo, mentre nel prollasso vaginale, inteso nel senso corretto della terminologia, il solo trattamento medico spesso non è risolutivo, ma occorre un approccio di tipo chirurgico che consente, come nel caso da noi presentato, una soluzione definitiva.



Fig. 1 - Al centro della parte prollassata si osserva il lume della vagina.



Fig. 2 - Nella parte ventrale si possono notare ampie aree necrotiche.

BIBLIOGRAFIA - **1.** Parmigiani, E., Bigliardi, E., Ambrosi, V., Morini, G., L'iperplasia vaginale nella cagna. *Atti S.I.S.Vet*, LI, 565-566. Bologna, (1997) **2.** Okkens, A.C., Vaginal edema and vaginal fold prolapse in the bitch, including surgical management. www.ivis.org/advances/Concannon/schaefers, (2007). **3.** Alan, M., Cetin, Y., Sendag, S., Eski F., True vaginal prolapse in a bitch. *Animal Reproduction Science*, Article in Press, (2006). **4.** Post, K., Van Haften, B., Okkens, A.C., Vaginal hyperplasia in the bitch: literature review and commentary. *Can Vet J*, 32, 35-37, (1991).

PROLASSO VAGINALE IN GRAVIDANZA NELLA CAGNA VAGINAL PROLAPSE DURING PREGNANCY IN THE BITCH

Rosati I., Zedda M.T., Ledda S., Bogliolo L., Ariu F., Pau S., *Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari*

Parole Chiave: Iperplasia Vaginale, Prolasso Vaginale, Cagna, Gravidanza.

Key Words: Vaginal Hyperplasia, Vaginal Prolapse, Bitch, Pregnancy.

SUMMARY - Vaginal fold prolapse is the protrusion of oedematous and hyperplasic vaginal tissue occurring frequently during proestrus/estrus or occasionally during the pregnancy in the bitch. True vaginal prolapse may occur near parturition, but it is an uncommon condition in this species. Five cases of “vaginal prolapse” during pregnancy in bitches are presented.

INTRODUZIONE - L'iperplasia/prolasso della mucosa vaginale è una patologia che colpisce occasionalmente cagne giovani prevalentemente di taglia medio-grande^{1,2,3}. Compare durante il proestro-estro^{1,2,3,4}, più raramente nella fase finale della gravidanza^{5,6}, e tende a recidivare nei calori successivi^{2,3}. L'eziopatogenesi non è ben definita, ma sembra dipendere da un'alterata risposta della mucosa vaginale alla stimolazione estrogenica cui è esclusivamente associata¹. In condizioni fisiologiche, durante la fase proestro-estrale del ciclo, la mucosa vaginale va incontro ad iperemia, cheratinizzazione dell'epitelio superficiale ed edema della sottomucosa per l'azione degli estrogeni circolanti⁷. Un aumento abnorme dell'edema accentua lo stato iperplastico della mucosa che spesso arriva a protrudere oltre la rima vulvare⁸. Il fenomeno ha sempre inizio nella porzione più caudale della vagina, cranialmente al meato uretrale; l'anomalo aumento di volume comincia sul pavimento a livello del tubercolo uretrale per poi espandersi lateralmente sino ad interessare, nei casi più gravi, l'intera circonferenza vaginale. L'edema comunemente si riassorbe col cessare dell'influsso estrogenico e quindi si ha una spontanea remissione del prolasso^{1,3}.

Il trattamento di elezione, in cagne non destinate alla riproduzione, è l'ovariectomia associata ad una terapia locale con pomate antibiotiche e regolare pulizia sino alla remissione della sintomatologia; negli altri casi è consigliabile intervenire chirurgicamente con escissione della porzione di mucosa prolassata in particolare quando è di grandi dimensioni o presenta danni tissutali¹.

La patologia sopra descritta deve essere differenziata dal prolasso vaginale propriamente detto che è caratterizzato dal prolasso dell'intera parete della vagina e colpisce diverse specie animali, tra cui la cagna^{9,10}, in prossimità del parto sempre in presenza di stimolazione estrogenica e/o di lassità del tessuto perivaginale o in corso di distocia.

DESCRIZIONE DEI CASI CLINICI - Si riportano 5 casi di cagne presentate in Clinica con prolasso riferibile all'apparato genitale in momenti diversi della gravidanza. Come illustrato in tabella 1, la visita permetteva di differenziare stati di prolasso vaginale p.d., iperplasia della mucosa vaginale o associazione di entrambe le condizioni con conseguenti trattamenti secondo il tipo di patologia e lo stato del soggetto.

DISCUSSIONE - I cinque casi riportati evidenziano che nella cagna durante la gravidanza è possibile il verificarsi di un prolasso vaginale p.d., di un prolasso della sola mucosa vaginale oppure della concomitanza di entrambe le condizioni forse come conseguenza l'una dell'altra.

I casi 2 e 3 erano riferibili a prolassi della mucosa vaginale iperplastica nella fase conclusiva della gravidanza. Nel caso 2 l'iperplasia interessava solo il pavimento della

Tabella 1 - Descrizione dei casi

RAZZA ETÀ	MOMENTO DELLA GRAVIDANZA	DIAGNOSI		TRATTAMENTO
		Prolasso vaginale p.d.	Prolasso mucosa vaginale iperplastica	
Caso 1 Meticcio 1 anno	Seconda metà della gravidanza	x	x	Ovario-isterectomia con riposizionamento della mucosa iperplastica; contenzione con sutura Bühner previa riduzione dell'edema
Caso 2 Pastore belga 2 anni	Fine gravidanza		x	Riposizionamento e contenzione con sutura Bühner
Caso 3 Segugio italiano 10 anni	Subito dopo il parto		x	Escissione della mucosa prolassata
Caso 4 Pointer 2,5 anni	Fine gravidanza	x		Taglio cesareo non conservativo
Caso 5 Meticcio 2,5 anni	Al parto	x	x	Taglio cesareo non conservativo e riposizionamento della mucosa iperplastica; contenzione con sutura Bühner

vagina e si è intervenuti con un riposizionamento della parte prolassata stabilizzato mediante sutura tipo Bühner sino al concludersi della gestazione; il parto avveniva 4 giorni dopo previa episiotomia con la nascita di 7 cuccioli vivi. Nel caso 3, invece, la contemporanea presenza di alcuni piccoli fibromi visibili sulla superficie della mucosa prolassata e di fibroleiomiomi apprezzabili con palpazione digitale nella sottomucosa del terzo medio della vagina, ci indirizzarono verso l'escissione della porzione di mucosa esposta insieme alle neoformazioni sottomucose. Mentre nel caso 2 la patologia rientra nella casistica descritta in letteratura^{5,6} ed è probabilmente ascrivibile all'aumento degli estrogeni durante le ultime settimane di gravidanza¹¹, nel caso 3 si è ipotizzata una causa meccanica. La presenza delle neoformazioni vaginali, infatti, può aver rallentato l'espulsione con traumatismo della parete ed accentuazione dell'edema dovuto al parto che, col passaggio dei cuccioli, è stato sospinto caudalmente causando l'abnorme aumento di volume della mucosa e la sua protrusione a 360° dalla rima vulvare.

Il caso 4 era un prollasso vaginale p.d. in cui, infatti, all'ispezione della massa prolassata era possibile visualizzare l'ostio cervicale e la vescica in essa contenuta attraverso lacerazioni vaginali a tutto spessore. Durante il taglio cesareo non conservativo, inoltre, si evidenziarono lacerazione del peritoneo e suo scollamento a livello delle tasche vagino-rettale e vagino-vescicale. In questo caso la cagna portava avanti una gravidanza con 11 feti ed è quindi probabile che, analogamente a quanto avviene in altre specie, l'eziologia vada ricercata nell'aumento della pressione intraddominale unita ad una lassità dei tessuti perivaginali.

I casi 1 e 5 erano caratterizzati dalla contemporanea presenza dei due tipi di prollasso. Nel primo l'evidenziazione dell'ostio cervicale esterno all'ispezione e la visualizzazione della vescica al suo interno mediante ecografia fecero pensare in un primo tempo solamente al prollasso vaginale p.d.; tuttavia, dopo il riposizionamento in cavità

addominale degli organi per effettuare l'ovarioisterectomia, persisteva un prollasso dell'intera circonferenza della porzione caudale della mucosa vaginale. Dopo la riduzione con l'ausilio di sostanze igroscopiche, venne riposizionato in vagina e trattenuto in situ mediante sutura di Bühner in attesa che regredisse l'iperplasia della mucosa. In questo caso lo stato di prollasso della mucosa vaginale è, a nostro avviso, secondario all'edema indotto dal prollasso vaginale p.d.

La cagna n. 5 è stata presentata a visita con un prollasso riferibile all'apparato genitale in corso di parto distocico. Dalla massa protrudeva un feto in presentazione cefalica, ma con arti portati sotto di sé. Ad un'attenta osservazione il prollasso era composto da due formazioni distinte. La prima, dorsale, avvolgeva a manicotto il feto e presentava nel margine posteriore una variazione repentina dell'aspetto della mucosa indicativa del passaggio tra vagina e cervice; la seconda formazione di aspetto piriforme, molto edematosa, si inseriva a livello del pavimento vaginale subito cranialmente al meato uretrale. Il tutto permetteva di esprimere una diagnosi di contemporanea presenza dei due tipi di prollasso. Si è ipotizzato quindi che il primitivo prollasso della mucosa vaginale iperplastica e l'anomalo atteggiamento del feto siano stati di ostacolo all'espletamento del parto inducendo premiti espulsivi prolungati che hanno conseguentemente indotto la paratopia della porzione più craniale della vagina.

CONCLUSIONI - I casi clinici da noi riportati evidenziano come il prollasso vaginale nella cagna sia un fenomeno complesso che, nella sua manifestazione, interessa strutture anatomiche diverse dell'organo (prollasso della sola mucosa iperplastica o dell'intera parete), talvolta anche concomitanti tra loro. Inoltre emerge una varietà eziologica che coinvolge diversi fattori nel determinismo della patologia.

BIBLIOGRAFIA - 1. Soderberg S.F. Vaginal disorders. In: *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*. Johnson C.A. Ed., Philadelphia, WB Saunders Co., 1983. 2. Rushmer R.A., Vaginal hyperplasia and uterine prolapse. In: *Current veterinary Therapy VII, Small Animal Practice*. Kirk R.W. Ed., Philadelphia, WB Saunders Co., 1222-1224, 1980. 3. Alexander J.E., Lennox W.J. Vaginal prolapse in a bitch. *Can. Vet. J.*, 2, 428-430, (1961). 4. Post K., Van Haaften B., Okkens A.C., Vaginal hyperplasia in the bitch: literature review and commentary. *Can. Vet. J.* 32, 35-37, (1991). 5. Memon M.A., Pavletic M.M., Kumar M.S.A., Chronic vaginal prolapse during pregnancy in a bitch. *JAVMA*, 202, 295-297, (1993). 6. Uma Rani R., Kathiresan D., Sivaseelan S., Vaginal fold prolapse in a pregnant bitch and its surgical management. *Indian Vet.J.*, 81, 1390-1391, (2004). 7. Holst P.A., Plemister R.D., Temporal sequence of events in the estrous cycle of the bitch. *Am. J. Vet. Res.*, 36, 705-706, (1975). 8. Schaefer-Okkens A. C., Vaginal edema and vaginal fold prolapse in the bitch, including surgical management. In: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Concannon P.W., England G., Verstegen III J. and Linde-Forsberg C. Eds., International Veterinary Information Service, Ithaca NY, (www.ivis.org), 2001. 9. McNamara P.S., Harvey H.J., Dykes N. Chronic vaginocervical prolapse with visceral incarceration in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 33, 533-536, (1997). 10. Alan M., Cetin Y., Sendag S., Eski F., True vaginal prolapse in a bitch. *Anim. Reprod. Sci.*, in stampa (2006). 11. Feldman, E.C., Nelson, R.W., Ciclo ovarico e colpocitologia. In: *Endocrinologia e riproduzione del cane e del gatto*, 2^a edizione, UTET, Torino, 581-600, (1998).

**PROPOSTA DI “GRADING” PER LA VALUTAZIONE CLINICA DELLA
CAGNA AFFETTA DAL COMPLESSO IPERPLASIA CISTICA
ENDOMETRIALE-PIOMETRA (ICE-P)**

**A GRADING SCORE PROPOSAL FOR THE CLINICAL EVALUATION OF
CYSTIC ENDOMETRIAL HYPERPLASIA-PYOMETRA (CEH-P) IN THE BITCH**

Bigliardi E., Parmigiani E., Morini G., Ferrari L., Di Ianni F., Bresciani C., Vecchi I., *Dipartimento Salute Animale Sezione Clinica Ostetrica e Riproduzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma*

Parole chiave: Iperplasia Cistica Endometriale, Piometra, Stadiazione Paziente
Key words: Cystic Endometrial Hyperplasia, Pyometra, Grading of the Patient

SUMMARY - Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex (ICE-P) is the most important pathological condition of the uterus in the bitch. Often the clinicians have not enough elements for a complete evaluation of all the involved pathological parameters. The aim of this study is a proposal of a “grading” score for the clinical evaluation of the patient.

INTRODUZIONE - Il complesso iperplasia cistica endometriale-piometra (ICE-P) rappresenta una delle più importanti condizioni patologiche che possono colpire l’utero della cagna. Spesso il Medico Veterinario, di fronte a questa patologia, si trova a dover decidere quale tipo di percorso terapeutico mettere in atto. Non sempre è chiara l’urgenza di dover intraprendere un intervento chirurgico e quello che emerge dai parametri clinici in alcuni casi non chiarisce lo stato di gravità della patologia d’organo. Alcuni autori recentemente hanno classificato alcuni stadi evolutivi della patologia (mucometra) come eventi non necessariamente collegati alla patologia infiammatoria^{1,2}. Si osserva infatti, in seguito ad esame istologico dell’utero, che in alcune circostanze l’intervento chirurgico non sarebbe stato necessario. Lo scopo di questo lavoro è quello di analizzare tutti i parametri clinici ritenuti significativi, in particolar modo quelli ecografici, al fine di proporre una griglia che consenta di classificare la compromissione clinica del paziente e funzionale dell’organo in oggetto tramite una scala di punteggio. Tale griglia permetterà in questo modo di eseguire una stadiazione della patologia, rendendo più semplice la scelta dell’indirizzo terapeutico più adatto ad ogni singolo caso clinico.

MATERIALI E METODI - Nel nostro studio abbiamo utilizzato un campione di 50 cagne con sintomatologia riferibile a ICE-P. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame ultrasonografico per la valutazione del grado (da I a IV grado) di compromissione dell’integrità dell’utero secondo la classificazione proposta in una precedente indagine³. *Grado I:* Nessuna presenza di cisti, superficie endometriale normale, contenuto uterino anecogeno; *Grado II:* Presenza di poche e piccole cisti, superficie endometriale normale, contenuto uterino anecogeno; *Grado III:* Presenza di numerose cisti di grosse dimensioni (>2mm), superficie endometriale irregolare, endometrio ipertrofico, contenuto uterino, se presente, ipoecogeno (corpuscolato); *Grado IV:* Presenza di numerose cisti di grosse dimensioni (>2mm) in tutto l’utero, superficie endometriale irregolare, endometrio ipertrofico o atrofico, contenuto uterino ipoecogeno (corpuscolato). Per ogni soggetto abbiamo inoltre raccolto i seguenti parametri: componente batterica dell’essudato⁴, conta leucocitaria, valori epatici, valori renali⁵, temperatura rettale, frequenza cardiaca e respiratoria. Tali parametri sono normalmente coinvolti nella Sindrome di Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS), ovvero il quadro di manifestazioni cliniche in risposta ad uno stimolo sufficientemente

grave da indurre un massivo rilascio a livello sistemico di mediatori dell'inflammatione^{6,7}. Ad ognuno dei parametri considerati è stato assegnato un valore centesimale come indicato nella tabella:

PARAMETRI	VALORE (massimo)	VARIAZIONI
ECOGRAFIA	48/100	I° gruppo → 10/100 II° gruppo → 20/100 III° gruppo → 45/100 IV° gruppo → 48/100
CONTA LEUCOCITARIA (WBC)	10/100	cell/ml <20.000 → 1/100 cell/ml 20.000-40.000 → 5/100 cell/ml >40.000 → 10/100
FUNZIONALITÀ RENALE	12/100	p.s. urine >1.035 → 1/100 p.s. urine 1.035-1.024 → 2/100 p.s. urine <1.024 → 3/100 azotemia > valori basali → 3/100 creatinina > valori basali → 3/100
PARAMETRI EPATICI	8/100	p. epatici fisiologici → 1/100 p. epatici (transaminasi, azotemia, Fosf. Alk.) → 8/100
ANEMIA (PVC)	5/100	PVC >37% → 1/100 PVC <37% → 5/100
TEMPERATURA RETTALE	5/100	T° 39°C-40°C → 1/100 T° <37,8°C o >40°C → 5/100
FREQ. CARDIACA	3/100	b.p.m. 80-120 → 1/100 b.p.m. >120 → 3/100
FREQ. RESPIRATORIA	3/100	Respiri/min. 16-20 → 1/100 Respiri/min. >20 → 3/100
PERDITE VAGINALI	3/100	Assenza di <i>Coli</i> nello scolo vag. → 2/100 Presenza di <i>Coli</i> nello scolo vag. → 3/100
FALSE GRAVIDANZE	2/100	Sporadicamente → 1/100 Ad ogni ciclo estrale → 2/100
FASE DEL CICLO ESTRALE	1/100	Altra fase del ciclo → 0 Diestro → 1/100

I soggetti che avevano un punteggio superiore a 60/100 sono stati sottoposti ad ovariosterectomia, quelli con punteggio compreso tra 40/100 e 60/100 potevano essere sottoposti a trattamento farmacologico se le condizioni cliniche generali consentivano l'esecuzione della terapia e in alternativa all'intervento chirurgico; quelli con punteggio inferiore a 40/100 sono stati trattati farmacologicamente con una associazione di cloprostenolo (2-4 µg/kg/die per 5 giorni) ed antibiotici (amoxicillina, ac. clavulanico, enrofloxacin).

RISULTATI - I parametri presi in esame hanno fornito i seguenti risultati: 1) Ecografia: 27 cagne sono state classificate di IV grado, 15 di III grado, 6 di II e 2 di I grado 2) Componente batterica: nell'utero del 62% dei soggetti è stata riscontrata la presenza di *E. Coli* con una frequenza del 50% del fattore citotossico (CFN)⁸; nell'11% è stata osservata la presenza di *Streptococcus Canis*; nel 7% *Proteus spp*; nel 4% *Enterobacter Cloacae*; nel 4% *Pseudomonas Spp*; nel 2% *Klebsiella Spp* e nel 10% dei soggetti il contenuto dell'utero è risultato sterile. 3) Conta leucocitaria: nel 76% dei soggetti (38 cagne grado III e IV) è stato riscontrato un valore di leucociti compreso tra 20.000 e 40.000 cell/ml, nel 14 % (7 cagne grado III) un valore oltre 40.000 cell/ml e nel 10% (1 grado I e 4 grado II) inferiore a 20.000 cell/ml. 4) Funzionalità renale: i parametri riferiti alla funzionalità renale (creatinina, azotemia, peso specifico dell'urina)

hanno subito variazioni rispetto ai valori normali in 10 soggetti di cui 5 con un iperplasia cistica endometriale di IV grado, 4 di III grado e 1 soggetto con grado II. 5) Parametri epatici: 5 soggetti, tutti con iperplasia cistica endometriale grave (IV grado) presentavano alterazioni della funzionalità epatica con incrementi dell'azotemia e della fosfatasi alcalina. 6) Anemia: tre cagne mostravano alterazioni dell'emocromo (oltre alla leucocitosi) con un quadro di anemia rigenerativa. 7) Temperatura rettale: 40 soggetti (80%) mostravano un diverso grado di ipertermia con valori compresi tra 39° e 40°C, 5 soggetti erano normotermici e 5 cagne avevano ipertermia di grado superiore a 40°C. 8) Frequenza cardiaca: La frequenza cardiaca si presentava superiore a 120 bpm nei soggetti con ipertermia mentre rimaneva compresa tra 80 e 120 bpm nei soggetti normotermici 9) Frequenza respiratoria: la frequenza respiratoria aveva un andamento in sincronia con la frequenza cardiaca. 10) Perdite vaginali: lo scolo vaginale è stato riscontrato nel 50% dei soggetti con una frequenza del 60% di colture positive all'E.Coli. 11) Falsa gravidanza: il 70% dei soggetti aveva presentato uno o più episodi di pseudociesi. 12) Tutti i soggetti si trovavano nella fase diestrale. In riferimento alla scala centesimale prefissata 8 soggetti avevano raggiunto un punteggio inferiore a 40/100, 8 soggetti un valore compreso tra 40 e 60/100 e 36 un punteggio superiore a 60/100.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI - L'eziologia multifattoriale dell'ICE-P richiede la valutazione, ai fini terapeutici e soprattutto prognostici, di numerosi parametri⁹ al fine di valutare lo stato di cronicità della patologia e le cause predisponenti^{10,11,12} L'ICE-P si inserisce senza dubbio tra le patologie in grado di determinare SIRS e pertanto spesso rappresenta una condizione che richiede un trattamento d'urgenza. Urgenza non significa necessariamente trattamento chirurgico. Nel nostro campione abbiamo potuto osservare che la sintomatologia clinica, i riscontri di laboratorio e soprattutto le lesioni endometriali rilevabili ecograficamente³ non sono sempre concordi tra loro. In effetti un certo numero di soggetti (16) presentava lesioni endometriali modeste, anche se accompagnate da rilievi clinici significativi (ipertermia, leucocitosi, incremento della fosfatasi alcalina) che con un trattamento farmacologico adeguato (associazione di PgF2alpha e antibiotici, terapia reidratante) hanno avuto la remissione della sintomatologia con il recupero funzionale dell'utero. Questi soggetti, senza la possibilità di valutare l'integrità endometriale sarebbero stati arbitrariamente sottoposti al trattamento chirurgico o farmacologico. È evidente che alla decisione devono concorrere tutti i parametri indicati in quanto la terapia farmacologica deve essere attuata solo se il soggetto presenta parametri clinici che possano consentire, senza rischi per il paziente, la possibilità di tollerare la terapia. La griglia proposta offre al clinico una valutazione complessiva dei principali parametri coinvolti in questa patologia al fine di valutare con maggiore obiettività quale paziente può beneficiare del trattamento chirurgico o di quello farmacologico. Nel campione esaminato i risultati sono stati positivi dal momento che i soggetti sottoposti al trattamento farmacologico, in base alla griglia proposta, hanno presentato la remissione della patologia senza presentare recidive e in alcuni casi all'estro successivo sono state fecondate con esito positivo. In conclusione pertanto, pur con il limite della soggettività dei parametri inseriti nella valutazione e del punteggio attribuito a ciascuno di essi, possiamo affermare che la proposta di una valutazione del "grading" della compromissione del paziente affetto da ICE-P possa essere un valido aiuto al clinico nella decisione del percorso terapeutico da seguire.

BIBLIOGRAFIA - 1. De Bosschere, H., Ducatelle, R., Tshamala, M., Coryn, M., Changes in Sex Hormone Receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. *Theriogenology*, 58, 1209-1217, (2002). 2. De Bosschere, H.,

Ducatelle, R., Vermerisch, H., Simoens, P., Coryn, M., Estrogen and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Animal Reproduction Science*, 70, 251-259, (2002). **3.** Bigliardi, E., Parmigiani, E., Cavirani, S., Luppi, A., Bonati, L., Corradi, A., Ultrasonography and Cystic Hyperplasia-Pyometra Complex in the Bitch. *Reprod. Dom. Anim.*, 39, 136-140, (2004). **4.** Wadas, B., Kuhn, I., Lagerstedt, A.S., Jonsson, P., Biochemical phenotypes of Escherichia Coli in dogs: comparison of isolates isolated from bitches suffering from pyometra and urinary tract infection with isolates from faeces of healthy dogs. *Vet. Microbiol.*, 52(3-4), 293-300, (1996). **5.** Stone, E.A., Littman, M.P., Robertson, J.L., Bovée, K.C., Renal dysfunction in dogs with pyometra. *JAVMA*, 193, 457-464, (1988). **6.** Purvis, D., Kirby, R., Systemic inflammatory response syndrome: septic shock. *Veterinary Clinics of North America*, 24, 1225-1247, (1994). **7.** Brady, C.A., Otto, C.M., Systemic inflammatory response syndrome, sepsis and multiple organ dysfunction. *Veterinary Clinics of North America Practice*, 31, 147-162, (2001). **8.** Brest, P., Mograbi, B., Hofman, V., Loubat, A., Rossi, B., Auberger, P., Hofman, P., Rho GTPase is activated by cytotoxic necrotizing factor 1 in peripheral blood T lymphocytes: potential cytotoxicity for intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 71(3), 1161-1169, (2003). **9.** Kaymaz, M., Bastan, A., Erunal, N., Aslan, S., Findik, M., The use of laboratory findings in the diagnosis of CEH-pyometra complex in the bitch. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 127-134, (1999). **10.** De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermerisch, H., Van Den Broeck, W., Coryn, M. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected?. *Theriogenology*, 55, 1509-1519, (2001). **11.** De Cock, H., Ducatelle, R., Tilmant, K., De Schepper, J., Possible role for insulin-like growth factor-I in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch. of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 48, 1035-1047, (1997). **12.** De Cock, H., Vermerisch, H., Ducatelle, R., De Schepper, J., Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cysti-endometritis-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 18, 6, 1035-47, (1977).

**EFFETTI IN VITRO DELL'OMOCISTEINA SULLA CONTRATTILITÀ
UTERINA DELLA CAGNA**
IN VITRO EFFECTS OF HOMOCYSTEINE ON BITCH UTERINE
CONTRACTILITY

**Cosola C., Trisolini C., Spedicato M., Minoia G., Manca R., Mutinati M., Rizzo A.
Sciorsci R.L.,** *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari*

Parole chiave: Omocisteina, Miometrio, Cagna.

Key Words: Homocysteine, Myometrium, Bitch.

SUMMARY - Hyperhomocysteinemia has often been considered a risk factor for placental microvascular diseases and pregnancy complications such as spontaneous abortion, placental abruption, low birthweight, preeclampsia and preterm labour. The aim of this study was to investigate the effects of homocysteine on spontaneous contractility of myometrium isolated from pregnant and non pregnant bitches.

INTRODUZIONE - Recenti studi hanno dimostrato l'associazione tra elevati livelli di Omocisteina (Hcy) e patologie microvascolari placentari, responsabili di riassorbimento embrionale, aborto, distacco placentare, morte fetale, preeclampsia e ritardo dello sviluppo fetale^{1,2,3,4,5}. L'iperomocisteinemia è associata ad alterazioni vascolari, in quanto determina l'ossidazione delle LDL (Low Density Lipoproteins), promuovendo lo sviluppo di placche aterosclerotiche⁶, la proliferazione delle cellule muscolari vasali⁷, l'alterazione dell'interazione endotelio-piastrine e la riduzione della produzione di nitrossido (NO) e di prostaciline⁸. A livello placentare, si possono riscontrare depositi di fibrina intorno ai villi ed aree infartuate. In medicina umana, quindi, l'Hcy è ritenuta un utile marker di gravidanza a rischio⁹. È probabile che l'Hcy determini le suddette patologie non solo attraverso il danno vascolare placentare, ma anche tramite un'azione diretta sul miometrio. Alcuni studi hanno evidenziato che l'Hcy aumenta la contrattilità spontanea di strip di miometrio di cavia e di donna a fine gravidanza, in maniera dose dipendente^{10,11}. In tale ottica, il nostro studio si propone di indagare, in vitro, l'effetto dell'Hcy sulla contrattilità del miometrio di cagna, nelle diverse fasi del ciclo estrale e in gravidanza.

MATERIALI E METODI - La sperimentazione è stata condotta su 20 cagne meticce di proprietà, di età compresa tra 2 e 6 anni (peso 10-30 Kg), sottoposte ad intervento di sterilizzazione presso il Dipartimento di Produzione Animale dell'Università di Bari.

L'esame clinico, l'esame colpocitologico e il dosaggio del progesterone plasmatico, eseguito mediante test ELISA semiquantitativo rapido (Ovulation Test®, Bio Veto Test, France; sensibilità: 74%, specificità: 97%), hanno permesso di individuare le fasi del ciclo estrale. Per la diagnosi dell'epoca di gravidanza è stata impiegata l'indagine ecografica eseguita a 25 giorni dall'accoppiamento.

Dopo l'ovarioisterectomia, gli uteri sono stati immersi nella soluzione di Krebs modificata refrigerata e tamponata a pH 7,4, al fine di conservarne la vitalità. In seguito è stato ottenuto uno strip uterino (10-15 mm x 3-4 mm), tramite sezione longitudinale delle pareti del corno. Lo strip è stato posizionato in un bagno d'organo isolato a flusso debordante (Ugo Basile, Milano, Italia), contenente un volume complessivo di 30 ml di soluzione di Krebs continuamente carbossigenata (95% O₂ e 5% di CO₂) e termostata (37°C), per condurre l'esperimento in condizioni omeostatiche. Il tessuto è stato sospeso tra due uncini paralleli, sottoposto alla tensione di 1 g e connesso ad un trasduttore isometrico (Ugo Basile, Milano, Italia), per la misurazione delle risposte contrattili. Durante la fase di stabilizzazione, di circa 90 minuti, è stata registrata

l'attività contrattile spontanea con un poligrafo ad una via (Ugo Basile, Milano, Italia). Successivamente, dosi cumulative di Hcy-tiolattone (Sigma, Italia) disciolta nella soluzione di Krebs, sono state aggiunte al bagno d'organo (1×10^{-9} M- 1×10^{-3} M). La contrattilità del campione è stata esaminata valutando l'ampiezza (g) e la frequenza (numero di contrazioni/20 minuti) delle contrazioni per un periodo di 20 minuti prima (basale) e dopo l'applicazione dell'Hcy-tiolattone. Al termine di ogni somministrazione è stato effettuato un lavaggio con soluzione di Krebs. I valori ottenuti sono stati espressi come medie \pm S.E.M. Le significatività statistiche sono state valutate mediante analisi della varianza (ANOVA) ad una via e post test Tukey-Kramer e sono state considerate significative per $p < 0,05$ e altamente significative per $p < 0,001$.

RISULTATI - L'attività dell'Hcy-tiolattone (Hcyt) è stata esaminata alle concentrazioni di 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, in quanto, in prove preliminari, concentrazioni inferiori non hanno determinato alcun effetto sulla contrattilità di base dei preparati.

Nella tabella 1 e 2 sono indicati rispettivamente i valori medi relativi alla frequenza ed alla tensione delle contrazioni di strip miometriali di cagne cicliche e gravide, in condizioni basali e dopo la somministrazione di Hcyt.

Fasi del ciclo estrale	Frequenza media			
	Frequenza di base (n° contrazioni / 20 min.)	Frequenza Hcyt (numero contrazioni/20 minuti)		
		1×10^{-5} M	1×10^{-4} M	1×10^{-3} M
Proestro-Estro	$1,25 \pm 0,25^b$	$4 \pm 0,40^{*b}$	$8 \pm 0,40^{*b,c,e}$	$11,5 \pm 0,64^{*b,e}$
Diestro	$21,5 \pm 1,32^a$	$40,5 \pm 2,10^{*a}$	$50,5 \pm 2,10^{*a}$	$96 \pm 2,16^{*a}$
Anestro	$2,5 \pm 0,64^b$	$3 \pm 0,91^b$	$5,5 \pm 0,64^{*b}$	$8,5 \pm 0,64^{*b,g}$
Gravidanza (30 gg)	$2,5 \pm 0,28^b$	3 ± 0^b	$3,25 \pm 0,25^{b,d}$	$2,25 \pm 0,25^{b,f,h}$
Gravidanza (50 gg)	1 ± 0^b	$0,5 \pm 0,29^b$	$0,5 \pm 0,29^{b,i}$	$2,25 \pm 0,25^{*b,i,h}$

Tab. 1 - Frequenza dell'attività contrattile durante le fasi del ciclo estrale e in gravidanza. Confronto statistico tra i valori ottenuti prima (base) e dopo l'aggiunta di Hcy-tiolattone (Hcyt). I dati sono espressi come media \pm S.E.M.. In riga: (*) $p < 0,01$; (**) $p < 0,05$. In colonna: a,b, e,f: $p < 0,001$; c,d: $p < 0,05$; g,h: $p < 0,01$.

L'Hcy ha aumentato la frequenza delle contrazioni spontanee in maniera concentrazione-dipendente in proestro-estro, diestro e anestro, mentre non ha determinato alcun effetto significativo sulla frequenza in gravidanza (30 gg). Per quanto riguarda la tensione, non si è avuto nessun effetto statisticamente significativo, in nessuna delle fasi esaminate.

Fasi del ciclo estrale	Tensione media			
	Tensione di base (g)	Tensione Hcyt (g)		
		1×10^{-5} M	1×10^{-4} M	1×10^{-3} M
Proestro-Estro	$1,89 \pm 0,04$	$1,92 \pm 0,03$	$1,91 \pm 0,03$	$1,9 \pm 0,03$
Diestro	$1,13 \pm 0,05$	$1,05 \pm 0,02$	$1,04 \pm 0,02$	$0,97 \pm 0,02$
Anestro	$1,37 \pm 0,01$	$1,34 \pm 0,05$	$1,35 \pm 0,01$	$1,33 \pm 0,01$
Gravidanza (30 gg)	$1,89 \pm 0,04$	$1,86 \pm 0,06$	$1,88 \pm 0,03$	$1,88 \pm 0,01$
Gravidanza (50 gg)	$1,90 \pm 0,04$	$1,93 \pm 0,01$	$1,88 \pm 0,03$	$1,89 \pm 0,01$

Tab. 2 - Valori medi di tensione dell'attività contrattile durante le fasi del ciclo estrale e in gravidanza. Prima (base) e dopo l'aggiunta di Hcy-tiolattone (Hcyt). I dati sono espressi come media \pm S.E.M.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI – I risultati ottenuti dimostrano che l'Hcy è in grado di aumentare, in vitro, la contrattilità spontanea di strip uterini di cagna in proestro-estro, diestro e anestro, in maniera dose-dipendente. Gli strip uterini a 30 giorni di gravidanza non hanno mostrato significative variazioni della frequenza, a

nessuna delle dosi utilizzate e ciò potrebbe essere correlabile a fattori di protezione della madre nei confronti del feto. A 50 giorni, invece, l'Hcy è stata efficace solo alla concentrazione massima utilizzata, confermando quanto riscontrato da Ayar e collaboratori^{10,11}. In diestro, inoltre, è stato rilevato un incremento ($p < 0.001$) della frequenza, rispetto alle altre fasi, proporzionale alla concentrazione utilizzata. I meccanismi attraverso cui l'Hcy è in grado di espletare l'effetto contratturante sulla muscolatura liscia sono due: un aumento della sensibilità delle fibrocellule muscolari lisce al Ca^{2+} ¹² e una riduzione della quota disponibile di NO, ad azione miorilassante¹³. È stato dimostrato che gli estrogeni prevengono la diminuzione dell'espressione dell'eNOS (endothelial Nitric Oxide Sintetase)¹⁴. Nella nostra sperimentazione, infatti, la maggior frequenza contrattile si è avuta in diestro, in presenza di basse concentrazioni di estrogeni. Durante la gravidanza la produzione di NO subisce un incremento che favorisce il flusso utero-placentare e garantisce lo stato di quiescenza del miometrio. A fine gravidanza, invece, si verifica un calo della produzione di NO che concorrerebbe all'avvio del meccanismo del parto¹⁵. In tale ottica, la mancata azione dell'Hcy riscontrata sull'utero gravido a metà gestazione sta ad indicare che, probabilmente, in questa fase della gravidanza, sia necessaria un'esposizione prolungata a dosi elevate di Hcy per ridurre la quota disponibile di NO e ottenere l'effetto contratturante. In conclusione, i risultati ottenuti in vitro ci consentono di affermare che nella cagna, elevati livelli di Hcy sono in grado di interferire con la normale contrattilità uterina. In vivo, ciò potrebbe costituire un importante meccanismo eziopatogenetico nelle alterazioni dei normali processi riproduttivi, quali l'impianto embrionale e la placentazione, mentre, a fine gravidanza, una condizione di iperomocisteinemia potrebbe incrementare la contrattilità uterina con il verificarsi di un parto pretermine.

BIBLIOGRAFIA - 1. Ray, J.M., Laskin, C.A., Folic acid and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption, preeclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systemic review. *Placenta*, 20, 519-529, (1999). 2. Lopez-Quesada, E., Vilaseca, M. A., Gonzalez, S., Homocisteina y gestación. *Medicina Clínica*, (Barcelona) 115, 352-356, (2000). 3. Picciano, M.F.: Is homocysteine a biomarker for identifying women at risk of complications and adverse pregnancy out-comes? *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 857-858, (2000). 4. Vollset, S.E. et al., Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 962-968, (2000). 5. Robbe, D. et al., Homocysteine and early embryonic death in mares. *Prog. Rep.*, 15 (3), 25-33 (2003). 6. Parthasarthy, S., Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds lead to its recognition by the acetyl LDL receptor. *Biochem. Biophys. Acta*, 917, 337-350, (1987). 7. Lubec, B., Fang-Kircher, S., Lubec, T., Blom, H.J., Boers, G.H.J.: Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1315, 159-162, (1996). 8. Stamler, J.S. et al., Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelial derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J. Clin. Invest.* 91, 308-318 (1992). 9. Sikkema, J.M. et al., Placental pathology in early onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction in women with and without thrombophilia. *Placenta*, 23, 337-342 (2002). 10. Ayar, A., Tug, N., Celik, H., Ozean, M., Ozcelik, O., Homocysteine-induced augmentation of spontaneous contraction of isolated guinea pig myometrium. *Pol. J. Pharmacol.*, 54, 281-284, (2002). 11. Ayar, A., Celik, H., Ozcelik, O., Kelestimur, H., Homocysteine-induced enhancement of spontaneous contractions of myometrium isolated from pregnant women. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 82, 789-793 (2003). 12. Izumi, H. et al., Agonists increase the sensitivity of contractile elements for Ca^{2+} in pregnant rat myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175, 199-206, (1996). 13. Lang, D. et al., Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta, role for superoxide anions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 422-427, (2000). 14. Spencer, T.A. et al., Estrogen blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. *J. Surg. Res.*, 118 (1), 83-90, (2004). 15. Norman, J.E., Cameron, I.T., Nitric oxide in human uterus. *Rev. Reprod.*, 1, 61-68, (1996).

INFERTILITÀ NEL CANE MASCHIO: EFFETTI DELL'ALLOPURINOLO SULLA SPERMATOGENESI E SUL METABOLISMO DEL TESTOSTERONE

MALE INFERTILITY IN DOG: EFFECTS OF ALLOPURINOL ON SPERMATOGENESIS AND TESTOSTERONE METABOLISM

¹Cassata R.B., ²Zarbo P., ³Iannuzzi A., ¹Libero professionista, PhD Tecnologie della Riproduzione degli Animali Domestici, Messina; ²Libero Professionista, Specialista in Parassitologia, Messina; ³Specializzanda in Fisiopatologia della Riproduzione degli Animali Domestici, Università Federico II, Napoli.

Parole chiave: Cane Maschio, Infertilità, Allopurinolo, Spermatogenesi, Testosterone.
Key Words: Male Dog, Infertility, Allopurinol, Spermatogenesis, Testosterone.

SUMMARY - A lot of drugs are able to interfere negatively on spermatogenesis and semen quality, then correlated to male fertility disfunctions. Allopurinol, used in canine leishmaniasis as treatment in the follow up, chemically is an hypoxantine isomer, essential basis for purinic nucleotide synthesis in four species of *Leishmania*, forming an enormous RNA than does not permit the normal parasite multiplication³. Although side effects are little in the dog, we have found, often, bone marrow depression, hepatic disorders and infertility in male. The aim of this study was to evaluate the effects of allopurinol, at pharmacological doses, on semen quality and testosterone metabolism.

INTRODUZIONE - Molti agenti farmacologici^{1,2} possono interferire negativamente sulla spermatogenesi e sulla qualità del seme ed essere quindi correlati a disfunzioni della fertilità del maschio. L'allopurinolo, usato nel trattamento e nel controllo della leishmaniosi canina, chimicamente è un isomero dell'ipoxantina, base essenziale per la sintesi del nucleotide purinico in quattro specie di *Leishmania*, portando alla formazione, di un RNA anormale, che non consente una normale moltiplicazione del parassita³. Benché nel cane gli effetti collaterali siano apparentemente poco frequenti, spesso sono state da noi riscontrate depressione del midollo osseo, epatopatie ed infertilità nel maschio. Scopo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti dell'allopurinolo, a dosi farmacologiche, sulla qualità del seme e sul metabolismo del testosterone.

MATERIALI E METODI - Il nostro studio è stato condotto su 5 soggetti, di razza e provenienza diversa, di età compresa tra i 3 e i 9 anni. Tutti i soggetti, positivi per *Leishmania* (IDEXX Snap Leish) erano stati precedentemente trattati con antimoniato di N-metilglucamina (Glucantime Merial, Italia) alla dose di 100mg/Kg ogni 3 giorni per 20 somministrazioni, ed allopurinolo (20 mg/Kg) per 60 giorni. Agli stessi soggetti, l'allopurinolo alla dose di 10 mg/Kg veniva somministrato, come terapia di mantenimento, per tre settimane al mese seguite da 2 settimane di sospensione. Dopo un accurato esame clinico generale e particolare dell'apparato genitale, la raccolta del seme, in ciascun soggetto è stata praticata due volte in corrispondenza della fine dei periodi di somministrazione e di sospensione del farmaco. Il seme raccolto mediante manipolazione digitale, è stato valutato sia dal punto di vista macroscopico che microscopico. I livelli del testosterone, in campioni di sangue, raccolti nelle 24 ore sia nel periodo di somministrazione che di sospensione dell'allopurinolo, sono stati valutati con tecnica ELFA (Biomerieux, VIDAS, Testosterone, REF. 30418), kit precedentemente testato con campioni di sangue raccolti da un cane maschio castrato e da un soggetto intero *Leishmania* negativo, ed in accordo con Olson⁴, i valori di riferimento sono stati compresi tra 0,4 e 10 ng/ml.

RISULTATI E DISCUSSIONI - Nelle tabelle 1 e 2 sono riportati per i soggetti presi in esame tutti gli elementi relativi alla valutazione macroscopica del seme, alla motilità, al numero di nemaspermi per ml e al numero totale di spermatozoi per ciascun eiaculato prima e dopo la somministrazione del farmaco.

Tab. 1 - *Parametri seminali dopo la sospensione di allopurinolo per 2 settimane*

Parametri	1 Beagle	2 M. Abruzzese	3 Corso	4 P. Tedesco	5 Volpino
Volume (ml)	0 ^a	5	6	4	1,5
Colore	0 ^a	opalescente	opalescente	opalescente	opalescente
Motilità %	0 ^a	70	75	65	70
Concentrazione Spz x10 ⁶ /ml	0 ^a	350	420	300	200
Vivi %	0 ^a	70	75	70	75
Anomalie %	0 ^a	25	30	25	15
pH	0 ^a	6,7	6,3	6,5	6,7

0^a = prelievo di seme non effettuato

Tab. 2 - *Parametri seminali dopo la somministrazione di allopurinolo per 3 settimane*

Parametri	1	2	3	4	5
Volume (ml)	0 ^a	5	2	3	2
Colore	0 ^a	chiaro	bianco sporco	chiaro	chiaro
Motilità %	0 ^a	60	65	65	60
Concentrazione Spz x10 ⁶ /ml	0 ^a	180	200	170	80
Vivi %	0 ^a	65	70	70	50
Anomalie %	0 ^a	30	30	35	30
pH	0 ^a	6,3	6,4	6,8	6,7

0^a = prelievo di seme non effettuato

Fatta eccezione per il cane n° 1 dal quale non è stato possibile effettuare la raccolta di seme, tutti gli altri presentano una concentrazione spermatica compresa tra 4 e 400 x 10⁶/ml a due settimane dalla sospensione del farmaco, mentre a fine somministrazione la concentrazione spermatica oscilla tra 1,5-250 x10⁶/ml. Tuttavia il soggetto n° 2, nella media relativamente alla concentrazione spermatica, presenta un numero di nemaspermi vitali modesto mentre è elevato il numero di nemaspermi portatori di anomalie primarie a livello della testa (4%), del tratto intermedio (1%) e della coda (a frustino e attorcigliata), in accordo con la valutazione della motilità a fresco, che risulta inferiore al 50%. I livelli della testosteronemia (Tab. 3-4) nelle 24 ore, sono da ritenersi normali, anche durante il periodo di somministrazione del farmaco, fatta eccezione per il soggetto n° 1 che presenta concentrazioni di testosterone al di sotto di 0,4 ng/ml, mentre dopo tre settimane di terapia presenta un valore di testosteronemia di 1,15 ng/ml che è da ritenersi normale.

Tab. 3 - *Valori di testosteronemia (ng/ml) dopo la sospensione di allopurinolo per 2 settimane*

Tempo (ore)	1	2	3	4	5
08,00	0,36	4,75	3,45	0 ^a	0 ^a
12,00	0,20	6,80	6,40	6,80	0 ^a
16,00	0,52	4,59	10,20	8,63	0 ^a
20,00	0,48	8,03	8,64	0 ^a	0 ^a

0^a = prelievi di sangue non effettuati

Tab. 4 - Valori di testosteronemia (ng/ml) dopo la somministrazione di allopurinolo per 3 settimane

Tempo(ore)	1	2	3	4	5
08,00	1,15	6,80	4,75	0 ^a	0 ^a
12,00	0 ^a	6,64	8,90	0 ^a	0 ^a
16,00	0,36	4,58	10,33	0 ^a	
20,00	0 ^a	10,05	6,80	8,90	0 ^a

0^a = prelievi di sangue non effettuati

Pertanto non possiamo ritenere che nel cane l'allopurinolo abbia un qualche effetto sul metabolismo del testosterone, diversamente che nell'uomo e nel ratto dove tale trattamento farmacologico diminuisce le concentrazioni plasmatiche sia del testosterone che del LH⁵; tuttavia, non essendo stato possibile valutare i livelli di testosteronemia, in tutti i soggetti, nelle 24 ore, non possiamo neppure escluderne l'effetto. Diversa, invece, appare la problematica collegata alla qualità del seme. Nell'uomo, l'allopurinolo, è compreso tra i farmaci che causano infertilità; infatti Margalioth et al., (1985)⁶ ipotizzano che tale farmaco porti a un difetto nella capacità di fertilizzazione degli spermatozoi a causa di una anormale penetrazione della zona pellucida dell'ocita. Nel cane causa principalmente oligospermia ed anomalie della morfologia spermatica, effetti, comunque, completamente reversibili; tuttavia, ciò non preclude potenziali effetti embriotossici e teratogeni.

Quindi sotto questo aspetto, altre indagini di tipo ultrastrutturale e citogenetica potrebbero apportare ulteriori chiarimenti, nella valutazione della fertilità e nell'impostazione di un corretto esame prognostico e/o diagnostico del maschio.

BIBLIOGRAFIA - **1.** Feldman, E.C., Nelson, R.W., *Endocrinologia e Riproduzione del Cane e del Gatto*, UTET, Torino, (1992). **2.** von Heimendahl, A., England, G.C.W., Sheldon LM, Influence of Griseofulvin treatment on semen quality in the dog. *Anim. Reprod. Sci.*, 80, 1-2, 175-181, (2004). **3.** Katzung, B.G., *Farmacologia Generale e Clinica*, Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova, (1992). **4.** Olson, P.N., Clinical Approach to infertility in the stud dog. *Proceedings Annual Society for Theriogenology*, Denver, 33-45, (1984b). **5.** Graef, V., Zubrzycki, Z., Jarrar, K., The effect of allopurinol on testosterone metabolism. *Arzneimittelforschung*, 34, 12, 1760-1762, (1984). **6.** Margalioth, E.J., Navot, D., Beyth, Y., Diagnosis of drug-related male infertility by zona-free hamster egg sperm penetration assay. *Lancet*, II, 275-279, (1985).

MONITORAGGIO ECOGRAFICO IN CANI VASECTOMIZZATI PER VIA LAPAROSCOPICA
LONG TERM ULTRASONOGRAPHIC FOLLOW-UP AFTER LAPAROSCOPIC VASECTOMY IN DOGS

Russo M.,¹Cozzolino A.,¹Spada A., Tortora G.,²Catone G., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Napoli "Federico II";¹Ospedale Veterinario, Azienda Sanitaria Locale, Napoli; ²Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Camerino.*

Parole chiave: Cane, Vasectomia, Videolaparoscopia, Ecografia, Testicolo,
Key words: Dog, Vasectomy, Videolaparoscopy, Ultrasonography, Testicle,

SUMMARY - Laparoscopic Vasectomy is a simple and effective method of contraception in dog, consisting of cauterization of the vas deferens and, thus, interfering with transport of spermatozoa from the testis and epididymis into the ejaculatory duct. However, the effect of vasectomy on the testis in humans and animals is incompletely understood, and with respect to dogs, few reports have been published. The aim of the present study was to assess the long-term ultrasonographic features of the testes and related structures in vasectomized dogs.

INTRODUZIONE - Prove valide dei benefici e dei rischi degli interventi terapeutici e preventivi sono essenziali per prendere decisioni a livello della pratica clinica e nel definirne le linee guida. La vasectomia laparoscopica è una tecnica di chirurgia endoscopica mininvasiva, utilizzata come tecnica di contraccezione in diverse specie, uomo compreso ed utilizzata negli ultimi anni come tecnica alternativa nei cani maschi attraverso il pinzettamento seguito dalla cauterizzazione dei dotti deferenti^{1,2,3,4}. Il vantaggio della vasectomia è senz'altro quello di mantenere inalterata la funzione endocrina. La spermatogenesi sembra persistere, anche se la risposta testicolare alla vasectomia varia da specie a specie; sembra anche che si sviluppi un equilibrio tra produzione spermatica ed il riassorbimento di sperma. Tutte le conseguenze immunologiche della legatura dei vasi sono sconosciute. Le recenti osservazioni su scimmie indicano che dopo vasectomia può riscontrarsi un'elevata incidenza di aterosclerosi; comunque, tale fenomeno non è stato riscontrato nell'uomo. Nella specie canina è stata evidenziata la formazione di un granuloma localizzato alla coda epididimale ed uno spermatocele bilaterale multiloculare in un cane vasectomizzato per via tradizionale⁵. Scopo del presente lavoro è quello di verificare le modificazioni ecografiche a lungo termine su testicoli ed epididimi in soggetti vasectomizzati per via laparoscopica.

MATERIALI E METODI - Sono stati utilizzati per questo lavoro cinque cani maschi di razza pitbull, di età compresa tra i quattro ed i sei anni, di peso corporeo tra i 20 e i 30 kg, ricoverati presso l'Ospedale Veterinario della ASL Napoli 2. Gli animali provenienti dal canile il Cucciolo venivano ricoverati 2 giorni prima dell'intervento di vasectomia laparoscopica nel febbraio del 2006. Dopo un esame clinico generale e particolare dell'apparato genitale, ogni paziente ha ricevuto un esame ecografico per evidenziare il parenchima testicolare, gli epididimi e la relativa vascolarizzazione in modo da poter ottenere dati da confrontare con gli esami ecografici successivi agli interventi^{7,8,9,10}. È stato utilizzato un apparecchio ecografico Medison Pico, munito di sonda lineare multifrequenza da 10 MHz, con animale posto in decubito laterale destro. Sono state ottenute scansioni longitudinali e trasversali. Le misurazioni effettuate sono state ottenute tramite software integrato dell'apparecchio. Prima dell'intervento di

vasectomia, tutti gli animali sono stati mantenuti a digiuno solido nelle 24 ore precedenti la chirurgia e liquido per 12 ore. La sedazione è stata eseguita con una associazione di xilazina (0,3 mg/kg) e ketamina (3 mg/kg) per via intramuscolare e l'iduzione con propofolo (2 mg/kg) ad effetto per via endovenosa. L'anestesia generale è stata mantenuta, dopo intubazione orotracheale, con isofluorano (1,5%) in miscela di ossigeno. Dopo aver tosato e preparato chirurgicamente l'addome dalla regione xifoidea fino a quella pubica, si è provvedute ad insufflare il cavo addominale con CO₂. Dopo la rimozione del catetere trocar e l'ampliamento chirurgico dell'incisione ombelicale, è stato inserito nel cavo addominale un laparoscopio con angolo visivo a 0° di 10 mm collegato ad una videocamera endoscopica (TRICAM) (b) e ad una sorgente luminosa a luca fredda (Xenon 300 W). Il letto operatorio è stato quindi inclinato fino a che l'animale non ha raggiunto la posizione Trendelenburg con inclinazione di 30° dal piano ortogonale mentre gli arti posteriori sono stati mantenuti sollevati^{5,6}. Una volta visualizzati, i dotti deferenti venivano clampati e cauterizzati. Si è proceduti successivamente ad eseguire controlli seriali ecografici per 12 mesi post-intervento a cadenza mensile per poter valutare eventuali modificazioni strutturali e di flusso.

RISULTATI - Tutti gli esami ecografici, eseguiti prima dell'intervento, hanno evidenziato strutture testicolari normali, caratterizzate da ecostruttura omogenea, finemente granulare con ecogenicità maggiore dell'epididimo, interrotta da una banda ecogenica, a partenza dal polo craniale e terminante al polo caudale, il *mediastinum testis* minore di 2 mm. La tunica vaginale appariva nettamente iperecogena rispetto al parenchima testicolare. Anche la flussimetria ha evidenziato parametri simili a quelli descritti in letteratura^{7,8}. Una volta ecografati, i soggetti venivano vasectomizzati per via laparoscopica, ospedalizzati per 3 giorni, al fine di poter valutare eventuali complicazioni post-chirurgiche e successivamente rinviati al canile di provenienza. Ad un mese dall'intervento tutti i soggetti venivano valutati ecograficamente e l'esame è stato ripetuto per un anno ad intervallo di un mese. Nei primi 6 controlli non si sono evidenziate sostanziali alterazioni ecografiche. Dal 6° al 12° mese, invece, il parenchima testicolare ha evidenziato un'accentuazione dell'ecogenicità parenchimale con ispessimento del *mediastinum testis* (>3 mm). La coda dell'epididimo che prima dell'intervento appariva di forma conica, ipoecogena rispetto al parenchima testicolare, risultava aumentata in dimensioni (>2 cm) ed i dotti apparivano nettamente dilatati (1mm), visualizzati come strutture anaecogene tortuose. La velocità del flusso nella porzione marginale dell'arteria testicolare risultava leggermente aumentata (PSF 1,51 KHz, EDF 0,91 MHz, Fmean 1,26 MHz, PI 0,48, RI 0,40 ed S/D 1,66).

CONCLUSIONI - Il presente studio mette in evidenza la necessità di verificare i benefici o gli effetti negativi di una tecnica. Nel caso specifico la tecnica di vasectomia laparoscopica, ritenuta pratica e sicura per la sterilizzazione di animali, eseguita correttamente comporta minime alterazioni a carico del parenchima testicolare e dell'epididimo e modifica lievemente la velocità del flusso testicolare.

L'esame ecografico risulta un valido strumento, che ben si presta allo studio dettagliato del contenuto scrotale, capace di evidenziare minime alterazioni testicolari ed epididimali, e soprattutto in grado di monitorare gli effetti a lungo termine, in maniera non invasiva, di tecniche chirurgiche alternative.

BIBLIOGRAFIA - 1. Freeman, L.J., Hendrickson, D.A., in *Veterinary Endosurgery*, ed. Freeman, L.J., Mosby, Ohio, 205-225, (1999) 2. Wildt, D.E., Seager, S.W.J., Bridges, C.H., Sterilization of the male dogs and cat by laparoscopic occlusion of the ductus deferens. *Am J Vet Res.*, 42, 1888-1897, (1981). 3. Moriconi, F., Di Meo, A., Bellezza, E., Bellucci, M., Sterilizzazione per via laparoscopica nel cane e nel gatto.

Obiettivi Veterinari 13, 13-16, (1989) **4.** Veronesi, M.C., Mollo, A., Acocella, F., Battocchio, M., Vasectomia nel cane maschio per via laparoscopica. *Atti SISVet*, 51, 173-174, (1997). **5.** Perez-Marin, C.C., Lopez, R., Dominguez, J.M., Zafra, R., Clinical and pathological findings in testis, epididymis, deferens duct and prostate following vasectomy in a dog. *Reprod Domest Anim.*, 41(2):169-74, (2006). **6.** Silva, L.D.M.; Onclin, K., Donnay, I, Verstegen, J.P., Laparoscopic vasectomy in the male dog. *J. Reprod Fert.*, (Suppl) 47, 399-401, (1993). **7.** Gumbsch, P., Gabler, C., Holzmann, A., Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. *Vet Rec.*, 3; 151(5): 140-4, (2002). **8.** Gunzel-Apel, A.R., Mohrke, C., Poulsen Nautrup, C., Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: physiological and pathological findings. *Reprod. Domest. Anim.*, 36(5):236-40, (2001). **9.** Paltiel, H.J., Diamond, D.A., Di Canzio, J., Zurakowski, D., Borer, J.G., Atala, A., Testicular volume: comparison of orchidometer and US measurements in dogs. *Radiology*, 222(1):114-9, (2002). **10.** Pugh, C.R., Konde, L.J., Park, R.D., Testicular ultrasound in the normal dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 31, 4, 195, (1990).

**ANALISI COMPUTERIZZATA E METODICA CLASSICA A CONFRONTO
PER LA VALUTAZIONE DEL MATERIALE SEMINALE CANINO
REFRIGERATO SECONDO DIVERSI PROTOCOLLI**
SUBJECTIVE AND COMPUTER SPERM ANALYSIS FOR EVALUATION OF
CANINE SEMEN CHILLED WITH DIFFERENT PROTOCOLS

Ponzo P., Semita C., Nervo T., ¹Sferlazzo A., *Dipartimento di Patologia Animale,
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino, ¹Libero
professionista.*

Parole chiave: Cane, Analisi Spermatica, CASA, Diluitori
Key words: Dog, Sperm Analysis, CASA, Extenders

SUMMARY - Subjective (optical microscopy and Bürker chamber) and computer system (CASA, CEROS, Hamilton-Thorne, USA) methods were compared in sperm quality evaluation. Concentration, % of motility and 3 different viability parameters on 30 fresh and chilled semen samples, diluted with different extenders, in 18 non breeder dogs, were valuated. Statistical analysis was performed and the better characteristics of each method were showed.

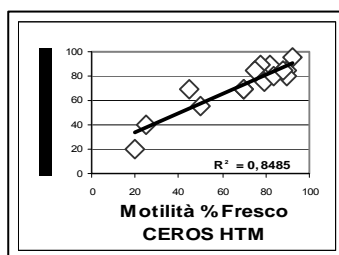
INTRODUZIONE - In ambito di allevamento canino, l'inseminazione artificiale è ormai diventata una pratica fondamentale per ottimizzare la gestione sanitaria e logistica della riproduzione. Nel corso di questo studio sono stati confrontati i risultati ottenuti dall'analisi del materiale seminale canino fresco e refrigerato utilizzando la camera contaglobuli di Bürker, considerata affidabile per la conta spermatica¹, ed il microscopio ottico (M.O.) e quelli con analizzatore computerizzato sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)².

La ricerca si è prefissata da un lato di dare un giudizio sull'affidabilità dell'analisi seminale del protocollo standard e dall'altro di individuare vantaggi e svantaggi delle diverse procedure. Sui singoli campioni sono stati valutati, nei due sistemi, la concentrazione e le caratteristiche della qualità del movimento spermatico, anche in relazione alla densità del terreno di conservazione utilizzato.

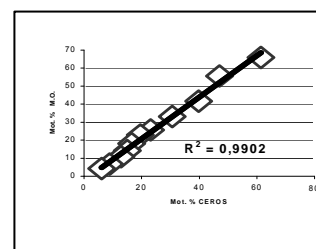
MATERIALI E METODI - Diciotto cani di diverse razze, non riproduttori, sono stati sottoposti ad uno o più prelievi con stimolazione manuale³, per un totale di 30 prelievi. Su ogni campione sono state valutate a fresco, per entrambe le metodiche, la concentrazione^{1,4,5} e la motilità percentuale, mentre per la velocità al M.O. è stato attribuito un unico valore numerico relativo alla rapidità e direzione della progressione e alle caratteristiche dei movimenti laterali della testa degli spermatozoi (su scala da 0 a 5)⁶ e per la metodica computerizzata (CASA, Hamilton-Thorne, CEROS 12.1, USA), mediante uso di vetrino a 4 camere di Leja, i valori di VCL (Velocità sul percorso reale), LIN (Linearità), ALH (spostamento della testa del gamete in µm dalla traiettoria media). I campioni sono stati diluiti in modo da ottenere una concentrazione standard di 10 milioni di spermatozoi progressivamente mobili/ml, refrigerati a +4°C e sottoposti allo stesso protocollo di analisi⁷. I terreni utilizzati sono stati: TRIS (triidrossimetilamminometano), a diverse concentrazioni di tuorlo d'uovo (10-20%); LAICIPHOS[®] IMV, diluitor commerciale a base di latte e tuorlo d'uovo (10-20-40%); INRA 96[®] IMV, diluitor commerciale a base di latte; LATTE SCREMATO, centrifugato per eliminare le micelle di grasso residuo⁷. I campioni di seme sono stati valutati a T0, subito dopo la diluizione, e ad intervalli di 24 ore per 10gg (T1-T10). I dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente con sistema Paired t-Test e correlazione lineare (r²).

RISULTATI E DISCUSSIONE - I dati corrispondenti alla media della concentrazione spermatica, alla deviazione standard e alla percentuale di differenza tra i conteggi con la camera di Bürker e il sistema CASA dei campioni analizzati, a fresco e diluiti, sono riportati nella TAB. 1. L' r^2 ottenuto tra i due sistemi sulla concentrazione del seme fresco è di 0,88. Il risultato statistico del Paired t-test ha però individuato una bassa significatività della popolazione delle conte (p<0,05). Nonostante l'andamento delle letture sembri quindi avere una buona correlazione lineare, i valori presi in esame sono troppo differenti tra di loro. Questo è dovuto al fatto che i dati sono stati acquisiti a fresco e che la concentrazione del seme dei diversi soggetti è risultata estremamente variabile. Il parametro quindi può sicuramente essere indicativo di una tendenza ma il suo preciso valore non può essere del tutto paragonato a quelli ottenuti con il seme diluito. La differenza della concentrazione è pari a 11,8%. Il sistema CASA sottostima questo parametro in campioni ad elevata concentrazione. In un campione molto concentrato, dove avvengono numerose collisioni tra gli spermatozoi, la parte ottica della macchina fatica ad interpretare le traiettorie dei gameti che si incrociano ed il software non conteggia le cellule che collidono. Per lo stesso parametro, riferito al seme diluito, il coefficiente di correlazione r^2 è di 0,85 estremamente significativo per il Paired t-test (p<0,0001) e in ottimo accordo con quello riportato in bibliografia di 0,89⁸. La differenza percentuale media della concentrazione (6,33%) potrebbe in parte essere dovuta all'uso dei diversi terreni a base di uovo e latte per la presenza di aggregati e micelle che possono alterare la lettura al computer; nonostante il corretto settaggio il software, infatti, li conteggia erroneamente come spermatozoi. Nei grafici seguenti (Graf. 1 e 2) vengono riportate rispettivamente le correlazioni dei valori medi di motilità % ottenute al M.O. con il sistema CASA sui campioni a fresco e diluiti con INRA96 a T₀.

SEME DILUITO INRA 96		Differenza %	
OSS.	Media±DS (x10 ⁶ spz/ml)	Burker	Ceros
Burker	20,25±3,57	X	6,33
Ceros	21,62±3,68	6,33	X
SEME FRESCO		Differenza %	
OSS.	Media ±DS (x10 ⁶ spz/ml)	Burker	Ceros
Burker	92,84±33,53	X	5,21
Ceros	87,9±30,39	5,21	X



Graf.1- r^2 Motilità % seme fresco



Graf.2 - r^2 Motilità % seme diluito

Tab. 1 – Confronto concentrazioni

È risultata una forte correlazione lineare tra le due modalità di osservazione: r^2 0,84 per l'osservazione sul seme fresco e di 0,99 per quella con seme diluito. La lettura dei campioni diluiti con altri terreni è risultata non eseguibile o non correlabile per le caratteristiche dei componenti e le evidenti alterazioni nel tempo dei terreni stessi. Anche dal punto di vista della variazione percentuale delle misurazioni sono stati ottenuti risultati molto simili, la differenza media è risultata essere solo del 3,4%. Per quanto riguarda l'analisi statistica è risultata molto significativa (p<0,0001).

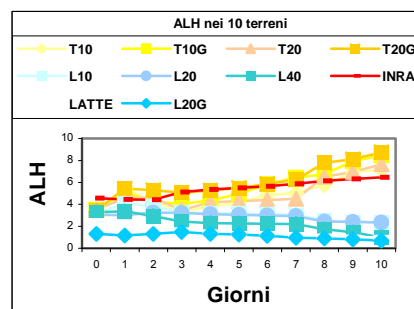
L'alto grado di concordanza pare determinato dal fatto che le letture sono state effettuate sempre dal medesimo operatore, che ha lavorato su campioni sempre diluiti alla stessa concentrazione. Inoltre la bassa concentrazione analizzata ha favorito sia la lettura ottica del computer, sia quella al M.O.

I valori di correlazione (r^2) tra la velocità valutata al M.O. e i valori LIN, VCL nel seme diluito a T₀ con i differenti diluitori sono riportate nella TAB 2. Statisticamente sono risultati entrambi molto significativi (p<0,001).

Tab. 2

	T10	T20	L10	L20	L40	INRA	LATTE
R ² LIN	0,79	0,73	0,96	0,94	0,92	0,87	0,85
R ² VCL	0,79	0,82	0,74	0,85	0,91	0,73	0,68

È emerso che i campioni diluiti con Tris e quelli con il latte, nonostante presentino una VCL molto superiore, hanno una linearità inferiore a quelli diluiti con Laiciphos. I valori di r^2 della correlazione VCL/velocità al M.O. e LIN/velocità al M.O. in questi i terreni si presentano inferiori a quelli calcolati per i terreni Laiciphos. Questi ultimi presentano addirittura un r^2 di 0,95 per quanto riguarda la LIN. Per quanto concerne il parametro ALH, (TAB.3), nei terreni a base di Tris e nell'INRA, l'alto valore attribuito a T0 ed il forte aumento dei valori con il passare dei giorni di conservazione (T10) potrebbe essere la causa per la quale i valori di LIN e VCL di questi terreni risultano meno correlati linearmente all'osservazione ottica della velocità. Gli ampi movimenti laterali della testa e la minore linearità vengono interpretati dall'operatore come un difetto ed il punteggio di velocità viene considerato più basso. Attribuendo un unico valore della velocità a 3 diversi parametri aumenterà la variabilità e la difficoltà del giudizio dell'operatore determinando una diminuzione di correlazione.



CONCLUSIONI - Dall'analisi dei dati ottenuti si evince che, riguardo la concentrazione dei campioni, il modello di macchina utilizzata nel presente studio, anche se correttamente settata, ha dimostrato un grado di affidabilità minore rispetto alla camera di Bürker, che rimane il metodo di elezione per effettuare questa conta. L'analisi computerizzata permette, infatti, una scansione molto rapida dei parametri riducendo al minimo la tempistica delle operazioni di lettura ma, allo stesso tempo, il conteggio può essere significativamente condizionato dalle caratteristiche del terreno (densità) e del campione (concentrazione). Dal momento che i diluitori più utilizzati per la refrigerazione del seme canino sono a base di tuorlo d'uovo, il mestruo non si presenta completamente limpido e quindi interferisce nella lettura della macchina. Il conteggio di particelle e residui del diluente rende impreciso, naturalmente, anche il calcolo della motilità percentuale del campione. I valori di tale parametro, ottenuti con la metodica classica, si sono rivelati molto attendibili.

Analizzando le differenze tra le due procedure è emerso che l'occhio umano è attratto dal movimento e tende a sovrastimare la motilità percentuale quando vi è un maggior numero di cellule in movimento, viceversa, tende a sottostimare il numero di cellule mobili quando vi è minor numero di cellule che si muovono nel campo da analizzare.

Si è inoltre osservato che valori inferiori di velocità riferiti a diluitori a base di tuorlo d'uovo o latte non corrispondono ad una effettiva diminuzione del movimento delle cellule. Tali valori non sono dovuti ad un peggioramento qualitativo delle condizioni di conservazione del materiale seminale ma alla caratteristica densità del diluente stesso.

La velocità dell'esecuzione della valutazione computerizzata insieme all'oggettività, la completezza dei dati e la ripetitività dei risultati rende, comunque, questo sistema vantaggioso nel caso di scambi di informazioni tra centri di ricerca. L'analisi seminale effettuata con la metodica classica resta però, per certi aspetti, un punto fermo di confronto e di riferimento sulla base del quale si devono perfezionare in futuro nuovi software e supporti informatici.

BIBLIOGRAFIA - 1. Christensen, P. et al., Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burker-Turk, Thoma and Maskler counting chambers, *Theriogenology*, 63, 992-1003, (2005). 2. Kuster, C., Sperm concentration

determination between hematocytometric and CASA systems: Why they can be different. *Theriogenology*, 64; 614-617, (2005). **3.** Seager, SWJ, Fletcher WS, Collection, storage and insemination of canine semen. *Lab Anim Sci*; 22:177-82, (1972). **4.** Ginsburg, KA., Armand, DR., The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movements measurements obtained by manual and video micrographic analysis. *Fert. Steril.*, 53:882, (1990). **5.** Imade GE. et al., Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler and Horwells counting chamber. *Arch Androl*; 31:17-22, (1993). **6.** Ponzio, P. et al., Termoresistenza del seme canino refrigerato con impiego di diversi diluitori. Atti IV Congresso Nazionale SIRA, 34-39, (2006). **7.** Mortimer, D. Semen Analysis, Practical laboratory andrology, 43-47 (1994). **8.** Rijsselaere, T. et al., Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, 60; 1553-1568 (2003).

SERTOLIOMA CON SINDROME FEMMINILIZZANTE E TORSIONE DEL FUNICOLO SPERMATICO IN DUE CANI CRIPTORCHIDI

SERTOLI CELL TUMOUR WITH FEMINISING SYNDROME AND TORSION OF SPERMATIC CORD IN TWO CRYPTORCHID DOGS

Quartuccio M., Garufi G., Barna A., ¹Di Pietro M., Marino G., Zanghì A., Cristarella S., *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Messina, ¹Canile di S. Lucia sopra Contesse (ME).*

Parole chiave: Cane, Criptorchidismo, Sertolioma, Sindrome Femminilizzante, Torsione del Funicolo Spermatico.

Key words: Dog, Cryptorchidism, Sertoli Cell Tumour, Feminising Syndrome, Spermatic Cord Torsion.

SUMMARY - Two dogs were admitted for bilateral skin alopecia and weight loss. Both dogs were cryptorchid and displayed pendulous preputial sheath, prostate hypertrophy and increased levels of circulating estrogens. Transabdominal palpation and ultrasonography revealed the presence of neoplastic retained gonads. At surgery, torsion of spermatic cord was also detected in the enlarged neoplastic testes. In both cases, histology confirmed the diagnosis of Sertoli cell tumour which was the primary responsible of the feminising syndrome. Complete remission of the symptoms occurred by few months after orchiectomy. The association of cryptorchidism, functional Sertoli cell tumour and torsion of spermatic cord has poorly been reported in literature.

INTRODUZIONE - Il criptorchidismo è un'anomalia testicolare, relativamente frequente nel cane, principalmente legata a cause genetiche¹. Tra le possibili complicanze del criptorchidismo, comune è lo sviluppo di neoplasie testicolari, in particolare sertoliomi e seminomi, che possono presentare persino un maggiore grado di malignità^{2,3}. Circa il 70% dei sertoliomi che si sviluppano in testicoli ritenuti inducono sindrome femminilizzante², caratterizzata da alopecia bilaterale simmetrica non pruriginosa e iperpigmentazione della cute dei fianchi e del tronco, ginecomastia, prepuzio edematoso e pendulo, prostatopatie, attrazione di altri maschi, atteggiamento femminile all'atto della minzione^{1,4,5,6}. Il testicolo ritenuto occasionalmente può subire una torsione del funicolo spermatico e ciò si verifica con maggiore frequenza con il progressivo aumento di volume dell'organo, in corso di neoplasia^{1,7,8}. La sintomatologia clinica può comprendere addome acuto, vomito, anoressia, letargia, disuria e rigidità degli arti posteriori. Il riscontro contemporaneo di tali patologie, nonostante siano strettamente connesse tra loro, è un evento poco documentato in letteratura^{7,9,10}.

CASO CLINICO 1 - Cane maschio, incrocio Pastore Tedesco di anni 7, ospitato da tre mesi presso il canile di S. Lucia sopra Contesse (ME), veniva portato alla nostra attenzione per alopecia diffusa, notevole stato di dimagrimento, postura femminile durante la minzione e assenza di entrambi i testicoli dallo scroto. All'esame clinico l'alopecia si presentava bilaterale non pruriginosa con ipercheratosi che, dalla regione inguinale, si estendeva all'addome ed al torace fino ad interessare la regione del collo. Alla palpazione addominale il soggetto presentava dolorabilità ed era possibile percepire, caudalmente, una grossa massa di consistenza dura. All'esame dell'apparato genitale entrambi i testicoli non erano palpabili, mentre il prepuzio appariva pendulo e la prostata uniformemente aumentata. L'esame ecografico rivelava, nel quadrante addominale caudale sx, la presenza di una grossa formazione, con struttura tipo "complex mass" delimitata da una capsula iperecogena; nel relativo quadrante dx si rinveniva una seconda formazione di dimensioni minori con ecogenicità più o meno

uniforme, riferibile a parenchima testicolare. La prostata, aumentata di volume (4,7 x 4,8 x 7,8 cm), presentava disomogeneità del parenchima e presenza di piccole aree anecogene riferibili a cisti. L'esame radiografico dell'addome confermava i reperti e, unitamente a quello toracico, non rivelava metastasi. L'esame emocromocitometrico evidenziava lieve anemia e leucocitosi (HCT: 25,7; HGB: 11,9; RBC: 4,37; WBC: 21,6); la valutazione endocrina mostrava un lieve incremento degli estrogeni [Progesterone (P₄)=0,39 ng/ml; 17-β estradiolo (E₂)=17,90 pg/ml; Testosterone (T)=0,66 ng/ml]. Con il sospetto di sertolioma in testicolo criptico, si praticava una laparotomia esplorativa con accesso parapenieno, che permetteva di visualizzare e rimuovere i testicoli, entrambi neoplastici. In particolare il testicolo sx, notevolmente aumentato di volume, presentava una torsione multipla del funicolo spermatico. Il trattamento post-operatorio prevedeva una copertura antinfiammatoria di 3 gg e antibiotica di 7 gg. All'esame macroscopico, il testicolo sx (10,5 x 6,5 x 5,5 cm) presentava notevole alterazione del profilo e aspetto bernoccolato; alla sezione appariva completamente sostituito da tessuto neoformato, in prevalenza di aspetto spugnoso. Il testicolo dx, moderatamente aumentato di volume (5 x 4 x 2,5 cm), aveva forma piramidale e alla sezione appariva quasi completamente sostituito da tessuto neoformato, organizzato in lobuli compatti di colorito giallastro. L'esame istopatologico confermava per entrambi i testicoli la presenza di un sertolioma, organizzato in *pattern* tubulare e a tratti pseudofollicolare. A distanza di un mese dall'intervento il soggetto presentava un notevole miglioramento della sintomatologia clinica e netta involuzione della prostata; i valori ematologici apparivano in ripresa ed il profilo endocrino ritornava a valori basali (P₄=0,14 ng/ml; E₂ e T non dosabili). La totale remissione della sintomatologia cutanea si otteneva al terzo mese.

CASO CLINICO 2 - Cane maschio, Rottweiler di anni 8, portato a visita per grave ematuria, dimagramento e apatia progressiva negli ultimi 5 mesi. All'esame clinico si osservava forte abbattimento del sensorio, alopecia bilaterale non pruriginosa a livello dei fianchi e delle cosce, prepuzio edematoso e pendulo ed una lieve ginecomastia. Le mucose esplorabili apparivano pallide. L'addome era estremamente sensibile alla palpazione; tuttavia era possibile percepire caudalmente la presenza di una massa di dimensioni superiori ad un mandarino. Lo scroto risultava disabitato; solo il testicolo sx, diminuito di volume e consistenza, era palpabile in prossimità dell'anello inguinale esterno. La prostata, alla palpazione, rivelava oltre che un notevole aumento di volume, anche algia. L'esame ecografico evidenziava nel quadrante addominale caudale dx, una formazione con ecogenicità irregolare tipo "*complex mass*". La prostata, notevolmente aumentata di volume (6,9 x 6,8 x 10,5 cm), presentava ecogenicità disomogenea per la presenza di formazioni cistiche a contenuto anecogeno (fino a 2,2 cm di diametro). L'esame emocromocitometrico rivelava una grave anemia e leucocitosi (HCT 24; HGB 8,1; RBC: 3,36; WBC 33,3); la valutazione endocrina mostrava una prevalenza degli estrogeni (P₄=1,32 ng/ml; E₂=23,05 pg/ml; T=0,20 ng/ml). Al fine di abbassare il rischio anestesilogico si effettuava un'emotrasfusione prima di intervenire chirurgicamente. Dopo aver rimosso il testicolo sx, si praticava una laparotomia sulla linea alba e, giunti in addome, si reperiva e si asportava il testicolo dx neoplastico, visibilmente aumentato di volume e con una duplice torsione del funicolo spermatico. Prima della chiusura della breccia operatoria si effettuava un'aspirazione del contenuto di una delle formazioni cistiche prostatiche. Il trattamento post-operatorio prevedeva una copertura antinfiammatoria di 3 gg e antibiotica di 7gg. Il testicolo sx (2,5 x 1,5 x 1 cm) era atrofico mentre il dx (4,5 x 3,5 x 2,7 cm) aveva forma tondeggiante e alla sezione era completamente sostituito da tessuto neoformato, di aspetto spugnoso e di colorito grigio-giallastro. L'esame istologico confermava la diagnosi di sertolioma caratterizzato da *pattern* pseudotubulare con elementi cellulari riccamente vacuolizzati e

con modesta atipia nucleare. La citologia del liquido della cisti prostatica rivelava quadri di metaplasia squamosa. La visita di controllo, effettuata a 4 settimane dall'intervento, mostrava un incremento ponderale di 4 kg, una ripresa dei parametri ematologici e un profilo endocrino a livelli basali. A distanza di 3 mesi si osservava una completa remissione della sintomatologia cutanea e la prostata presentava una notevole riduzione di volume (3,9 x 4,1 x 6 cm).

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI - I due casi descritti risultano simili per la consequenzialità degli eventi patologici riscontrati. In entrambi i casi la mancata discesa di un testicolo o di entrambi ha esitato nella formazione di un sertolioma ormonoattivo, come descritto in letteratura^{1,3}; la sindrome femminilizzante da esso derivata è alquanto caratteristica e spesso rappresenta l'unica manifestazione clinica della trasformazione neoplastica. Interessanti appaiono i reperti prostatici in corso di tale sindrome che includono vari gradi di ipertrofia e metaplasia squamosa, con formazione di cisti e relativa sintomatologia^{11,12}. Il dosaggio ormonale ha rilevato un incremento dei livelli di estrogeni, verosimilmente responsabili della mielodepressione e delle discrasie ematiche riscontrate⁹, che infatti si normalizzavano, nell'arco di qualche mese, dopo l'asportazione chirurgica della neoplasia. I testicoli ritenuti neoplastici sono maggiormente predisposti alla torsione testicolare che, se si realizza, rischia di acutizzare la sintomatologia clinica e rendere la prognosi infausta^{1,7,8}. Nei casi da noi osservati la torsione del funicolo spermatico non aveva determinato fenomeni congestivi e necrotici tali da influenzare la sintomatologia e mettere a rischio la vita del paziente. I casi presentati enfatizzano quanto importante sia il monitoraggio dei soggetti criptorchidi, in relazione alle possibili complicanze che nel tempo possono insorgere, al fine di una corretta valutazione dei rischi/benefici dell'asportazione chirurgica delle gonadi ritenute¹³.

BIBLIOGRAFIA – 1. Feldman, E.C., Nelson, R.W., *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, W.B. Saunders Co. Philadelphia (1996). 2. Reif, J.S., Brodey, R.S., The relationship between cryptorchidism and canine testicular neoplasia. *J Am Vet Med Assoc*, 155, 2005-2010, (1969). 3. Hayes, H.M., Wilson, G.P., Pendergrass, T.W., Cox, V.S., Canine cryptorchidism and subsequent testicular neoplasia: case-control study with epidemiologic update. *Teratology*, 32, 51-56, (1985). 4. Heidbrink, U., Kaup, F.J. Sertoli cell tumour with feminization syndrome in a German longhaired male dog. Case report. *Kleinterpraxis*, 35, 661-665, (1990). 5. Lanore, D., Pechereau, D., Martel P., Hormone-secreting metastasis of a Sertoli cell tumour. *Prat Med Chir Anim Comp*, 27, 727-730, (1992). 6. Metzger, F.L., Hattel, A.L., White, D.G., Hematuria, hyperestrogenemia and hyperprogesteronemia due to a Sertoli cell tumor in a bilaterally cryptorchid dog. *Canine Pract*, 18, 32-35, (1993). 7. Pearson, H., Kelly, D.F., Testicular torsion in the dog: a review of 13 cases. *Vet Rec*, 97, 200-204, (1975). 8. Miyabayashi, T., Biller, D.S., Cooley, A.J., Ultrasonographic appearance of torsion of a testicular seminoma in a cryptorchid dog. *J Small Anim Pract*, 31, 401-403, (1990). 9. Laing, E.J., Harari, J., Smith, C.V., Spermatic cord torsion and Sertoli cell tumor in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 183, 879-881, (1983). 10. Mozzanti, A., Kaiser, A.G., Pippi, N.L., Stigger, A.L., Sanches, A.W.D., Leotte, A., Sertolioma em um cão associado a criptorquidia bilateral e torção testicular. www.redevet.com.br/artigos/cripto1.htm, (2001). 11. Spackman, C.J.A., Roth, L., Prostatic cyst and concurrent Sertoli cell tumor in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 192, 1896-1898, (1988). 12. Gill, C.W., Prostatic adenocarcinoma with concurrent Sertoli cell tumor in a dog. *Can Vet J*, 22, 230-233, (1981). 13. Peters, M.A.J., Van Sluijs, F.J., Decision analysis tree for deciding whether to remove an undescended testis from a young dog. *Vet Rec*, 150, 408-411, (2002).

SOMMINISTRAZIONE QUINDICINALE DELLA VINCRISTINA PER IL TRATTAMENTO DEL TUMORE VENEREO TRASMISSIBILE DEL CANE

TWO-WEEKLY REGIMEN OF VINCRISTINE TREATMENT IN DOGS WITH TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOUR

Marino G., Barna A., Quartuccio M., Cristarella S., Ajello A., Zanghì A.,
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Messina.

Parole chiave: Cane, Tumore Venereo Trasmissibile, Vincristina
Key words: Dog, Transmissible Venereal Tumour, Vincristine

SUMMARY - This study aimed to evaluate a new, 2-weekly, vincristine treatment in comparison to the traditional weekly protocol for canine transmissible venereal tumours (CTVT). 30 CTVT affected dogs were divided into three groups: 10 dogs in the control group A were treated weekly with 0,025 mg/Kg iv of vincristine, 10 dogs in each of the experimental groups B and C were treated at 2-week intervals. Groups A and B were monitored daily for side effects and haematological parameters. Group C included dogs for which weekly treatment and monitoring were difficult for problems regarding management and temperament. Therapy was suspended when neoplastic cells were no longer found in smears. In group A, the complete remission of CTVT was obtained with $3,6 \pm 0,7$ administrations; in groups B and C with $2,2 \pm 0,3$ administrations. Only mild side effects were observed with no difference among the groups. A 2-weekly vincristine regimen could be an alternative to elective treatment for CTVT. It can be successfully applied in animals in which weekly therapy is impractical, allowing a remission with fewer chemotherapy sessions and advantages for both owners and animals.

INTRODUZIONE - Il tumore venereo trasmissibile del cane (CTVT) rappresenta l'unico esempio di neoplasia trasmissibile mediante trapianto allogenico di cellule neoplastiche¹. Dopo una fase di proliferazione, la cui durata è stata calcolata sperimentalmente in circa 6 mesi, le cellule neoplastiche, per meccanismi non del tutto chiariti, si espongono all'immunità umorale e cellulo-mediata dell'ospite^{2,3}. La crescita del tumore viene così arrestata e nel 19-60% dei casi si ha regressione spontanea, che conferisce tra l'altro immunità alle reinfezioni¹. La sintomatologia clinica, il rischio di metastasi, la contagiosità spingono tuttavia il veterinario a trattare precocemente il CTVT farmacologicamente e/o chirurgicamente. Il trattamento chirurgico da solo non è ottimale a causa dell'elevata percentuale (fino al 68%) di recidive⁴. Il protocollo chemioterapico più accreditato prevede invece la vincristina (0,025mg/Kg ev settimanale), somministrata fino alla scomparsa del tumore^{5,6}, valutata preferibilmente attraverso la citologia esfoliativa^{7,8}. L'efficacia del trattamento è dell'84-90%, la prevalenza delle recrudescenze si assesta a circa il 5%^{5,6,8} e gli animali tendono ad essere immuni alle reinfezioni, come nella regressione spontanea^{1,2}. Questi aspetti sembrano indicare un'azione sinergica del chemioterapico con il sistema immunitario, nell'innescare la regressione del tumore, che forse avverrebbe anche dopo "modesta chemioterapia"⁹. Se questa ipotesi è corretta, una somministrazione più dilazionata della vincristina dovrebbe favorire o comunque non ostacolare la risposta immunitaria nei confronti del tumore.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato realizzato su 30 cani, in prevalenza meticci, randagi o di proprietà, affetti da CTVT. I pazienti venivano suddivisi in tre gruppi di 10 unità: gruppo A (controllo), costituito da 5 femmine e 5 maschi, con età compresa tra 2 e 7 anni (media 3,6); gruppo B (sperimentale), costituito 9 femmine e 1 maschio, con età compresa tra 1 e 9 anni (media 3,8); gruppo C (sperimentale), costituito 6 femmine e 4 maschi, con età compresa tra 2 e 4 anni (media 3,3). Un

preliminare *screening* clinico rivelava la prevalenza di parassitosi come pulicosi, in qualche caso responsabile di grave dermatite (B5), leishmaniosi (A5, A6, A7, A9, B1, B5, C1, C6, C8, C9) e rogna sarcoptica (A8). L'erlichiosi veniva diagnosticata in tre casi (A6, A9, C8), una piodermite in 1 caso (A4). L'esame emocromocitometrico permetteva di rilevare le seguenti anomalie: lieve anemia (A3, A8, A9, C7, C8, C9, C10), policitemia (B2), leucocitosi (A2, A3, A4, A6, A7, B3, B4, B10, C5, C6, C8), eosinofilia (B1), basofilia (B2), piastrinopenia (A6), piastrinosi (A4, B3, B4). Nelle femmine il CTVT veniva diagnosticato tramite citologia esfoliativa in sede vulvare in 1 caso (B10), vulvare e vaginale in 3 casi (B2, B4, C8), vestibolo-vaginale nei rimanenti. Nei maschi la sede preferenziale era il glande in 8 casi (A2, A3, A5, A10, B6, C3, C4, C7), il prepuzio in 1 caso (A7), entrambe le sedi in 1 caso (C9). Metastasi a linfonodi e mammelle inguinali si osservavano in 2 casi (B2, B4), alla cute in 1 caso (C9). Il tumore veniva considerato piccolo (<1 cm) in 8 soggetti (A1, A3, A10, B1, B6, C1, C7, C10), medio (1-3 cm) in 16 soggetti (A2, A4, A6, A7, A8, A9, B2, B5; B7, B8, B9, B10, C2, C4, C5, C6), grande (>3 cm) in 6 soggetti (A5, B2, B4, C3, C8, C9). Il CTVT, valutato citologicamente, risultava essere nettamente in fase proliferativa in 8 casi (A1, A2, A3, A10, B2, B4, C1, C9), in fase di stasi nei restanti. Veniva applicato il seguente protocollo chemioterapico: gruppo A, vincristina 0,025mg/Kg ev settimanale; gruppo B e C vincristina 0,025mg/Kg ev quindicinale. Durante la terapia, per i gruppi A e B, venivano registrati giornalmente eventuali effetti collaterali, gastroenterici e neurologici; ogni 2-3 giorni, attraverso citologia esfoliativa del tumore, venivano monitorate le modificazioni citologiche indotte dalla vincristina e con prelievi ematici, veniva valutato l'andamento dell'emocromo e dei parametri epatici. Il gruppo C comprendeva cani difficilmente gestibili per svariati motivi (distanza, indole, etc.) che venivano monitorati, giornalmente per eventuali effetti collaterali e ogni 15 giorni, in coincidenza con la somministrazione del chemioterapico, attraverso citologia esfoliativa, valutazione dell'emocromo e dei parametri epatici. La terapia veniva sospesa una volta accertata, al controllo, l'assenza di cellule neoplastiche dai preparati citologici. Il *follow-up* veniva eseguito con cadenza mensile per un periodo variabile, da soggetto a soggetto, da 1 mese a 2 anni.

RISULTATI - Dopo la prima somministrazione il CTVT cominciava a ridursi drasticamente, diminuendo di un 30-50% del volume iniziale già dopo una settimana. Successivamente la riduzione proseguiva più gradualmente fino alla formazione di un nodulo (0,1-2 cm) di tessuto di granulazione. Parallelamente, la citologia (gruppi A e B) accertava l'invasione del tumore da parte di linfociti, granulociti neutrofili, plasmacellule, macrofagi e mastcellule. Le cellule neoplastiche mostravano segni progressivi di degenerazione, come arresto dell'attività mitotica, vacuolizzazione citoplasmatica, frammentazione, perdita dei contorni nucleari e nucleolari. Il tumore regrediva dopo 1 somministrazione in 5 casi (B1, B7, C1, C4, C5), 2 somministrazioni in 11 casi (A3, A4, B2, B3, B6, B8, B10, C2, C3, C7, C8), 3 in 5 casi (A8, A10, B8, C9, C10), 4 in 6 casi (A1, A2, A7, B4, B5, B6), 5 in 2 casi (A5, A6). Nel soggetto A9, nonostante una notevole riduzione (<1 cm), il tumore persisteva dopo 7 somministrazioni e veniva asportato chirurgicamente. In media la regressione è stata ottenuta con $3,6 \pm 0,7$ somministrazioni nel gruppo controllo (escluso A9) e $2,2 \pm 0,3$ nei gruppi sperimentali (B, C) ($P < 0,16$), mentre la durata del trattamento è risultata rispettivamente 28 ± 6 e 31 ± 6 giorni. Il chemioterapico è stato sempre ben tollerato dai pazienti, in cui solo lievi e transitori disturbi gastrointestinali (disoressia, vomito, diarrea, dimagrimento) venivano osservati in 6 casi (A5, A6, A7, A8, A10, B4, B5). La valutazione dell'emocromo durante la terapia consentiva di individuare tendenze più o meno marcate di: eritropenia (A8, B5, B7, C6, C7), emoglobinemia (A8, B5, C6, C7, C8), piastrinopenia (A5, A8, C6, C7, C8), neutropenia (A10), linfocitosi (B4, A10). Il

profilo epatico rivelava un lieve innalzamento degli enzimi in 3 casi (A2, A9, C6). Si trattava comunque di effetti transitori che si ristabilivano entro un mese dall'ultima somministrazione del chemioterapico. Il *follow-up* rinveniva una recidiva dopo 4 mesi nel soggetto B8, che veniva trattato farmacologicamente con successo una seconda volta. Un'altra recidiva è stata rinvenuta dopo 8 mesi nel soggetto B5, gravemente affetto da leishmaniosi, che di fatto decedeva 2 mesi dopo.

DISCUSSIONI - I risultati di questa ricerca evidenziano come le interazioni del CTVT col sistema immunitario dell'ospite possono avere interessanti risvolti epidemiologici, clinici e terapeutici. Lo *screening* clinico, effettuato preliminarmente, ha evidenziato, come già segnalato in precedenza¹⁰, che il CTVT, nell'area messinese, si rinviene prevalentemente in cani randagi e con sistema immunitario compromesso, anche per la copresenza di malattie parassitarie e infettive. In tali soggetti la regressione spontanea e persino quella farmaco-indotta potrebbe essere ostacolata. Nonostante ciò, le percentuali di efficacia e di recidive ottenute nei gruppi controllo e sperimentale non si discostano da quelle documentate in letteratura^{5,6,8}. La prima somministrazione svolgerebbe un ruolo fondamentale, come già rilevato da altri AA⁵, contribuendo in maniera determinante alla regressione del tumore, comunque garantita dalle successive somministrazioni che ostacolano qualsiasi ripresa proliferativa. L'azione antiblastica del chemioterapico sembra essere coadiuvata dall'attività delle cellule immunitarie che accorrono in gran numero con quadri citologici sovrapponibili a quelli della regressione spontanea⁹. Una volta innescato questo processo sembra procedere anche senza l'apporto puntuale del chemioterapico. È importante sottolineare che il numero di somministrazioni necessarie per la remissione completa del tumore si assesta al valore di 2,2 nei gruppi sperimentali, mentre sale a 3,6 nel gruppo controllo, quest'ultimo in linea ai valori della letteratura di 3,3⁵ e 3,5⁶. Se il chemioterapico viene somministrato in maniera più dilazionata è facile aspettarsi una riduzione degli effetti collaterali, in verità non particolarmente rilevanti anche con il trattamento classico. In conclusione, il CTVT può essere curato in maniera alternativa o persino elettiva con somministrazioni di vincristina (0,025mg/Kg ev) ogni 15 giorni. Questo protocollo può essere applicato a cani difficilmente gestibili con protocolli rigidi settimanali, tra cui molti randagi, che sono ancora oggi i più importanti serbatoi naturali del CTVT.

BIBLIOGRAFIA - **1.** Cohen, D., The canine transmissible venereal tumour: a unique result of tumor progression. *Adv. Cancer Res.*, 43, 75-112, (1985). **2.** Yang, T.J., Chandler, J.P., Dunne-Anway, S., Growth stage dependent expression of MHC antigens on the canine transmissible venereal sarcoma. *Br J Cancer*, 55, 131-134, (1987). **3.** Hsiao, et al., Effect of tumor infiltrating lymphocytes on the expression of MHC molecules in canine transmissible venereal tumor cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 87, 19-27, (2002). **4.** Das, U., Das, A.K., Review of canine transmissible venereal sarcoma. *Vet Res Commun*, 24, 545-556, (2000). **5.** Calvert, C.A., Leifer, C.E., MacEwen, E.G., Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. *J Am Vet Med Assoc*, 181, 163-164, (1982). **6.** Nak, D., Nak, Y., Cangul, I.T., Tuna, B., A clinicopathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 52, 366-370, (2005). **7.** Erunal-Maral, N., Findik, M., Aslan, S., Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 107, 175-180, (2000). **8.** Amber, E.I., Henderson, R.A., Adeyanju, J.B., Gyang, E.O., Single-drug chemotherapy of canine transmissible venereal tumor with cyclophosphamide, methotrexate, or vincristine. *J Vet Intern Med*, 4, 144-147, (1990). **9.** Gonzalez, C.M., Griffey, S.M., Naydan, D.K., Flores, E., Cepeda, R., Cattaneo, G., Madewell, B.R. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. *J Comp Pathol*, 122, 241-248, (2000). **10.** Marino, G., Catone, G., Cristarella, S., Poglayen, G., Zanghi, A., Tumore venereo trasmissibile e leishmaniosi nel cane: patologie endemiche associate. *Atti SIRA*, 1, 46-48, (2003).

**INFLUENZA DEL DILUITORE E DELLA TEMPERATURA SULLA
CONSERVAZIONE A BREVE TERMINE DELLO SPERMA DI GATTO**
INFLUENCE OF EXTENDER AND TEMPERATURE ON SHORT-TERM
PRESERVATION OF CAT SEMEN

Zambelli D., Cunto M., Merlo B., *Dipartimento Clinico Veterinario, Sezione
Ostetrico-Ginecologica, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna*

Parole Chiave: Gatto, Sperma, Refrigerazione, Temperatura, Diluitore

Key Words: Cat, Sperm, Chilling, Temperature, Extender

SUMMARY - Pooled semen from 8 electroejaculated domestic cats was stored at 5, 18 or 30°C for 48 h after dilution in saline, M 199, egg-yolk lactose, egg-yolk Tris or egg-yolk BF5. Motility, acrosome status and viability were evaluated. The results showed that 5°C is the best temperature for short term spermatozoa preservation and egg-yolk Tris and egg-yolk BF5 are the most suitable extenders for cat semen.

INTRODUZIONE - Nonostante i recenti successi nella riproduzione assistita nel gatto domestico e il crescente interesse degli allevatori, l'utilizzo di tali procedure nella pratica veterinaria risulta ancora non routinario¹. La conservazione a breve termine dello sperma di gatto può facilitare lo scambio di materiale genetico agevolando il trasporto dello stesso. L'applicazione di protocolli per la conservazione a breve termine del seme è stata ampiamente documentata con buoni risultati nel cane², testando numerose procedure di raffreddamento, temperature e diluitori^{2,5}. Scarsa è la letteratura che affronta questo argomento nel gatto domestico^{6,9} e talvolta i risultati ottenuti si dimostrano insoddisfacenti a causa dell'applicazione di procedure formulate per altre specie⁵. La temperatura interviene nel processo di conservazione del seme modificando il metabolismo dei gameti stessi, mentre si suppone che il diluitore protegga lo spermatozoo conservando la motilità e la fertilità mediante la stabilizzazione della membrana cellulare, fornendo substrati energetici e prevenendo gli effetti indesiderati causati da modificazioni del pH o dell'osmolarità. Lo scopo di questo lavoro è di individuare quali siano, tra quelli testati, il diluitore e la temperatura che consentono di ottenere la migliore conservazione a breve termine dello sperma di gatto.

MATERIALI E METODI - La ricerca è stata svolta utilizzando un pool di spermatozoi ottenuti mediante elettroeiaculazione da 8 gatti di razza europea, di età compresa tra i 2 e i 7 anni, sottoposti ad anestesia mediante ketamina e medetomidina. Sono stati testati 5 diluitori⁶ (soluzione fisiologica, M199, Lattosio-uovo, Tris-uovo, BF5-uovo) e 3 temperature di conservazione (5°C, 18°C, 30°C). Dopo la raccolta, il pool, mantenuto ad una temperatura costante di 30°C, è stato suddiviso in 15 parti assegnate a 3 gruppi da 5 campioni ciascuno. I 5 campioni appartenenti a ciascun gruppo sono stati diluiti utilizzando uno dei 5 diluitori sopra menzionati e quindi conservati ad una delle temperature previste per 48 h. Subito dopo l'allestimento del pool, sono state rilevate motilità (%), vitalità (% spermatozoi vivi - colorazione eosina-nigrosina) e % di spermatozoi con acrosomi intatti (colorazione Fast green FCF - Rosa bengala). Per ogni campione, la motilità è stata valutata ogni 3 h per le prime 24 h e poi ogni 6 h fino a 48 h, mentre la vitalità e la % di spermatozoi con acrosomi intatti sono state valutate dopo 0, 24 e 48 h dall'aggiunta del diluitore. Le valutazioni microscopiche sono state eseguite utilizzando un microscopio a contrasto di fase a 100 X dotato di tavolino riscaldante (motilità) ed un microscopio ottico a 400x (vitalità) o a 1000x (spermatozoi con acrosomi intatti). I risultati ottenuti sono stati elaborati statisticamente

mediante ANOVA (Statistica for Windows). La significatività è stata considerata per $p < 0,05$.

RISULTATI - La motilità, la vitalità e gli spermatozoi con acrosoma intatto nel pool prima della diluizione erano rispettivamente 80%, 87% e 90%.

L'analisi statistica dei dati ha permesso di osservare che la temperatura, indipendentemente dal diluente, influenza la motilità del materiale seminale; infatti, dopo 12 h di conservazione, la motilità del seme conservato a 30°C è risultata inferiore ($p < 0,05$) a quella osservata negli altri 2 gruppi. A 24 h di conservazione la motilità è risultata migliore per il seme conservato a 5°C ($p < 0,05$) rispetto agli altri 2 gruppi e a 18°C rispetto a 30°C ($p < 0,05$). Dopo 48 h, le migliori percentuali di motilità si sono osservate nei campioni conservati a 5°C. Analizzando l'influenza del diluente sulla motilità del seme (Tab. 1), è apparso evidente che le diluizioni con M 199 a 18°C e 30°C e con lattosio-uovo a 30°C hanno prodotto risultati peggiori ($p < 0,05$). Dopo 24 h, le migliori percentuali di motilità sono state osservate in campioni diluiti con Tris-uovo e BF5-uovo e mantenuti a 5°C ($p < 0,05$). Gli stessi diluenti, dopo 48 h di conservazione a 5°C, hanno permesso di ottenere risultati superiori a quelli osservati in tutti gli altri gruppi ($p < 0,05$), nei quali le percentuali di motilità rilevate erano pari o prossime a 0.

Tab. 1 - Valutazione della motilità (media \pm ds) di materiale seminale di gatto a 12, 24 e 48 ore di conservazione a 5, 18 o 30°C in cinque diversi diluitori.

Temp (°C)	Diluente	Mot tot 12 h (%)	Mot tot 24 h (%)	Mot tot 48 h (%)
5	Fisiologica	73,8 \pm 9,5 ^a	45,0 \pm 12,9 ^b	5,0 \pm 10,0 ^b
	M 199	48,8 \pm 22,5 ^{a,b}	5,0 \pm 7,1 ^c	0,0 \pm 0,0 ^b
	Lattosio-uovo	72,5 \pm 2,9 ^a	52,5 \pm 13,2 ^{a,b}	6,3 \pm 9,5 ^b
	Tris-uovo	75,0 \pm 4,1 ^a	66,3 \pm 4,8 ^a	45,0 \pm 12,9 ^a
	BF5-uovo	75,0 \pm 4,1 ^a	65,0 \pm 4,1 ^a	40,0 \pm 14,1 ^a
18	Fisiologica	73,8 \pm 7,5 ^a	43,8 \pm 17,0 ^b	0,0 \pm 0,0 ^b
	M 199	40,0 \pm 27,4 ^b	3,5 \pm 4,4 ^c	0,0 \pm 0,0 ^b
	Lattosio-uovo	70,0 \pm 7,1 ^a	27,5 \pm 22,2 ^b	0,0 \pm 0,0 ^b
	Tris-uovo	73,8 \pm 7,5 ^a	41,3 \pm 15,5 ^b	6,3 \pm 4,8 ^b
	BF5-uovo	75,0 \pm 5,8 ^a	42,5 \pm 15,5 ^b	5,0 \pm 4,1 ^b
30	Fisiologica	50,0 \pm 29,4 ^{a,b}	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^b
	M 199	30,0 \pm 35,6 ^b	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^b
	Lattosio-uovo	37,5 \pm 31,2 ^b	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^b
	Tris-uovo	45,0 \pm 30,8 ^{a,b}	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^b
	BF5-uovo	46,3 \pm 31,2 ^{a,b}	0,0 \pm 0,0 ^c	0,0 \pm 0,0 ^b

(a,b,c) $p < 0,05$

La valutazione della vitalità e della percentuale di acrosomi intatti nei diversi campioni non ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'arco delle 48 h. Al termine della prova, è stata comunque osservata la presenza di spermatozoi vivi solo nei 2 campioni diluiti con Tris-uovo (vitalità=81%) e BF5-uovo (vitalità=28%) e conservati a 5°C 48 ore di conservazione a 5, 18 o 30°C in cinque diversi diluitori Tab. 2).

DISCUSSIONE - In questo lavoro è stata valutata l'influenza della temperatura e del diluente sulla qualità dello sperma di gatto conservato a breve termine. I dati raccolti evidenziano che, in termini di motilità, i risultati migliori si ottengono in campioni diluiti con Tris-uovo o BF5-uovo ad una temperatura di 5°C. Sebbene al termine della prova non siano mai state osservate differenze significative nella valutazione della vitalità del seme, solo in campioni conservati a 5°C e diluiti con Tris-uovo e BF5-uovo è stato possibile rilevare la presenza di spermatozoi vivi anche dopo 48 h. L'assenza di una diminuzione statisticamente evidente della percentuale di spermatozoi con acrosoma intatto può essere spiegata dal fatto che il danno acrosomale è attribuibile in

massima parte allo shock subito in seguito a raffreddamento rapido,^{10,11} non indotto in questo lavoro.

I diluitori base Tris e BF5 sono stati quelli più appropriati per la conservazione del seme, in quanto contenenti i substrati energetici e i tamponi più idonei per gli spermatozoi rispetto alla semplice soluzione fisiologica e a quella di lattosio o al medium complesso M 199, normalmente utilizzato per la coltura cellulare in presenza di elevate concentrazioni CO₂. Inoltre l'aggiunta di uovo può essere stata determinante nella migliore conservazione degli spermatozoi a 5°C.

Sebbene siano necessari ulteriori studi che valutino le capacità fertilizzanti del seme di gatto refrigerato, i risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano la possibilità di conservazione dello stesso per 24 h mantenendo buoni valori di motilità, vitalità ed integrità acrosomale. La conservazione fino a 48 h appare possibile ai fini di un impiego del materiale seminale per l'IA intrauterina o per l'IVF.

Tab. 2 - Percentuale di vitalità e di acrosomi intatti di materiale seminale di gatto a 0, 24 e 48 ore di conservazione a 5, 18 o 30°C in cinque diversi diluitori.

Temp (°C)	Diluitore	0 h		24 h		48 h	
		Acr. Norm. (%)	Vitalità (%)	Acr. Norm. (%)	Vitalità (%)	Acr. Norm. (%)	Vitalità (%)
5	Fisiologica	90	87	85	53	80	0
	M 199	89	87	87	15	82	0
	Lattosio-uovo	85	80	80	61	78	0
	Tris-uovo	92	87	85	69	80	81
	BF5-uovo	89	87	86	71	81	28
18	Fisiologica	90	87	85	52	78	0
	M 199	89	87	88	10	81	0
	Lattosio-uovo	85	80	80	31	75	0
	Tris-uovo	92	87	84	43	80	0
	BF5-uovo	89	87	84	48	80	0
30	Fisiologica	90	87	80	0	69	0
	M 199	89	87	82	0	70	0
	Lattosio-uovo	85	80	79	0	70	0
	Tris-uovo	92	87	80	0	71	0
	BF5-uovo	89	87	80	0	69	0

BIBLIOGRAFIA - 1. Zambelli, D., Cunto, M., Transcervical artificial insemination in the cat. *Theriogenology*, 64 (3), 698-705, (2005). 2. Goodman, M.F., Cain, J.L., Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. *J Reprod Fertil*, (47), 554, (1993). 3. Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C., Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, (44), 885-900, (1995). 4. Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D., Youngquist, R.S., Effects of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, (34), 147-157, (1990). 5. Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M., Log-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extenders: In vitro and un vivo studies. *Theriogenology*, (64), 720-733, (2005). 6. Zambelli D., Tesi di dottorato di ricerca, Università degli Studi di Perugia, VII ciclo (1991-1994). 7. Harris, R.F., Pope, C.E., Gomez, M.C., Leibo, S.P., Dresser, B.L., Storage of domestic cat spermatozoa fo extended periods at 4°C. *Theriogenology*, (55), 308, (2001). 8. Tittarelli, C., Savignone, C.A., Arnaudin, E., Stornelli, M.C., Stornelli, M.A., de la Sota, R.L., Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, (66), 1637-1640, (2006). 9. Villaverde, A.I., Martins, M.I., Castro, V.B., Lopes, M.D., Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology*, (66), 1641-1644, (2006). 10. Pukazhenth, B., Pelican, K., Wildt, D., Howard, J., Sensitivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. *Biol. Reprod.*, (61), 135-141, (1999). 11. Zambelli, D., Caneppele, B., Castagnetti, C., Belluzzi, S., Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim*, (37), 310-313, (2002).

**OVULAZIONE INDOTTA NELLA GATTA MEDIANTE
SOMMINISTRAZIONE INTRANASALE DI GnRH**
INDUCTION OF OVULATION BY INTRANASAL ADMINISTRATION OF GnRH
IN THE QUEEN

De Sandro Salvati A., Aiudi G., ¹Cinone M., *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari; ¹Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università degli Studi del Molise.*

Parole chiave: Gatta, GnRH, Organo Vomero Nasale, Ovulazione, Pseudociesi
Key words: Queen, GnRH, Vomeronasal Organ, Ovulation, Pseudopregnancy

SUMMARY - In queen ovulation can be induced by parenteral administration of GnRH-analogues. Nasal administration induces a rapid high drug concentration, ensuring rapid absorption and onset of therapeutic action. The aim of our clinical trial was to evaluate effectiveness of intranasal GnRH to induce ovulation in estrous queens. Sixteen estrous queens were randomly divided in two groups: A) 8 queens treated twice with Buserelin every 12 h. B) 8 queens treated with saline solution. Each queen was monitored for estrous behaviour, vaginal cytology and blood progesterone concentration. In 7/8 queens of group A, estrous disappeared within 1-2 days, while control subjects were still in heat. Intranasal administration of GnRH-analogues effectively stimulated LH release, resulting in drug-induced ovulations and pseudopregnancy.

INTRODUZIONE - Nelle gatte la possibilità d'indurre l'ovulazione con conseguente interruzione delle manifestazioni estrali ha sempre destato grande interesse. Appare tuttavia evidente la necessità di disporre di un metodo che, in alternativa all'uso dei progestinici somministrati per via sistemica¹, possa essere utilizzato anche per periodi di tempo prolungati, privo di effetti collaterali e facile da somministrare. Numerosi studi condotti sia in vitro che in vivo su ratti, cavie, suini, conigli, pecore e cani, hanno dimostrato come la via nasale possa essere una valida alternativa per la somministrazione di farmaci², in grado di garantire una maggiore biodisponibilità del principio attivo³ riducendone i dosaggi. Questa via di somministrazione consente un assorbimento immediato e diretto nel torrente ematico e a livello del sistema nervoso centrale, diminuendo i meccanismi di degradazione enzimatica a cui vanno incontro i farmaci somministrati per via parenterale⁴. Inoltre, è stato dimostrato nel criceto che la stimolazione dell'organo vomeronasale, induce l'attivazione di meccanismi chemiosensoriali simili a quelli osservati durante l'accoppiamento, ciò conferma che esiste una correlazione tra la stimolazione del bulbo olfattorio, mediata dall'innervazione vomeronasale, e l'attivazione dell'area preottica ipotalamica⁵. Nello stesso studio è stato dimostrato come tali stimolazioni, nel maschio, inducano un incremento dei livelli di LH e testosterone⁵; effetti simili potrebbero essere evocati con la somministrazione di GnRH esogeno utilizzando gli stessi circuiti. Obiettivo del presente lavoro è definire un nuovo protocollo per l'interruzione delle manifestazioni estrali nelle gatte, inducendo l'ovulazione mediante somministrazione per via nasale di un GnRH analogo, il Buserelin, utilizzato nella terapia del carcinoma prostatico in medicina umana.

MATERIALI E METODI - La sperimentazione è stata condotta su 16 gatte con manifestazioni estrali, portate a visita ambulatoriale presso la sezione di Clinica Ostetrica dell'Ospedale Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bari, per la soppressione del calore, nell'anno 2006. I soggetti esaminati erano di età compresa tra

1-5 anni, di peso variabile (2,5-4 kg) e appartenenti a diverse razze: 3 Persiani, 11 Europei e 2 Siamesi. Tutte le gatte sono state monitorate durante il calore e trattate in presenza di una fase estrale comprovata da segni clinici, comportamentali e da rilievi colpocitologici (60% cellule superficiali, 40% corneificate, con l'80% di trasparenza del fondo del vetrino). Le gatte sono state suddivise in due gruppi: Gruppo A (sperimentale, N=8) e Gruppo B (controllo, N=8). I soggetti del Gruppo A sono stati trattati con 0,1 mg/ml di Buserelin (Suprefact nasale[®], Aventis Pharma S.p.A. Milano, Italia) somministrato mediante contagocce nella narice, per 2 volte a distanza di 12h. Le gatte del Gruppo B sono state trattate con 0,1 ml di soluzione fisiologica somministrata con le stesse modalità dei soggetti del Gruppo A. Nei due mesi successivi al trattamento, in tutte le gatte sono state effettuati prelievi ematici ogni 7 giorni per il dosaggio del progesterone (Progesterone Kit ELISA[®], IBL, Germania). Due soggetti del Gruppo A sono stati sottoposti, su richiesta del proprietario, ad intervento di ovarioisterectomia 25 giorni dopo la somministrazione di Buserelin ed in tale sede si è valutata la presenza dei corpi lutei confermata dall'esame istologico. I dati relativi alla durata dell'estro dei soggetti del Gruppo A e B sono stati sottoposti ad analisi statistica con *t* di Student.

RISULTATI - La somministrazione del GnRH analogo per via endonasale si è rivelata di facile esecuzione e non ha mostrato alcun effetto collaterale, incluse ipersensibilità locale o reazioni allergiche sistemiche. Sette gatte appartenenti al Gruppo A hanno sospeso le manifestazioni estrali dopo 1-2 giorni dall'inizio del trattamento presentando una fase estrale di $5,1 \pm 1,1$ giorni, ed una gatta ha avuto la remissione spontanea dell'estro dopo 4 giorni dal trattamento, con una fase interestrile della durata di 13 giorni. In questi soggetti si è ottenuto un incremento dei livelli plasmatici del progesterone ($21 \pm 4,7$ ng/ml) fino al 25° giorno dopo il trattamento (Graf. 1). In seguito le concentrazioni di P4 sono progressivamente diminuite con un andamento variabile nei diversi soggetti. Le due gatte ovarioisterectomizzate hanno presentato evidenti corpi lutei su entrambe le ovaie a conferma dell'avvenuta ovulazione. La durata della pseudociesti è stata di $42 \pm 7,1$ giorni e dopo $8,8 \pm 0,9$ giorni dalla fine della pseudociesti, 4/5 soggetti hanno manifestato l'estro ed una sola gatta un periodo anestrile terminato dopo 126 giorni. In due soggetti del gruppo A, all'estro successivo è stato nuovamente effettuato il trattamento d'interruzione delle manifestazioni estrali ottenendo una pseudociesti di $50,5 \pm 3,5$ giorni. Le gatte del Gruppo B hanno continuato a mostrare i segni tipici dell'estro completando la fase estrale in $8,9 \pm 1,9$ giorni con una fase interestrile di $11 \pm 2,3$ giorni. Il confronto statistico relativo alla durata dell'estro delle gatte del Gruppo A e B ha mostrato differenze altamente significative (A vs B: $p < 0,001$).

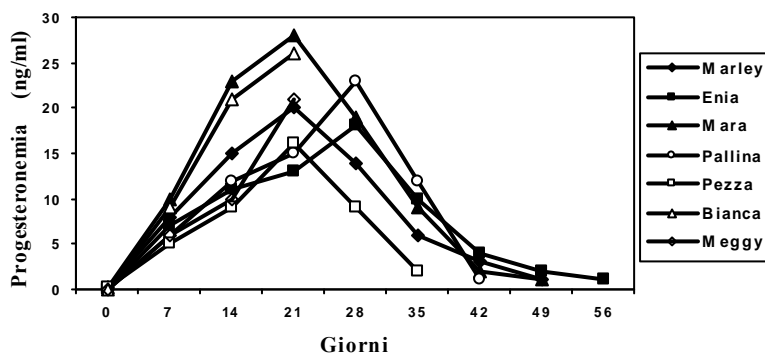


Grafico 1 - Gruppo A, Concentrazioni plasmatiche del progesterone in gatte in estro dopo somministrazione endonasale di Buserelin.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE - L'elevata vascolarizzazione dell'epitelio nasale ha permesso un rapido assorbimento del Buserelin per unità di superficie (cm²) e determinato in breve tempo l'inizio dell'azione terapeutica. La terapia endonasale esclude il rischio di sopradosaggio in quanto, le particelle idrosolubili a contatto dello strato mucoso sono solubilizzate ed il GnRH in eccesso è deglutito. Molecole peptidiche idrofile somministrate per via endonasale sono rapidamente assorbite dalla mucosa nasale con un'emivita di 5-20 min⁶. La somministrazione endonasale del Buserelin durante la fase estrale ha determinato la sospensione delle manifestazioni estrali della gatta con conseguente avvio della pseudociesti. L'ulteriore conferma dell'avvenuta ovulazione è stato l'incremento dei tassi plasmatici del progesterone e la presenza di evidenti corpi lutei in due gatte del gruppo A. Questi risultati consentono di affermare che nella gatta il Buserelin, alla dose di 0,1 mg/bid per via endonasale, è in grado di stimolare il rilascio di LH, indurre l'ovulazione ed una successiva fase diestrade. La liberazione del picco ovulatorio di LH ha influenzato i centri di controllo del comportamento sessuale e la disponibilità copulatoria delle gatte. L'esame colpocitologico si è rivelato di fondamentale importanza per stabilire il momento ottimale in cui effettuare la somministrazione del GnRH analogo. La semplicità del trattamento, privo di effetti collaterali, consente la somministrazione anche da parte del proprietario. Studi condotti sulla gatta hanno dimostrato che possono ripetersi anche 4-5 episodi di pseudociesti, senza inconvenienti, nel corso di una singola stagione riproduttiva⁷. Di conseguenza la ripetibilità del trattamento con Buserelin, in grado d'indurre pseudociesti, non pregiudica l'eventuale possibilità riproduttiva della gatta. Per concludere, si ritiene che l'induzione dell'ovulazione e la successiva pseudociesti ottenute con la somministrazione di Buserelin per via endonasale, rappresenti una valida alternativa per il condizionamento riproduttivo dell'attività ciclica nella gatta rispetto alle terapie convenzionali¹. Questa sperimentazione merita ulteriori approfondimenti sperimentali e clinici, in relazione alla farmacocinetica e farmacodinamica del GnRH somministrato per la via nasale, e in particolare al ruolo svolto a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio.

BIBLIOGRAFIA - 1. Romagnoli, S., Concannon, P.W., Clinical use of progestins in bitches and queens: A review. In: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Ed. I.V.I.S., Ithaca NY, (2001). 2. Ugwoke, M.I., Verbeke, N., Kinget, R., The biopharmaceutical aspect of nasal mucoadhesive drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (1), 3-21, (2001). 3. Westin, U. et al., Transfer of morphine along the olfactory pathway to the central nervous system after nasal administration to rodents. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 24, 565-573, (2005). 4. Illum, L., Nasal drug delivery-possibilities, problems and solutions. *J. Control. Release*, 87, 187-198, (2003). 5. Meredith, M., Fewell, G., Vomeronasal organ: electrical stimulation activates Fos in mating pathways and in GnRH neurons. *Brain Res.*, 922, 87-94, (2001). 6. Soane, R.J. et al., Evaluation of the clearance of bio-adhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.*, 178, 55-65, (1999). 7. Paape, S.R., Shille, V.M., Seto, H., Stabenfeldt, G.H., Luteal activity in the pseudopregnant cat. *Biol. Reprod.*, 13, 470-474, (1975).

**RIPRESA DELLA CICLICITÀ NELLA CAVALLA IN TRANSIZIONE
PRIMAVERILE TRAMITE SOMMINISTRAZIONE DI UN ANTAGONISTA
DELLA DOPAMINA O DI UN PROGESTINICO: RISULTATI
SPERIMENTALI E CLINICI**

RESUMPTION OF MARE CICLICITY DURING SPRING TRANSITION USING A
DOPAMINE ANTAGONIST OR PROGESTINS ADMINISTRATION:
EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESULTS

Panzani D.,¹ Marmorini P., Zicchino I., Rota A., Vannozzi I., Crisci A., Camillo F.,
*Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Pisa; Libero
Professionista, Pisa*

Parole chiave: Cavallo, Transizione Primaverile, Ciclicità, Sulpiride

Key words: Horse, Spring Transition, Cyclicity, Sulpiride

SUMMARY - Sulpiride administration showed to be inconsistent in resuming cyclicity in deep anoestrus mares if not associated to artificial photoperiod. Aim of our study was to evaluate if a sulpiride treatment would be reliable if started when one or more follicles of 25 mm in diameter were detected. Sulpiride treated mares maintained outdoor under natural light exposure ovulated significantly earlier than control mares or Altrenogest treated mares housed in the same conditions.

INTRODUZIONE - Alle nostre latitudini la maggior parte delle cavalle tende a ciclare da aprile ad ottobre mentre la stagione di monta ufficiale va dal 15 febbraio al 31 luglio. Anticipare la prima ovulazione dell'anno permetterebbe sia di poter sfruttare più cicli per ottenere una gravidanza, che di far nascere puledri nei primi mesi dell'anno successivo, in modo che siano più maturi al momento delle loro prime competizioni. Per raggiungere questo scopo sono disponibili diversi approcci: la stimolazione luminosa, il trattamento con progestinici e, più recentemente, la somministrazione di antagonisti della dopamina (sulpiride e domperidone). Sottoponendo cavalle in anestro ad almeno 14,5 ore di luce al giorno^{1,2} è stato ottenuto un anticipo significativo della prima ovulazione dell'anno. Risultati analoghi si sono avuti trattando cavalle in transizione primaverile con progesterone o progestinici per almeno 10 giorni, associandovi o meno la stimolazione luminosa^{3,4}. La somministrazione di antagonisti della dopamina a cavalle in anestro ha dimostrato una loro più rapida ripresa dell'attività ovarica sia se sottoposte a stimolazione luminosa^{5,6} o meno^{7,8,9}. In altre specie è dimostrata una diretta inibizione da parte della dopamina sul rilascio di gonadotropine¹⁰, cosa che non avviene nella cavalla^{5,7} dove l'azione inibitoria di questo neurotrasmettitore pare svolgersi direttamente a livello follicolare¹¹. Scopo di questo studio è stato di valutare l'effetto sulla ripresa dell'attività ovarica del trattamento con 1 mg/kg/die/capo di Sulpiride (Championil®) in cavalle in transizione primaverile.

MATERIALI E METODI - Studio 1: Questo studio è stato condotto presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa (San Piero a Grado, Pisa: latitudine 43° 43' Nord) nelle stagioni di monta 2005 e 2006. Sono state impiegate 31 cavalle in anestro appartenenti a razze diverse (25 trottatrici, 5 Sella, 1 PSI), di età compresa tra i 3 ed i 21 anni e peso corporeo tra i 420 e 636 Kg. Gli animali sono stati mantenuti in paddock sotto regime di fotoperiodo naturale ed alimentati con fieno polifita *ad libitum* e mangime fioccato per cavalli. Sono state considerate in anestro le cavalle che ai controlli ecografici settimanali tra il 10 Gennaio ed il 7 Febbraio non avessero presentato: corpi lutei, follicoli di diametro superiore a 20 mm o utero da calore. Dal 7 di Febbraio, questi soggetti sono stati sottoposti a: un controllo ecografico

settimanale fino all'evidenza di un follicolo dal diametro $\varnothing < 20$ mm; due controlli ecografici settimanali dall'evidenza di almeno un follicolo dal diametro tra i 20 ed i 24 mm; tre controlli ecografici settimanali dall'evidenza di almeno un follicolo di diametro tra i 25 ed i 29 mm; esami ecografici quotidiani dall'evidenza di almeno un follicolo di $\varnothing \geq 30$ mm fino all'ovulazione. All'evidenza di almeno un follicolo con $\varnothing \geq 25$ mm (Giorno 0) le cavalle sono state incluse in uno di 2 gruppi: Gruppo S (n=22), trattate con una dose di 1 mg/kg/die/im di sulpiride (Championil®, Sanofi Synthelabo, MI) per un massimo di 21 giorni o fino all'ovulazione e Gruppo C (n=9), non trattate e lasciate come controllo. A 5 cavalle appartenenti al Gruppo S, alla comparsa di un follicolo dal $\varnothing \geq 35$ mm sono state somministrate 3000 UI/iv di hCG (Vetecor®, Bio98, MI). Il Test T di Student è stato impiegato per confrontare il Gruppo S ed il Gruppo C per gli intervalli tra Giorno 0 e l'evidenza di un follicolo dal $\varnothing \geq 35$ mm e tra Giorno 0 ed ovulazione (escludendo le cavalle del Gruppo S a cui era stata indotta l'ovulazione con hCG). Il Fisher's Exact Test è stato invece impiegato per confrontare, sempre tra i Gruppi S e C, sia il numero di fattrici che hanno raggiunto un diametro follicolare $\varnothing \geq 35$ mm entro il Giorno 21 che il numero di fattrici che hanno ovulato entro il Giorno 28 dall'inizio del trattamento. Sono state ritenute significative differenze con $P < 0,05$.

Studio 2: Lo studio è stato effettuato presso l'allevamento "La Piaggia" (Staffoli, Pisa: latitudine 43° 43' Nord), nelle stagioni di monta 2005 e 2006, su un totale di 28 cavalle trottatrici, di età compresa tra i 4 ed i 20 anni, in buono stato di nutrizione, mantenute in paddock sotto regime di fotoperiodo naturale ed alimentate con fieno polifita *ad libitum* e mangime fioccato per cavalli. Lo stato di anestro è stato stabilito in seguito a controlli ecografici settimanali effettuati tra l'inizio di Gennaio ed il 15 Febbraio; da questo momento le cavalle sono state sottoposte a controllo ecografico dell'apparato riproduttore due volte a settimana. Alla comparsa di un follicolo dal $\varnothing \geq 25$ mm (Giorno 0) le cavalle sono state divise in due gruppi: Gruppo S, trattate con 1 mg/Kg/die/im di sulpiride (Championil®, Sanofi Synthelabo, MI) fino all'ovulazione o per un massimo di 21 giorni; Gruppo R, trattate con 0,044mg/kg/die/os di altrenogest (Regumate®, Intervet Italia, MI) per 10 giorni e 3 mg/im Alfaprostol (Gabbrostim®, Ceva Vetem, MB) l'ultimo giorno di trattamento. Alla comparsa di un follicolo dal $\varnothing \geq 35$ mm sono state somministrate 3000 UI/ev di hCG (Vetecor®, Bio98, MI) a 13 cavalle del Gruppo S e 4 cavalle del Gruppo R. Ventuno/22 cavalle del Gruppo S e 6/6 cavalle del Gruppo R sono state sottoposte ad inseminazione artificiale secondo buona pratica veterinaria a ridosso della prima ovulazione dell'anno. Il Test *t* di Student è stato impiegato per confrontare il Gruppo S con il Gruppo R per gli intervalli tra Giorno 0 e l'evidenza di un follicolo di $\varnothing \geq 35$ mm e tra Giorno 0 ed ovulazione (dopo trattamento con hCG). Il Fisher's Exact Test è stato invece impiegato per confrontare, sempre tra i gruppi S e R: il numero di fattrici che avessero raggiunto un diametro follicolare $\varnothing \geq 35$ mm entro il Giorno 21, il numero di fattrici che avessero ovulato entro il Giorno 23 e le gravidanze dopo inseminazione. Sono state ritenute significative differenze con $P < 0,05$.

RISULTATI - Studio 1: Il tempo medio intercorso tra il Giorno 0 e la comparsa di un follicolo di $\varnothing \geq 35$ mm è stato inferiore nel Gruppo S che nel Gruppo C (9 ± 6 e 23 ± 18 giorni rispettivamente; $P = 0,003$), così come è stato inferiore il tempo tra il Giorno 0 e l'ovulazione nel Gruppo S, escludendo i soggetti in cui stata indotta l'ovulazione, rispetto al Gruppo C (24 ± 22 e 42 ± 22 giorni rispettivamente; $P = 0,035$). Il numero delle cavalle che hanno presentato un follicolo con $\varnothing \geq 35$ mm entro 21 giorni dall'inizio del trattamento è risultato superiore ($P = 0,0007$) nel Gruppo S (22/22) rispetto al Gruppo C (4/9). Infine, il numero di soggetti in cui si è avuta un'ovulazione entro 28 giorni dall'inizio del trattamento è risultato maggiore ($P = 0,028$) nel Gruppo S, sempre escludendo quelli in cui era stata indotta l'ovulazione (14/17), rispetto al Gruppo C

(3/9). Le ovulazioni sono avvenute mediamente il giorno 93 ± 15 dell'anno (intervallo: 47-128) per il Gruppo S e il giorno 110 ± 17 (intervallo: 84-143) per il Gruppo C.

Studio 2: Il tempo medio intercorso tra il Giorno 0 e la comparsa di un follicolo di ≥ 35 mm è stato inferiore ($P < 0,0001$) nei soggetti del Gruppo S (9 ± 4 gg) rispetto a quelli del Gruppo R (30 ± 18 gg); così come il periodo intercorso tra il Giorno 0 e l'ovulazione in soggetti trattati con hCG (Gruppo S: 12 ± 5 gg; Gruppo R: 44 ± 17 gg; $P = 0,0005$). Il numero delle cavalle che hanno presentato un follicolo di ≥ 35 mm entro 21 giorni dall'inizio del protocollo è risultato superiore ($P = 0,005$) nei soggetti del Gruppo S (22/22) rispetto a quelli del Gruppo R (3/6). Il numero di soggetti in cui si sono avute ovulazioni, dopo somministrazione di hCG, entro 23 giorni dall'inizio del protocollo è risultato maggiore ($P = 0,04$) nel Gruppo S (13/13) rispetto al Gruppo R (2/4). Le ovulazioni sono avvenute mediamente il giorno 100 ± 21 dell'anno (intervallo: 64-136) per il Gruppo S e il giorno 96 ± 24 (intervallo: 67-124) per il Gruppo R. Non sono emerse differenze statisticamente significative ($P = 0,22$) nella percentuale di gravidanze dopo inseminazione nei soggetti sottoposti ai due trattamenti (13/21 Gruppo S Vs 6/6 Gruppo R).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI - I dati in letteratura sul trattamento prolungato con antagonisti della dopamina, utilizzati per anticipare la ripresa dell'attività ovarica in cavalle in anestro mantenute all'aperto, ha dato risultati contrastanti. È stato osservato che fattori ambientali come temperatura e fotoperiodo possono condizionare l'efficacia di queste molecole sulla ripresa dell'attività ovarica^{5,6}. Nel nostro lavoro abbiamo inteso valutare l'efficacia del sulpiride in cavalle già in transizione, iniziando il trattamento in un preciso stadio fisiologico dei soggetti, col risultato che sia la comparsa di follicoli preovulatori che le ovulazioni sono state anticipate rispetto a quanto osservato in cavalle non trattate (Studio 1) o trattate con progestinici (Studio 2). Ciò è in accordo solo con i primi lavori apparsi in letteratura^{7,8} ma contrasta quanto osservato successivamente in gruppi di animali mantenuti all'aperto^{5,6,12}. I risultati da noi ottenuti indicano che, iniziando il trattamento dall'evidenza di un follicolo di ≥ 25 mm invece che in anestro, si può avere l'anticipazione della prima ovulazione anche non sottoponendo le cavalle a fotoperiodo artificiale. Ciò contrasta in parte con le ipotesi che gli autori dei precedenti lavori propongono per spiegare l'incostanza dei risultati di questo tipo di trattamento somministrato a cavalle mantenute all'aperto. È indubbio un effetto delle condizioni ambientali sulla ripresa della ciclicità, ma è anche ipotizzabile che esista una componente soggettiva che, al pari di condizioni ambientali e trattamento, faccia sì che una cavalla inizi la fase di transizione in un momento differente da altri soggetti ed è possibile che solo da quel momento sia capace di rispondere efficacemente alla terapia con sulpiride. In conclusione, il trattamento con sulpiride in cavalle in transizione allo scopo di anticiparne la prima ovulazione è risultato efficace.

BIBLIOGRAFIA - 1. Burkhardt, J., *J. Agric. Sci. Camb.*, 37, 64-68, (1947). 2. Palmer, E., Driancourt, M.A. e Ortavant, R., *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 32, 275-282, (1982). 3. Weibel S.K. e Squires E.L., *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 32, 193-198, (1982). 4. Squires, E.L. et al., *J. Anim. Sci.*, 56, 901-910 (1983). 5. Daels et al., *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 56, 173-183, (2000). 6. Duchamp e Daels, *Theriogenology*, 588-602, (2002). 7. Besognet, B., Hansen, B.S., Daels, P.F., *J. Reprod. Fertil.*, 108, 55-61, (1996). 8. Besognet, B., Hansen, B.S., Daels, P.F., *Theriogenology*, 47, 467-480, (1997). 9. Brandemuhel, J.P. e Cross, D.L., *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 56, 185-193, (2000). 10. Sarkar, D.K., Fink, G., *Endocrinology*, 108, 862-867, (1981). 11. King et al., *Animal Reproduction Science*, 94, 175-178, (2006). 12. Donadeu, F.X., Thompson, D.L. Jr., *Theriogenology*, 57, 963-976, (2002).

IMPIEGO DI SEME SESSATO NELLA SPECIE EQUINA: RISULTATI PRELIMINARI

USE OF EQUINE SEXED SEMEN: PRELIMINARY RESULTS

Mari G., Rizzato G., Iorio F., Iacono E.,¹Bucci D.,¹Galeati G.,¹Spinaci M.,
*Dipartimento Clinico Veterinario; ¹Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e
Produzioni Animali, Università degli Studi di Bologna.*

Parole chiave: Seme Sessato, Equino, Inseminazione Artificiale, Sorter

Key words: Sexed Semen, Equine, Artificial Insemination, Sorter

SUMMARY - The object of this study was to determine the effects of flow cytometric sorting on stallion sperm motility and viability and to compare pregnancy rate after endoscopic insemination with fresh sorted and frozen-thawed spermatozoa. Ejaculates from four fertile stallions were collected every other day and motility was evaluated with CASA. Spermatozoa were stained with Hoechst 33342 and sorted into X- and Y-chromosome bearing populations using a MoFlo SX® sperm sorter. After sorting sperm was re-evaluated with CASA, stained with SYBR-PI to evaluate the viability, and splitted in two equal aliquotes: one was frozen (Group 1) and the other was used fresh for endoscopic insemination (Group 2). Flow cytometric sorting negatively affected both total and progressive motility, average path velocity and percentage of rapid spermatozoa ($P < 0.05$). No difference were found in live sperm between pre- and post-sorted semen. Pregnancies were obtained only with fresh sorted spermatozoa.

INTRODUZIONE - Nel 1987, Johnson et al., misero a punto la metodica di sessaggio degli spermatozoi mediante citofluorimetro, separando gli spermatozoi portatori del cromosoma X e Y in base alla differenza nel contenuto di DNA¹. Oggi è possibile predeterminare il sesso della progenie prima della fertilizzazione con un'accuratezza dell'85-95%², e tale metodica è stata applicata in diverse specie animali tra le quali la suina³, la ovina⁴, la bovina⁵, la felina⁶ e l'equina⁷. La capacità fecondante del seme sessato è risultata inferiore rispetto al controllo non sessato^{5,7}; Suh et al. (2005) hanno dimostrato come, all'aumentare della pressione utilizzata per il sortaggio, si accompagni una progressiva diminuzione della motilità totale, misurata mediante CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), e della percentuale di spermatozoi vitali⁸. Come riportato da Morris et al. (2003), l'estrema diluizione degli spermatozoi a seguito del sortaggio (8×10^5 spermatozoi/ml) determinerebbe una riduzione della concentrazione di proteine seminali e di anti-ossidanti che giocano un ruolo importante nel mantenimento della stabilità di membrana, causando così un incremento della sensibilità degli spermatozoi ai danni di membrana⁹. Tali danni si ripercuotono anche sulla qualità post-congelamento del materiale sessato, che risulta essere ridotta rispetto al controllo non sessato¹⁰. Lo scopo del presente lavoro è stato duplice: 1) verificare gli effetti del sortaggio sul materiale seminale equino in termini di motilità totale, motilità progressiva, velocità media della traiettoria, spermatozoi rapidi, vitalità; 2) comparare la percentuale di gravidanza dopo inseminazione endoscopica utilizzando materiale seminale, congelato e non, dopo separazione con citofluorimetro.

MATERIALI E METODI - Quattro stalloni di razza Trottatore (4-10 anni) e di provata fertilità sono stati inclusi nella prova. I prelievi di seme sono stati eseguiti a giorni alterni utilizzando una vagina artificiale modello Missouri. Dopo la raccolta, il materiale seminale è stato diluito 1:1 in KMT (Kenney-Modified Tyrodes) e successivamente sottoposto ad esame computerizzato della motilità mediante analizzatore d'immagine HTM IVOS Version 12 (standard equine setup). I parametri considerati sono stati: 1) Motilità Totale (MOT), espressa in %; Motilità Progressiva

(PROG), espressa in %; Velocità Media della Traiettorie (VAP), espressa in $\mu\text{m}/\text{sec}$; Spermatozoi Rapidi (RAP), cioè la percentuale di spermatozoi con $\text{VAP} > 80 \mu\text{m}/\text{sec}$. Gli spermatozoi sono stati colorati con Hoechst 33342 e, previa aggiunta di FD&C #40 (25mg/ml), sono stati separati in popolazioni X e Y in base al contenuto di DNA utilizzando un MoFlo SX® sperm sorter (Dako-Cytomation Inc., Fort Collins, CO, USA) equipaggiato con laser argon (lunghezza d'onda 351 a 150 mW); come sheat fluid è stato utilizzato un TALP modificato⁸. La pressione dello sheat fluid è stata settata a 40 psi (pounds/square inch), e il numero di eventi processati è stato di circa 20.000 cellule al secondo. Gli spermatozoi sortati sono stati deviati in tubi di polipropilene da 20 ml contenenti 500 μl di una soluzione tampone al 2% di Tes-Tris-tuorlo d'uovo. Dopo il sortaggio sono stati nuovamente valutati i parametri di motilità tramite CASA e la vitalità spermatica mediante colorazione SYBR-PI. Il materiale sortato è stato quindi diviso in due parti: una è stata utilizzata subito per l'inseminazione, mentre l'altra è stata diluita in glicerolo al 4%¹¹, confezionata in paillettes da 0.25 ml, congelata in congelatore programmabile (Mini Digit Cool, IMV) ad una velocità di $-33^\circ\text{C}/\text{min}$ da $+4^\circ\text{C}$ a -140°C e stoccata in azoto liquido. Per verificare la fertilità del materiale seminale sessato, congelato e non, sono stati utilizzati 13 cicli estrali di 4 cavalle, la cui attività ovarica è stata valutata mediante ecografia transrettale; alla comparsa di un follicolo di diametro $\geq 35 \text{ mm}$ l'ovulazione è stata indotta con somministrazione e.v. di 2500 U.I. di hCG (Vetecor, Serono, Italia) e l'inseminazione effettuata 30-32 h dopo. I soggetti sono stati divisi in due gruppi: GRUPPO 1 (n=7): cavalle inseminate con 5×10^6 spermatozoi totali sessati in 250 μl ; GRUPPO 2 (n=6): cavalle inseminate con 5×10^6 spermatozoi sessati, congelati-scongelati, in 250 μl . In tutte le cavalle è stata effettuata inseminazione endoscopica (Pentax EC-380FKp Video Colonscope; catetere MILA ISN 200) con deposizione del materiale seminale a livello di papilla utero-tubarica ipsi laterale rispetto al follicolo preovulatorio. Dopo inseminazione tutti i soggetti sono stati sottoposti ad ecografia transrettale per verificare l'avvenuta ovulazione; la diagnosi di gravidanza è stata effettuata 15 giorni dopo l'ovulazione (giorno dell'ovulazione=0). I dati relativi al materiale seminale, espressi come media \pm ds, sono stati analizzati mediante test T di Student per variabili indipendenti; i dati relativi alle percentuali di gravidanza sono stati analizzati mediante test Chi Quadrato ((Statistics for Windows, Stat Soft Inc., Tusla, Ok, USA). In entrambi i casi le differenze sono state considerate significative per $P < 0,05$.

RISULTATI - L'analisi statistica dei risultati ottenuti ha evidenziato come il sortaggio determini una diminuzione significativa dei parametri di motilità totale e progressiva, velocità media della traiettoria e spermatozoi rapidi ($P < 0,05$). La percentuale di spermatozoi vitali è invece risultata simile nei due gruppi ($P > 0,05$) (Tabella 1), considerando che solo gli spermatozoi vitali vengono selezionati prima del processo di sortaggio. La percentuale di gravidanza con seme sortato fresco è stata del 28% (2/7), mentre non si sono ottenute gravidanze a seguito di inseminazione con seme sortato e congelato (0/6) (Tabella 2). La differenza tra i due gruppi non è risultata statisticamente significativa ($P > 0,05$) a causa del numero ridotto di fecondazioni effettuate.

Tabella 1 - Valori di motilità e vitalità nemaspermatica prima e dopo sortaggio a,b $P < 0,05$

	MOT(%)	PROG(%)	VAP($\mu\text{m}/\text{sec}$)	RAP(%)	SP.VITALI (%)
Pre-Sorter	79,6 \pm 5,5 ^a	32,3 \pm 9,4 ^a	116,4 \pm 12,4 ^a	67,0 \pm 12,0 ^a	84,3 \pm 7,1
Post-Sorter	38,6 \pm 14,5 ^b	10,6 \pm 5,4 ^b	99,9 \pm 13,3 ^b	30,2 \pm 12,0 ^b	74,3 \pm 11,6

Tabella 2 - Gravidanze ottenute con seme sortato

Gruppo	N° cicli	Dose inseminante(pms $\times 10^6$)	Volume (μl)	N° gravidanze (%)
1	7	5	250	2 (28,6)
2	6	5	250	0 (0,0)

DISCUSSIONE - I risultati ottenuti indicano come il sortaggio degli spermatozoi mediante citofluorimetro determini una significativa diminuzione dei parametri di motilità nemaspermatica. Secondo quanto riportato da Lindsey et al. (2003)¹², l'aggiunta di caffeina determinerebbe un miglioramento di tali parametri, aumentando la motilità totale dal 24% al 32%. Shu et al. (2005)⁹ hanno invece dimostrato come un miglioramento significativo possa essere determinato da una diminuzione della pressione utilizzata, passando dal 30,1% a 50 psi al 40,6% a 30 psi. Non si sono osservate differenze significative nella percentuale di spermatozoi vitali pre e post sort e tale dato conferma, anche nella specie equina, l'efficacia del processo di selezione degli spermatozoi già danneggiati al momento della valutazione citofluorimetrica mediante l'aggiunta di FD&C40 (Food Coloring Dye); tale colorante infatti, penetrando negli spermatozoi con membrana lesa, ne permette l'esclusione dal sortaggio. Generalmente le cavalle vengono inseminate con una dose fecondante pari a 500×10^6 spermatozoi motili (pms); sfortunatamente il numero di spermatozoi sortati in un'ora è di 15×10^6 , quindi servirebbero diversi giorni per poter ottenere la dose necessaria per una fecondazione artificiale tradizionale. Lindsey et al. (2002)¹³, utilizzando l'inseminazione endoscopica, hanno ottenuto una percentuale di gravidanza pari al 38% (6/16) con una dose fecondante di 5×10^6 spermatozoi motili sessati; le gravidanze ottenute utilizzando la stessa dose fecondante di seme sessato e congelato sono state invece 2/15 (13%). La dose di spermatozoi utilizzata in questo studio è stata invece pari a 5×10^6 di spermatozoi totali, quindi sensibilmente inferiore a quella impiegata da altri Autori^{7,12} relativamente al numero di spermatozoi motili. Le gravidanze ottenute sono state 0/6 per il materiale seminale congelato, 2/7 (28%) per il materiale seminale impiegato subito dopo sorting. Di queste, una è andata incontro a riassorbimento embrionale, verificato per via ecografia al giorno 30; l'altra è tutt'ora in corso. La percentuale di fertilità ottenuta in questo studio dimostra come la riduzione del numero di spermatozoi impiegati possa essere la causa del risultato negativo ottenuto con seme sortato sottoposto a congelamento-scongelo. Ulteriori studi sono necessari al fine di ottimizzare la tecnica di sortaggio del materiale seminale di stallone e mettere a punto protocolli di congelamento più efficienti.

BIBLIOGRAFIA - 1. Johnson, L.A., Flook, J.P., Look, M.V., Pinkel, D., Flow sorting of X and Y chromosome bearing spermatozoa into two populations. *Gen. Res.*, 16, 1-9, (1987). 2. Johnson, L.A., Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, 93-107, (2000). 3. Vazquez, J.M., et al., Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59, 1605-1614, (2003). 4. Hollinshead, F.K., et al., In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod. Fertil. Dev.*, 15, 351-359, (2003). 5. Seidel, G.E., et al., Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, 52, 1407-1420, (1999). 6. Spinaci, M., et al., In vitro production of cat blastocysts of predetermined sex using flow cytometrically sorted semen. *Theriogenology*, 67, 872-877, (2007). 7. Buchanan, B.R., et al., Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 53, 1333-1344, (2000). 8. Suh, T.K., Schenk, J.L., & Seidel, G.E. Jr., High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*, 64, 1035-1048, (2005). 9. Morris, L.H.A., Hollinshead, F.K., Evans, G., Maxwell, W.M.C., The longevity and acrosome status of stallion flow sorted spermatozoa. *Theriogenology*, 59, 512, (2003). 10. Schenk, J.L., Shu, T.k., Cran, D.G., Seidel, G.E. Jr, Cryopreservation of flow-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, 52, 1375-1391, (1999). 11. Heitland, A.V., et al.: Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.*, 28, 47-53 (1996). 12. Lindsey, A.C., Mukle, L.K., Squires, E.L., Effects of caffeine stimulation on stallion sperm motion characteristics following 18-h storage, flow-sorting and cryopreservation. *Theriogenology*, 59, 510, (2003). 13. Lindsey, A.C., et al., Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Eq. Vet. J.*, 34, 121-127, (2002).

STUDIO DELLA VASCOLARIZZAZIONE TESTICOLARE DELLO STALLONE MEDIANTE ECO COLOR DOPPLER: RISULTATI PRELIMINARI

TESTICULAR BLOOD FLOW EVALUATION IN STALLIONS BY COLOR DOPPLER ULTRASOUND: PRELIMINARY RESULTS

Zelli R., Dipartimento di Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Sezione di Ostetricia e Ginecologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia.

Parole Chiave: Doppler, Testicoli, Stallone.

Key Words: Doppler, Testis, Stallion.

SUMMARY - Two-dimensional ultrasound in combination with colour-coded and pulsed Doppler sonography was used to study the blood flow of the testis in 6 stallions. After detection of the vessels by colour-coded Doppler sonography, the blood flow patterns were determined by pulsed Doppler sonography measuring and describing the systolic peak velocity (SPV), the end-diastolic velocity (EDV), the pulsatility index (PI) and resistance index (RI). The blood flow of the testicular artery was measured in the spermatic cord and in the marginal aspect of the artery on caudal pole of the testis. The physiological testicular flows patterns were biphasic with resistive waveform in the spermatic cord and biphasic non-resistive waveform in the marginal aspect. The present results give basal informations on the blood perfusion in healthy testis in stallion.

INTRODUZIONE - L'ecografia bi-dimensionale nella diagnostica delle patologie dell'apparato genitale maschile ha registrato negli ultimi anni un forte incremento anche in medicina veterinaria. Essa rappresenta il metodo di diagnostica per immagini elettivo nello studio della pelvi e dell'apparato genitale maschile dello stallone, poiché consente una diagnosi rapida, sicura e di basso costo di un ampio spettro di patologie. Tra le più recenti ed importanti applicazioni dell'esame ecografico vanno annoverate le metodiche color-Doppler e Doppler pulsato che combinano l'imaging ad alta risoluzione con la contemporanea visualizzazione dei parametri di flusso consentendo una dettagliata indagine morfologica e flussometrica, costituendo quindi un importante complemento alle metodiche ultrasonografiche espresse in scala dei grigi. In medicina umana sono stati riportati i diagrammi di flusso caratteristici dell'arteria testicolare nelle diverse localizzazioni e i limiti di riferimento degli indici flussometrici¹. Questa tecnica è ormai impiegata da tempo sia per la diagnosi di patologie testicolari associate ad alterazioni del flusso ematico, come la torsione testicolare o il varicocele^{2,4}, sia come ausilio per l'estrazione spermatica tramite biopsia testicolare⁵. Gli obiettivi del presente lavoro sono stati quelli di valutare l'applicabilità delle metodiche color-Doppler e Doppler pulsato per lo studio della vascolarizzazione testicolare dello stallone e di riportare le caratteristiche flussometriche fisiologiche.

MATERIALI E METODI - Oggetto del presente studio sono stati 6 stalloni di diverse razze (2 PSI, 3 Trottatori e 1 Maremmano) del peso compreso fra 400 e i 520 kg, di età compresa tra 3 e 15 anni. I soggetti sono stati sottoposti ad esame clinico particolare dell'apparato genitale al fine di escludere patologie intercorrenti.

I soggetti erano contenuti in stazione quadrupedale in travaglio senza sedazione. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad esame ecografico dell'apparato riproduttore maschile utilizzando un ecografo marca Kretz, modello Sonoace 8800 dotato di sonda lineare da 7.5 MHz e sonda microconvex da 6,5 MHz. Su ogni soggetto si è proceduto all'identificazione dell'arteria testicolare nella localizzazione sopratesticolare ponendo

il trasduttore sul cordone spermatico e visualizzando il lume vascolare mediante l'applicazione color-Doppler (modalità duplex) come aree colorate in rosso e blu (Figura 1). La localizzazione dell'arteria testicolare sul polo caudale del testicolo è stata ottenuta ponendo il trasduttore sul margine infero-posteriore dello stesso e visualizzando il lume vascolare colorato in rosso con l'applicazione color-Doppler (modalità duplex) (Figura 2). Sono stati automaticamente calcolati mediante il Doppler pulsato (modalità triplex) i seguenti parametri flussometrici: il picco della velocità sistola (*SPV*), la velocità di fine-diastole (*EDV*), l'indice di pulsatilità (*PI*) [(velocità massima-velocità minima)/velocità media] e l'indice resistivo (*RI*) [(*SPV-EDV*)/*SPV*]. Sono state eseguite tre rilevazioni per ogni localizzazione ottenute con un angolo di incidenza inferiore a 60°, a cui veniva applicata la correzione angolare.

RISULTATI - L'arteria testicolare nella porzione sopratesticolare è risultata facilmente localizzabile essendo visualizzabile in diverse sezioni longitudinali oblique e trasversali mentre nella porzione marginale è risultata più difficoltosa a causa delle ridotte dimensioni e dell'andamento tortuoso della stessa. La valutazione completa delle arterie testicolari ha richiesto circa 40 minuti per soggetto.

I diagrammi di flusso dell'arteria testicolare nella localizzazione sopratesticolare mostravano un andamento bifasico ad alta resistenza (Figura 1) mentre appariva bifasico a bassa resistenza nella localizzazione marginale (Figura 2).

Le medie e le deviazioni standard dei valori degli indici flussometrici calcolati sono riportati in Tabella 1.

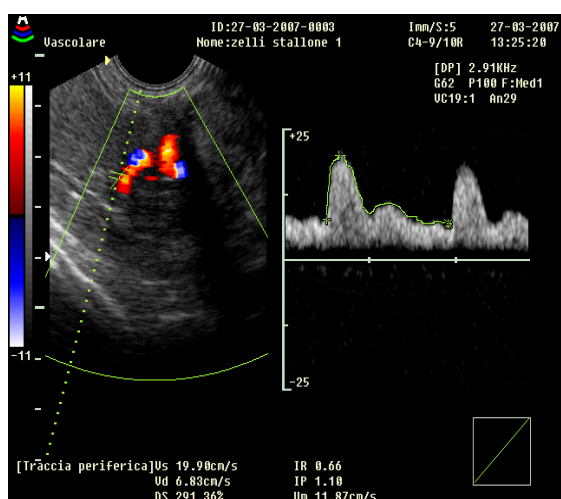


Fig. 1 - Color Doppler e diagramma di flusso dell'arteria testicolare nella localizzazione sopratesticolare

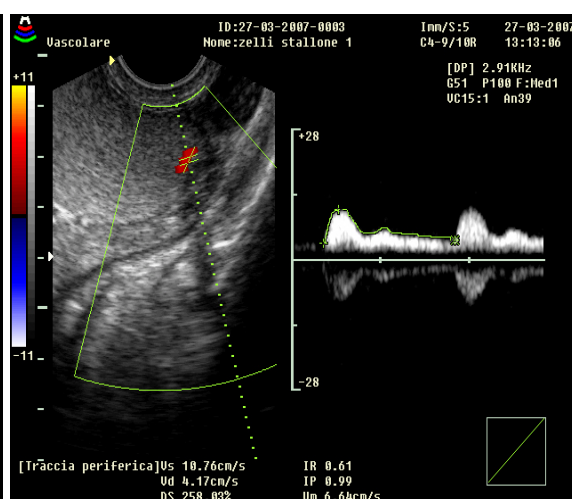


Fig. 2 - Color Doppler e diagramma di flusso dell'arteria testicolare nella localizzazione marginale

Tabella 1. Parametri flussometrici dell'arteria testicolare (n=12)

<i>Parametri</i>	<i>Localizzazione sopratesticolare (media ± d.s.)</i>	<i>Localizzazione marginale (media ± d.s.)</i>
<i>Spv (cm/s)</i>	19,76 ± 5,8	12,54 ± 3,9
<i>Edv (cm/s)</i>	3,78 ± 2,26	4,4 ± 2,09
<i>PI</i>	1,71 ± 0,29	1,09 ± 0,18
<i>RI</i>	0,81 ± 0,06	0,66 ± 0,06

Spv: picco della velocità sistola; *Edv*: velocità di fine-diastole; *PI*: indice di Pulsatilità; *RI*: indice resistivo.

DISCUSSIONE - Nell'uomo la valutazione delle caratteristiche flussometriche testicolari ha assunto notevole importanza nella diagnosi delle diverse patologie testicolari. In Medicina Veterinaria sono state riportate le caratteristiche flussometriche sia in condizioni fisiologiche che patologiche nel cane^{6,7,8} e recentemente nello stallone^{9,10}. Nello stallone differentemente da quanto riscontrato nell'uomo¹ e nel cane^{6,8}, il diagramma di flusso dell'arteria testicolare nella localizzazione sopratesticolare mostrava un andamento tipico di un flusso ad alta resistenza. Tale differenza potrebbe essere imputata alla diversa disposizione del testicolo nello stallone molto prossimo alla parete addominale con asse longitudinale orizzontale e con relativa brevità del cordone spermatico. Analogamente a quanto riscontrato nell'uomo^{9,10} e nel cane^{6,7,8} nella localizzazione marginale il flusso arterioso mostrava un andamento a bassa resistenza. La tecnica color-Doppler risulta più efficace rispetto all'ecografia in scala di grigi nell'identificare ristrette porzioni longitudinali dell'arteria testicolare tuttavia il corretto posizionamento del volume campione all'interno del vaso può risultare difficoltoso.

In conclusione il presente lavoro apporta un ulteriore contributo circa l'applicabilità dell'ecografia Doppler nello studio della vascolarizzazione testicolare dello stallone in condizioni fisiologiche. Ulteriori studi sugli andamenti flussometrici in un maggior numero di animali e nelle diverse condizioni patologiche testicolari dello stallone sono necessari al fine di validare tale metodica come ausilio diagnostico nella valutazione andrologica dello stallone.

BIBLIOGRAFIA - 1. Middleton, W.D., Thorne, D.A., Melson, G.L., Color Doppler ultrasound of the normal testis. *Am. J. Radiol.*, 152, 293-297, (1989). 2. Pavlica, P., Barozzi, L. Imaging of the acute scrotum. *Eur. Radiol.* 11, 220-228, (2001). 3. Sidhu, P.S. Clinical and imaging features of testicular torsion: role of ultrasound. *Clin. Radiol.* 54, 343-352, (1999). 4. Aydos, K. et al., Use of Color Doppler sonography in the evaluation of varicoceles. *Eur. Urol.*, 24, 221-225, (1993). 5. Osnat, E. et al., Vascularity index distribution within the testis: A technique for guiding testicular sperm extraction. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 27, 9, 1171-1176, (2001). 6. Günzel A-R., Möhrke C., Poulsen Nautrup C., Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: physiological and pathological findings. *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 236-240, (2001). 7. Gumbsch, P., Gabler, C., Holzmann, A., Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs, *Vet. Rec.*, Volume: 151, 140-144, (2002). 8. Zelli, R., Bocci, F., Di Salvo, P., Polisca, A., Colour-coded and pulsed doppler measurements of prostatic and testicular arterial blood flow in male dog. 5th *Biannual Congress European Veterinary Society for Small Animal Reproduction*, Budapest, Hungary, April 313, 7-9, (2006). 9. Pozor, M.A., McDonnell, S.M., Doppler ultrasound measures of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology*, 58, 437-440, (2002). 10. Pozor, M.A., McDonnell, S.M. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology*, 61, 799-810, (2004).

**EFFETTI DEL SODIO DODECIL SOLFATO SULLA
CRIOCONSERVABILITÀ DELLO SPERMA EQUINO**
EFFECTS OF SODIUM DODECYL SULPHATE ON CRYOPRESERVATION OF
EQUINE SPERM

Ranzenigo G., Gambarotta L., Pecile A.M., Cremonesi F., *Dipartimento Scienze
Cliniche Veterinarie, Unità Operativa di Riproduzione, Ospedale Grossi Animali, Lodi,
Università degli Studi di Milano*

Parole chiave: Sodio Dodecil Solfato, Stalloni, Congelamento.
Key Words: Sodium Dodecyl Sulphate, Stallions, Freezing.

SUMMARY - During the last decades several researches have been conducted to improve the ability of stallion sperm to undergo cryopreservation. One of the most used components of sperm cryopreservation media is the egg yolk and recently detergents were introduced to improve the post-thaw motility. Sodium dodecyl sulphate (SDS) has been studied on numerous domestic animal species but not on stallion semen. We frozen four stallions' semen in egg yolk-EDTA extender with different concentrations of SDS. 0.1% SDS tends to improve the post-thaw survival in every stallion, and in one stallion it allowed a significant improvement in progressive sperm motility in comparison to control. Adding SDS in cryopreservation extender could be beneficial especially for "poor freezers", solubilizing the lipid component of egg yolk and reducing osmotic stress.

INTRODUZIONE - Lo sperma di stallone è particolarmente sensibile ai processi di crioconservazione. Rispetto ad altre specie di animali domestici, infatti, si osserva una significativa riduzione della sua fertilità durante il congelamento. Le membrane citoplasmatiche sono il principale obiettivo dei danni da congelamento in quanto sottoposte a processi di perossidazione lipidica e riorganizzazione strutturale con conseguente riduzione della loro fluidità e della funzionalità della cellula spermatica¹. Al fine di ridurre i danni da crioconservazione sono state studiate numerose procedure e medium diluitori. Fin dal 1940 uno dei principali componenti dei medium diluitori utilizzati per congelare le cellule spermatiche è il tuorlo d'uovo. Il tuorlo è in grado di proteggere gli spermatozoi da shock termico¹, di mantenere la pressione colloidale del medium e le sue lipoproteine a bassa densità stabilizzano le membrane degli spermatozoi^{2,3}. Per migliorare la protezione delle membrane citoplasmatiche durante i processi di congelamento recentemente è stato introdotto l'utilizzo di un surfattante sintetico, l'Orvus ES paste (Equex STM paste, Nova Chemical Sales, Situate, MA, USA). L'Equex STM paste è in grado di migliorare la motilità post-congelamento dello sperma di suino⁴, di cane⁵ e di cavallo⁶. Il principale componente dell'Equex STM paste è il sodio dodecil solfato (SDS), di cui tuttavia è ignota la concentrazione. Per meglio comprendere il meccanismo d'azione dell'SDS e la sua concentrazione più efficace, diversi Autori hanno studiato l'introduzione di questo detergente nel medium per il congelamento dello sperma di cane⁷, di coniglio⁸, di topo², di toro⁹, di becco¹, ma nessuno studio è stato eseguito sullo sperma di stallone. Lo scopo di questo lavoro è quindi valutare gli effetti di differenti concentrazioni di SDS sulla motilità post-congelamento dello sperma equino.

MATERIALI E METODI - Sono stati utilizzati quattro stalloni di comprovata fertilità, di età compresa tra 10 e 20 anni. Dopo una settimana di prelievi intervallati di 48 h per eliminare le riserve extragonadiche, lo sperma è stato prelevato mediante vagina artificiale (modello Missouri) ad intervalli di 48 ore per tre volte per ogni

stallone. Lo sperma filtrato è stato diluito 1:1 con un medium per il trasporto a base di latte in polvere, glucosio, penicillina e streptomina, valutato al microscopio a contrasto di fase su tavolinetto riscaldato e mantenuto a circa 30°C per 1h prima di essere processato per il congelamento. Successivamente lo sperma è stato ulteriormente diluito 1:1 con il medium pre-riscaldato per la centrifugazione e lasciato equilibrare a temperatura ambiente per 5 minuti¹⁰. La centrifugazione è avvenuta a 400 x g per 15 minuti. Dopo aver aspirato il surnatante il pellet di sperma è stato risospeso nel medium per il congelamento¹⁰ contenente cinque diverse concentrazioni di SDS: 0% (controllo), 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2%. Le paillettes medie (0,5 ml) contenenti lo sperma diluito sono state congelate con un sistema a controllo computerizzato di abbassamento della temperatura. Il protocollo di congelamento da noi adottato ha previsto la discesa della temperatura da +22°C a +5°C alla velocità di -0,4°C/min e da +5°C a -120°C a -15°C/min. Le paillettes sono state quindi immerse in azoto liquido e la motilità è stata valutata tramite un microscopio a contrasto di fase con tavolinetto riscaldante (37°C), ad un ingrandimento di 200x, dopo almeno una settimana di congelamento. La motilità è stata valutata utilizzando un sistema di analisi delle immagini computerizzato (CASA). I dati sono espressi in percentuali medie e la loro valutazione statistica è avvenuta tramite la procedura GLM del SAS.

RISULTATI - I risultati del lavoro sono schematizzati nella tabella A. Si è verificata una significativa riduzione ($P<0,001$) della motilità progressiva lineare tra lo sperma fresco e quello sottoposto a crioconservazione in tutti gli stalloni. La motilità post-congelamento dello sperma di tutti gli stalloni ha mostrato la tendenza a migliorare quando lo sperma è stato diluito nel medium contenente lo 0,1% di SDS. Nello stallone 3 questa tendenza è diventata statisticamente significativa nei confronti del controllo.

Tabella A - Effetti di differenti concentrazioni di SDS sulla motilità progressiva lineare, espressa in valori percentuali, dello sperma di stallone dopo congelamento (pt) (le lettere in apice indicano la correlazione e la significatività statistica)

Trattamento	Stallone 1	Stallone 2	Stallone 3	Stallone 4
Fresco	70 ^g	56,67 ^f	50 ^f	70 ^g
pt 0%	26,67 ^{cde}	23,33 ^{cde}	4 ^a	25 ^{cde}
pt 0,05 %	25 ^{cde}	18,33 ^{bc}	10 ^{ab}	28,33 ^{cde}
pt 0,1 %	30 ^{de}	25 ^{cde}	18,33 ^{bc}	31,67 ^e
pt 0,15 %	26,67 ^{cde}	20 ^{bcd}	11,67 ^{ab}	31,67 ^e
pt 0,2 %	26,67 ^{cde}	25 ^{cde}	12,67 ^{ab}	23,33 ^{cde}

DISCUSSIONE - La notevole diminuzione della motilità dello sperma di stallone post-congelamento rispetto a quella dello sperma fresco riscontrata in questo esperimento è probabilmente legata all'intervallo di tempo che è trascorso tra il prelievo e l'inizio delle procedure del congelamento.

Congelando lo sperma dei quattro stalloni con differenti concentrazioni di SDS si è registrata una tendenza a migliorare la motilità progressiva lineare ad una concentrazione dello 0,1% di SDS. Nello stallone 3 la motilità post-congelamento è migliorata significativamente ($P<0,01$) con lo 0,1% di SDS rispetto al controllo congelato in assenza di SDS. Confrontando la motilità post-congelamento ottenuta in assenza di SDS tra i quattro soggetti, lo stallone 3 è stato classificato come “poor freezer” ossia il suo seme era caratterizzato da una scarsa attitudine ad essere congelato. In base al nostro studio, l'aggiunta di 0,1% di SDS nel medium per il congelamento

sarebbe quindi in grado di migliorare la crioconservabilità dello sperma di stalloni “poor freezer”.

Non sono ancora stati definiti gli esatti meccanismi d’azione attraverso i quali l’SDS agisce, ma l’esame microscopico dello sperma durante le rilevazioni eseguite nel nostro lavoro ha messo in evidenza una crescente omogeneità del medium attorno agli spermatozoi all’aumentare delle concentrazioni di SDS. Questo riscontro è in accordo con l’ipotesi riportata da Dewitt et al.² secondo i quali l’SDS solubilizza i lipidi e i componenti lipoproteici del tuorlo d’uovo. La solubilizzazione delle molecole lipidiche, che si manifesta con una maggiore limpidezza del medium, le rende più accessibili alle membrane degli spermatozoi, consentendo una più efficace azione protettiva a carico del doppio strato fosfolipidico di membrana.

Un ulteriore meccanismo d’azione proposto da Arriola and Foote⁸ sarebbe legato alla capacità dell’SDS di ridurre i danni da shock osmotico. Durante la discesa della temperatura, infatti, da una fase cristallina si passa ad una fase di gel con conseguente stress cellulare, deleterio per la sopravvivenza degli spermatozoi¹. La forte soggettività alla crioconservabilità che caratterizza i singoli stalloni può essere legata ad una maggiore o minore sensibilità agli stress termici ed osmotici.

Possiamo quindi concludere che l’aggiunta di 0.1% di SDS nel medium per il congelamento dello sperma di stalloni “poor freezer” è in grado di migliorare significativamente la sopravvivenza degli spermatozoi, portandola a valori simili alla motilità di stalloni “good freezer”. Ulteriori studi dovrebbero confermare questa capacità su una casistica maggiore e dovrebbero approfondire le alterazioni di membrana.

BIBLIOGRAFIA - 1. Aboagla, E.M.E., Terada, T., Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62, 809-818, (2004). 2. Dewitt, M., Marley, S., Graham, J.K., Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. *Cryobiology*, 40, 36-45, (2000). 3. Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Ménard, M., Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen’s egg yolk. *Biology Reproduction*, 67, 1250-1258, (2002). 4. Pursel, V.G., Schulman, L.L., Johnon, L.A., Effect of Orvus ES paste on acrosom morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J Anim Sci.*, 47, 198-202, (1978). 5. Peña, A.I., Lugilde, L.L., Barrio, M., Herradòn, P.G., Quintela, L.A., Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 59, 1725-1739, (2003). 6. Schembri, M.A., Major, D.A., Suttie, J.J., Maxwell, W.M., Evans, G., Modification of standard freezing media to limit capacitation and maximise motility of frozen-thawed equine spermatozoa. *Aust Vet J.*, 81, 748-751, (2003). 7. Hori, T., et al., Effects of addition of sodium dodecyl sulphate on frozen-thawed canine spermatozoa. *J Vet Med Sci.*, 68 (10), 1125-1128, (2006). 8. Arriola, J. and Foote, R.H., Accessory sperm as an indicator of fertilizing ability of rabbit spermatozoa frozen in egg yolk-acetamide with detergent. *Journal of Andrology*, 22 (3), 458-463, (2001). 9. Arriola, J., Foote, R.H., Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg-yolk and whole egg extenders. *J Dairy Sci.*, 70, 1664-1670, (1987). 10. Schulman, M.L., et al., Effects of halothane anaesthesia on the cryopreservation of epididymal spermatozoa in pony stallions. *Equine veterinary journal*, 35 (1), 93-95, (2003).

**VALUTAZIONE MORFOMETRICA COMPUTERIZZATA DELLA TESTA
DEGLI SPERMATOZOI DI STALLONE**
COMPUTERIZED MORPHOMETRIC EVALUATION OF STALLION HEAD
SPERMATOZOA

Acierno C.; ¹**Peretti V.;** ²**Ciotola F.;** **Lorizio R.,** *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Sezione Clinica Ostetrica, Università degli Studi di Napoli Federico II;* ¹*Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli Federico II;* ²*Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro*

Parole chiave: Cavallo, Analisi Morfometrica, Testa Spermatozoi.
Key words: Stallion, Morphometric Analysis, Head Spermatozoa.

SUMMARY - The aim of this work is to estimate applicability computer-assisted morphometric analysis of the head spermatozoa on stallion fertility evaluation. Semen samples were collected during breeding season from 10 stallions ranging in age from 7 to 18 years. A semen analysis included the measurement of gel-free semen volume, determination of spermatozoal concentration in gel-free semen, motility and morphology spermatozoa. Morphometric parameters evaluated were area, maximum diameter, minimum diameter, perimeter and roundness. The results obtained suggest us that morphometric analysis may have future applications as a method for evaluating fertility of stallion.

INTRODUZIONE - La valutazione mediante analisi computerizzata della morfometria della testa degli spermatozoi ha permesso da tempo, nell'uomo, di valutarne la correlazione con la fertilità^{1,2} e standardizzarne la metodica. In campo veterinario, questa tecnica è stata introdotta solo di recente ed applicata per studi in alcune specie animali di interesse zootecnico veterinario^{3,4,5,6}. Nel cavallo^{7,8}, sebbene alcuni autori ne abbiano prospettato l'uso quale metodo di valutazione del materiale seminale, non si è ancora evidenziato quali possano essere i valori morfometrici significativamente correlati con la fertilità.

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare l'applicabilità dell'analisi morfometrica computerizzata della testa degli spermatozoi quale metodo di valutazione della capacità riproduttiva dello stallone e di correlare i risultati ottenuti con le tecniche attualmente utilizzate allo scopo.

MATERIALI E METODI - È stato valutato il seme di dieci stalloni, in attività di età compresa fra i 7 ed i 18 anni, di cui otto (gruppo A) con misure testicolari nella norma (testicolo destro dia. max. 11 cm, dia. min. 6 cm; testicolo sinistro dia. max. 10,5 cm, dia. min. 6 cm), uno criptorchide monolaterale destro (gruppo B) (testicolo sinistro dia. max. 10,5 cm, dia. min. 5,8 cm) ed uno con ipoplasia dei testicoli (gruppo C) (testicolo destro dia. max. 7,8 cm, dia. min. 3,5 cm; testicolo sinistro dia. max. 5 cm, dia. min. 3 cm). Per ogni stallone sono stati eseguiti due prelievi a distanza di 1 mese uno dall'altro, utilizzando una vagina artificiale tipo Missouri. Per la valutazione del materiale seminale quali parametri relativi alle caratteristiche qualitative e quantitative sono stati presi in considerazione il volume dell'ejaculato, la concentrazione, la percentuale vivi e morti, la morfologia e la motilità degli spermatozoi. Per i preparati morfometrici il seme diluito, mantenuto a temperatura ambiente, è stato centrifugato a 600 g per 10 minuti, rimosso il supernatante, il pellet di spermatozoi è stato risospeso in una soluzione Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). Successivamente sono stati preparati i vetrini, essiccati all'aria per 20 minuti e colorati con ematossilina-eosina. Per ogni

stallone sono stati allestiti 10 vetrini ed esaminati 500 spermatozoi per prelievo. Le immagini degli spermatozoi sono state acquisite con una videocamera collegata ad un microscopio ottico con obiettivo 40x ed analizzate con un programma di analisi d'immagine (Image Pro Plus versione 4). I parametri morfometrici presi in considerazione sono stati area, diametro massimo, diametro minimo, perimetro e fattore di rotondità. I dati sono stati sottoposti al test del t di Student.

RISULTATI E CONCLUSIONI - Per il gruppo A la media della concentrazione degli spermatozoi/ml e del volume di seme gel free è stata pari rispettivamente a 354×10^6 e 42,29 ml; la motilità pari a $68,25 \pm 5,7$ con una percentuale di spermatozoi morfologicamente normali del 70% ed una percentuale di alterazioni a carico della testa pari a 10%. Nello stallone con criptorchidismo monolaterale destro (gruppo B) la media della concentrazione degli spermatozoi/ml e del volume di seme gel free è stata pari a $369,5 \times 10^6$ e 21 ml; la motilità pari a $53,5 \pm 10,6$, con una percentuale di spermatozoi morfologicamente normali del 63% ed una percentuale di alterazione della testa pari a 12%. Per lo stallone con ipoplasia ai testicoli (gruppo C) la media della concentrazione degli spermatozoi/ml e del volume di seme gel free è stata pari rispettivamente a $131,5 \times 10^6$ e 50 ml; la motilità pari a $17,5 \pm 3,5$ con una percentuale di spermatozoi morfologicamente normali del 15% ed una percentuale di alterazioni a carico della testa pari a 65% (Tabella 1).

Tab. 1 - Esame qualitativo e quantitativo del materiale seminale

Stalloni	Concentrazione spz/ml	Volume ml	Motilità %	Spz. con morfologia normale %
Gruppo A	354×10^6	42,29	$68,25 \pm 5,7$	70
Gruppo B	$369,5 \times 10^6$	21	$53,5 \pm 10,6$	63
Gruppo C	$131,5 \times 10^6$	50	$17,5 \pm 3,5$	15

I parametri morfometrici della testa degli spermatozoi degli stalloni esaminati sono riportati in Tabella 2.

Tab. 2 - Parametri morfometrici della testa degli spermatozoi

Stalloni	Area μm^2	Dia. max μm	Dia. min μm	Perimetro μm	Roudness
Gruppo A	$14,55 \pm 1,68$	$5,89 \pm 0,4$	$2,93 \pm 0,26$	$16,64 \pm 0,97$	$1,17 \pm 0,05$
Gruppo B	$14,32 \pm 1,53$	$5,87 \pm 0,31$	$2,92 \pm 0,89$	$16,70 \pm 0,27$	$1,17 \pm 0,04$
Gruppo C	$13,33 \pm 1,61$	$5,59 \pm 0,35$	$2,82 \pm 0,23$	$13,97 \pm 0,99$	$1,17 \pm 0,06$

Dall'analisi dei dati morfometrici della testa degli spermatozoi ottenuti si evidenziano statisticamente differenze significative ($P \geq 0,01$), per tutti i parametri escluso il fattore di rotondità, fra il gruppo A ed il gruppo B rispetto a quello C.

La variabilità dei diversi gruppi correlata con la percentuale di fertilità degli stessi, nonostante i pochi casi esaminati in questo studio fanno prevedere la possibilità di risultati significativi. Questa tecnica, una volta ampliato adeguatamente il campione, potrà risultare una metodica standardizzabile per la valutazione non solo della fertilità

dello stallone ma anche, visti i primi dati delle esperienze in corso, della utilizzabilità del seme per il suo congelamento.

BIBLIOGRAFIA - 1. Katz, D.F., Overstreet, J.W., Samuels, S.J., Niswander, P.W., Bloom, T.D., Lewis, E.L., Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J Androl.*, 7(4), 203-10, (1986). 2. Kruger, T.F., Acosta, A.A., Simmons, K.F., Swanson, R.J., Matta, J.F., Oehninger, S., Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril.*, 49(1),112-7, (1988). 3. Dahlbom, M., Andersson, M., Vierula, M., Alanko, M., Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology*, 48(4), 687-98, (1997). 4. Davis, R.O., Gravance, C.G., Casey, P.J., Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *Am J Vet Res.*, 54(11), 1808-11, (1993). 5. Gravance, C.G., Champion Z Liu, I.K., Casey, P.J., Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. *Anim Reprod Sci.*, 47(1-2), 149-55 (1997). 6. Ball, B.A., Mohammed, H.O., Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. *Theriogenology*, 44(3), 367-77 (1995). 7. Gravance, C.G., Liu, I.K., Davis RO, Hughes, J.P., Casey, P.J., Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 108(1), 41-6 (1996). 8. Peretti, V., Ciotola, F., Lorizio, R., Cocchia, N., De Vico, G., Solimene, R., D'Andrea, F., Barbieri, V., Considerazioni sull'utilizzo di un sistema di analisi computerizzato nella valutazione morfometrica della testa degli spermatozoi di stalloni trottatori. *Atti SISVet*, LIV, 445-446, (2000).

VALUTAZIONE DEL SEME E DEGLI ORMONI STEROIDEI IN STALLONI CON ASTENOSPERMIA GRAVE TRATTATI CON CALCIO E NALOXONE
SEMEN AND STEROIDAL HORMONE EVALUATION IN SEVERE ASTHENOSPERMIC STALLIONS TREATED WITH CALCIUM AND NALOXONE.

Nicassio M., Matarrese R., Aiudi G., De Sandro Salvati A., ¹Maggi A., Lacalandra G.M., *Dipartimento di Produzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, ¹Istituto Regionale Incremento Ippico Puglia (I.R.I.I.P), Italia.*

Parole chiave: Stallone, Astenospermia, Calcio/Naloxone, Fertilità
Key words: Stallion, Asthenospermia, Calcium/Naloxone, Fertility

SUMMARY - In many mammalian species, including equine, the normal spermatogenesis is dependent upon a functional hypothalamic-pituitary-testicular axis which involves the endocrine actions of gonadotropin, feedback mechanisms of steroids and proteins, and modulating effects of paracrine factors. Endogenous opioid peptides inhibit spermatozoa metabolism as well as LH, testosterone secretion by reducing the GnRH release. Naloxone, an opioid antagonist, can reverse steroid-induced suppression and improve spermatozoon metabolism. The aim of the work is to evaluate the effects of a therapy with calcium and naloxone on seminal parameters and steroidogenesis in asthenospermic stallions. Experimental trial lasted 8 weeks, during which stallion were used for natural mating. The treatment improved both seminal and hormonal parameters and gave good conception rate in 2/3 stallions.

INTRODUZIONE - La spermatogenesi nei mammiferi è sotto il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, attraverso i meccanismi di feedback degli steroidi, l'attività modulatrice di fattori paracrini,¹ con coinvolgimento del GnRH, di androgeni, inibina e attivina.² Diversi studi hanno dimostrato come nel testicolo sia importante la produzione di estrogeni,³ coinvolti, soprattutto a livello epididimale, nella regolazione di diverse funzioni.⁴ La produzione degli estrogeni avviene a livello delle cellule del Sertoli e del Leydig¹, ma anche delle cellule germinali.⁵ Nelle cavie è stato dimostrato che, a livello epididimale, gli estrogeni regolano il riassorbimento del fluido luminale dei dotti efferenti e che, se privati degli specifici recettori risultano infertili.⁶ Nell'epididimo di molti mammiferi sono stati individuati specifici recettori per gli estrogeni (ER α e ER β), e per gli androgeni (AR). L'AR e l'ER β sono localizzati in tutte le regioni dell'epididimo,^{7,8} l'ER α , invece, è stato rinvenuto a livello dei dotti efferenti di diverse specie, ma la sua localizzazione nell'epididimo è molto variabile sia tra le specie che intraspecie.⁹ Sono stati riscontrati nell'epididimo di stallioni postpuberi, tuttavia il loro esatto ruolo fisiologico non è ancora del tutto chiaro.^{10,11} Nell'uomo è stato dimostrato che gli estrogeni modulano la sensibilità dell'epididimo all'ossitocina, favorendo un riassorbimento di acqua e di ioni e permettendo l'adeguata concentrazione del seme.¹² Nello stallone esistono diversi fattori in grado di alterare la funzionalità riproduttiva, correlabili ad una minore secrezione di testosterone, inibina, estrogeni e ad un aumento dei livelli di FSH.¹³ L'insufficiente produzione di LH determina minore secrezione di testosterone da parte delle cellule di Leydig ed alterazione della spermatogenesi. Nello stallone l'aumento degli oppioidi endogeni interferisce negativamente, con la produzione di GnRH, LH e Testosterone e la riduzione dell'attività testicolare che si osserva al di fuori della stagione riproduttiva si associa ad un aumento di endorfine.¹⁴ Il Naloxone (Nx), un antagonista recettoriale degli oppioidi endogeni stimola, nella cavalla e nello stallone, l'increzione e il rilascio di LH.¹⁵ Sugli

spermatozoi equini sono presenti recettori μ per gli oppioidi,¹⁶ è ipotizzabile quindi che l'aumento di β -endorfina in condizioni patologiche o di stress, provoca il blocco dei canali del calcio (Ca^{++}) alterando il metabolismo della cellula spermatica. Il trattamento con Ca/Nx si è dimostrato utile nella terapia di uno stallone oligospermico.¹⁷ Sulla base di tali premesse, abbiamo voluto valutare gli effetti di un trattamento con Ca/Nx sul pattern del 17 β -estradiolo e del testosterone e sui parametri seminali di tre stalloni astenospermici.

MATERIALI E METODI - Il trattamento è stato effettuato presso l'Istituto Regionale Incremento Ippico della Puglia (Foggia; 41° 28' Lat. N) su tre stalloni nella primavera 2006 (1° marzo-1° maggio). L'anamnesi riferiva che i soggetti, utilizzati in monta naturale nella stagione precedente (2005), avevano fornito pessimi risultati: Sidoro, Murgese di 4 anni (6 q/p.v.), una sola fattrice gravida su 15; Rovito, Murgese di 5 anni (6,5 q/p.v.), nessuna gravida su 15; Sandokan, Tiro Pesante Rapido, di 4 anni (9 q/p.v.), nessuna gravida su 20 fattrici. I soggetti, sottoposti a visita clinica generale, esame obiettivo particolare ed ecografico dell'apparato riproduttore, sono risultati in buone condizioni generali e dotati di normale libido. Lo spermogramma (Tab.1) ha messo in evidenza nei primi due stalloni una grave astenospermia con concentrazione normale ($200 \times 10^6/\text{ml}$), mentre il TPR è risultato oligo-astenospermico ($60 \times 10^6/\text{ml}$). Gli stalloni sono stati trattati con una soluzione di Calcio Borogluconato 20% (Fatro, Italia) contenente 100 mg di Naloxone Cloridrato (Dyosint, Olanda) somministrata alla dose di 5ml/q/ev per 4 giorni alla settimana per 8 settimane. Sono state effettuate valutazioni dei parametri seminali ed ormonali. Il sangue è stato prelevato ogni 4 giorni per 8 settimane per il dosaggio con metodica ELFA (Enzyme Liked Fluorescent Assay) del testosterone e del 17 β -estradiolo (kit Vidas, Biomerieux, Italia). Dopo centrifugazione (3000 rpm/15 min), il siero è stato stoccato a -20°C fino al momento della determinazione. In seguito al trattamento gli stalloni sono stati utilizzati in monta naturale su 30 fattrici. I dati ottenuti sono stati statisticamente analizzati con ANOVA test.

RISULTATI E DISCUSSIONE - La valutazione del seme post trattamento ha evidenziato che la motilità è migliorata in tutti i soggetti, pur mantenendosi al di sotto dei valori fisiologici. Nel soggetto TPR (Sandokan) la concentrazione è aumentata nettamente (60×10^6 vs 120×10^6 , Tab.1). Al miglioramento dei parametri seminali, è corrisposto un incremento delle percentuali di gravidanza (6,6% vs 100% per Sidoro; 0% vs 83,3% per Rovito), ad eccezione di Sandokan, il quale anche dopo trattamento, non è stato in grado di determinare alcuna gravidanza.

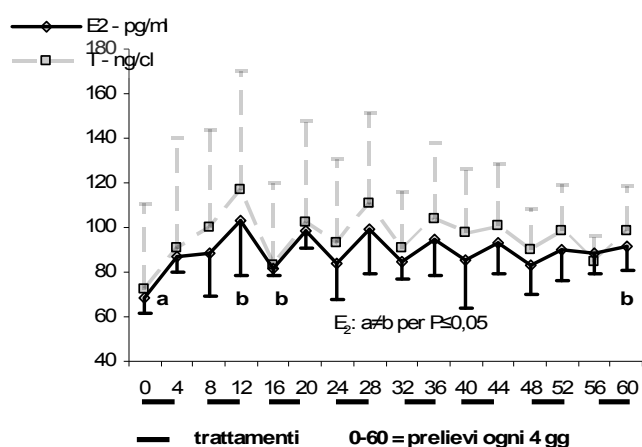
Tab. 1 - Parametri seminali e risultati di fertilità in stalloni astenospermici trattati con Calcio e Naloxone

PARAMETRI	STALLONI					
	SIDORO		ROVITO		SANDOKAN	
	Pre-tratt.	Post-tratt.	Pre-tratt.	Post-tratt.	Pre-tratt.	Post-tratt.
Volume (ml)	130 gel+++	120 gel+	120	120	80	80
Conc. (spz/ml - $\times 10^6$)	200	200	200	200	60	120
Motilità totale (%)	20	40	0	30	1	30
Gravide/coperte (%)	1/15 (6,6)	4/4 (100)	0/15 (0)	5/6 (83,3)	0/20 (0)	0/20(0)

I livelli ormonali mostrano un andamento chiaramente correlato ai cicli di trattamento. Ad ogni ciclo di somministrazione è corrisposto un aumento dei livelli ematici di testosterone ed estradiolo. In particolare, il 17- β estradiolo (pg/ml), ha mostrato variazioni statisticamente significative ($P < 0,05$) dal giorno 0 vs i giorni 12, 16 e 60 ($68,26 \pm 6,8$ vs $102,96 \pm 24,5$); ($68,26 \pm 6,8$ vs $82,75 \pm 2,7$); ($68,26 \pm 6,8$ vs $91,9 \pm 11,3$) (Graf.1). Dopo il picco registrato al 12° giorno i livelli di entrambi gli ormoni sono leggermente

diminuiti, pur mantenendosi al di sopra dei valori iniziali pre-trattamento, fino alla fine della terapia. I dati ottenuti consentono di correlare positivamente il miglioramento dei parametri seminali ed ormonali al trattamento terapeutico sperimentale. È ipotizzabile pertanto che, almeno nei due soggetti che hanno risposto positivamente al trattamento (Sidoro e Rovito), l'infertilità possa ricondursi all'effetto stress-indotto dall'aumento delle endorfine. La somministrazione di Calcio e Naloxone ha determinato, sia attraverso la modulazione degli equilibri ormonali sia direttamente sulla funzionalità testicolare, il miglioramento delle caratteristiche qualitative del seme. Il particolare andamento degli steroidi, aumentati parallelamente ai cicli di somministrazione, costituiscono la base per ulteriori studi anche di rivalutazione del protocollo terapeutico ed incoraggiano a proseguire le ricerche, ampliando la casistica e approfondendo soprattutto il ruolo degli estrogeni sull'attività funzionale del testicolo e dell'epididimo nello stallone.

Graf. 1 - Variazioni medie (\pm ds) di 17 β -estradiolo e testosterone in stalloni (n=3) trattati con Calcio e Naloxone



BIBLIOGRAFIA - 1. McKinnon, A.O., Voss, J.L.: Equine reproduction. (Eds), A.R.S. Philadelphia, Lea e Febiger, 68, 139–151, (1993). **2.** Muyan, M., et al., Modulation of gonadotropin releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male equine anterior pituitary cells by gonadal steroids. *Biology Reproduction*, 49, 340-345, (1993). **3.** Stewart, B.L., Roser J. F., Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. *Dom. Anim. Endocrinol.* 63, 1873-80, (1998). **4.** Parlevliet, J.M., et al., Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentration in the stallion epididymis. *Theriogenology*, 66, 755-765, (2006). **5.** Carreau, S., Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 178 (1-2), 65-72, (2001). **6.** Hess, R.A., Carnes, K., The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim. Reprod.*, 1, 5-30, (2004). **7.** Nie, R., et al., Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. *Biology Reproduction*, 66, 1161-8, (2002). **8.** Yamashita, S., Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissue of mice and rats. *Anac. Rec.*, 279A, 768-78, (2004). **9.** Hess, R.A.: Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1, 52, (2003). **10.** Hejmej, A., et al., Expression of aromatase and oestrogen receptors in reproductive tissue of the stallion and a single cryptorchid visualised by means of immunohistochemistry. *Domestic Animal Endocrinology*, 29,534-47, (2005). **11.** Bilinska, B., Hejmej, A., Gangarczyk, M., Sadowska, J., Immunoexpression of androgen receptors in the reproductive tract of the stallion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 227-9, (2005). **12.** Vignozzi, L., et al., Oxytocin receptor is expressed in the penis and mediates an estrogen-dependent smooth muscle contractility. *Endocrinology* 145(4),1823-34, (2004). **13.** Roser, J.F., Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 68, 139-151, (2001). **14.** Aurich, C., Burgmann, F., Hoppe, H., Opioid regulation of LH and prolactin release in the horse - identical or independent endocrine pathways?. *Anim. Reprod. Sci.* 44, 127-134, (1996). **15.** Aurich, C., et al., Dopaminergic and Opioidergic Regulation of Gonadotropin and Prolactin Release in Stallions. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 335-340, (2002). **16.** Albrizio, M., et al., Expression and subcellular localization of the mu-opioid receptor in equine spermatozoa: evidence for its functional role. *Reprod.*, 129, 39-49, (2005). **17.** Lacalandra, G.M., et al., Qualità del seme e livelli plasmatici di testosterone in uno stallone oligospermico dopo trattamento con Naloxone e Calcio. *Atti S.I.R.A.*, II, Vico Equense (Na), 8-10 Aprile, 108-112, (2003).

EFFICIENZA RIPRODUTTIVA DI CAVALLE TRATTATE CON INFUSIONE ENDOUTERINA DOPO FECONDAZIONE STRUMENTALE ED OVULAZIONE

REPRODUCTIVE EFFICIENCY OF MARES TREATED WITH INTRAUTERINE INFUSION AFTER ARTIFICIAL INSEMINATION AND OVULATION

Parmigiani E., Bigliardi E., Morini G., Di Ianni F., Bresciani C., Ferrari L., Vecchi I., Buddemeier J., Di Ciommo F., *Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Clinica Ostetrica e Riproduzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma*

Parole chiave: Endometrite, Cavalla, Infusione Endouterina Post-I.A.

Key words: Endometritis, Mare, Intrauterine Infusion Post-A.I.

SUMMARY - The aim of the present study was to verify if an post-breeding and post-ovulation intrauterine antibiotic infusion was able to increase the reproductive efficiency of mare with mild endometritis. The Authors considered a total of 56 mares with diagnosed endometritis, 45 of them were treated with an association of 6.000.000 I.U. of penicillin G procaine and 7,50 gr diidrostreptomicine sulfate intra-uterus 24 hours after ovulation, 11 represented the control. The treatment has shown to be very useful and the comparison between the pregnancy rates has been highly significant ($P < 0,01$).

INTRODUZIONE - L'endometrite di origine batterica e non^{5,11} è da decenni una delle principali e più gravi cause di infertilità nella cavalla. Per quanto riguarda l'eziologia ormai esiste fra i Ricercatori la convinzione generale che i momenti critici in cui la cavalla contrae l'endometrite siano il parto, specialmente quando distocico ed aiutato con manipolazioni ostetriche traumatiche ed igienicamente scadenti, l'inseminazione artificiale, eseguita in modo non corretto oppure il coito eseguito utilizzando uno stallone infetto, il tutto complicato da scarse difese organiche della fattrice^{3,5,13}. Per quanto riguarda la terapia invece sono stati messi a punto protocolli e tecniche tra le più disparate, eseguite sia prima dell'intervento fecondativo^{4,5,6,10}, sia dopo l'intervento fecondativo^{7,9,10,15}, sia dopo l'ovulazione.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di verificare l'efficacia di un trattamento intrauterino post-ovulazione con penicillina G procaina (6.000.000 U.I.) e 7,50 gr di diidrostreptomicina solfato nell'aumento dell'efficienza riproduttiva di cavalle affette da endometrite cronica di grado lieve.

MATERIALI E METODI - Sono state prese in considerazione 56 fattrici di età variabile da 6 a 20 anni (media=11,5) in parte ospitate presso la stazione di monta della nostra Facoltà negli ultimi due anni ed in parte visitate presso altri allevamenti da uno degli Autori del presente lavoro. Le 45 cavalle trattate erano fattrici vuote dalla stagione di monta precedente, con storie di ripetuti interventi fecondativi durante diversi cicli estrali senza alcun esito positivo, oppure fattrici già inseminate almeno per due cicli senza esito presso la nostra stazione di monta (Tabella 1). Il controllo era rappresentato da fattrici presenti in allevamenti in cui è stato inviato il seme refrigerato oppure fattrici vuote presso la nostra stazione ed inseminate per almeno due cicli estrali senza esito positivo. Tutte le cavalle giunte presso la nostra clinica e inserite nel gruppo di trattamento sono state sottoposte ad esame ecografico associato a tampone cervico-uterino e nei casi in cui entrambi o uno degli esami risultava positivo per endometrite, la cavalla veniva sottoposta ad un lavaggio endouterino con un litro di soluzione elettrolitica associata a piccoli quantitativi di H₂O₂ e *betadine washing* seguita da

infusione con Rifaximina spray 300 mg di principio attivo in veicolo gassoso (Fatroximmin Schiuma, Fatro, Italia). Dopo un periodo di attesa volontaria di 10 giorni, le fattrici venivano indotte in estro con PGF_{2α} (Dalmazin, Fatro, Italia) e controllate ecograficamente ogni 24 ore durante la fase estrale normale e sottoposte ad ecografia ogni 12 ore durante la fase ovulatoria in modo da ridurre al minimo il numero di interventi fecondativi. Le cavalle sono state fecondate con seme fresco, refrigerato proveniente da altri centri stallonieri e congelato. 24 ore dopo l'avvenuta ovulazione sono state trattate per via endouterina con 6.000.000 U.I. di penicillinaG procaina e 7,50 gr di diidrostreptomomicina solfato (Repen, Fatro, Italia). Subito dopo l'infusione sono state sottoposte a plastica vulvare secondo il metodo *Caslick* in modo da evitare qualsiasi possibilità di reinfezione. I risultati ottenuti sono stati analizzati statisticamente (Tabella 1).

TABELLA 1 - Efficienza riproduttiva in fattrici affette da endometrite dopo trattamento intrauterino con associazione antibiotica* 24 ore dopo I.A. ed ovulazione

N° FATTRICI		N° interventi I.A. durante lo stesso ciclo (media ± s.d.)	N°(%) Gravidanze
TRATTATE	CONTROLLO		
45		1,7 ± 1,2	42 (93,3) ^o
	11	1,8 ± 1,1	3 (27,2) ^o

^o Il confronto fra le percentuali è altamente significativo (χ^2) per P<0,01

* Repen, Fatro, Italia)

RISULTATI DISCUSSIONE E CONCLUSIONI - I principali germi isolati tramite tampone cervico-uterino sono stati: *Streptococcus spp.*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Staphylococcus spp.*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *C. pyogenes*, sapendo però che il tampone ha dei limiti in riferimento alla capacità di isolamento di germi patogeni, noi abbiamo trattato le cavalle anche quando con tampone negativo l'utero mostrava presenza di essudato. Come mostra la Tabella 1 il numero di interventi fecondativi per il ciclo considerato è stato inferiore a due sia per il gruppo di studio che per il controllo al fine di ridurre al minimo la possibilità di infezione conseguente ad I.A. e che nel gruppo di studio la percentuale di gravidanza è stata del 93% rispetto al controllo che ha avuto solo il 27%, il confronto fra le percentuali è stato altamente significativo (P<0,01).

Mentre prima si riteneva che le endometriti potessero essere solo di origine batterica^{1,2,13} ora si sa che il seme stesso introdotto in utero viene considerato dalla fattrice alla stregua di batteri e quindi viene messo in atto una reazione organica che culmina con un notevole aumento della produzione di polimorfonucleati (PMN) i quali tenderebbero a distruggere anche il materiale seminale il quale viene a sua volta protetto dal plasma seminale¹². Per chi centrifuga il seme quindi si tratta di mantenere un giusto equilibrio fra numero di giri e tempo di centrifugazione in modo che il plasma seminale possa essere solo un fattore positivo in ogni caso. Le endometriti sono state trattate sia nei decenni passati che attualmente nei modi più disparati: alcuni Autori consigliano la somministrazione di prostaglandina associata ad ossitocina 48 ore prima dell'ovulazione, altri eseguono lavaggi endouterini 24-48 ore dopo l'ovulazione e l'inseminazione^{3,4,7,9,10,11,14}. Noi pensiamo che sia importantissimo preparare l'utero affinché il seme una volta introdotto si trovi in condizioni ideali per risalire l'apparato riproduttore ed in caso dopo la risalita del materiale seminale restino tracce di processo infiammatorio l'infusione post-ovulazione contribuisce a preparare l'ambiente idoneo che l'embrione dovrà trovare al quinto giorno quando scenderà nell'utero ed inizierà tutte le migrazioni che porteranno poi all'impianto verso il 15° giorno. In conclusione considerando i risultati ottenuti anche per questa stagione di monta noi usiamo la metodica sopradescritta ed i risultati mostrano che è altamente consigliabile.

BIBLIOGRAFIA - 1. Bennett, D.G., Therapy of endometritis in mares. *JAVMA*, 188 (12): 1390, (1986). 2. Hughes, J.P., Loy, R.G., Investigations on the effect on intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. In *Proceedings AAEP*, 15: 289-292, (1969). 3. Hurtgen, J.P., Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. *Theriogenology*; 66: 560-566, (2006). 4. Le Blanc, M.M., Oxytocin – the new wonder drug for treatment of endometritis? *Eq. Vet. Educ.*, 6: 39-43, (1994). 5. Parmigiani, E., Truszkowska, B., Terapia dell'endometrite nella bovina e nella cavalla. *Summa*, VII (1); 43-46, (1990). 6. Pycock, J.F., Assessment of oxytocin and intrauterine antibiotics on intrauterine fluid and pregnancy rates in the mare. In *Proceedings AAEP*, 40: 19-20, (1994). 7. Pycock, J.F., Newcombe J.R., Assessment of the effect of three treatment to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare. *Veterinary Record*, 138: 320-323, (1996). 8. Rasch, K., Schoon, H-A, Sieme, H., et al. Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rates in mares. *Eq. Vet Journal*; 28: 455-472, (1996). 9. Troedsson, M.H.T., Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, 52: 461-471, (1999). 10. Troedsson, M.H.T., Ohlgren, A.F., Ababneh, M., et al., Effect of periovulatory prostaglandin F₂α on pregnancy rates and luteal function. *Theriogenology*, 55: 1891-1899, (2001). 11. Troedsson MHT, Equine endometritis: still an important problem in equine practice. *Proceedings XIII SIVE Congress*, 13: 79-81, (2007). 12. Troedsson M.H.T., Clinical importance of sperm transport and elimination from the mare's reproductive tract. *Proceedings XIII SIVE Congress*, 13: 85-87, (2007). 13. Valon, F., Etiologie des endométrites infectieuses chez la jument. *Rec. De Méd. Vét.*, 2: 147, (1987). 14. Watson, D.E., Post-breeding endometritis in the mare. *Animal Reproduction Science*, 60-31: 221-232, (2000). 15. Zent, W.W., Troedsson, M.H.T., Post breeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. *Proceedings AAEP*, 44: 64-65, (1998).

**CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE DELLA PLACENTA A TERMINE
NELL'ASINA DI MARTINA FRANCA**
MORPHOLOGICAL FEATURES OF AT TERM FOETAL MEMBRANES IN
MARTINA FRANCA JENNIES

Carluccio A., ¹Panzani S., ²Riccaboni P., Contri A., ²Rondena M., ¹Veronesi M.C.,
*Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Teramo; ¹Dipartimento di Scienze
Cliniche Veterinarie, Milano; ²Dipartimento di Patologia Animale Igiene e Sanità
Pubblica, Milano*

Parole chiave: Asino, Placenta, Morfologia

Key words: Donkey, Foetal Membranes, Morphological Features

SUMMARY - The aim of the present study was to describe the placenta in full-term, normal, spontaneous parturition Martina Franca jennies, in order to increase the knowledge in the puzzled pictures of reproduction in this species. The study was conducted on 10 Martina Franca jennies, 5-18 years old, monitored to assess the normal evolution of pregnancy and foetal viability. The placenta was checked for the evaluation of integrity and gross characteristics. Amnion, allantochorion, cord and total placental weights and amnion, allantochorion, cord and total placental volumes were measured. Surface area of allantochorion, cord length and cord vessels diameter were measured too. An histological exam was also performed. The obtained results showed that donkey placenta is very similar to the horse one, above all when ponies are concerned.

INTRODUZIONE - Nei mammiferi il corretto sviluppo e la vitalità fetali sono garantiti dall'integrità anatomica e dall'efficienza funzionale della placenta. La conoscenza delle caratteristiche morfologiche della placenta normale è di rilevante importanza, infatti consentirebbe il pronto riconoscimento di anomalie che potrebbero interferire con il corretto sviluppo e con la vitalità del feto. Diverse indagini sono state condotte sulle caratteristiche morfologiche della placenta della cavalla, non altrettanto si può dire per quanto riguarda la placenta asinina. Con l'intento di ampliare le conoscenze sui principali aspetti riproduttivi dell'asina, quale potrebbe essere il normale evolversi della gravidanza, abbiamo indagato alcune caratteristiche morfologiche della placenta a termine nell'asina di Martina Franca.

MATERIALI E METODI - Lo studio ha interessato 10 asine di Martina Franca, di 5-18 anni, stabulate presso il Rustico di Chiareto della Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo. Le asine sono state monitorate per tutta la gravidanza, onde verificarne il normale svolgimento, ed assistite al parto per controllare la nascita spontanea dei feti. Sono stati registrati i dati relativi alla durata della gestazione, all'età ed al peso delle asine, e, per quanto riguarda i neonati, il sesso ed il peso, rilevato entro 30 minuti dalla nascita e prima dell'inizio della suzione. La valutazione dell'integrità e delle caratteristiche macroscopiche delle placente è stata eseguita in accordo con quanto riportato per la cavalla¹. Sono stati misurati i pesi dell'amnios (AP), dell'allantocorion (ALP), del cordone ombelicale (COP) e della placenta in toto (TP), così come i volumi: amnios (AV), allantocorion (ALV), cordone ombelicale (COV) e placenta in toto (TV) e la superficie allantocoriale (ALS). Sono stati registrati anche la lunghezza del CO ed il diametro dei vasi ombelicali.

Esame istologico - Dalle placente sono stati prelevati campioni a tutto spessore (3x4 cm circa), corrispondenti al corpo dell'utero, al corno gravido, al corno non gravido ed alla stella cervicale, immediatamente fissati in una soluzione di formalina tamponata al

10%. I campioni sono stati inclusi in paraffina, avendo cura di imprimere una curvatura che conferisse convessità alla superficie coriale e concavità a quella allantoidea, per ottenere una migliore distensione dei villi. Dai campioni sono state ottenute sezioni di 4 µm di spessore colorate poi con ematossilina-eosina. L'esame istologico dei preparati era mirato alla descrizione della struttura placentare, al rilievo delle alterazioni morfologiche ed alla distribuzione dei villi coriali. Quest'ultimo parametro veniva valutato contando i villi in almeno 4 campi d'osservazione microscopica a basso ingrandimento (4x) in ciascuna delle differenti porzioni placentari.

RISULTATI - In tabella 1 sono riportati i rilievi clinici delle 10 asine prese in esame e dei relativi neonati.

Tabella 1. Dati clinici (media±DS) delle 10 asine e relativi neonati

Madre		Gravidanza (gg)	Espulsione (min)		Neonato Peso (kg)
Età (anni)	Peso (kg)		Feto	Placenta	
11,8±4,61	305±48,81	368,7±6,91	11,7±2,11	29,3±27,18	28,7±4,76

I risultati della valutazione macroscopica delle placente sono esposti in tabella 2.

Tabella 2. Dati (media±DS) delle caratteristiche macroscopiche delle 10 placente

AP (kg)	ALP (kg)	COP (kg)	TP (kg)	AV (l)	ALV (l)	COV (ml)	TV (l)
0,6±0,19	1,6±0,42	0,14±0,05	2,3±0,58	0,6±0,19	1,5±0,31	128,8±62,79	2,2±0,46

Per la valutazione macroscopica degli invogli fetali, l'allantocorion è stato disteso su una superficie, con la classica disposizione a "F" con la stella cervicale in basso, la porzione principale del corno gravido a formare la linea verticale della "F", la porzione più ampia dello stesso il braccio superiore della "F" ed il corno non gravido il braccio inferiore. La superficie allantocoriale è risultata pari a 10670±1664,70 cm². Tutte le placente sono risultate completamente integre e con il corno gravido di lunghezza maggiore rispetto a quello non gravido (57,3±11,88 vs 46,4±9,73 cm). Il corion appariva come un tessuto vellutato e rossastro per la presenza dei villi. In quasi tutte le placente sono state identificate alcune aree prive di villi in corrispondenza della stella cervicale, delle pieghe endometriali e dell'apice del corno gravido. In corrispondenza di quest'ultimo, in particolare, è stata riscontrata in 9 placente una placca ispessita, edematosa, priva di villi, ricoperta da materiale di colore rosso scuro. Diversamente dalla placenta equina, non sono state rilevate zone prive di villi in corrispondenza delle coppe endometriali. In 3 casi, piccole emorragie sono state rilevate intorno alla stella cervicale e al punto di lacerazione. L'amnion appariva di colore biancastro con riflessi rosa/giallastri, traslucido, con qualche area edematosa e con la presenza di ippomani. La lunghezza del cordone ombelicale, misurata dopo la sua distensione per la presenza di avvitamamenti sia in senso orario che antiorario, è stata di 62±11,02 cm. Al suo interno erano contenuti l'uraco, 2 arterie e una vena nella porzione amniotica, mentre in quella allantoidea 2 arterie e 2 vene di simile diametro, insieme a diversi vasi di dimensioni più ridotte, soprattutto intorno all'uraco. I diametri dei vasi placentari, misurati con il calibro nel tratto mediano, oscillavano da 0,76±0,11 a 0,62±0,14 mm per le due arterie e da 0,71±0,22 a 0,58±0,16 mm per le vene.

Esame istologico - La superficie coriale della placenta asinina è ricoperta da villi ramificati, costituiti da uno stroma fibrovascolare rivestito da epitelio cubico, mentre alla base dei villi le cellule epiteliali diventano più voluminose e spesso mostrano citoplasma schiumoso. Per altezza e distribuzione, i villi non mostrano particolari differenze in funzione della sede, variando da 4 a 5 per campo d'osservazione microscopica in tutti i distretti con l'eccezione della regione cervicale dove si diradano

diventando corti e tozzi. Di riscontro assai frequente sono reperti d'accumulo di emosiderina, mentre solo in un caso (sezione di corno gravido) era presente una lieve infiltrazione granulocitaria neutrofilica focale. Lo stroma è composto da una porzione superficiale, costituita da uno strato di tessuto connettivo compatto modicamente vascolarizzato, e da una porzione profonda, più lassa e più vascolarizzata. Sul versante opposto è presente l'allantoide, che è diviso dallo stroma fibrovascolare da spazi otticamente vuoti, residui del celoma extra embrionario.

DISCUSSIONE - Lo scopo di questo lavoro è stato quello di descrivere le caratteristiche della placenta dell'asina di Martina Franca. Sebbene il numero di animali esaminati sia ridotto, esso rappresenta comunque un campione pari al 4% della popolazione asinina di razza Martina Franca attualmente presente sul territorio nazionale. Tutte le asine hanno partorito spontaneamente dopo una gravidanza normale. I tempi di espulsione del puledro e della placenta sono simili a quanto riportato nella cavalla^{2,3}. Tutti i feti (5 maschi e 5 femmine) sono nati maturi, vivi e vitali, così che le placente esaminate, prive di anomalie macroscopiche, possono essere considerate rappresentative di condizioni di normalità. Ad una valutazione macroscopica, la placenta riprende, come nella cavalla, la classica configurazione a "F" quando distesa su una superficie. La superficie allantocoriale della placenta asinina appare vellutata e rossastra e, come nella cavalla, la placca priva di villi, che si riscontra frequentemente a livello dell'apice del corno gravido, non appare correlata ad alterazioni del benessere fetale^{1,4}. L'analisi delle caratteristiche placentari mostra come il peso delle membrane fetali totali, così come il peso dell'allantocorion e dell'amnion separati, siano inferiori rispetto a quelli della cavalla (5,7, 3,6 e 1,85 kg, rispettivamente), ma più simili a quelli riportati per i ponies. Il peso totale della placenta rappresenta circa il 12% del peso del neonato alla nascita, leggermente più alto dell'11% riportato nella cavalla¹. È interessante sottolineare che la lunghezza del cordone ombelicale è simile a quella riscontrata nella cavalla (36-83 cm)³, mentre il peso del cordone asinino è intermedio tra quello della cavalla e quello dei ponies¹. A differenza di quanto osservato nella placenta della cavalla⁵ non abbiamo notato differenze considerevoli nel numero e nella dimensione dei villi, tutti apparentemente rigogliosi, nelle diverse sedi placentari. È ipotizzabile che l'apparato di scambio utero-placentare dell'asina sia complessivamente meno efficiente rispetto a quello della cavalla. Infatti per produrre un neonato maturo, con un rapporto ponderale madre/neonato (9,4% vs 9,3%) e placenta/neonato (12% vs 11%) simili a quelli della cavalla, l'asina deve prolungare la gestazione. La presenza di emosiderina potrebbe essere segno di pregresse emorragie, dovute alla frequente rottura di piccoli vasi ematici all'interno dei villi o nello stroma superficiale, ma, considerata la costanza del reperto in gravidanze giunte regolarmente a termine, questo riscontro appare di scarso impatto funzionale. I risultati del presente studio, pur confermando quanto riportato in precedenti studi^{6,7} sulla somiglianza tra placenta asinina e placenta equina, in particolare con quella dei ponies, evidenziano una minor efficienza dell'unità feto-placentare dell'asina.

BIBLIOGRAFIA - 1. Withwell, K.E., Jeffcott, L.B. Morphological studies on the fetal membranes of the normal singleton foal at term. *Res. Vet. Sci.*, 19, 44-55, (1975). 2. Arthur, G.H. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 4th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, (1975). 3. Morresey, P.R., Prenatal and perinatal indicators of neonatal viability. *Clinical techniques in Equine Practice*, 4(3), 238-249, (2005). 4. Oikawa, M. et al., Morphology of equine allantochorion at the tip of the pregnant horn. *J. Comp. Pathol.*, 103, 343-349, (1990). 5. Veronesi, M.C. et al., Potential association between placental features and APGAR scores after normal parturition in the Thoroughbred horse. *J. Anim. Vet. Adv.*, 4(12), 965-970, (2005). 6. Leiser, R., Kaufmann, P. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 102(3): 122-134, (1994). 7. Allen, W.R., Short, R.V., Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. *J. Hered.*, 88(5), 384-392, (1997).

INFLUENZA DELLA STAGIONE E DEL DILUITORE SULLA CONSERVABILITÀ DEL MATERIALE SEMINALE ASININO REFRIGERATO

**INFLUENCE OF SEASON AND TYPE OF EXTENDER ON JACKASS SEMEN
COOLING PRESERVATION**

Contri A., Tosi U., De Amicis I., ¹Veronesi M.C., ¹Panzani S., Carluccio A.,
Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Teramo;
¹Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Milano

Parole Chiave: Asino, Seme, Refrigerazione

Key Words: Donkey, Semen, Cooling

SUMMARY - The aim of this study was to evaluate the influence of season (May-June vs November-December) and extenders (INRA 96 vs E-Z Mixin) on chilled semen preservation in Martina Franca donkey. Total and gel-free volume, pH, concentration, progressive motility and viability, of fresh semen were not influenced by season. However, the results highlight the strong influence of season on progressive motility and viability over 24 hours at 4°C. The extender has also an influence on preservation, with better results obtained with INRA 96 as compared to EZ-Mixin, in both May-June and November-December collections.

INTRODUZIONE - Negli equidi, la crioconservazione dei gameti maschili diversamente da altre specie, presenta difficoltà tecnico-metodologiche, maggiori costi di produzione ed un minor tasso di fecondità¹. Il rischio d'estinzione di diverse razze così come l'interesse per la produzione di latte asinino per il trattamento delle intolleranze alimentari pediatriche² e per il sociale, hanno incentivato la ricerca sulle tematiche riproduttive nell'asino con particolare interesse sugli effetti della conservazione del materiale seminale^{3,5}. Nel cavallo, che presenta un'attività riproduttiva stagionale, la longevità del materiale seminale refrigerato nel periodo autunno-inverno non è stata approfondita. La specie asinina non sembra presentare una stagionalità riproduttiva⁶, per cui lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare gli effetti della stagione di raccolta e del tipo di diluitore sulla conservabilità del materiale seminale refrigerato dello stallone asinino di razza Martina Franca.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto su 6 stalloni asinini di razza Martina Franca di età compresa fra 4 e 9 anni, funzionanti presso la Stazione di Monta del Fondo Rustico di Chiareto della Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo. Per ogni stallone, a riposo sessuale da almeno una settimana, sono state effettuate due raccolte di materiale seminale, a distanza di un'ora, mediante vagina artificiale modello Missouri ed asina in estro spontaneo. Le raccolte sono state ripetute ogni 10 giorni per 3 volte e la sequenza dei prelievi è stata eseguita nei mesi di maggio-giugno (MG) e in novembre-dicembre (ND) per valutare l'influenza della stagione. Il materiale seminale proveniente dalla seconda raccolta è stato valutato considerando: il volume totale e gel-free, la concentrazione (camera di Burker), la motilità progressiva (IVOS 12.3, Hamilton Thone Biosciences) e la vitalità nemaspermica, valutata sull'integrità della membrana di almeno 200 spermatozoi per campione, attraverso l'impiego di ioduro di propidio e di SYBR-14 (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Molecular Probe)⁷. Il materiale seminale è stato suddiviso in due aliquote diluite con INRA 96® (INRA - IMV Technologies Italia s.r.l.) (dIN) o E-Z Mixin® (ARS, Inc., USA) (dEZ) fino ad ottenere una concentrazione di 50×10^6 spermatozoi/ml e centrifugato a $800 \times g$ per 15 minuti. I pellet, dopo allontanamento del surnatante, sono stati risospesi con uno dei due

diluenti fino a ripristinare il volume iniziale. I campioni posti in Equitainer[®] (Hamilton Thorne Biosciences) per 24 ore, sono stati infine trasferiti in frigorifero termostato (4°C). La motilità progressiva e la vitalità sono state valutate prima della conservazione (tempo 0) e successivamente ogni 24 ore su un'aliquota di 1 ml riportata a 37°C per 10 minuti.

L'effetto della stagione sulle caratteristiche del materiale seminale è stato indagato mediante ANOVA, così come l'influenza del diluente sulla motilità progressiva e sulla vitalità. L'effetto del tempo sulla longevità (motilità progressiva e vitalità) è stato valutato mediante lo Student's *t* Test. Le differenze sono state considerate significative per $P \leq 0,05$.

RISULTATI - La media (\pm D.S.) delle caratteristiche del materiale seminale raccolto nei sei soggetti, nei due periodi considerati, è riportata in tabella 1.

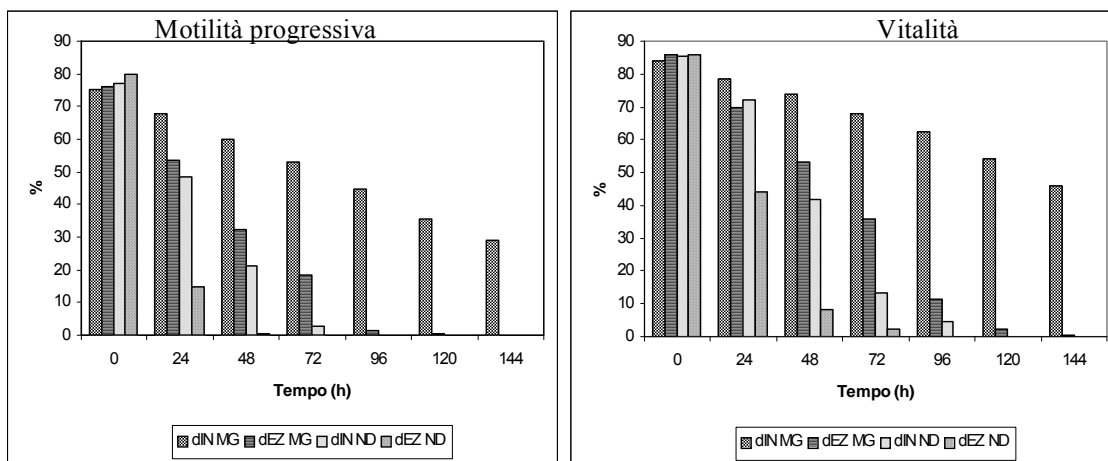
Tabella 1 - Caratteristiche del materiale seminale (media \pm D.S.) in funzione della stagione (MG e ND) nei 6 stalloni asinini

Parametri	Periodo MG	Periodo ND
	Media \pm D.S.	Media \pm D.S.
Volume (ml)	96,0 \pm 26,1	107,2 \pm 41,6
Volume gel-free (ml)	80,2 \pm 18,4	90,0 \pm 43,4
pH	7,5 \pm 0,1	7,6 \pm 0,2
Concentrazione ($\times 10^6$ spz/ml)	310,2 \pm 69,8	350,4 \pm 139,7
Motilità progressiva (%)	75,4 \pm 4,2	76,6 \pm 4,8
Vitalità (%)	83,2 \pm 5,7	86,8 \pm 5,4

I parametri seminologici considerati non presentano differenze significative in funzione della stagione di raccolta.

I dati relativi all'andamento della motilità progressiva e della vitalità del materiale seminale refrigerato con dIN e dEZ nei periodi MG ed ND sono riportati in figura 1.

Figura 1 - Andamento della motilità progressiva e della vitalità del materiale seminale refrigerato con dIN e dEZ nei periodi MG ed ND nei 6 stalloni asinini



Il materiale seminale presentava, al tempo 0, valori di motilità progressiva e vitalità sovrapponibili nei periodi di raccolta MG ed ND. Nel periodo MG il seme diluito con dIN ha sempre presentato, a partire dalle 24 ore di refrigerazione, motilità progressiva ($68 \pm 5,4\%$ vs $53,5 \pm 9,6\%$) e vitalità ($78,5 \pm 5,3\%$ vs $69,8 \pm 7,9\%$) statisticamente superiori ($P \leq 0,05$) rispetto a dEZ. Nel periodo ND è stato evidenziato il medesimo effetto del diluente a partire dalle 24 ore di conservazione, con valori di motilità progressiva e vitalità migliori per dIN ($48,4 \pm 4,8\%$ e $72 \pm 6\%$) rispetto a dEZ ($15 \pm 3,5\%$ e $44,1 \pm 5,8\%$)

($p \leq 0,05$). Tuttavia i valori, per entrambi i diluitori, sono stati inferiori rispetto a quelli ottenuti con le raccolte nel periodo MG ($P \leq 0,05$).

DISCUSSIONE - La qualità del materiale seminale fresco nell'asino di Martina Franca non sembra essere influenzata dal momento dell'anno in cui è effettuata la raccolta. Le differenze fra il volume totale e gel-free, il pH e la concentrazione nel periodo Maggio-Giugno rispetto a quello Novembre-Dicembre non sono risultate statisticamente significative. Nel periodo invernale, tuttavia, è stata riscontrata una maggiore variabilità individuale per il volume totale, gel-free e la concentrazione. I risultati da noi ottenuti sono in accordo con quanto riportato nel cavallo⁸, in cui sono state riscontrate variazioni annuali non significative dei medesimi parametri pur con una variabilità individuale molto limitata.

Diversamente, la conservabilità del materiale seminale asinino sembra essere fortemente influenzata dal diluitore e dalla stagione di raccolta. In particolare, l'impiego dell'INRA ha consentito la conservazione del materiale seminale a 4°C fino a 120 ore con motilità progressiva e vitalità soddisfacente (36% e 54%, rispettivamente) durante il periodo MG. Al contrario, il seme diluito con E-Z Mixin ha presentato percentuali accettabili di motilità progressiva e vitalità (32% e 53%, rispettivamente) solo fino a 48 h, confermando quanto riportato in letteratura per i diluitori a base di latte scremato³.

I dati sulla conservabilità del seme refrigerato asinino nel periodo ND ottenuti in questo studio, radicalmente inferiori rispetto a quelli riscontrati durante il periodo di massima attività riproduttiva, sono a nostro avviso da imputare all'influenza diretta della stagione sulla membrana nemaspermatica. Questo riscontro non può purtroppo essere confermato dalla bibliografia per l'assenza di studi sulla conservazione del materiale seminale refrigerato raccolto nel periodo autunno-invernale nell'asino, così come nel cavallo. Nel cavallo è stata studiata l'influenza della stagione sulla qualità del seme dopo congelamento, con risultati controversi. Blotner et al.⁹ hanno riscontrato una riduzione rilevante della motilità dopo crioconservazione nel mese di dicembre rispetto a maggio. Al contrario Jannett et al.⁸ hanno evidenziato una motilità post-congelamento significativamente maggiore per il materiale seminale crioconservato in autunno-inverno rispetto a quello in primavera-estate. La stagione potrebbe influenzare la qualità del materiale seminale dopo crioconservazione o refrigerazione attraverso il medesimo meccanismo, con una modificazione nella composizione della membrana nemaspermatica.

In conclusione, nel presente studio la conservabilità del materiale seminale asinino sembra essere fortemente influenzata dalla stagione di raccolta e dal diluitore impiegato per la refrigerazione.

BIBLIOGRAFIA - 1. Samper, J., Morris, C.A., Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*, 49, 895-903, (1998). 2. Carroccio, A. et al., Evidence of very delayed clinical reactions to cow's milk in cow's milk-intolerant patients. *Allergy*, 55, 574-579, (2000). 3. Santos, G.F., et al., Effect of cooling system and rate of cooling on sperm quality of donkey semen preserved at 5°C. *Biol. Reprod. Mono.*, 1, 761-767, (1995). 4. Cottorello, A.C.P. et al. Effect of storage temperature and extenders on "in vitro" activity of donkey spermatozoa. *Theriogenology*, 58, 325-328, (2002). 5. Rota, A. et al., Effetto della centrifugazione e della rimozione del plasma seminale sulla motilità e sulla vitalità degli spermatozoi refrigerati di asino dell'Amiata. *Atti S.I.S.Vet.*, 60: 93-94, (2006). 6. Carluccio A. et al. Il ciclo estrale nell'asina di Martina Franca. *Veterinaria Pratica Equina*, 5, 35-41, (2003). 7. Garner, D.L., Johnson, L.A., Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biol. Reprod.*, 53:276-284, (1995). 8. Jannett, F. et al., Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology*, 60, 453-461, (2003). 9. Blotner, S. et al., Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.*, 65, 75-88, (2001).

INQUINAMENTO DI URINE NEL SEME CUNICOLO URINE CONTAMINATION IN RABBIT SEMEN

Macchia G.,¹Cocchia N., Paino S.,²Silvestre F.,³Mangano N., Boni R.,
Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali, Università della Basilicata,
Potenza; ¹*Dipartimento Scienze Cliniche Veterinarie, Università di Napoli Federico II;*
²*Stazione Zoologica "Anton Dohrn", Napoli;* ³*Associazione Provinciale Allevatori di*
Potenza

Parole Chiave: Coniglio, Sperma, Urina, Urea
Key Words: Rabbit, Sperm, Urines, Urea

SUMMARY - Following a preliminary screening on semen quality within a genetic rabbit centre, we found some bucks showing abnormal ejaculates. These bucks (n=8) together with control animals (n=3) were sampled once weekly and semen characteristics analysed. Related to an abnormality scale, ejaculates were classified in 5 groups (1=normal ejaculates; 5=ejaculates with urines). Urea analysis revealed that urine contamination increased from groups 1 to 5. The animals under investigation repeated this contamination in most of the collected ejaculates; hence, the attitude of some animals to produce ejaculates contaminated with urine may be classified as a behaviour abnormality. Bucks affected by this defect should be excluded from semen production activities.

INTRODUZIONE - La tecnica della ciclizzazione settimanale associata all'applicazione della tecnica di inseminazione strumentale (IS) ha consentito alla conigliocoltura italiana di raggiungere importanti primati sia in ambito nazionale che internazionale¹. Tra le problematiche legate alla produzione di materiale seminale cunicolo, emerge un'elevata variabilità delle sue caratteristiche quali-quantitative^{2,3}. Per ovviare a ciò è pratica comune presso i centri di produzione seminale cunicola mescolare seme di individui diversi allo scopo di uniformare e ottimizzare le performance dell'IS. Theau-Clement e coll. (2003)⁴ comparando la produzione seminale in diversi genotipi cunicoli riportano che mediamente l'87,4% dei conigli sollecitati produce un eiaculato e solo il 45,7% di questi eiaculati è ritenuto utile ai fini di inseminazione. Le principali cause di esclusione degli eiaculati sono riferite alla presenza di urina (10,8%), ad un'insufficiente motilità spermatica (22,1%) ed a un volume insufficiente (38,3%). Nel corso di un'indagine di monitoraggio sulle caratteristiche qualitative e quantitative dello sperma prodotto da conigli allevati presso un centro genetico lucano, è stato riscontrato in alcuni soggetti esaminati un fenomeno di severa alterazione della qualità spermatica. Uno studio è stato, quindi, intrapreso allo scopo di descrivere il fenomeno ed accertare le cause responsabili.

MATERIALI E METODI - La prova è stata condotta nel periodo compreso tra giugno e luglio 2006 presso lo stabulario del Centro di Selezione Genetica gestito dall'APA di Potenza a Laurenzana, ove erano presenti 60 conigli maschi di razza Nuova Zelanda e Californiana, con età media di circa 22 mesi. I conigli, alloggiati in gabbie singole, venivano alimentati a volontà con del mangime commerciale pellettato, integrato con coccidiostatico. Il prelievo del seme è avvenuto con frequenza di raccolta settimanale. Dopo una fase iniziale di monitoraggio del materiale seminale in tutti gli animali, sono stati isolati 8 soggetti il cui seme mostrava una colorazione anomala e 3 animali di controllo con la tipica colorazione bianco-crema dell'eiaculato. Prelievi di seme sono stati ripetuti settimanalmente per un periodo di 2 mesi. Taluni soggetti alternavano l'eiaculato anomalo con sporadici momenti in cui l'eiaculato assumeva caratteristiche macroscopiche normali. In altri casi l'eiaculato assumeva caratteristiche macroscopiche

intermedie tra quello normale e quello anomalo. Il materiale seminale prelevato è stato suddiviso sulla base di un'analisi visiva in cinque categorie: categoria 1 = seme pulito con una colorazione bianco-crema; categoria 2 = seme pulito proveniente da animali che alternavano eiaculati anomali ad eiaculati puliti; categoria 3 = seme bianco-sporco; categoria 4 = seme con colorazione grigia e sfumature ocra; categoria 5 = seme giallo. Il seme è stato prelevato, con l'ausilio di una coniglia "ruffiana", mediante una vagina artificiale di vetro con camera ad acqua. Immediatamente dopo il prelievo si è proceduto alle analisi macroscopiche (colore e volume) del materiale seminale⁵. Il pH è stato valutato mediante un pHmetro portatile a tenuta stagna (H19025C, Hanna Instruments). La motilità e la concentrazione spermatica totale sono state valutate mediante camera di Bürker, utilizzando seme diluito rispettivamente con soluzione fisiologica o acqua e osservato al microscopio provvisto di tavolino termostato. Tutti i campioni di seme prelevato e alcuni campioni di urina raccolta sono stati congelati a -20°C. Dopo centrifugazione, i campioni di sperma e urina sono stati sottoposti a dosaggio dell'urea mediante un metodo enzimatico cinetico. In particolare, l'urea contenuta nel campione è stata idrolizzata in ammoniaca mediante aggiunta di ureasi. La concentrazione di NH_4^+ è stata determinata attraverso la sua reazione con l' α -chetoglutarato e NADH che, in presenza dell'enzima glutammico-deidrogenasi (GLDH), forma L-glutammato e NAD^+ . La diminuzione della densità ottica della reazione è proporzionale alla concentrazione di urea presente nel campione. Ad 1 e 2 minuti dopo il termine del periodo di incubazione, i campioni sono stati letti allo spettrofotometro. La differenza delle due letture, rapportata alla differenza delle letture effettuate con il bianco (acqua distillata) e moltiplicata per lo standard, ha fornito il valore di concentrazione dell'urea. I risultati ottenuti sono stati analizzati mediante test General Linear Model (GLM) per misure ripetute. Nel caso di valori percentuali si è provveduto ad una trasformazione dei dati in arcoseno prima della elaborazione statistica.

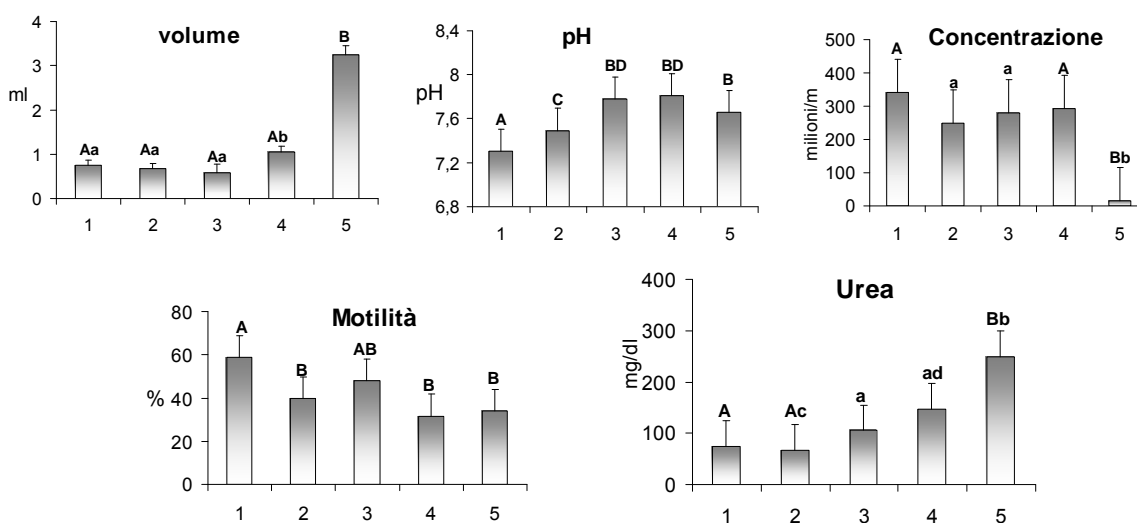
RISULTATI E DISCUSSIONI - L'incidenza del fenomeno è stata nel complesso pari al 13% (8/60). Nell'ambito dei soggetti esaminati, il riscontro di anomalie del seme si è verificato nella maggior parte (60%) dei prelievi ottenuti dai soggetti "anomali". Sporadicamente, tuttavia, anche altri individui non inclusi nella prova hanno presentato tale fenomeno. Lo sperma di categoria 5 è facilmente classificabile come inquinato di urina, sia per il colore e sia per il volume significativamente ($P < 0,01$) superiore a quello delle altre categorie in esame (Figura 1). Tra queste ultime, un lieve aumento di volume è, tuttavia, osservato nella categoria 4 ($P < 0,05$).

Non sono emerse differenze significative tra il pH registrato nel seme normale ($7,31 \pm 0,09$) e quello di categoria 2 ($7,49 \pm 0,07$). Significativamente più basico dei precedenti è invece risultato il pH dei campioni di categoria 3 e 4 ($P < 0,01$). Il valore alcalino dell'urina di coniglio ($\text{pH} = 8,56 \pm 0,46$) potrebbe essere alla base di questa alcalinizzazione dello sperma dei campioni di eiaculato anomalo.

Una maggiore concentrazione spermatica è stata osservata nello sperma di tipo normale; non sono, tuttavia, emerse differenze significative tra le prime 4 categorie a confronto. Differenze sostanziali sono invece emerse tra le dette 4 categorie e la categoria 5 che, al di là della diluizione, è caratterizzata da una ridotta concentrazione spermatica totale. Un individuo è risultato azospermico. Nel corso della prova lo sperma di questo individuo, collocato nella categoria 4, è rientrato una sola volta nell'ambito delle categorie 3 e 2. La motilità spermatica degli eiaculati osservati ha mostrato un decadimento progressivo al crescere della categoria di appartenenza. Ciò potrebbe essere riconducibile alla tossicità dell'urina risultata essere di tipo dose-dipendente⁶. La presenza di urina all'interno degli eiaculati "anomali" è dimostrata dall'andamento della concentrazione di urea che è risultata aumentare al crescere della categoria di appartenenza.

In conclusione, le anomalie spermatiche esaminate nel corso di questo studio possono essere attribuibili ad una più o meno imponente contaminazione con urina. Tale evento, che può verificarsi sporadicamente nel corso dell'attività di produzione spermatica in maschi di specie diverse⁷, assume nel coniglio un carattere ripetitivo in taluni individui. Interessante è risultato il riscontro che, al di là delle evidenti alterazioni a carico del seme contaminato, anche gli eiaculati "normali" prodotti dai soggetti con eiaculati anomali presentavano concentrazione e motilità spermatica deficitarie. L'emissione di urina nel corso della eiaculazione assume quindi un significato di "vizio" o anomalia comportamentale di taluni soggetti che, perciò, potrebbero essere esclusi da centri di produzione seminale cunicola sulla base di un esame preliminare.

Figura 1. Valori medi (\pm ES) del volume, pH, concentrazione e motilità spermatica, e concentrazione di urea rilevata negli eiaculati di coniglio distribuiti all'interno delle 5 categorie esaminate.



A,B e C,D (P<0,01); a,b e c,d (P<0,05)

BIBLIOGRAFIA - 1. Battaglini, M., Castellini, C., Lattaioli, P., Variability of the main characteristics of rabbit semen. *J Appl Rabbit Res.*, **15**, 439-446, (1992). 2. Castrovilli, C., Gualtieri, M., Toschi, I., Il futuro delle zooteculture nel terzo millennio. *Atti Convegno Nazionale "Parliamo di...allevamenti nel 3° millennio"*, Fossano, Cuneo 12-13 Ottobre 2000, 47-84, (2001). 3. Garcia-Tomas, M., Sanchez, J., Rafel, O., Ramon J., Piles, M., Variability, repeatability and phenotypic relationships of several characteristics of production and semen quality in rabbit. *Anim Reprod Sci.*, **93**, 88-100, (2006). 4. Griggers, S., Paccamonti, D.L., Thompson, R.A., Eilts, B.E., The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. *Theriogenology*, **56**, 613-22, (2001). 5. Kim, S.C., Kim, H.W., Effects of nitrogenous components of urine on sperm motility: an in vitro study. *Int J Androl.*, **21**, 29-33, (1998). 6. Lavara, R., Moce, E., Lavara, F., Viudes de Castro, M.P., Vicente, J.S., Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, **64**, 1130-41, (2005). 7. Theau-Clement, et al., Comparaison de la production spermatiche de trios souches de lapins: moyennes et variabilités. *Proc 10th Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, nov 19-20, 81-84, (2003).

INDAGINI ECOGRAFICHE IN CORSO DI GRAVIDANZA NEL CONIGLIO NANO: STUDIO PRELIMINARE
ULTRASOUND INVESTIGATION DURING PREGNANCY IN THE “DWARF” RABBIT: PRELIMINARY STUDY

Gelli D., Mollo A., Stelletta C., Falomo M., Milani C., Tramontano A., Romagnoli S., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova*

Parole chiave: Coniglio Nano, Gravidanza, Ecografia

Key words: Pet, Rabbit, Pregnancy, Ultrasound

SUMMARY - Rabbits are becoming common patient in the veterinary practice, as they represent easy “pet” to keep in small space and require less time dedicated to them in comparison to the one required from dogs and cats. In this preliminary study, ultrasound investigations have been performed in 6 rabbits before and during pregnancy to collect data regarding the implantation of the embryo and to assess fetal viability and development. Echographic investigations were performed with a AU3 Partner (Esaote Biomedical, Italy), with trans abdominal approach at days 0, 7, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 27 and 29 of pregnancy. Fetal structures were observed and fetal diameters were collected. Despite the limited number of the animals of this study the data collected could be considered a first step into ultrasonography investigation during pregnancy in the domestic rabbit.

INTRODUZIONE - Il coniglio nano è diventato un paziente comune negli ambulatori veterinari essendo un animalletto facile da gestire in cattività e che può sostituire, richiedendo minor impegno la compagnia di un cane o di un gatto. Un numero crescente di clienti sottopone a controlli frequenti i propri conigli e ciò ha portato a ricercare un numero maggiore e migliore di informazioni sui trattamenti veterinari. Le indagini ecografiche inoltre, sono diventate un ausilio diagnostico indispensabile nella diagnosi di alcune patologie e nel monitoraggio di stati fisiologici come la gravidanza. In questo studio sono state effettuate indagini ecografiche durante la gravidanza di sei coniglie nane, al fine di raccogliere dati utili nella pratica clinica sia per effettuare ecograficamente diagnosi di gravidanza, alla stregua di quanto avviene nel cane e nel gatto, sia per monitorare la stessa, in quanto lo stato di cattività complica spesso, in questi animali, per lo stress indotto da fattori ambientali un evento fisiologico come il parto. Inoltre, essendo stato ed essendo tuttora il coniglio un animale da reddito ed estremamente facile da riprodurre, scarsa attenzione diagnostica è stata rivolta al monitoraggio della gravidanza, essendo l’attenzione zootecnica rivolta alla produttività globale degli allevamenti e non ovviamente al rendimento dei singoli soggetti. In questo studio gli autori hanno effettuato indagini ecografiche in coniglie nane nel periodo precedente e durante la gravidanza al fine di raccogliere dati sullo svolgimento della stessa e sui parametri fetometrici misurabili in questa specie.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto inizialmente su sei coniglie nane, tre delle quali di razza ariete, due a “testa di leone” e una coniglia “angora”. Eccetto un soggetto di razza ariete, tutte le coniglie erano primipare. Al fine di sincronizzare l’inizio delle gravidanze, in modo da avere uguali condizioni di gestazione nell’analisi ecografia, si è inizialmente proceduto a fecondare nello stesso giorno tutti gli animali tramite inseminazione artificiale. Quarantotto ore prima dell’inseminazione è stato eseguito uno spostamento di gabbia per indurre e sincronizzare l’estro. Successivamente si è proceduto alla raccolta del seme; questo, di volume pari 0,5 cc, subito dopo la raccolta, è stato diluito con un diluente commerciale

in polvere (M3 standard, Mini Tub, Germania). Dopo aver in seminato le coniglie, si è proceduto ad indurre l'ovulazione con analogo del GnRH, il Buserelin (Receptal, Intervet), in quantità di 0,2 ml/soggetto per via intramuscolare. Per condurre le indagini ecografiche sono stati utilizzati un apparecchio AU3 Partner (Esaote Biomedical, Italia) con modalità B-mode e sonda transcutanea settoriale a 7,5-10 MHz, ed un apparecchio 100 Falco, sempre con modalità B-mode (Pie Medical) e sonda trans-cutanea lineare a frequenza 8 MHz. Le ecografie sono state eseguite al giorno o dall'accoppiamento, successivamente 7, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 25, 27 e 29 per un totale di 156 osservazioni ecografiche. I parametri biometrici considerati e misurati nelle diverse fasi di gestazione sono stati: diametro longitudinale (DLV) e trasversale (DTV) della vescicola embrionale, diametro longitudinale dell'embrione (DLE), frequenza cardiaca (FC), lunghezza cranio-sacrale (LCS), diametro biparietale (DBP), distanza testa-mento (DTM) e diametro addominale trasversale (DAT) a livello della bolla gastrica. In particolare lo sviluppo fetale è stato valutato dapprima misurando il diametro longitudinale dell'embrione e successivamente, quando si è differenziata la testa dal tronco, determinando la LCS.

RISULTATI - Il diametro del lume uterino nelle coniglie nane nullipare ed in fase non gestazionale, rilevato con sonda settoriale da 7,5 MHz è risultato $2,72 \pm 0,5$ mm e 3,9 mm nella pluripara. Visivamente si presentava come un'area ipoecogena circondata da un sottile bordo iperecogeno. L'utero è stato localizzato dorsalmente alla vescica e centralmente all'intestino. Le vescicole embrionali sono state evidenziate dal giorno 7 post-accoppiamento utilizzando una sonda settoriale 7,5 MHz ed apparivano come zone circolari ipoecogene, circondate da una parete uterina spessa ed esogena. In questa fase il diametro longitudinale della vescicola (DLV) era 4 mm nelle coniglie non di razza ariete e di 6 mm nelle femmine di razza ariete, mentre il diametro trasversale della vescicola (DTV) era di 2 mm nelle prime e di 2,7 mm nelle seconde. Dal nono giorno post-coitum per la prima volta si è ecograficamente evidenziato l'embrione, come una struttura esogena compatta, di forma ovoidale, localizzata all'interno e vicino alla parete della vescicola embrionale anaecogena: esso misurava 3,9 mm circa. Dal decimo giorno in poi è stato possibile evidenziare più vescicole embrionali. All'undicesimo giorno di gravidanza l'embrione, localizzato sempre più al centro della vescicola, misurava 9,20 mm circa. Al dodicesimo giorno di gravidanza si è evidenziato il cordone ombelicale, come una sottile linea ecogena, in rapporto con la placenta, che si è resa identificabile dal 13° giorno. Dal 15° giorno post-coitum, l'immagine ecografica dell'embrione raggiunge i 11/12mm circa e permette la misurazione del diametro longitudinale e, verso il 17° giorno anche la lunghezza cranio-sacrale.

Il battito cardiaco si è reso riconoscibile dal 13° giorno ed in questa fase gestazionale esso era di 215/245 battiti al minuto: ecograficamente il cuore è apparso come una piccola area ipoecogena suddivisa da un setto ecogeno.

Un altro parametro che si è potuto rilevare per mezzo dell'ecografia, dal 19° giorno ed utilizzando sia la sonda settoriale da 10 MHz sia la sonda lineare da 8 MHz è stato il diametro trasversale addominale (DTA) a livello della bolla gastrica: essa, contenente liquido amniotico, appariva come un'area anaecogena della misura di 11 mm circa.

Dal 19° giorno di gestazione in poi si sono evidenziati gli arti ed i movimenti fetali. In questa fase, utilizzando la sonda lineare da 8 MHz si sono riconosciuti i contorni del cranio, che aveva raggiunto la lunghezza di 14,10 mm mentre il diametro biparietale era di 7,30 mm. Al 20° giorno si è osservata la comparsa delle costole e della colonna vertebrale che non hanno evidenziato la presenza di coni d'ombra evidenziabili a partire dal 24° giorno. Dal 22° giorno si sono potuti distinguere il polmone dal fegato, essendo il primo iperecogeno rispetto al secondo, e la vescica.

Verso la fine della gravidanza (29° giorno), il cranio presentava una lunghezza di circa 22/23 mm, mentre il DPB misurava 14/15mm.

La valutazione ecografica dell'involutione uterina ha evidenziato come questa avviene in breve tempo dopo il parto: al settimo giorno post-partum l'utero non era più evidenziabile ecograficamente.

DISCUSSIONE - L'ecografia nelle specie domestiche si è rivelato un ottimo mezzo diagnostico per effettuare la diagnosi di gravidanza e per monitorare lo sviluppo embrionale prima e fetale dopo. Studi condotti nel cavallo, nel bovino e nel cane hanno consentito di stabilire, attraverso la valutazione dei parametri le rispettive età gestazionali. In letteratura non sono riportate immagini ecografiche del coniglio, in particolare modo del coniglio nano. Non avendo alcuna fonte alla quale fare riferimento gli autori sono ricorsi alla modalità Color-Doppler per evidenziare i flussi sanguigni tipici degli organi considerati. Per quanto riguarda la metodica, gli autori hanno preso in considerazione i parametri fetometrici che meglio rappresentassero lo sviluppo fetale in relazione all'età gestazionale: diametro longitudinale e trasversale delle vescicole embrionali, diametro longitudinale dell'embrione, lunghezza cranio-sacrale, diametro bi-parietale, lunghezza testa mento, diametro trasversale addominale a livello della bolla gastrica. La diagnosi di gravidanza nelle prime fasi di gestazione, è possibile dal 7° giorno in poi. In letteratura sono riportate la diagnosi di gravidanza^{1,2,3,4} ed il rilievo del battito fetale^{1,3}, ma non la misurazione del battito stesso, studio che è stato possibile effettuare in questo lavoro. Dal 17° giorno di gravidanza è possibile iniziare ad eseguire le misurazioni dei parametri fetali. Sebbene lo studio debba essere approfondito utilizzando un maggior numero di soggetti e monitorando quotidianamente la gravidanza, questo lavoro è da considerarsi preliminare per quanto riguarda la raccolta delle misure fetometriche.

BIBLIOGRAFIA - **1.** Curley, S., Ultrasound imaging and pregnancy monitoring of rabbit. *Animal technology*, 52: 113-119, (2001). **2** Dimitrov, F., Iotov S., Dimitrov, M., Georgiev, P., Wehrend, A., Pregnancy diagnosis in the rabbit by real time ultrasonography. *Wien. Tierarztl. Mschr.*, 91(2), (2004). **3** Inaba T., Mori J., Torii, R., Use of ecography in rabbits for pregnancy diagnosis. *Jpn. J. Vet Sci.*, 48: 1003-1006, (1986). **4** Ypsilantis P., Saratsis P.H., Early pregnancy diagnosis in the rabbit by real time ultrasonography. *World Rabbit Science*, 7(2): 95-99, (1999).

VALUTAZIONE DELLA TESTOSTERONEMIA DOPO TEST DI STIMOLAZIONE CON GnRH IN ESEMPLARI ADULTI DI ORSO NERO ASIATICO (*Ursus thibetanus*)

TESTOSTERONE LEVEL ASSESSMENT AFTER GnRH STIMULATION TEST IN ADULT ASIATIC BLACK BEARS (*Ursus thibetanus*)

Gelli D.,¹ Aiudi G.,² Laricchiuta P., Ferrari V.,² Bucci F.A.,² Lacalandra G.M., Romagnoli S., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova;* ¹*Dipartimento di Produzione Animale, Università degli studi di Bari;* ²*Libero professionista, Zoosafari di Fasano, Brindisi.*

Parole chiave: Orso Nero Asiatico, Gonadorelina, Testosterone

Key words: Asiatic Black Bear, Gonadorelin, Testosterone

SUMMARY - Reproduction and its control in zoo animals is still a challenging subject, in part due to the lack of data regarding reproductive physiology. In this study testosterone secretion and its level in serum have been tested in six adult male Asiatic black bears before and one hour after the administration of GnRH (gonadorelin). The GnRH stimulation test was performed in order to elicit maximal testosterone secretion. Pre-injection serum testosterone concentration were ≤ 0.2 ng/ml on the average (just one was 0.46 ng/ml), post-injection testosterone concentration ranged from 0.2 ng/ml to 1.35 ng/ml

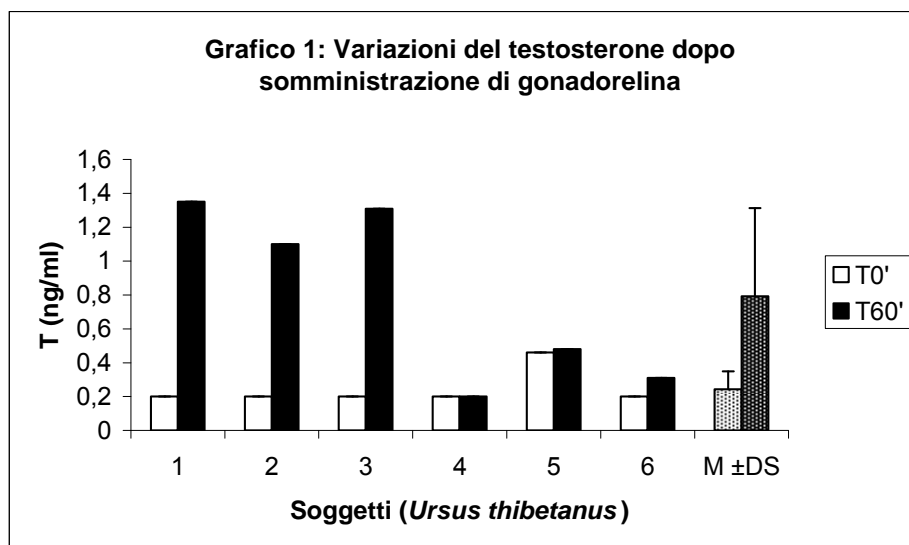
INTRODUZIONE - Il problema principale della gestione e del controllo della riproduzione degli animali da zoo è essenzialmente correlato alla mancanza di parametri di riferimento relativi ai valori fisiologici necessari per monitorare l'attività riproduttiva di questi soggetti, nonché a motivazioni etiche¹ che spesso condizionano qualsiasi tipo di intervento. L'orso nero asiatico (*Ursus thibetanus*) è una specie considerata in pericolo di estinzione secondo la IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources). I maschi della sottospecie giapponese (*Ursus thibetanus japonicus*) mostrano notevoli variazioni stagionali², con un periodo riproduttivo che va da maggio a luglio³, e raggiungono la maturità sessuale fra i 2 e i 4 anni d'età^{4,5,6,7}. Nella famiglia *Ursidae*, le concentrazioni sieriche di testosterone nei maschi sono basse al di fuori della stagione riproduttiva, mentre raggiungono il picco poco prima di essa^{8,9,10,11}. Le concentrazioni di testosterone nei maschi di orso nero giapponese in cattività subiscono variazioni stagionali accompagnate da differenze nell'attività spermatogenetica, con livelli basali (0,02-0,17 ng/ml) in novembre e gennaio, livelli crescenti (0,24-0,98 ng/ml) in marzo-aprile, e alti (1,7-4,3 ng/ml) in maggio-giugno¹² durante la stagione degli amori. Soggetti selvatici della stessa sottospecie nel periodo di giugno-luglio hanno presentato una certa variabilità individuale, alcuni con concentrazioni sieriche di testosterone sopra i 0,5 ng/ml, altri al di sotto di questa soglia¹³.

In questo studio sono stati valutati, al di fuori della stagione riproduttiva, i livelli sierici di testosterone in sei esemplari maschi adulti di orso nero asiatico in seguito a test di stimolazione con GnRH.

MATERIALI E METODI - Sei orsi neri asiatici adulti (*Ursus thibetanus*), di età compresa tra i 4 ed i 6 anni e di 150-180 Kg p.v., allocati presso le strutture dello Zoosafari di Fasano (Br), sono stati sottoposti, previa anestesia, a test acuto di stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi con GnRH. Per l'anestesia si è fatto ricorso ad un sistema di teleiniezione a distanza utilizzando una cerbottana con dardi teleinject da 3 ml provvisti di ago 18G caricati con Tiletamina cloridrato e Zolazepam

(Zoletil[®], Virbac, Italia) alla dose di 250-300 mg/capo e Detomidina (Domosedan[®], Pfizer, Italia), alla dose di 3-5 mg/capo. Dopo circa 20 minuti dall'induzione sono stati effettuati i prelievi dalla vena giugulare (T₀) e la somministrazione di gonadorelina (Fertagyl[®], Intervet, Italia) in ragione di 60 µg/capo i.v. Dopo circa 60 minuti, eseguito un prelievo di sangue (T₆₀), gli orsi sono stati risvegliati con 15 mg/capo di Atipamezolo cloridrato (Antisedan[®], Pfizer, Italia). I campioni di sangue sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti e il siero stoccato alla temperatura di -20°C. Il dosaggio del testosterone (Testosterone LKTW1, Diagnostic Products Corporation, USA) è stato effettuato utilizzando un analizzatore per immunodosaggi automatizzati (Immulite[®], D.P.C., USA). I dati sono stati elaborati mediante ANOVA test e considerati significativi per $P < 0,05$.

RISULTATI - Sia induzione e mantenimento che risveglio anestesiológico sono stati scevri da complicazioni. I livelli di testosterone prima della stimolazione con gonadorelina sono risultati inferiori a 0,2 ng/ml in tutti i soggetti, eccetto in un maschio di sette anni, in cui il valore è stato di 0,46 ng/ml. Il testosterone su siero prelevato dopo un'ora dalla somministrazione è risultato compreso in un range tra 0,2 e 1,35 ng/ml. I soggetti 4 e 5 non hanno risposto al trattamento (Graf. 1). L'analisi statistica ha mostrato differenze significative fra il T₀ e T₆₀ ($P < 0,05$), dimostrando che il trattamento è stato in grado di innalzare i valori della testosteronemia nonostante gli orsi si trovassero in quiescenza riproduttiva tipica del periodo invernale.



DISCUSSIONE - I nostri risultati sulle concentrazioni di testosterone durante l'inverno negli orsi neri asiatici sono paragonabili a quelli riportati da altri Autori nell'orso nero giapponese¹², attestandosi in tutti i soggetti tranne uno su valori basali $\leq 0,2$ ng/ml (Grafico 1). Un'ora dopo la somministrazione di gonadorelina, due degli orsi trattati (5 e 6) non hanno mostrato un aumento significativo della concentrazione di testosterone che ha raggiunto comunque valori compresi nel range riscontrato nei maschi della sottospecie giapponese nel periodo primaverile (marzo-aprile)¹², che precede la stagione riproduttiva. In tre soggetti (1, 2, 3) i valori molto alti riscontrati al T₆₀ ($n=3$; $P < 0,01$) rientrano nel range che si osserva nei maschi della sottospecie giapponese durante la stagione riproduttiva (maggio-luglio)³. Nell'orso nero americano (*Ursus americanus*) la somministrazione di gonadorelina ha determinato risposte differenti a seconda della stagione e della dose di somministrazione⁸. È stato osservato un aumento della concentrazione del testosterone ai due dosaggi più alti, risultando evidente solo dopo 90 minuti dalla somministrazione di GnRH quando effettuata in inverno⁸. È possibile

ipotizzare che la risposta negativa del soggetto n. 4 e 5 rientri nei parametri di normalità, mancando un riscontro della concentrazione sierica del testosterone successivamente al T₆₀, o che in questi esemplari si sarebbe potuto ottenere una risposta positiva utilizzando un dosaggio più alto di gonadorelina. La risposta ormonale alla stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi potrebbe essere dipendente dal dosaggio di GnRH utilizzato, dalla tempistica dei prelievi e dalla stagione in cui si effettua tale somministrazione.

Questo studio contribuisce ad arricchire la conoscenza dei parametri riproduttivi dell'orso nero asiatico in cattività. Ulteriori studi, ripetuti in un arco di tempo più prolungato a causa dell'evidente stagionalità di questi animali, sono tuttavia necessari per comprendere meglio l'attività riproduttiva di questa specie.

BIBLIOGRAFIA - **1.** Porton, I.J. The ethics of wildlife contraception. In: *Wildlife Contraception, Issues, Methods and Applications*, ASA, C.S., Porton, I.J. eds, Baltimore, pp.3-16, (2005). **2.** Tsubota, T., Mizouguchi, N., Kita, I., Ecological and physiological studies of the Japanese black bear *Ursus thibetanus japonicus*. *Jpn. J. Wildl. Med.*, 3, 17-24, (1998). **3.** Kojima, E., Tsuruga, H., Komatsu, T., Murase, T., Tsubota, T., Kita, I., Characterization of semen collected from beagles and captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Theriogenology*, 55, 717-731, (2001). **4.** Komatsu, T. Sexual maturity and seasonal change of spermatogenesis in male Japanese black bear (*Selenarctos thibetanus japonicus*). *Graduation thesis*, Faculty of Agriculture, Gifu University, (1993). **5.** Komatsu, T., Tsubota, T., Kishimoto, M., Hamasaki, S., Tiba, T. Sytem cell in connection with sexual maturity and spermatogenesis in male Japanese black bear (*Selenarctos thibetanus japonicus*). *J. Reprod. Dev.*, 40, 65-71, (1994). **6.** Investigation report of the population of Japanese black bear *Natural Environment Conservation section, forest policy planning division, Gifu prefecture*, (1994). **7.** Sasaki, A.A., Ito, K., Reproductive status (breeding age) investigation, Japanese black bear in Akita. *Report of Syntactic Investigation of Japanese black bear. Forest division*, pp. 66-77, Akita prefecture, (1983). **8.** Horan, K.T., Nelson, R.A., Plalmer, S.S., Bahr, J.M., Seasonal response of pituitary and testes to gonadotropin-releasing hormone in the black bear (*Ursus americanus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A, 175-182, (1993). **9.** McMillin, J.M., Seal, U.S., Rogers, L., Erickson, A.W., Annual testosterone rhythm in the black bear (*Ursus americanus*). *Biol. Reprod.*, 15, 163-167, (1976). **10.** Palmer, S.S., Nelson, R.A., Ramsey, M.A., Stirling, I., Bahr, J.M., Annual changes in serum sex steroids in male and female black (*Ursus americanus*) and polar (*Ursus maritimus*) bears. *Biol. Reprod.*, 38, 1044-1087, (1988). **11.** Tsubota, T., Kanagawa, H., Annual changes in serum testosterone levels and spermatogenesis in the Hokkaido brown bear, *Ursus arctos yesoensis*. *J. Mamm. Soc. Jpn.*, 14, 11-17, (1989). **12.** Komatsu, T., Tsubota, T., Yamamoto, Y., Atoji, Y., Suzuki, Y., Seasonal changes in the immunolocalization of steroidogenic enzymes in the testes of the Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *J. Vet. Med. Sci.*, 59, 521-529 (1997). **13.** Okano, T., Murase, T., Tsubota, T., Spermatogenesis, serum testosterone levels and immunolocalization of steroidogenic enzymes in the wild male Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *J. Vet. Med. Sci.*, 65, 1093-1099, (2003).

TECNICA DELL'HACKING E PROGRAMMI DI CONSERVAZIONE *EX SITU* DEL CAPOVACCAIO (*NEOPHRON PERCNOPTERUS*) IN ITALIA: NOTE PRELIMINARI

HACKING AND *EX SITU* CONSERVATION PROGRAMS FOR EGYPTIAN VULTURE (*NEOPHRON PERCNOPTERUS*) IN ITALY: PRELIMINARY NOTES

¹Ceccolini G., ¹Cenerini A., ²Lacalandra G.M., ³Aebischer A. ⁴Andreotti A., ⁵Gustin M., ⁷Bedin M., ⁶Sigismondi A., ⁵Giacoa V., ⁵Bellini F., ⁷Barberio F., ²Costantini V., ¹Progetto Capovaccaio, WWF, Italia; ²Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari; ³Zoological Institute, Conservation Biology, University of Bern; ⁴Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica; ⁵LIPU; ⁶ALTURA (Associazione per La Tutela degli Uccelli Rapaci e dei loro Ambienti); ⁷Medico Veterinario, Libero Professionista.

Parole chiave: Capovaccaio, *Hacking*, Telemetria Satellitare, Migrazione, Programmi Di Conservazione *Ex Situ*.

Key words: Egyptian Vulture, *Hacking*, Satellite Telemetry, Migration, *Ex Situ* Conservation Programs.

SUMMARY - The Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) is classified as an endangered species of the bird fauna and it is included in the species with an Unfavourable Conservation Status in Europe (SPEC 3). In assisted reproduction and *ex situ* conservation program was undertaken to confirm in this species the use of *hacking* method for releasing juvenile captive-reared individuals. So far five fledglings born or reared in the WWF Captive Breeding Station of Semproniano (Tuscany) have been released in Puglia region (Italy). The migrations of two of them were studied by means of satellite telemetry. The data obtained (over 105 Argos® locations) have allowed to describe movement patterns, timing of migration, routes followed and speed of flight. One young vulture, after travelling ca. 3,800 km and 24 days spent on migration, arrived in wintering area of central-east Mali (Africa).

INTRODUZIONE - Il capovaccaio (*Neophron percnopterus*) è un piccolo avvoltoio migratore che nidifica in Europa meridionale tra marzo ed agosto e sverna in Africa a sud del Sahara. La specie è monogama. I giovani individui effettuano la migrazione verso gli areali africani a fine estate e ritornano nei siti europei (*filopatria*), generalmente dopo alcuni anni, per la riproduzione^{1,2}. Attualmente il capovaccaio è considerato specie 'prioritaria di conservazione' SPEC 3 (*Species of European Conservation Concern*), con uno *status* sfavorevole di conservazione che merita un'attenzione particolare. I nuclei riproduttivi che raggiungono in primavera l'Europa meridionale, ad eccezione della Penisola Iberica (1.000 coppie circa), sono ormai ridotti a poche decine di individui concentrati in areali circoscritti³. In Italia peninsulare il capovaccaio presenta una popolazione attuale stabilizzata attorno a 9 coppie in due aree meridionali di nidificazione (Calabria: area Ionica; Puglia-Basilicata: comprensorio Pollino-Gravine) con previsione di estinzione della specie, nel territorio nazionale, entro il 2015⁴. Per le specie giunte sull'orlo dell'estinzione, accanto agli interventi nell'ambiente di conservazione *in situ*, i programmi di riproduzione in cattività (*captive breeding*), possono permettere la reintroduzione della specie negli areali storici e l'incremento delle residue popolazioni naturali (*restocking*) secondo mirati progetti scientifici (conservazione *ex situ*) e nell'ambito di specifici Piani di Azione (PdA)⁵. Per i rapaci sono state individuate diverse metodiche di rilascio (*direct fostering*, *cross fostering*) e l'*hacking* è risultata efficace, in programmi internazionali di conservazione *ex situ* di specie 'prioritarie' di Falconiformi^{5,6}. Per il capovaccaio l'*hacking* è stato

utilizzato in Italia (2004) per la prima volta⁷. La tecnica prevede che i giovani nati in cattività ed allevati esclusivamente da genitori vengano trasferiti, prima del termine dello svezzamento, in cavità su pareti rocciose o nidi artificiali (*hack box*) nei siti di rilascio (*hack site*), ed alimentati da operatori senza contatti diretti con gli animali, sino all'involo ed all'acquisizione dell'autonomia alimentare. In tal modo l'*hacking* salvaguarda e tutela nei piccoli, nati in cattività e liberati in natura, le caratteristiche comportamentali biologiche e riproduttive tipiche di specie⁸. Nell'ambito di un progetto di riproduzione in ambiente controllato e di conservazione *ex situ* del capovaccaio è stata valutata la possibilità di definire l'efficacia della tecnica dell'*hacking* per il rilascio di giovani nati in cattività, in relazione alle attitudini all'involo, all'alimentazione autonoma in ambiente naturale, ed all'attività migratoria. Il monitoraggio delle localizzazioni di alcuni giovani capovacciai, dopo rilascio in natura, è stato realizzato mediante telemetria satellitare per la validazione della metodica.

MATERIALI E METODI - La tecnica dell'*hacking* è stata utilizzata per il rilascio in Puglia (Laterza - Ta, Oasi LIPU, 40°37'N, 16°50'E), nel periodo 2004-2006, di cinque giovani capovacciai, nati in cattività presso il Centro di Riproduzione del WWF di Semproniano (GR). Nel 2004 e nel 2006 sono stati liberati, rispettivamente, un individuo di sesso maschile, denominato Laerte (anello plastico: IBT), e due individui di sesso femminile, denominati Arianna (ICD) e Barbara (ICF), nati nel Centro da una coppia di riproduttori di origine spagnola. I *pulli*, dopo incubazione naturale delle uova (41 gg), sono stati allevati esclusivamente dai genitori, in voliera videocontrollata (TV a circuito chiuso), in assenza di contatti ripetuti con operatori. Nel 2005 il programma di rilascio è stato realizzato con due giovani capovacciai, denominati Ali (ICB) e Turchino (ICC), di probabile origine turca, provenienti da un sequestro di uova operato dal Corpo Forestale dello Stato, adottati e allevati sin dai primi giorni di vita, in cattività, da una coppia di riproduttori del Centro. All'età di circa 2 mesi, a ciascuno dei cinque individui, sono state decolorate alcune remiganti per l'identificazione in volo ed applicati una radio trasmittente locale VHF, su penna timoniera. Due giovani sono stati equipaggiati con un trasmettitore satellitare ad energia solare (Arianna, *Microwave Telemetry Solar Power* PTTs 100 35 g; Barbara, *Northstar Solar* PTTs 40 g), mediante imbracatura convenzionale per rapaci⁴. Tra l'ultima decade di luglio e la prima decade di agosto è stato realizzato il trasferimento dei giovani capovacciai, a svezzamento non ultimato e prima dell'involo, dalla Toscana in Puglia. Nel sito di rilascio, individuato presso una 'gravina', i giovani avvoltoi sono stati alloggiati in un anfratto di parete rocciosa (cavità-nido) attrezzato per il videocontrollo e con un sistema di tubi per la somministrazione di cibo (topi - 250 gr/die/pro capite) e di acqua a distanza, per evitare contatti diretti con operatori, sino a svezzamento e involo. Le localizzazioni (*fixes*) di ciascun capovaccaio sono state raccolte dal sistema satellitare Argos® e trasmesse via Internet. I dati sono stati georeferenziati mediante applicativi GIS (*Geographic Information System*) del programma software ESRI *ArcView*® 3.2 con definizione dei percorsi giornalieri, della mappa migratoria e dell'area di svernamento.

RISULTATI - Il videocontrollo dell'attività quotidiana nella 'cavità-nido' dei giovani capovacciai, dopo il trasferimento dal Centro di Riproduzione in Toscana al sito di rilascio in Puglia, ha evidenziato un rapido superamento dello stress da viaggio e, nei giorni successivi, attività comportamentali (frequenti battiti d'ali, defecazioni proiettate all'esterno del nido, sistemazione del piumaggio) tipiche della specie. Nella cavità-nido il consumo di cibo e di acqua, in assenza di contatti diretti con operatori, è risultato regolare. L'involo si è realizzato all'età di 73-85 giorni e, nei successivi 2-4 giorni è stata acquisita l'attitudine al consumo autonomo di cibo nell'ambiente, da punti di alimentazione distribuiti nei dintorni dell'area di rilascio. A 12-17 giorni dall'involo

(età=87-97 giorni) i cinque giovani capovacciai si sono definitivamente allontanati dall'*hack site*, oltre il raggio di azione (3-25 km) della radio trasmittente VHF ad azione locale. Nel 2004, Laerte, dopo l'ultimo avvistamento nel sito di rilascio in Puglia (22 agosto), è stato osservato il 2 e 3 settembre nei pressi dell'Isola di Marettimo (Egadi), insieme ad adulti di capovaccaio in migrazione. Nel 2006 le localizzazioni fornite dal sistema satellitare Argos® hanno definito lo spostamento dei due capovacciai Barbara ed Arianna, equipaggiati con radio satellitari, dal sito di rilascio in direzione sud-ovest della Penisola, con superamento dello stretto di Messina (38°16'N, 15°44'E) tra il 28 e il 29 agosto. In Sicilia Arianna e Barbara hanno seguito rotte diverse. Barbara si è diretta prima ad ovest e quindi a sud, con interruzione dei segnali il 16 settembre, senza recupero dei PTTs. Arianna si è diretta, a sud-ovest, verso le province di Caltanissetta ed Enna, raggiungendo, il 2 settembre, i pressi dell'Isola di Marittimo, Egadi (37°54'N, 12°12'E). La regolare emissione di messaggi del trasmettitore satellitare ha permesso di monitorare la migrazione del giovane capovaccaio in Africa. Attraversata la Tunisia e superato il Sahara, in Algeria, Arianna ha raggiunto in data 16 settembre il Mali (18°59'N, 0°67'E), percorrendo in un giorno anche 580 Km (velocità media = 158,3 km/die). Da ottobre a febbraio, le segnalazioni del sistema Argos® hanno confermato la localizzazione stabile del giovane capovaccaio in un areale ben definito del Mali centro-orientale (superficie=22.970 km² circa), con occasionali spostamenti in Niger e Burkina Faso, e pertanto la migrazione è stata considerata conclusa.

DISCUSSIONE - La tecnica di svezzamento e di rilascio denominata '*hacking*' applicata in un programma di conservazione *ex situ* del capovaccaio si è confermata tecnica efficace per la liberazione di giovani individui, nati in cattività, con regolare involo, manifestazioni comportamentali tipiche della specie ed attività migratoria definita mediante telemetria satellitare (oltre 105 Argos® *locations*). Un capovaccaio di sesso femminile (Arianna), nato in cattività in Toscana nel 2006 e liberato in Puglia, ha migrato verso sud ed ha raggiunto il Mali (areale di svernamento), dove si è stabilmente insediato, percorrendo una distanza di 3.800 km circa, in 24 gg. Per il secondo giovane capovaccaio liberato in Puglia nel 2006 (Barbara) che, ha presentato una interruzione dei messaggi (*fixes*) del trasmettitore satellitare in Sicilia, si ipotizza una probabile perdita per cause di selezione naturale⁴. I giovani esemplari rilasciati in Puglia e monitorati mediante telemetria satellitare, nati in cattività da genitori di origine spagnola, hanno presentato attività comportamentali e rotta migratoria tipiche dei capovacciai selvatici. I risultati positivi ottenuti meritano conferme e ulteriori piani di ricerca sono necessari per una valutazione della attitudine dei capovacciai, nati in cattività e liberati mediante *hacking*, alla migrazione di ritorno, dagli areali africani di svernamento nei siti europei di rilascio, con studi mirati sulla performance riproduttiva.

BIBLIOGRAFIA - 1. Ferguson-Lees, J., Christie, D. A., *Raptors of the World*. Houghton Mifflin, Boston, (2001). 2. Meyburg, B.U. et al., Migrations and sojourn in Africa of Egyptian vultures tracked by satellite. *J. of Ornithol.* 145, 273-280, (2004). 3. BirdLife International. Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status. Wageningen, The Netherlands. *BirdLife Conserv. Series* No. 12, (2004). 4. Ceccolini G., Cenerini A., Sarà M. Il Capovaccaio, specie prossima all'estinzione? In: Fraissinet, M., Gariboldi, A. (eds): *Salvati dall'Arca*, WWF Italia, Alberto Perdisa Ed., Bologna, 351-365, (2006). 5. Gariboldi, A., Andreotti, A., Bogliani, G. La conservazione degli uccelli in Italia. Strategie e azioni. Alberto Perdisa Ed. Bologna, (2004). 6. Frey, H., Walter, W., The reintroduction of the bearded vulture *Gypaetus barbatus* into the Alps. In: B.U. Meyburg, B.U., Chancellor, R.D. (eds). *Raptors in the Modern World*, 341-44, (1989). 7. Ceccolini G., Cenerini A. Techniques of release for Egyptian vultures in Italy. In: *Bearded Vulture Annual Report 2005*. F.C.B.V., 121-124, (2005). 8. Sherrod, S. K. et al., Hacking: A Method For Releasing Peregrine Falcons and Other Birds of Prey, *The Peregrine Fund*, (1981).

VALUTAZIONE DEL LIQUIDO SEMINALE, REFRIGERAZIONE, E INSEMINAZIONE ARTIFICIALE NEL COLOMBO VIAGGIATORE (*Columba livia*)

SEMEN EVALUATION, CHILLED STORAGE, AND ARTIFICIAL INSEMINATION IN RACING PIGEON (*Columba livia*)

Costantini V., Nicassio M., Bucci F.A., Binetti F., Lacalandra G.M., *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari*

Parole chiave: Colombo viaggiatore, seme, extender, refrigerazione, inseminazione artificiale.

Key words: Racing pigeon, semen, extender, chilled storage, artificial insemination.

SUMMARY - This study was undertaken in the racing pigeon (*Columba livia*) to evaluate some semen characteristics, to identify a suitable extender for semen chilled storage and finally to check whether intracloacal insemination would lead to the birth of the chicks. Over a period of 4 months during the breeding season, semen was collected using manual massage method and evaluated for semen volume, sperm concentration and percentage motile spermatozoa. INRA96[®], semen extender with only one milk protein, the native phosphocaseinate, proved to be the best compared to two others extenders (EZ-Mixin[®]“BF” and EquiPro[®]). Artificial insemination using fresh semen resulted in 60% fertilization and birth of three live chicks.

INTRODUZIONE - In diversi Paesi sono in corso progetti di conservazione integrata per le specie ‘prioritarie’ dell’avifauna selvatica protetta mediante una migliore tutela degli habitat (conservazione *in situ*) e, per alcune delle 182 specie ‘in pericolo critico’ (*critically endangered*) della Lista Rossa dell’Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN), mediante programmi di riproduzione in cattività (*captive breeding*), rilascio in natura di giovani individui (*captive stock*) e piani di incremento delle popolazioni naturali residue (*restocking*) e reintroduzione negli areali storici (conservazione *ex situ*)^{1,2}. Le metodiche di riproduzione assistita ed inseminazione artificiale (IA), con crioconservazione del seme, possono svolgere un ruolo determinante nei programmi di conservazione della originale variabilità genetica delle specie (banca del seme) e di riproduzione in ambiente controllato dell’avifauna selvatica protetta. Le specie ‘prioritarie’, allevate in cattività, presentano frequentemente un basso tasso di fertilità, con una percentuale non trascurabile di problematiche da *impotentia coeundi* (incompatibilità di coppia, *imprinting* inidoneo, patologie biomeccaniche) e le adeguate tecniche di gestione dell’ambiente e dell’alimentazione non sempre garantiscono il successo riproduttivo³. L’applicazione in campo delle metodiche di IA prevede studi preliminari specie-specifici sulla fisiologia dello sperma, la definizione di efficaci diluitori e crioprotettori del seme, e lo sviluppo di idonei regimi di crioconservazione⁴. Negli uccelli sono state individuate varie tecniche di inseminazione artificiale e di conservazione di materiale seminale diluito e refrigerato, in specie domestiche^{4,5,6,7} e selvatiche^{8,9} utilizzando diversi diluitori come il TALP (Tyrode modificato), il turkey sperm extender (TSE), il chicken sperm extender (CSE), l’Ham’s F-10 e la soluzione di Tyrode, ma non sempre con definizione di metodiche affidabili, semplici ed economiche^{3,4}. Nell’ambito di un programma di ricerca sulla inseminazione artificiale del Colombo viaggiatore (*Columba livia*), individuato come specie ‘modello’ per programmi di conservazione *ex situ* di specie ‘prioritarie’ dell’avifauna selvatica protetta, è stata realizzata la valutazione di alcuni parametri del seme fresco, raccolto per 4 mesi durante la stagione riproduttiva, e degli effetti sulla percentuale di motilità degli spermatozoi di tre diluitori durante la refrigerazione. La inseminazione

intraclonale con seme fresco, è stata realizzata per valutare e confermare, nel Colombo viaggiatore, l'efficacia di una tecnica per ottenere *pulli* vivi e vitali.

MATERIALI E METODI - Il programma di ricerca è stato realizzato con individui adulti di Colombo viaggiatore (*Columba livia*) (maschi n=8; femmine n=4; età=1-2 anni; p.c.= ~ 350 g), muniti di anello inamovibile della Federazione Colombofila Italiana, e alloggiati da aprile a luglio (2006), a fotoperiodo naturale (12,8-14,9hL:11,2-9,1hD), in poste individuali standard in legno (36x75x36) di una colombaia, presso il Dipartimento di Produzione Animale dell'Università degli Studi di Bari (41°06'N, 16°52'E). Le poste sono state posizionate in modo da conservare il contatto visivo tra individui di sesso opposto⁴. I soggetti sono stati alimentati con specifica miscela di semi 'mantenimento extra', presente in commercio (mais, grano, favino, sorgo, pisello, girasole), integrata da sali minerali e grit. L'acqua è stata fornita *ad libitum*. I prelievi del liquido seminale sono stati realizzati da un operatore, una volta a settimana, con tubi da microematocrito calibrati (75±1,0L x 1,15±0,05d mm; Vol = ~75 µl), mediante massaggio dorso-addominale e pressione alla base della cloaca¹⁰. Sono stati valutati il volume (µl) ed il colore del liquido seminale, immediatamente dopo la raccolta e direttamente nel tubo calibrato, la motilità degli spermatozoi, con microscopio a contrasto di fase (100-400 x) (tecnica della 'goccia schiacciata' a 37,7 °C) e stima in termini percentuali (media di tre campi), e la concentrazione, previa diluizione (1:100; 1:200) in formalina al 2%, con camera ematocitometrica di Thoma (10⁹ ml⁻¹). Per valutare gli effetti di tre diluitori (extenders) sulla percentuale di motilità degli spermatozoi durante la refrigerazione, gli eiaculati di quattro soggetti (motilità spermatica media > 80%), sono stati miscelati in un unico campione (*pool*) e suddivisi in tre aliquote omologhe. Ciascuna aliquota è stata diluita, in Eppendorf da 2 ml, con uno degli extenders, a 37°C: INRA 96[®] (IMV Technologies, Italia s.r.l.), EZ-Mixin[®] "BF" (ARS, Chino, CA) ed EquiPro[®] (Minitube of America, Verona, WI). Per ciascun extender è stata realizzata la diluizione 1:10 (n = 5 campioni) e 1:20 (n = 5 campioni), utilizzando complessivamente 10 *pool* di eiaculati. La percentuale di motilità spermatica è stata valutata, prima (tempo 0) della diluizione e dopo refrigerazione (4-8°C), ad intervalli di 24 h. Per confermare l'efficacia, nel Colombo viaggiatore, di una tecnica di inseminazione intraclonale, mediante l'ausilio di tubi da microematocrito, quattro femmine sono state inseminate con seme fresco raccolto da quattro maschi. Le inseminazioni sono state realizzate subito dopo la deposizione del primo uovo della covata o ad un intervallo di 18 gg dalla deposizione del secondo uovo della covata precedente⁴.

RISULTATI - In quattro mesi sono stati ottenuti da maschi (n=8) di Colombo viaggiatore 120 eiaculati su 128 operazioni di prelievo (93%), mediante massaggio dorso-addominale¹⁰, per la valutazione di alcuni parametri del liquido seminale. Il colore del seme raccolto è risultato bianco opaco ed, occasionalmente, crema; il volume medio è risultato 7,4±2,5 µl (range: 4-15 µl). La concentrazione media spermatica è risultata 3,1±0,9 x 10⁹ spz/ml (range: 1,1-4,9 x 10⁹ spz/ml), con una percentuale media di motilità individuale degli spermatozoi di 74,4±16,7 % (range: 20-100%), e significative correlazioni positive tra il volume e la motilità spermatica (test di correlazione di Spearman: r_s = 0,45, P<0,01), la motilità spermatica e la concentrazione (test di correlazione di Spearman: r_s = 0,40, P<0,01). I campioni (n=10) di materiale seminale di Colombo viaggiatore (1 campione=4 eiaculati), prima della diluizione e refrigerazione, non hanno mostrato differenze statisticamente significative (P<0,01), relativamente alla percentuale di spermatozoi motili. Durante la refrigerazione (4-8 °C), tra i diluitori indicati, la percentuale media di motilità degli spermatozoi significativamente più elevata (66±6,5) è stata evidenziata nelle aliquote di liquido

seminale diluite (1:20) con INRA 96[®]. Le percentuali medie significativamente più basse a 24h (23±4,8%) ed a 48h (8±5,7%), invece, sono state evidenziate nelle aliquote diluite (1:10-1:20) e refrigerate con EquiPro[®] ($P<0,05$). Le quattro femmine di Colombo viaggiatore, per le quali sono state realizzate 16 inseminazioni intracloracali, mediante tubi da microematocrito, hanno presentato deposizione di 10 uova, con nascita, dopo 18 giorni di incubazione artificiale, di 3 pulcini vivi e vitali. Altre 3 uova non schiuse sono risultate con embrione con una 'fertilità uova' pari al 60% (n. uova fertilizzate/n. uova deposte).

DISCUSSIONE - Nel Colombo viaggiatore (*Columba livia*) è stata realizzata la valutazione di alcuni parametri del liquido seminale, degli effetti di tre diluitori sulla percentuale di motilità degli spermatozoi durante la refrigerazione, e dell'efficacia di una tecnica di inseminazione intracloracale. Per il prelievo del liquido seminale la tecnica del massaggio dorso-addominale e l'ausilio di tubi capillari da microematocrito calibrati, si sono confermati, nella specie, efficaci e di agile applicazione in campo. Nel Colombo viaggiatore, la concentrazione media di spermatozoi per eiaculato, a differenza di varie specie dell'avifauna selvatica, è risultata elevata ($3,1\pm 0,9 \times 10^9$ spz/ml), come nel Colombo selvatico (*Columba livia*)⁴. Pertanto la diluizione del liquido seminale con extenders, nel Colombo viaggiatore, rende più agevole la valutazione soggettiva della percentuale di motilità nemaspermatica. La diluizione con formalina al 2% (1:200) si è confermata valida per la valutazione della concentrazione degli spermatozoi mediante camera di Thoma. Le aliquote dei campioni di liquido seminale di Colombo viaggiatore, diluite con l'INRA 96[®] (1:20), hanno presentato durante la refrigerazione, la percentuale di motilità degli spermatozoi significativamente più elevata ($66\pm 6,5$ a 24h) ($32\pm 5,7$ a 48h), rispetto ai diluitori in comparazione. La inseminazione intracloracale si è confermata, nel Colombo viaggiatore, tecnica semplice, rapida ed efficace con nascita di pulli vivi e vitali. I risultati positivi ottenuti meritano conferme e ulteriori piani di ricerca sono necessari, nel Colombo viaggiatore, come 'specie modello', per una valutazione, mediante analisi computerizzata, dei vari parametri di motilità spermatica e della fertilità in vivo del liquido seminale diluito e refrigerato, nella prospettiva di nuove e concrete possibilità operative nella realizzazione dei programmi di riproduzione assistita e conservazione *ex situ* di specie 'prioritarie' dell'avifauna selvatica protetta.

BIBLIOGRAFIA - 1. Butchart, S.H.M. et al., Using Red List Indices to measure progress towards the 2010 target and beyond. *Philosoph. Transactions of the Royal Society of London*, 360, 359-372, (2005). 2. Gariboldi, A., Andreotti, A., Bogliani, G., La conservazione degli uccelli in Italia. Strategie e azioni. *Alberto Perdisa Editore*, Bologna, (2004). 3. Saint Jalme et al., Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*, 59, 875-88, (2003). 4. Sontakke, S. D. et al., Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology*, 62, 139-153, (2004). 5. Donoghue, A.M., Prospective approaches to avoid flock fertility problems: predictive assessment of sperm function traits of poultry. *Poult. Sci.*, 78, 437-43, (1999). 6. Holsberger, D.R., Donoghue, A.M., Froman D.P., Ottinger, M.A. Assessment of ejaculate quality and sperm characteristics in Turkeys: sperm mobility phenotype is dependent of time. *Poult. Sci.*, 77, 1711-7, (1998). 7. Penfold, L.M. et al. Characterization of Northern pintail (*Anas acuta*) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. *Reprod.*, 121, 267-75, (2001). 8. Blanco, J.M., Gee, G., Wildt, D.E., Donoghue, A.,M. Species variation in osmotic, cryoprotectants and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 63, 1164-71, (2000). 9. Samour, J.H. Semen Collection, Spermatozoa Cryopreservation, and Artificial Insemination in Nondomestic Birds. *J. Avian Med. Surg.* 18, 219-223, (2004). 10. Cheng, F.P. et al., Annual variation in semen characteristics of pigeons (*Columba livia*). *Poult. Sci.*, 81, 1050-6, (2002).

SESSAGGIO DEL GRILLAIO (*Falco naumanni*) MEDIANTE PCR-RFLP DA PIUMA
SEX DETERMINATION OF LESSER KESTREL (*Falco naumanni*) BY PCR-RFLP FROM FEATHER SAMPLES

Costantini V., Guaricci A.C., ¹Inglese G., ¹La Gioia G., ²D'Onghia T., Lacalandra G.M., *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari;*
¹Osservatorio Faunistico Regionale, Regione Puglia; ²Medico Veterinario, Libero Professionista.

Parole chiave: Grillaio, Sessaggio, PCR-RFLP, Piuma, Programmi Di Conservazione.
Key words: Lesser Kestrel, Sex Determination, PCR-RFLP, Feather, Conservation Programs.

SUMMARY - The Lesser Kestrel (*Falco naumanni*) is a small colonial migratory falcon, mostly insectivorous (grasshoppers and locusts), that breeds in South Italy between March and September. Populations have decreased by 90% since the middle of the 20th century in Europe, and the world population is likely to have declined by more than 30% in the last 10 years. For these reasons the Lesser Kestrel is evaluated as *Vulnerable* to global extinction, on the World Conservation Union (IUCN) Red List, and classified as priority bird Species of European Conservation Concern (SPEC I). To verify sex ratio in field populations and for gender identification in captive-breeding and *ex situ* conservation programs the sex determination at any age is essential. In this study we were able in sexing Lesser Kestrel juvenile (Group I, n=25) and adult subjects (Control, n=25) by PCR-RFLP analysis from feather samples stored over three months at room temperature.

INTRODUZIONE - La perdita di habitat trofici, il disturbo antropico dei siti riproduttivi europei, l'uso dei pesticidi e la persecuzione diretta sono le cause più importanti del declino del Grillaio (*Falco naumanni*), piccolo falco migratore, presente in Italia meridionale tra marzo e settembre¹. Nella Lista Rossa dell'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN) la specie è considerata 'Vulnerabile' a livello globale. In Europa le coppie di Grillaio sono diminuite, negli ultimi 50 anni, del 90% e la specie è considerata 'prioritaria' di elevato interesse conservazionistico (SPEC 1)². Il Grillaio in Italia nidifica ancora in poche colonie urbane del Meridione (Puglia e Basilicata) e nelle isole maggiori (Sicilia e Sardegna)^{3,4}. Prevalentemente insettivora, la specie caccia in gruppo utilizzando prede diverse (Ortotteri e Coleotteri) a seconda della disponibilità trofica ambientale⁵. In alcuni Paesi europei sono in corso progetti di conservazione del Grillaio mediante una migliore tutela degli habitat (conservazione *in situ*) e programmi di riproduzione in cattività (*captive breeding*), con rilascio di giovani individui per piani di incremento (*restocking*) delle residue popolazioni naturali e reintroduzione della specie nei suoi areali storici⁶. Per la conservazione delle specie minacciate, la definizione del sesso è determinante per lo studio della sex ratio delle popolazioni naturali (conservazione *in situ*), e per la scelta precoce dei riproduttori nell'ambito di programmi di riproduzione in ambiente controllato (conservazione *ex situ*)⁷. Negli ultimi anni sono state messe a punto diverse metodiche genetiche non invasive, da DNA estratto da piuma, per il sessaggio degli uccelli monomorfici e dimorfici immaturi, in alternativa alla determinazione del sesso basata sulla valutazione di elementi morfologici e comportamentali, non sempre attendibile, ed alle tecniche chirurgiche, non prive di rischi per la salute dei volatili e di non pratica realizzazione in *pulli* ancora presenti nel nido o in specie di piccola taglia⁸. La metodica di base che prevede l'impiego di una PCR con primers universali per il

gene Chromobox Helicase DNA binding domain (CHD)⁹ si è dimostrata efficace su centinaia di specie^{10,11}. Per specie non responsive, come alcune specie di Rapaci Diurni e Notturmi, è stata definita una metodica alternativa di sessaggio genetico, da DNA estratto da piuma, che prevede l'associazione della PCR alla tecnica Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)^{12,13}. Nell'ambito di un programma di ricerca sulla riproduzione assistita in cattività e conservazione del Grillaio è stata valutata la possibilità di determinare il sesso in individui immaturi, morfologicamente simili alle femmine adulte¹⁴, a partire da DNA estratto da piuma, mediante la tecnologia della PCR associata ad un'analisi del polimorfismo in lunghezza dei frammenti di restrizione con gli enzimi *HaeIII* e *Asp700*. La determinazione del sesso, mediante PCR-RFLP da piuma, in individui adulti dimorfici di Grillaio è stata realizzata per la validazione della metodica.

MATERIALI E METODI - Il DNA è stato estratto da cellule del calamo di 2-3 piume prelevate direttamente dalla regione pettorale di individui immaturi (Gruppo I, n=25) di Grillaio (*Falco naumanni*), con piumaggio giovanile, presso l'Osservatorio Faunistico Regionale di Bitetto (Ba) della Regione Puglia. Contemporaneamente la determinazione genetica del sesso è stata realizzata, con la stessa metodica, su individui adulti dimorfici (Gruppo Controllo, n=25) di Grillaio per la validazione. La conservazione dei campioni è stata realizzata per oltre tre mesi a temperatura ambiente. L'estrazione del DNA è stata effettuata mediante il kit GenElute™ Mammalian Genomic DNA miniprep (Sigma, Milano) con una digestione tissutale propedeutica a 55°C in medium di lisi con 0,4 mg di proteinasi K. Con l'ausilio di una coppia di primers P2 e P8⁹ sono stati amplificati in PCR 100 ng di DNA in un volume finale di 50 µl contenenti inoltre 5 µl di buffer per la Taq, 0.2 mM di ciascun dNTPs e 1 unità di HotMaster Taq polymerase (Eppendorf, Milano). Le condizioni di reazione standardizzate sono state di 94°C per 120 s e 35 cicli a 94°C per 45 s (denaturazione), 48°C per 45 s (*annealing*) e 72°C per 45 s, con un ciclo finale a 72°C per 5 min (allungamento) utilizzando il termociclatore Mastercycler Personal (Eppendorf, Italia). È stato incluso un controllo negativo per escludere contaminazioni da DNA esogeno, in quanto il gene CHD-1 è presente anche nell'uomo¹⁵. Il prodotto di amplificazione è stato analizzato su gel di agarosio al 3% e l'immagine acquisita con il GelDoc 2000 (Bio Rad, Italia). I prodotti di PCR, successivamente, sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *HaeIII* (Sigma, Milano) ed *Asp700* (Roche, Milano). Le reazioni sono state condotte in un volume finale di 20 µl contenenti 17,5 µl di prodotto di amplificazione, un enzima per volta (*HaeIII*=5U; *Asp700*=2,5U) ed il buffer corrispondente. Dopo 3 ore di incubazione, a 37°C, è stata effettuata una elettroforesi su gel di agarosio al 2% dei campioni colorati con Etidio Bromuro e l'immagine è stata acquisita con l'apparecchio GelDoc 2000.

RISULTATI - Dopo la PCR condotta con i primers specifici per la regione intronica ipervariabile del gene CHD-1, in tutti i soggetti immaturi (Gruppo I, n=25) ed adulti (Gruppo Controllo, n=25) si è avuto un prodotto di amplificazione risolto come singola banda su gel di agarosio di circa 410 paia di basi (bp). Per la determinazione del sesso è stata realizzata l'analisi degli amplificati mediante digestione con l'enzima *HaeIII*, che presenta un sito di restrizione sul prodotto di amplificazione derivante dal cromosoma Z, e con l'enzima *Asp700* che ha un sito di restrizione sul prodotto di amplificazione derivante dal cromosoma W¹². In questo modo è stato possibile distinguere in maniera inequivocabile i soggetti maschili da quelli femminili.

Con gli amplificati degli individui di sesso maschile processati con *HaeIII* sono state ottenute, dopo elettroforesi, **due bande** di circa 360 e 50 paia di basi (Fig. 2 linee c, e, g, m, o, s), e, con *Asp700*, soltanto **una banda**, di dimensione originaria (410 bp). Gli amplificati degli individui di sesso femminile si sono visualizzati, nel tracciato

elettroforetico, con **tre bande**, sia dopo digestione con l'enzima *HaeIII* (410, 360 e 50 bp), che con l'enzima *Asp700* (410, 330 e 80 bp). Per tutti gli individui adulti (Gruppo Controllo, n=25) di Grillaio, con evidente dimorfismo sessuale, c'è stata concordanza tra i risultati relativi al sesso determinato mediante l'amplificazione del DNA e le caratteristiche morfologiche individuali.

DISCUSSIONE - La determinazione genetica del sesso nel Grillaio (*Falco naumanni*) realizzata con PCR ed RFLP, da DNA estratto da piuma, è risultata metodica rapida e affidabile. L'impiego della PCR-RFLP si è confermata attendibile e valida alternativa, rispetto alle tecniche chirurgiche, per la determinazione precoce del sesso in giovani immaturi, in questa specie 'prioritaria' di elevato interesse conservazionistico. La metodica genetica per il sesso da piuma, incruenta e priva di alcun rischio per la salute dei volatili, è stata definita nel Grillaio dopo conservazione dei campioni (2-3 piume), a temperatura ambiente, anche oltre tre mesi. La metodica pertanto è di agile applicazione in campo, con possibilità di prelievo ed invio dei campioni ai laboratori specializzati con mezzi ordinari, direttamente ad opera di personale dei Centri di Recupero Animali Selvatici (CRAS) e Centri di Ricerca che intendono sviluppare programmi di conservazione nell'ambito di mirati Piani di azione. Si intravede anche la possibilità del prelievo dei campioni di piume da nidiacei di Grillaio, nei siti di nidificazione, ad opera di personale autorizzato, in concomitanza alle procedure di inanellamento delle popolazioni naturali, previste, a scopo scientifico, per studi della biologia e delle rotte migratorie della specie. La determinazione del sesso, mediante PCR-RFLP da piuma, si conferma, quindi, metodica di elezione, in soggetti molto giovani di Grillaio, per lo studio della sex ratio delle popolazioni naturali, nell'ambito di programmi di conservazione *in situ*, e per la scelta precoce dei riproduttori nel corso di programmi di riproduzione assistita e conservazione *ex situ*.

BIBLIOGRAFIA - 1. Palumbo, G., *Il Grillaio*. Altrimedia Ed., Matera, (1997). 2. BirdLife International. *Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status*. Wageningen, The Netherlands. BirdLife Conserv. Series, 12, (2004). 3. Sigismondi, A. et al., Status e problemi di conservazione della popolazione di Grillaio *Falco naumanni* nelle Murge. *Avocetta* 27, 44, (2003). 4. Gariboldi, A., Andreotti, A., Bogliani, G., *La conservazione degli uccelli in Italia. Strategie e azioni*. Alberto Perdisa Editore, Bologna, (2004). 5. Donazar, J. A., Negro, J. J., Hiraldo, F. Foraging habitat selection, land-use changes and population decline in the Lesser Kestrel (*Falco naumanni*). *J. Appl. Ecol.*, 30, 515-522, (1993). 6. Biber, J.P. International Action Plan for the Lesser Kestrel (*Falco naumanni*). In: Heredia, B., Rose, L., Painter, M. (eds), *Globally threatened birds in Europe: action plans*. Birdlife International, Strasbourg, 191-203, (1996). 7. IUCN. Guidelines for Re-introductions. Prepared by the IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, (1998). 8. Halverson, J., Nonsurgical method of avian sex identification. In: Altman, R.B., Clubb, S.L., Dorrestein, G.M., Quesenberry, K., *Avian medicine and surgery*. Saunders WB Co. Philadelphia, PA. 117-121, (1997). 9. Griffiths, R., Daan, S., Dijkstra, C.. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc R Soc Lond Ser., B* 263, 1251-1256, (1996). 10. Guaricci, A.C., Minoia, R., Lacalandra, G.M., Costantini, V., Sesso di volatili monomorfi mediante PCR. *Atti SIRA*, (2005). 11. Costantini V., et al., Sesso di l'Outarde Houbara par PCR sur plume. Séminaire international. Proc. *Elevage et faune sauvage dans les régions aride set désertiques: Enjeux et techniques d'amélioration*, Djerba, (Tunisie), 33, (2006). 12. Sacchi, P. et al., A non-invasive test for sex identification Short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). *Mol Cell Pro*, 18, 193-196, (2004). 13. Costantini, V. et al., Sesso di Rapaci Diurni e Notturmi mediante Pcr e Polimorfismo di Restrizione (RFLP). *Atti SIRA*, (2006). 14. Bricchetti, P., Fracasso, G. *Ornitologia Italiana. Vol.1 Graviidae, Falconidae. Identificazione, distribuzione, consistenza e movimenti degli uccelli italiani*. Alberto Perdisa Editore Bologna, (2003). 15. Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K., Dawson, R.J.G., A DNA test to sex most birds. *Molec. Ecol.*, 7, 1071-1075, (1998).

RINGRAZIAMENTI: Gli Autori ringraziano per la collaborazione lo staff dell'Osservatorio Faunistico Regionale di Bitetto (Ba), Assessorato Risorse Agroalimentari, Regione Puglia.

IMPIEGO DI DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI CPA E TEMPI DI ESPOSIZIONE PER LA VITRIFICAZIONE DI OOCITI DI GATTO
USE OF DIFFERENT CPA CONCENTRATIONS AND EXPOSURE TIMES FOR VITRIFICATION OF CAT OOCYTES

Ariu F., Bogliolo L., Fois S., Rosati I., Zedda M.T. , Pau S., Ledda S. *Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli studi di Sassari*

Parole chiave: Oocita, Vittrificazione, Gatto

Key words: Oocyte, Vittrification, Cat

SUMMARY - Experiments were carried out to test viability and meiotic competence of immature and mature cat oocytes vitrified by the MEMT with cryotops using two different methods: A) incubation with 10% EG+10% DMSO (30sec.); 20% EG+20%DMSO+ 0.25M sucrose (20 sec.) B) incubation with 7.5 % EG +7.5 % DMSO (3 min.); 15 % EG+ 15 % DMSO+ 0.5M sucrose (1 min.). In Exp.1 immature cat oocyte were vitrified immediately after collection without cumulus cells. After thawing oocytes were matured in vitro for 24 h with additional fresh cumulus cells. The results indicate that system B induced a significantly higher viability and developmental competence to MII compared with system A. In Exp.2, in vitro mature cat oocytes were vitrified with system A and B. Results showed that survival rate of the oocyte was statistically different after vitrification in A (8.7%) and B (80.5%) systems.

INTRODUZIONE - Nell'ambito delle biotecnologie riproduttive la crioconservazione del gamete femminile è una tecnica che sempre più si sta affermando in campo animale. La sua applicazione, infatti, potrebbe costituire un valido strumento per la conservazione del materiale germinale di soggetti di pregio o di specie che rischiano l'estinzione.

Il gamete femminile risulta particolarmente sensibile ai trattamenti ipotermici³ e diversi fattori incidono sulla sopravvivenza di questa speciale cellula dopo le procedure di crioconservazione. Tra questi è stato evidenziato come lo stadio meiotico dell'ooocita influenzi la sopravvivenza del gamete dopo il ripristino della temperatura. La maggior parte delle esperienze sono state condotte in oociti maturati in vitro dove è stato riportato come tale metodica induca una disorganizzazione del fuso meiotico e conseguentemente anomala distribuzione della cromatina¹. La crioconservazione di oociti immaturi potrebbe teoreticamente ridurre gli effetti di danneggiamento del citoscheletro e della cromatina e rappresentare una possibile alternativa, anche se in tale stadio il gamete è più sensibile alle condizioni ipotermiche che può causare maggiori danneggiamenti a carico della membrana cellulare⁵. Nella specie felina le esperienze di vittrificazione dell'ooocita sono alquanto scarse⁴ e i risultati ottenuti indicano come il gamete di questa specie sia particolarmente sensibile all'effetto tossico dei crioprotettori e alla rapida discesa termica.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la sopravvivenza e la competenza meiotica di oociti di gatto vittrificati allo stadio di vescicola germinale (GV) o dopo maturazione in vitro (MII) con la tecnica del Minimal Essential Volume utilizzando differenti concentrazioni di crioprotettori e tempi di esposizione diversi.

MATERIALI E METODI - Gli oociti utilizzati per la sperimentazione sono stati recuperati dalle ovaie di gatte sottoposti ad intervento di ovariectomia o ovarioisterectomia.

Esperimento 1- Dopo il recupero un gruppo di oociti è stato privato dalle cellule del cumulo e vittrificato secondo le seguenti due metodiche:

Protocollo A:

- incubazione in TCM 199 + 20% FCS + 10%EG +10%DMSO (30 sec.)
- trasferimento in TCM 199 + 20% FCS + 20%EG + 20%DMSO+ 0,25M saccarosio (20 sec)
- caricamento nel cryotop (2µl)
- immersione in azoto liquido

Protocollo B:

- incubazione in TCM 199 + 20% FCS + 7,5 % EG +7.5 % DMSO (3 minuti.)
- trasferimento in TCM 199 + 20% FCS + 15 % EG + 15 % DMSO + 0,5M saccarosio - caricamento nel cryotop (2µl)
- immersione in azoto liquido

Il ripristino della temperatura è stato effettuato in soluzione di TCM 199 + 20% FCS e saccarosio a concentrazioni decrescenti di 0,5 M, 0,25 M, 0.125 M, 0,062 M.

Gli oociti crioconservati secondo con i protocolli A e B, sono stati coltivati in TCM 199 + 10% FCS per 2 ore e successivamente è stata valutata la sopravvivenza evidenziando eventuali danneggiamenti a carico del citoplasma, della zona pellucida e della membrana plasmatica.

Maturazione in vitro - Dopo scongelamento e ripristino della temperatura gli oociti sono stati maturati in vitro in TCM199 + 0,4% BSA + hCG e FSH 0,1 UI/ml + cellule del cumulo addizionali a 38,5° C con il 5% CO₂ per 24 ore. Al termine della coltura sono stati fissati e colorati con glicerolo ed Hoechst 33342, osservati in fluorescenza per la valutazione dello stadio meiotico e la configurazione della cromatina.

Esperimento 2 - Dopo il recupero dalle ovaie un gruppo di oociti, è stato posto a maturare in vitro. Dopo 24 ore di incubazione gli oociti in metafase seconda (MII), valutati al microscopio stereo per la presenza del globulo polare, sono stati sottoposti ai protocolli di vitrificazione A e B. Si è proceduto quindi alla valutazione della sopravvivenza dopo il ripristino della temperatura.

Un gruppo di oociti controllo è stato maturato in vitro senza vitrificazione secondo le procedure indicate.

RISULTATI - I risultati relativi alla sopravvivenza e alla progressione meiotica degli oociti di gatto dopo vitrificazione allo stadio di vescicola germinale sono riportati nella Tab. 1. Dall'analisi dei dati si evidenzia come le percentuali di sopravvivenza dopo 2 ore dal ripristino della temperatura, non sono state significativamente differenti utilizzando il protocollo A (85,5%) e il protocollo B (90%). Le percentuali di oociti che hanno raggiunto la MII invece sono risultate significativamente più elevate dopo crioconservazione con il protocollo B (23,1%), rispetto al protocollo A (10,1%). Abbiamo, inoltre, osservato più elevati valori di degenerazione al termine della maturazione in vitro nel sistema A (20,2%), rispetto al sistema B (7,4%). Anche la vitrificazione di oociti in MII ha evidenziato maggiori percentuali di degenerazione dopo crioconservazione con il protocollo A (42/46: 91,3%), rispetto al protocollo B (8/41: 19,5 %).

DISCUSSIONE - I dati della presente sperimentazione hanno evidenziato per la prima volta come sia possibile crioconservare, mediante vitrificazione, oociti immaturi di gatto. Tale sistema potrebbe rappresentare un'alternativa alla crioconservazione del gamete maturo anche se le percentuali maturazione che sono state ottenute non sono ancora paragonabili a quelle osservate in altre specie animali e pongono la necessità d'individuare un protocollo specifico per questa specie. I nostri risultati dopo vitrificazione di oociti allo stadio di metafase seconda sono simili a quanto riportato da altri autori⁴ e mostrano la possibile applicazione di questa tecnica nei sistemi di riproduzione assistita nei felidi. Sono in corso prove di fertilizzazione in vitro e

attivazione partenogenetica, per verificare la potenzialità di sviluppo embrionale degli oociti vitrificati allo stadio di GV e MII.

Sistema di vitrificazione	n° oociti	n° oociti vitali dopo 2 IVC	Progressione meiotica			
			GV	GVBD MI/II	MII	DEG
A	104 (%)	89 (85,5) ^a	33 (37,0)	29 (32,6)	9 (10,1) ^a	18 (20,2) ^a
B	120 (%)	108 (90,0) ^a	32 (29,6)	43 (39,8)	25 (23,1) ^b	8 (7,4) ^b
Controllo	103 (%)		18 (17,4)	17 (16,5)	63 (61,1) ^c	5 (4,8) ^b

Tab. 1 - Vitalità e progressione meiotica di oociti di gatto vitrificati allo stadio di vescicola germinale. (GV: vescicola germinale; GVBD: rottura della vescicola germinale; MI: metafase I; MII: metafase II; DEG: degenerati).

BIBLIOGRAFIA - 1. Aman, R.R., Parks J.E., Effects of coolig and rewarming on the spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 103-110, (1994). 2. Hoch,i S., Tereo, T., Kamei, M., Kato, M., Hirabayashi, M., Hirao, M. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit by minimun volume cooling procedure. *Theriogenology*, 61, 267-275, (2004). 3. Ledda, S., Leoni, G., Bogliolo, L., Naitana, S., Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology* 55, 1359-1371 (2000). 4. Murakami, M.K., Otoi, T., Karja, N. W. K., Wongsrikeo, P., Agung, B., Suzuki, T. Blastocysts derived in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. *Cryobiology* 48, 341-348 (2004). 5. Otoi T., Yamamoto, K., Koyama, T., Suzuki, T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes criopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology*, 32: 455-460, (1995).

ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE MITOCONDRIALE IN OVOCITI DI CAGNA ESAMINATI AL PRELIEVO E DOPO MATURAZIONE IN VITRO
ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DISTRIBUTION IN BITCH OOCYTES EXAMINED AT COLLECTION AND AFTER IN VITRO MATURATION

Valentini L., Iorga A.I., De Santis T., Ambruosi B., Leoci R., Caira M., Dell'Aquila M.E., *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari.*

Parole chiave: cagna, oociti, maturazione in vitro, distribuzione mitocondriale.

Key words: bitch, oocyte, in vitro maturation, mitochondrial distribution.

SUMMARY - The aim of this study was to analyze the mitochondrial subcellular localization in canine oocytes examined at collection or after in vitro maturation (IVM). Our preliminary data show that mitochondrial distribution in immature oocytes could be related to the cycle stage. Germinal vesicle oocytes recovered from bitches in anestrous or late diestrous had homogeneous distribution of small granules. Oocytes recovered from bitches in proestrous, estrous and early diestrous showed networks of mitochondrial filaments. Metaphase II stage oocytes had a finely granular distribution, spread all over the cytoplasm. We conclude that current IVM culture systems may not allow canine oocytes to reach clustered subplasmalemmal or polarized mitochondrial distribution, described as typical of matured oocytes in other species, and that this unpaired oocyte energy status may contribute to low IVM rates in this species.

INTRODUZIONE - La distribuzione spaziale e l'attività metabolica dei mitocondri nell'ovocita sono requisiti fondamentali per la ripresa della meiosi e per il raggiungimento della piena maturità citoplasmatica e influenzano il successivo sviluppo embrionale dopo la fertilizzazione¹. Pertanto, l'attività mitocondriale negli ovociti può essere considerata un importante marker della loro condizione energetica e la sua valutazione può contribuire all'ottimizzazione delle condizioni colturali in vitro. Nella cagna, l'efficienza della maturazione in vitro (IVM) degli ovociti è ancora molto bassa rispetto alle altre specie domestiche. Le cause di questa situazione vanno ricercate in primo luogo nel livello iniziale della competenza meiotica degli ovociti recuperabili dall'ovaio, poiché in questa specie gli ovociti vengono ovulati allo stadio di vescicola germinale, completando la meiosi durante il transito tubarico². Negli ultimi anni è stata prodotta una crescente letteratura inerente alla IVM degli ovociti di cagna, in differenti condizioni colturali, ma i riscontri ottenuti sono ancora insoddisfacenti, con percentuali che non oltrepassano il 20%. I criteri operativi hanno considerato l'incidenza della fase del ciclo estrale^{3,4}; l'età delle donatrici⁵; la densità colturale⁶; i tempi di maturazione⁴; la supplementazione con ormoni eterologhi^{7,8}; la co-coltura con cellule oviduttali^{8,9}; l'aggiunta di fattori di crescita o di antiossidanti³. A nostra conoscenza, in letteratura non sono riportati dati sull'attività mitocondriale in ovociti di cagna, pertanto gli obiettivi del nostro lavoro sono stati: 1. studiare la distribuzione e lo stato di attivazione mitocondriale degli ovociti di cagna, esaminati al prelievo e dopo coltura per la IVM; 2. valutare se lo stato energetico possa essere considerato uno dei fattori limitanti la maturazione in tale specie, analizzando l'influenza della fase fisiologica riproduttiva della donatrice e della supplementazione del medium colturale.

MATERIALI E METODI - Gli ovociti sono stati prelevati da ovaie asportate da cagne sane puberi, di differente razza, età compresa tra 10 mesi e 5 anni, portate presso la nostra Clinica per essere sottoposte ad ovariectomia per finalità contraccettiva. La fase del ciclo è stata definita tramite valutazione clinica, esame colpocitologico, dosaggio del progesterone ematico, e confermata dalla valutazione morfologica delle ovaie secondo i

criteri descritti da Otoi et al.⁴ Il recupero degli ovociti è stato effettuato entro 30 minuti dall'intervento, mediante slicing delle ovaie. Sono stati analizzati solo ovociti circondati da alcuni strati di cellule del cumulo ooforo e con diametro maggiore di 100 µm. Una parte dei campioni è stata analizzata immediatamente dopo il prelievo e una seconda parte è stata coltivata in vitro per 72 ore a 38.5°C in 5% di CO₂ in terreno supplementato alternativamente con: 1) 20% Siero fetale bovino (FCS) e ormoni eterologhi (o-FSH, o-LH e 17β-estradiolo); 2) 10% siero di cagna in anestro (ACS) + ormoni; 3) 10% siero di cagna in estro (ECS) + ormoni; 4) 10% ECS senza ormoni; 5) 10% ECS senza ormoni (cambio di 100 µl del terreno di coltura ogni 24 ore). Dopo l'IVM, gli ovociti sono stati privati del cumulo ooforo e della corona radiata mediante breve incubazione in 80 UI/ml ialuronidasi e pulitura meccanica. Per l'evidenziazione dei mitocondri gli ovociti sono stati incubati per 30 minuti, a 38,5°C in 5% di CO₂, in un medium contenente 280 nM di MitoTracker Orange CMTM Ros (Molecular Probes) una sonda fluorescente, permeabile alle membrane cellulari, che si lega selettivamente ai mitocondri attivi. Al termine dell'incubazione gli ovociti sono stati fissati overnight a 4°C con paraformaldeide al 2% in tampone fosfato (PBS). La valutazione della cromatina nucleare degli ovociti è stata effettuata in microscopia in epifluorescenza dopo colorazione con 2,5 µg/ml di Hoechst 33258 disciolto in soluzione 3:1 di glicerolo e PBS. La valutazione della distribuzione mitocondriale è stata effettuata osservando gli ovociti con microscopio laser scanning confocale Nikon C1 ad ingrandimento 600x con olio ad immersione. I dati sono stati analizzati con test Chi-quadro.

RISULTATI - Centosessantaquattro ovociti, isolati da 8 cagne in differenti stadi del ciclo estrale (di cui 4 in diestro iniziale e 1 per ognuno degli stadi di anestro, proestro, estro, e diestro tardivo) sono stati analizzati al momento del prelievo. Di questi, 140 (85%) sono risultati allo stadio di vescicola germinale (GV), con cromatina decondensata, fibrillare o compatta, e 24 (15%) hanno mostrato anomalie della configurazione cromatinica. Gli ovociti in GV hanno mostrato differenti distribuzioni mitocondriali che, dalle preliminari osservazioni da noi condotte, sembrerebbero correlate allo stadio del ciclo. In particolare, la maggior parte degli ovociti dei soggetti in diestro tardivo (67%) e in anestro (54%) ha mostrato granuli piccoli distribuiti uniformemente nel citoplasma. La maggior parte degli ovociti dei soggetti in proestro (73%), estro (94%) e diestro iniziale (59%) ha mostrato un network reticolare di filamenti costituiti da granuli di dimensioni variabili, che nei soggetti in estro ha assunto una chiara distribuzione pericorticale (52%). Il nucleo è risultato sempre rivestito da uno strato uniforme di mitocondri. Dei 392 ovociti coltivati in vitro, 17 sono stati riscontrati in metafase II (MII, 4%), 19 in metafase I (MI, 5%), 211 in GV (54%) e 145 (37%) hanno presentato anomalie della cromatina. I dati relativi agli effetti delle condizioni colturali esaminate, sulle percentuali di IVM, sono riportati in **Tabella 1**. La distribuzione mitocondriale post-IVM è stata analizzata solo in ovociti in MI e MII. Degli ovociti in MI il 53% ha mostrato granuli piccoli e il 47% distribuzione reticolata. Tutti gli ovociti in MII hanno mostrato la configurazione con granuli piccoli diffusi in tutto l'ooplasma. In alcuni oociti (n°=2, 12%) è stato evidenziato un addensamento di mitocondri nell'area corrispondente al globulo polare.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI - A nostra conoscenza, ad oggi, nella cagna non sono stati prodotti lavori sulla distribuzione mitocondriale analizzata con sonde fluorescenti in grado di legarsi specificamente ai mitocondri attivi. I nostri dati consentono di concludere che: 1) sono stati descritti i pattern di aggregazione dei mitocondri attivi in ovociti canini nelle differenti fasi della meiosi; 2) notevole variabilità è stata riscontrata nei pattern degli ovociti esaminati al prelievo, probabilmente correlabile allo stadio del ciclo estrale; 3) i mitocondri di ovociti

riscontrati in MII dopo IVM hanno mostrato una distribuzione granulare diffusa in tutto l'ooplasma, che non richiama quella riportata per ovociti maturati in vitro in altre specie; 4) le condizioni colturali esaminate non consentono il raggiungimento di uno status energetico adeguato in ovociti di cagna. Questi riscontri confermerebbero le difficoltà a definire dei criteri morfologici univoci corrispondenti alle diverse fasi della meiosi per ovociti delle differenti specie di mammiferi. In ogni specie, con peculiarità legate alla fisiologia dello sviluppo follicolare e ovocitario, le modalità di migrazione e di riorganizzazione dei mitocondri appaiono differenti. Altre considerazioni potrebbero emergere dal confronto con pattern di ovociti maturati *in vivo* e dall'analisi di eventuali differenze quantitative nell'intensità della fluorescenza emessa.

Tabella 1 - Effetti di condizioni colturali sulla maturazione meiotica di ovociti di cagna.

Siero	Ormoni eterologhi	N° ovociti esaminati	N° (%) di ovociti in:			
			GV	da MI a TI	MII+PB	Anomalie
20% FCS	+	46	30 (65)	5 (11)	3 (7) ^b	8 (17)
10% ACS	+	44	24 (55)	2 (4)	1 (3)	17 (39)
10% ECS	+	125	59 (47)	7 (6)	1 (1) ^a	58 (46)
10% ECS	-	16	10 (63)	0 (0)	2 (12) ^b	4 (25)
10% ECS (*)	-	161	88 (55)	5 (3)	10 (6)	59 (36)

Test Chi-quadro con correzione di Yates per continuità e test esatto di Fisher, tabella di contingenza 2x2, 1 grado di libertà: $a \neq b = P < 0,05$. Legenda: GV = vescicola germinale; M = metafase; T = telofase; PB = polar body. (*) In questi campioni è stato effettuato un cambio di 100 µl del terreno di coltura ogni 24 ore.

BIBLIOGRAFIA - 1. Van Blerkom, J., Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*, 128(3), 269-80, (2004). 2. Reynaud, K. et al. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. *Theriogenology*, 66,1685–1693 (2006). 3. Kim, M.K. et al., Effect of β -mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *J. Vet. Sci.*, 5(3), 253-258, (2004). 4. Otoi, T., Shin, T., Kraemer, D.C., Westhusin, M.E., Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44(6), 631-7, (2004). 5. Rocha, A.A., Bastos, R., Cunha, I.C., Adona, P.R., Santos, J.A., Quantity and quality of oocytes recovered from donor bitches of different ages. *Theriogenology*, 66 (6-7),1465-7, (2006). 6. Otoi, T., Willingham, L., Shin, T., Kraemer, D.C., Westhusin, M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction*, 124, 775–781, (2002) 7. Rodrigues, B.A., Rodrigues, J.L. Meiotic Response of In vitro Matured Canine Oocytes under Different Proteins and Heterologous Hormone Supplementation. *Reprod. Dom. Anim.*, 38, 58–62, (2003). 8. Vannucchi, C.I., de Oliveira, C.M., Marques, M.G., Assumpcao, M.E., Visintin, J.A., In vitro canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone-supplemented media. *Theriogenology*, 66 (6-7), 1677-81, (2006). 9. Bogliolo, L. et al., Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42(3), 265-73, (2002).

ESPRESSIONE DEL RECETTORE MU PER GLI OPIOIDI IN UTERO DI CAGNA IN PIOMETRA
EXPRESSION OF MU OPIOID RECEPTOR IN CANINE UTERUS AFFECTED BY PYOMETRA

Valentini L., Guaricci A.C., Caira M., Zarrilli A., Albrizio M., *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari.*

Parole chiave: Cagna, Utero, Recettore Mu Per Gli Opioidi, Piometra, Diestro

Key words: Bitch, Uterus, Mu Opioid Receptor, Pyometra, Diestrus

SUMMARY - Pyometra in the bitch is an uterine subacute inflammation of diestrous. Cystic proliferation of the endometrium stimulation by progesterone frequently results in the development of pyometra due to subsequent bacterial infection; this causes a progressive increase of the volume of the uterus associated with a strong algic condition. This status determines an increase of the endogenous opioid peptides (EOP) levels, therefore in this study we analyzed the expression of the mu opioid receptor (MOR) in endometrium and myometrium of canine uterus affected by pyometra. After western blot analysis, a positive band of 50 KDa was observed in all samples. MOR appeared constitutively more expressed in the endometrium than in myometrium. Moreover the densitometric study showed an increase of MOR in the endometrium of the pathological samples compared with controls.

INTRODUZIONE - Il sistema oppioidergico modula la percezione del dolore, la secrezione ormonale, la contrattilità della muscolatura liscia e altre funzioni autonome, interagendo con specifici recettori di membrana localizzati nel sistema nervoso, centrale e periferico, e in molti organi cavi, come intestino^{1,2} e utero³. Numerosi studi sono stati condotti per evidenziare le funzioni di tale sistema nel controllo degli stati algici, mentre ancora carente è la bibliografia sul ruolo esercitato dagli oppioidi nella modulazione della cinetica viscerale. A livello intestinale, è stato dimostrato che l'infiammazione amplifica di 6-10 volte gli effetti inibitori degli agonisti oppioidergici sul transito e sulle secrezioni, attraverso un meccanismo periferico^{4,5}, e stimola la sintesi e l'espressione dei recettori μ per gli oppioidi (MOR)⁶, facendo ipotizzare che gli oppioidi endogeni (EOP) abbiano un ruolo inibitorio sulla contrattilità e sulle secrezioni ghiandolari intestinali. Ciò è stato confermato anche su base clinica, in quanto la somministrazione di calcio e naloxone, antagonista recettoriale degli oppioidi, in cavalli affetti da colica intestinale ha determinato il ripristino del transito intestinale in molti soggetti⁷. A livello uterino i peptidi oppioidi inibiscono le contrazioni^{8,9}, riducono il dolore locale durante la gravidanza e il parto^{10,11,12}, inibiscono la proliferazione cellulare estrogeno-indotta¹³. Nel ratto, la morfina riduce le contrazioni ritmiche spontanee e quelle toniche indotte da cloruro di potassio e tali effetti risultano maggiori in fase metaestrale¹⁴. La piometra nella cagna è una patologia infiammatoria, generalmente a decorso subacuto-cronico, che insorge a seguito della prolungata sollecitazione progestagena dell'utero, che in questa specie si verifica fisiologicamente in fase diestrale. Il progesterone (P₄) stimola la secrezione delle ghiandole endometriali, inibisce la contrattilità miometriale, riduce le difese immunitarie locali, mantiene la cervice chiusa. Tutto ciò predispone all'infezione batterica secondaria. Nella maggior parte dei casi, la cervice rimane chiusa per cui il pus si accumula nel lume uterino determinando una progressiva dilatazione di tale organo con marcata algia addominale. È ipotizzabile, pertanto, che la condizione algica e lo stato infiammatorio dell'utero inducano un incremento degli EOP legati a questo livello e che questi possano amplificare gli effetti del P₄ inibendo ulteriormente la contrattilità miometriale e le

difese immunitarie locali. In base a queste premesse, nel nostro lavoro abbiamo misurato i livelli di espressione di MOR nell'endometrio e nel miometrio di utero di cagna in piometra e in diestro, al fine di valutare se la piometra possa modificarne l'espressione.

MATERIALI E METODI - L'analisi è stata condotta su frammenti di endometrio e di miometrio prelevati da uteri sani di quattro cagne adulte di proprietà, portate presso i nostri ambulatori per essere sottoposte ad intervento di ovarioisterectomia per sterilizzazione (controllo) e da quattro cagne affette da piometra. Gli uteri sono stati aperti e lavati con soluzione fisiologica fredda. I campioni sono stati prelevati dalla base dei corni. L'endometrio è stato separato dal miometrio con microlama, sotto osservazione allo stereomicroscopio. La fase diestrale è stata valutata tramite esame colpocitologico e dosaggio del P₄ ematico e confermata dalla valutazione della morfologia ovarica dopo asportazione chirurgica. I campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido, polverizzati meccanicamente e incubati per 30' a 4°C in PBS/0,1% Triton in presenza di un cocktail di inibitori di proteasi (Roche, Milano). Dopo centrifugazione a 10000xg a 4°C, è stato prelevato il sovranatante contenente l'estratto proteico, che è stato dosato allo spettrofotometro (Beckman DU 640). Le proteine (40µg/campione) sono state separate mediante SDS-page su gel gradiente (4-12%) preconstituito (BioRad, MI, Italia), trasferite su membrana immobilon-P (Millipore, Bedford MA, USA) e ibridate per 18 ore con anticorpo (Ac) primario contro il terzo loop extracellulare del recettore oppioidergico mu di topo, prodotto nel coniglio (Chemicon Int. Temecula, CA, USA) diluito 1:7500. L'immunocomplesso è stato evidenziato mediante Ac secondario coniugato con perossidasi e rivelato mediante chemiluminescenza (SuperSignal West Pico, Pierce, MI, Italia). Dopo rivelazione, l'immunocomplesso è stato separato con specifico buffer (Restore™ Western blot stripping buffer, Pierce USA) e la membrana ibridata con Ac primario anti β-actina di ratto prodotto nel coniglio (SIGMA, Milano) diluito 1:30000. Dopo ibridazione di 18 h, è stato addizionato l'AC secondario e si è proceduto alla rivelazione con le stesse modalità. L'analisi densitometrica è stata effettuata mediante Gel Doc 2000 e software QuantityOne (BioRad, MI, Italia). L'analisi statistica è stata effettuata mediante test t-Student.

RISULTATI - L'analisi western blot ha evidenziato il segnale positivo atteso, di circa 50 KDa, in tutti i soggetti esaminati, corrispondente alla forma nativa di MOR (Fig. 1A). Tale banda è risultata presente anche nell'estratto proteico di cervello di topo, usato come controllo positivo. In alcuni campioni è presente anche una debole banda di circa 43 KDa. Nel cervello di topo, così come descritto in letteratura⁶, sono visibili anche altre due bande meno intense, di circa 60 e 43 KDa, possibile espressione di differenti gradi di modificazione post-traduzionale della forma nativa del recettore. Nessun segnale è risultato visibile con ibridazione effettuata dopo adsorbimento dell'Ac primario con il peptide immunizzante, indicativo della specificità dell'Ac utilizzato. L'analisi densitometrica, effettuata normalizzando i segnali di ibridazione del MOR con i corrispondenti valori relativi della β-actina (Fig. 1B), ha evidenziato livelli di espressione del MOR significativamente maggiori (p<0,001) nell'endometrio e nel miometrio degli uteri in piometra rispetto ai controlli; il MOR è risultato maggiormente espresso (p<0,001) nell'endometrio rispetto al miometro in entrambi i gruppi.

DISCUSSIONE - Lo studio condotto ha evidenziato che nell'utero di cagna il MOR è espresso sia nel miometrio che nell'endometrio, con maggiore intensità nel secondo. Nei campioni in piometra, l'incremento di espressione del MOR nell'endometrio è superiore rispetto a quello del miometrio. In alcuni soggetti, così come osservato nel

topo, compare la banda a basso peso molecolare di circa 43 KDa che coincide con il peso molecolare previsto per la forma clonata del MOR⁶. Lo stato infiammatorio, indotto dalla patologia, determina un significativo incremento dell'espressione, così come già osservato nell'intestino⁶. L'algia, conseguente alla distensione dell'utero per accumulo di materiale purulento, probabilmente è un ulteriore fattore di induzione dell'espressione del MOR in considerazione dell'importante ruolo svolto dagli EOP nella modulazione del dolore anche a livello periferico. L'incremento persistente dell'attività oppioidergica, potrebbe ulteriormente amplificare l'azione ipocinetica del P₄ a livello miometriale favorendo l'accumulo di materiale purulento nel lume uterino; inoltre considerati gli effetti immunodepressivi locali degli EOP¹⁵, potrebbero risultare un ulteriore fattore predisponente all'insorgenza dell'infezione batterica secondaria.

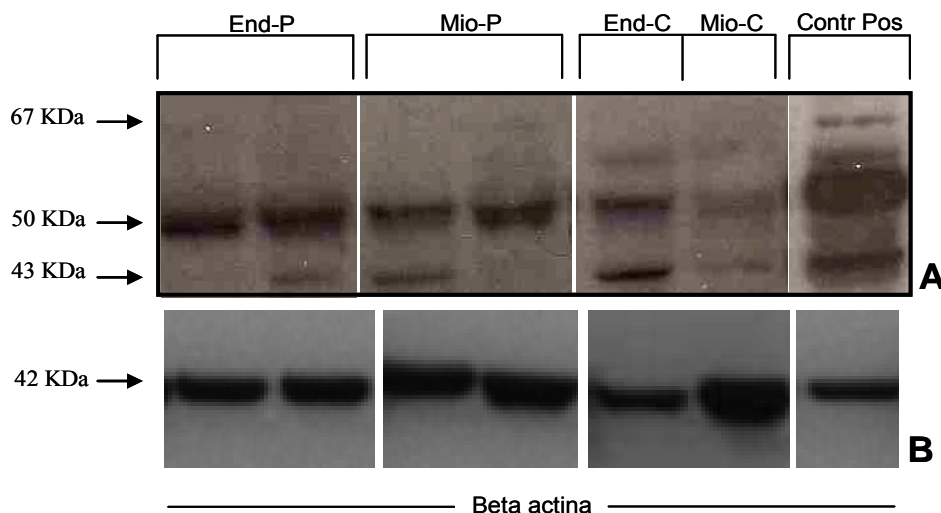


Fig. 1 - Immunoblot di un esperimento rappresentativo con: anticorpo contro il terzo loop extracitoplasmatico del recettore mu per gli oppioidi (pannello A) e anticorpo contro β -actina (pannello B). Sono evidenziati mediante frecce i pesi molecolari delle bande positive di ibridazione. End-P = endometrio da uteri in piometra; Mio-P = miometrio da uteri in piometra; End-C = endometrio da utero sano; Mio-C = miometrio da utero sano; Contr Pos= proteine estratte da cervello di topo. I pannelli A e B rappresentano estratti proteici dello stesso soggetto analizzati con i due diversi anticorpi.

BIBLIOGRAFIA - 1. Bagnol, D., Mansour, A., Akil, H., Watson, S., Cellular localization and distribution of the cloned opioid receptors in rat gastrointestinal tract. *Neuroscience*, 81, 579-591, (1997). 2. Cosola, C., et al., Opioid agonist/antagonist effect of naloxone in modulating rabbit jejunum contractility in vitro. *J. Physiol. Pharmacol.*, 57(3), 439-49, (2006). 3. Wittert, G., Hope, P, Pyle, D., Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 218, 877-881, (1996). 4. Puig, M.M., Pol, O. Peripheral effects of opioids in a model of chronic intestinal inflammation in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 287, 1068-1075, (1998). 5. Valle, L., Pol, O., Puig, M.M., Intestinal inflammation enhances the inhibitory effects of opioids on intestinal permeability in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 296, 378-387, (2001). 6. Pol, O., Alameda, F., Puig, M.M., Inflammation enhances μ -opioid receptor transcription and expression in mice intestine. *Mol. Pharmacol.*, 60, 894-899, (2001). 7. Caira, M., et al., Ruolo eziopatogenico degli oppioidi endogeni nella colica intestinale del cavallo. *Obiett. Doc. Vet.*, 7/8:33-36, (2004). 8. Poli, E., Merialdi, A., Coruzzi, G., Characterization of the spontaneous motor activity of the isolated human pregnant myometrium. *Pharmacol. Res.*, 22, 115-124, (1990). 9. Faletti, A. et al., Effects of beta-endorphin on spontaneous uterine contractions, prostaglandins production and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in uterine strips from ovariectomized rats. *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty Acids*, 47, 29-33, (1992). 10. Kimball, C.D., Chang, C.M., Chapman, M.B. Endogenous opioid peptides in intrapartum uterine blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 149, 79-82, (1984). 11. Baraldi, M. et al. Pregnancy related changes of opiate receptors identified in rat uterine membranes by ^3H -naloxone binding. *Peptides*, 6, 971-974, (1985). 12. Wahlstrom, T. et al., Immunoreactive β -endorphin is demonstrable in the secretory but not in the proliferative endometrium. *Life Science* 36, 987-990, (1985). 13. Környei, J.L. et al. Opioid peptides inhibit the estradiol-induced proliferation of cultured rat uterine cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 336, 65-70, (1997). 14. Ohia, S.E., Laniyonu, A.A., Naloxone-insensitive inhibitory and excitatory effects of opioid agonists in the rat isolated uterus. *J Pharm. Pharmacol.*, 41(3):168-72, (1989). 15. Wei, G., Moss, J., Yuan, C.S., Opioid-induced immunosuppression: is it centrally mediated or peripherally mediated? *Biochem Pharmacol.*, 65(11):1761-6, (2003).

CONFIGURAZIONE NUCLEARE, MICROFILAMENTI E GRANULI CORTICALI COME ESPRESSIONE DELLA MATURITÀ NUCLEARE E CITOPLASMATICA IN OVOCITI COMPATTI EQUINI DOPO INIBIZIONE MEIOTICA CON ROSCOVITINA

NUCLEAR CONFIGURATION, MICROFILAMENTS AND CORTICAL GRANULES AS MARKERS OF NUCLEAR AND CYTOPLASMIC MATURATION IN COMPACT HORSE OOCYTES AFTER ROSCOVITINE-INDUCED MEIOTIC INHIBITION

Lange Consiglio A., ¹**Arrighi S.**, **Bosi G.**¹, **Cremonesi F.**, *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie*, ¹*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano*

Parole chiave: Oociti Compatti Equini, Inibizione Meiotica, Roscovitina

Key words: Horse Compact Oocytes, Meiotic Inhibition, Roscovitine

SUMMARY - Oocytes recovered from small follicles have the capacity to undergo nuclear maturation, but may not achieve adequate cytoplasmic maturation to develop normally after fertilization. In this respect the aim of this study was to determine if, prior to *in vitro* maturation (IVM), meiotic suppression with Roscovitine (ROS) for 18h in maturation medium TCM199 (IVM-ROS) or in a simpler medium (M199-ROS), improves coordination of nuclear and cytoplasmic maturation of Cp horse oocytes. We analysed the nuclear maturation and the cytoskeletal organization of microfilaments and cortical granules (CG) by fluorescent dyes. Results show that pre-culture in IVM-ROS during meiotic suppression establishes a more suitable environment for partially improving the nuclear and cytoplasmic maturation of horse Cp oocytes.

INTRODUZIONE - La competenza dell'ooocita ad essere fertilizzato ed in seguito a svilupparsi in embrione dipende dalla sua abilità a completare la maturazione nucleare fino allo stadio di metafase II ma anche ad acquisire la maturazione citoplasmatica che coinvolge una serie di cambiamenti morfologici e biochimici dell'ooplasma¹. Nonostante un'ampia proporzione di oociti sia in grado di raggiungere la maturazione nucleare *in vitro*, quando rimossi dall'ambiente follicolare, molti oociti non completano la maturazione citoplasmatica che risulta asincrona con quella nucleare. Nel cavallo questa situazione è tipica soprattutto degli oociti con cumulo compatto recuperati dai follicoli vitali meno maturi². Al momento della raccolta dall'ovaio, questi oociti hanno cromatina diffusa entro la vescicola germinale (VG), basso tasso di maturazione^{3,4,5}, maturano più lentamente *in vitro*^{6,7} e richiedono più tempo per produrre proteine necessarie per la maturazione. Gli oociti espansi, invece, anche provenienti da follicoli atresici^{3,4}, sono caratterizzati da cromatina condensata entro la VG e migliori tassi di maturazione (80%)⁸. Fisiologicamente, più del 95% dei follicoli visibili presenti sulle ovaie equine ha diametro inferiore ai 20 mm e la raccolta tramite scraping della parete del follicolo permette di recuperare proporzionalmente un maggior numero di oociti dai follicoli più piccoli non atresici e, quindi, più oociti compatti rispetto agli espansi. Sarebbe interessante sviluppare *in vitro* un metodo per incrementare la percentuale degli oociti meioticamente competenti portando quelli compatti, aventi cromatina diffusa, allo stato di competenza meiotica degli oociti espansi. In quest'ottica, scopo del nostro lavoro è stato di verificare la possibilità di migliorare la coordinazione della maturazione nucleare e citoplasmatica degli oociti equini compatti, mantenendoli, prima della maturazione *in vitro*, in arresto meiotico grazie a trattamento con roscovitina (ROS), un inibitore specifico delle proteine responsabili della progressione della meiosi

(MPF e MAP)^{9,10}. Durante l'arresto meiotico allo stadio di VG, in condizioni che mimano la capacitazione¹¹, gli oociti potrebbero completare in maniera più fisiologica il processo di capacitazione necessario per sintetizzare e conservare RNAm e proteine¹² e diventare così più competenti a sviluppare embrioni. È necessario, però, durante questo condizionamento, riprodurre *in vitro* quei segnali inibitori della meiosi forniti *in vivo* dall'ambiente follicolare e per questo scopo abbiamo confrontato due *media* d'inibizione: il medium di maturazione *in vitro*, usato routinariamente nel nostro laboratorio, con la sola aggiunta di roscovitina (IVM-ROS) ed un medium d'inibizione di base (M199-ROS). Dopo il rilascio dall'arresto meiotico è stata studiata la cinetica di maturazione, poiché si suppone che, dopo inibizione con ROS, la progressione meiotica possa essere più veloce. La maturazione nucleare e citoplasmatica sono state valutate in base all'aspetto della configurazione nucleare e dell'organizzazione dei microfilamenti e dei granuli corticali (GC) attraverso colorazioni fluorescenti.

MATERIALI E METODI - Sono state recuperate 599 ovaie da cavalle con anamnesi riproduttiva sconosciuta sottoposte a macellazione. Le ovaie sono state private della tonaca albuginea al fine di evidenziare tutti i follicoli che sono stati incisi e sottoposti a raschiamento della parete interna mediante curette. I 2380 oociti recuperati sono stati morfologicamente classificati in: oociti aventi cumulo compatto (CCOs), cumulo parziale (Cp), cumulo espanso (Ex), corona radiata (Cr) o privi di cumulo (Cf). In questo studio sono stati utilizzati solo oociti con cumulo compatto che sono stati casualmente suddivisi in tre esperimenti.

• **Esperimento 1: controllo**

Parte degli oociti sono stati analizzati immediatamente dopo la raccolta (CTR) e parte dopo 29 ore di maturazione *in vitro* (IVM-CTR).

• **Esperimento 2: inibizione meiotica con ROS**

Gli oociti sono stati sottoposti a soppressione meiotica per 18 ore in due differenti *media* d'inibizione:

- Medium M199-ROS (TCM199 con l'aggiunta di 66 μ M di ROS)
- Medium IVM-ROS (medium di maturazione TCM199 completo di piruvato, FSH, LH, IGF, EGF, ITS con l'aggiunta di 66 μ M di ROS)

• **Esperimento 3: reversibilità dell'inibizione meiotica.**

Dopo inibizione meiotica gli oociti sono stati maturati *in vitro* (IVM) e analizzati a 11, 18 e 29 ore di maturazione per studiare la cinetica di maturazione.

Al termine di ciascuna condizione sperimentale gli oociti sono stati privati del cumulo e sottoposti alla valutazione della configurazione nucleare con *ioduro di propidio* (10 μ g/ml), all'analisi dell'organizzazione dei microfilamenti con *Faloidina* coniugata con fluoresceina isotiocianato (FITC) (1 μ g/ml) e all'analisi della distribuzione dei CG con *Lens culinaris*-FITC (1 μ g/ml). Gli oociti sono stati esaminati usando un microscopio confocale a scansione laser (Olympus BX51) con una combinazione di filtri d'eccitazione ed emissione a 488/650 nm.

RISULTATI - Esperimento 1: gli oociti immediatamente dopo la raccolta (CTR) erano tutti allo stadio di VG e presentavano microfilamenti e CG distribuiti attraverso tutto l'ooplasma. Dopo 29 ore di maturazione (IVM-CTR) il 24.92% degli oociti raggiungeva la metafase II, il 3.94% presentava microfilamenti alla regione corticale e l'8.66% era caratterizzato da CG alla periferia del citoplasma.

Esperimento 2: al termine delle 18 ore di inibizione meiotica con ROS, negli oociti coltivati in M199-ROS e in IVM-ROS il tasso di GV era rispettivamente del 70.15% e 14.49% ma in entrambi i *media* gli oociti mostravano ancora microfilamenti e CG distribuiti omogeneamente nel citoplasma. Il pre-trattamento con M199-ROS

incrementava significativamente ($p < 0,05$) la percentuale d'ocociti degenerati rispetto agli ocociti CTR, IVM-CTR e IVM-ROS.

Esperimento 3: dopo maturazione *in vitro*, negli ocociti pre-trattati con IVM-ROS il raggiungimento della metafase II era incrementato significativamente ($p < 0,05$) in paragone a M199-ROS e IVM-CTR (35,5% vs. 19,7% e 24,92% rispettivamente). Anche il tasso degli ocociti con microfilamenti e CG alla periferia del citoplasma aumentava significativamente ($p < 0,05$) negli ocociti pre-trattati in IVM-ROS rispetto a M199-ROS e IVM-CTR.

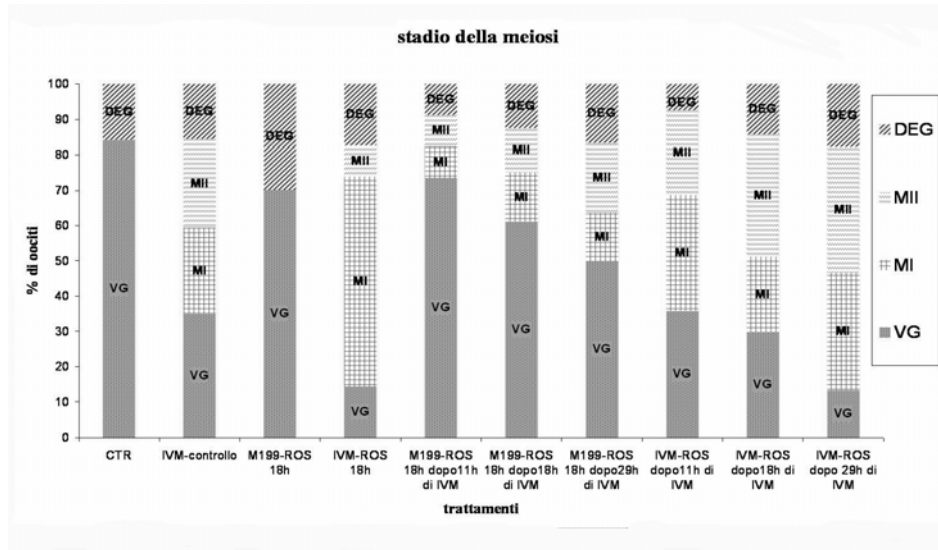


Figura 1 - Stadio della meiosi in ocociti soggetti a soppressione meiotica e dopo IVM
 Legenda: VG= vescicola germinale; M1= metafase I; MII= metafase II; Deg= degenerati

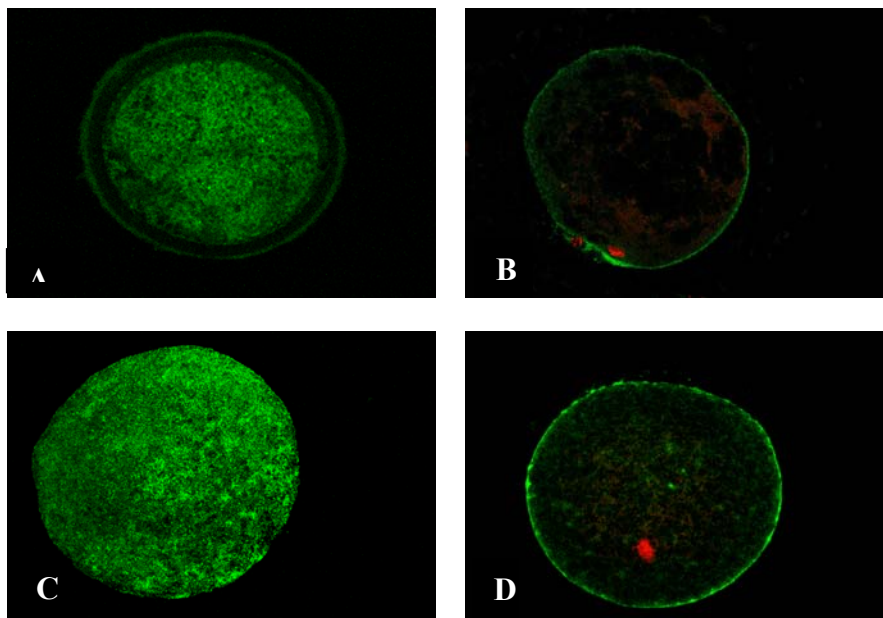


Figura 2 - Microfotografie di ocociti equino al microscopio confocale a scansione laser
 Gli elementi citoscheletrici ed il materiale nucleare sono stati marcati in maniera tale che i microfilamenti e i CG sono mostrati in verde e la cromatina in rosso. A) negli ocociti immaturi i microfilamenti sono distribuiti diffusamente attraverso l'ooplasma. B) negli ocociti maturi i microfilamenti sono concentrati alla periferia dell'ococita ed una ricca regione si sviluppa attorno al primo corpuscolo polare. C) negli ocociti immaturi i CG sono distribuiti attraverso il citoplasma dell'ococita. D) negli ocociti maturi i CG sono chiaramente concentrati alla periferia dell'ococita.

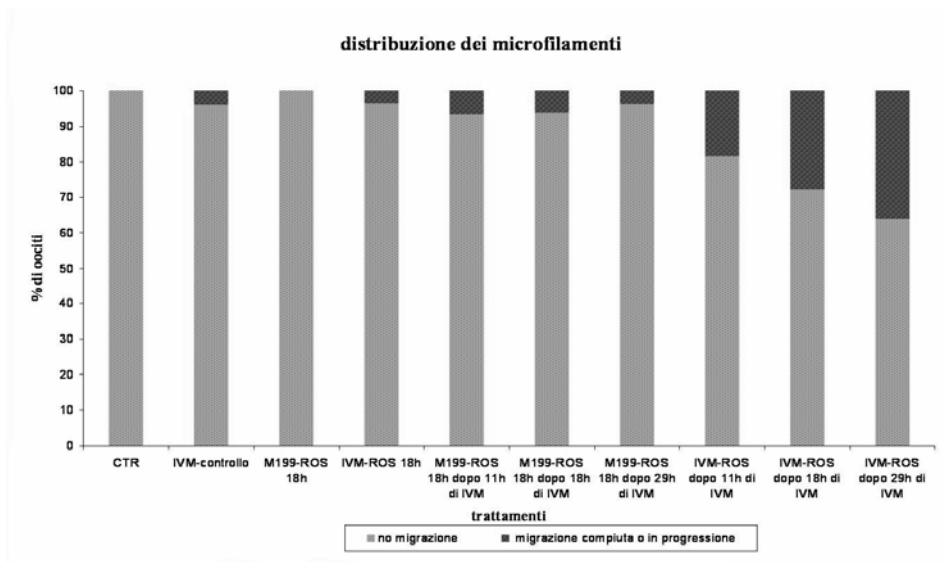


Figura 3 - influenza dei trattamenti sulla distribuzione dei microfilamenti

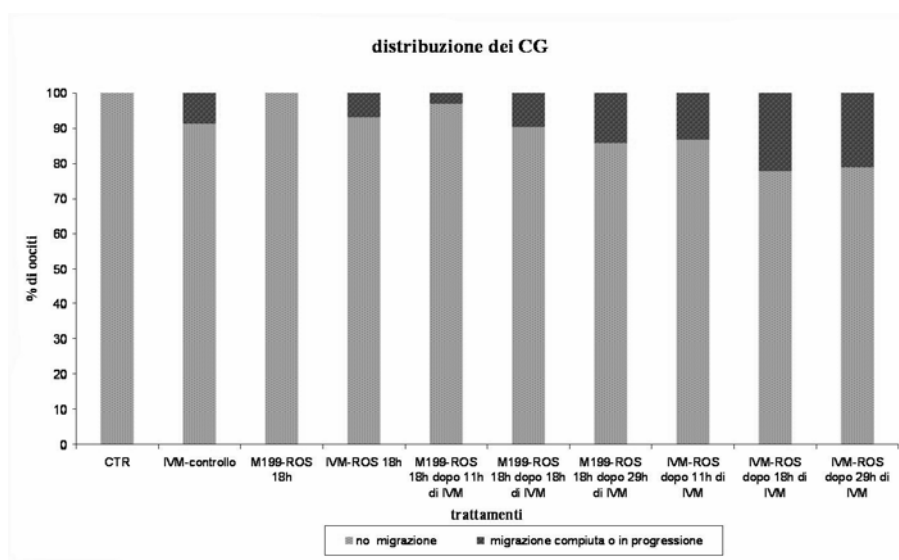


Figura 4 - influenza dei trattamenti sulla distribuzione dei CG

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI - Dai nostri risultati emerge che il tasso di maturazione *in vitro* degli oociti con cumulo compatto (IVM-CTR) è intrinsecamente basso. Infatti, la cromatina diffusa caratteristica degli oociti compatti al momento della raccolta, è inversamente correlata al tasso di maturazione⁵, ed inoltre, il lungo tempo di manipolazione degli oociti alla raccolta influenza negativamente il periodo di coltura necessario per la maturazione *in vitro*⁸. Durante la maturazione, come riportato in altre specie, la rottura della VG e la condensazione dei cromosomi sono solitamente accompagnate da una completa riorganizzazione dei microfilamenti e dei CG ma il basso tasso di migrazione delle strutture citoplasmatiche, rilevato nel nostro studio dopo IVM, potrebbe suggerire un ritardo della maturazione citoplasmatica rispetto a quella nucleare, probabilmente correlato al tipo di oociti impiegati, ottenuti da scraping di follicoli di ridotte dimensioni. Il pre-trattamento con roscovitina in M199-ROS chiaramente inibisce la progressione della meiosi, ma incrementa la proporzione di oociti degenerati rispetto agli oociti CTR e IVM-CTR suggerendo che la pre-maturazione in questo medium potrebbe provocare un effetto d'invecchiamento sugli oociti¹. Il medium IVM-ROS, invece, sopprime parzialmente la maturazione degli oociti come risulta anche evidente da un'iniziale espansione del cumulo che risulterebbe

indipendente dall'attività delle proteine MPF e MAP inibite dalla ROS. In entrambi i pre-trattamenti non sono ancora evidenti segnali di maturazione citoplasmatica. L'effetto inibitorio della roscovitina sia nel medium M199-ROS sia nel medium IVM-ROS è pienamente reversibile, poiché un sostanziale numero di oociti riassume la meiosi e raggiunge lo stadio di metafase II dopo maturazione *in vitro*. Il pre-trattamento con IVM-ROS a 29 ore di IVM migliora significativamente sia il tasso di maturazione sia la migrazione dei microfilamenti e dei granuli corticali rispetto al medium M199-ROS: questo suggerisce che i componenti del medium IVM-ROS (piruvato, LH, FSH, IGF, EGF, insulina, transferrina e selenio) creano un ambiente più adatto per migliorare parzialmente la maturazione nucleare e citoplasmatica degli oociti compatti equini. Dal nostro studio non emerge un'accelerazione della maturazione meiotica dopo un periodo d'inibizione a differenza di quanto suggerito da Ponderato¹³ sugli oociti bovini. Questa differenza potrebbe essere il risultato di variazioni di condizioni di coltura o di differenze biochimiche sulle modalità di azione della ROS sugli oociti bovini rispetto a quelli equini. Ovviamente, saranno necessarie successive modifiche delle concentrazioni di quest'inibitore e/o delle condizioni di coltura per migliorare la maturazione citoplasmatica che è il fattore limitante nel determinare la competenza allo sviluppo dell'oocita.

BIBLIOGRAFIA - 1. Donnay, I., Faerge, I., Grøndahl, C., Verhaeghe, B., Sayoud, H., Ponderato, N., Galli, C., Lazzari, G., Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. *Theriogenology*, 62, 1093-1107, (2004). 2. Franz, L. C., Choi, Y. H., Squires, E. L., Seide, Jr G. E., Hinrichs, K., Effects of roscovitine on maintenance of the germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction*, 125, 693-700, (2003). 3. Alm, H., Hinrichs, K., Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. *J. Reprod. Fertil.*, 107, 215-220, (1996). 4. Hinrichs, K., Williams, K.A., Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol. Reprod.*, 57, 377-384, (1997). 5. Hinrichs, K., Schmidt, A.L., Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. *Biol. Reprod.*, 62, 1402-1408, (2000). 6. Zhang, J.J., Boyle, M.S., Allen, W.R., Galli, C., Recent studies on *in vivo* fertilisation of *in vitro* matured horse oocytes. *Equine Vet. J. Suppl.*, 8, 101-104, (1989). 7. Hinrichs, K., Schmidt, A.L., Friedman, P.P., Selgrath, J.P., Martin, M.G., *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol. Reprod.*, 48, 363-370, (1993). 8. Hinrichs, K., Choi, Y. H., Love, L. B., Varner, D. D., Love, C. C. et al., Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biol. Reprod.*, 72, 1142-1150, (2005). 9. Nurse, P., Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-508, (1990). 10. Gotoh, Y., Nishida, E., Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 486-492, (1995). 11. Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Yang, X., Boland, M., Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. *Mol. Reprod. Dev.* 57, 204-209, (2000). 12. Diez, C., Duque, P., Gomez, E., Hidalgo, C.O., Tamargo, C., Rodriguez, A., Fernandez, L., de la Varga, S., Fernandez, A., Faca, N., Carbajo, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*, 64, 317-333, (2005). 13. Ponderato, N., Lagutine, I., Crotti, G., Turini, P., Galli, C., Lazzari, G., Bovine oocytes treated prior to *in vitro* maturation with a combination of Butyrolactone I and Roscovitine at low doses maintain a normal developmental capacity. *Mol. Reprod. Dev.*, 60, 579-585, (2001).

ESPRESSIONE, LOCALIZZAZIONE E FUNZIONI DEL CALCIUM SENSING RECEPTOR (CaSR) IN OVOCITI EQUINI
EXPRESSION, LOCALIZATION AND FUNCTIONS OF CALCIUM SENSING RECEPTOR (CaSR) IN EQUINE OOCYTES

De Santis T,¹ Guerra L,² Goudet G,² Dalbiès-Tran R,¹ Casavola V, Dell'Aquila ME
Dipartimento di Produzione Animale;¹ Dipartimento di Fisiologia Generale e Ambientale, Università degli Studi di Bari;² Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, France.

Parole Chiave: Equino, Ovociti, IVM, Calcium Sensing Receptor, NPS-R-467
Key Words: Horse, Oocyte, IVM, Calcium Sensing Receptor, NPS-R-467.

SUMMARY - This study investigates the functional role of Calcium Sensing Receptor (CaSR) in equine cumulus-oocyte complexes (COCs) by evaluating the effects of NPS-R-467, a calcimimetic agonist for CaSR, on in vitro oocyte maturation rate (MR). The expression of CaSR in equine cumulus-oocyte complexes was evaluated by means of RT-PCR, western blot e immunofluorescence. The effects of NPS-R-467 were analyzed after IVM, in standard culture conditions and after the addition for the first hour of incubation of an antagonist of CaSR, NPS2390. We conclude that NPS-R-467 has a beneficial role on in vitro maturation (IVM) and that CaSR plays a role in the control of meiotic maturation in equine oocytes.

INTRODUZIONE - Il Calcium Sensing Receptor (CaSR) è un G protein-coupled receptor attraverso il quale sistemi cellulari coinvolti e non nell'omeostasi del Ca^{2+} rispondono ai cambiamenti di Ca^{2+} extracellulare. Il gene codificante per CaSR, clonato e sequenziato da Brown et al. (1993)¹, è altamente conservato ed è stato isolato oltre che nell'uomo e nel bovino anche in rettili, pesci, anfibi e uccelli². La localizzazione di CaSR in cellule è stata messa in relazione alla regolazione di differenti processi cellulari, quali secrezione, chemiotassi, differenziamento, proliferazione, attività di canali ionici e apoptosi. Nell'ovocita, in particolare, il calcio (Ca^{2+}) è un fondamentale messaggero della maturazione citoplasmatica e nucleare. Nell'ovaio l'espressione di CaSR è stata riportata nelle cellule dell'epitelio superficiale³ e negli ovociti umani⁴. Oltre al Ca^{2+} , aminoacidi L, antibiotici aminoglicosidici, cationi bi e trivalenti, poliamine e numerosi agonisti convergono su CaSR per attivare un complesso network di reazioni a cascata di signal transduction³. L'NPS-R-467 è un calciomimetico in grado di mimare o potenziare gli effetti del calcio extracellulare sul CaSR determinando un aumento della $[Ca^{2+}]$ intracellulare⁵. Obiettivo del presente lavoro è stato di dimostrare l'espressione di CaSR in ovociti e cellule del cumulo equini mediante RT-PCR, western blot e immunofluorescenza e di valutare il ruolo funzionale di CaSR sul processo di IVM di COCs equini, attraverso l'analisi degli effetti del NPS-R-467 addizionato al terreno di coltura.

MATERIALI E METODI - **PCR** RNA totale è stato estratto da ovociti e cumuli oofori mediante Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics). Dopo l'estrazione il pellet è stato risospeso in 4µl di H₂O distillata e l'RNA retrotrascritto per 1 ora a 37°C. Per l'amplificazione del cDNA ottenuto è stata scelta una coppia di primers in grado di amplificare una regione tra l'esone 5 e l'esone 6. Per la reazione di PCR è stato utilizzato un thermocycler (geneamp PCRsystem 9700, Perkin Elmer). Il prodotto dell'amplificazione è stato analizzato mediante separazione elettroforetica su gel di agarosio al 2,5% contenente 0,25µg/ml di etidio bromuro. Il segnale è stato visualizzato mediante raggi UV. **Western blot** Gruppi di ovociti e i corrispondenti cumuli oofori sono stati trattati come riportato da Dell'Aquila et al., 2006⁴. **Immunofluorescenza**

Dopo il denuding e la valutazione della fase meiotica gli ovociti sono stati trattati come riportato da Dell'Aquila et al, 2006⁴. **Maturazione in vitro, valutazione della cromatina nucleare e analisi statistica** Sono state utilizzate ovaie di cavalle macellate, prelevate nel periodo di anestro invernale. I COCs sono stati raccolti mediante la tecnica dello scraping analizzati e suddivisi in compatti (Cp) ed espansi (Esp) in base alla morfologia del cumulo. Gli ovociti prelevati con cumulo Cp o Esp sono stati coltivati separatamente in ragione della riportata differente competenza meiotica di queste due categorie, denudati, fissati e valutati per la cromatina nucleare come riportato da Dell'Aquila et al. 2004⁶. **Disegno Sperimentale** Gli ovociti sono stati coltivati in terreno IVM standard, in presenza di NPS-R-467 5 μ M e in presenza di NPS2390 10 μ M (per la prima ora di incubazione) e NPS-R-467 5 μ M.

RISULTATI - Per la PCR l'RNA totale è stato estratto da 10 ovociti e da cumuli di 10 ovociti. Una banda di 162bp è stata rilevata solo nelle cellule del cumulo corrispondente alla dimensione del frammento amplificato. Per l'analisi di Western blot sono stati esaminati estratti cellulari di 10 ovociti denudati e 10 cumuli oofori. Negli ovociti denudati è stata riscontrata una banda di 130 kDa rappresentativa una forma glicosilata della proteina CaSR e nei cumuli oofori è stato osservato un doppietto di 120 e 130 kDa, corrispondente ad una forma glicosilata e ad una non-glicosilata. L'immunofluorescenza è stata condotta su 20 ovociti equini di cui 4 ovociti in GV, 4 in MI e 12 in MII. Le serie ottiche hanno fornito informazioni sulla distribuzione della proteina CaSR ai piani focali esaminati evidenziando la presenza del recettore sia nel comparto somatico che germinale dei complessi cumulo-ovocita e in tutti gli stati maturativi osservati. L'NPS-R-467 aggiunto alla concentrazione 5 μ M ha significativamente aumentato le percentuali di maturazione nel gruppo degli ovociti Esp (23/31, 74% vs 8/20, 40% p<0,04) ma non ha avuto effetti significativi sugli ovociti Cp (17/40, 43% vs 11/26, 42%). Al fine di valutare se l'effetto osservato fosse mediato da CaSR l' NPS-R-467 5 μ M è stato aggiunto al terreno di IVM dopo 1 ora di incubazione con un antagonista di CaSR, l'NPS2390 10 μ M. L'antagonista di CaSR ha annullato l'effetto dell'agonista negli ovociti Esp in maniera significativa (12/27 44% vs 23/31, 74% p<0,04), ma non ha avuto effetti sui Cp (12/30, 40% vs 17/40, 43%).

DISCUSSIONE - Questo studio indaga per la prima volta l'espressione di CaSR in ovociti e cellule di COCs equini mediante RT-PCR, Western Blot e immunofluorescenza. Gli esperimenti di RT-PCR hanno dimostrato la presenza di frammento della dimensione attesa solo in cellule del cumulo. La mancanza dell'amplificato negli ovociti lascia ipotizzare una limitata quantità di RNA per il CaSR dovuta a degenerazione o a un blocco della trascrizione in questa fase dello stadio maturativo dell'ovocita. Gli esperimenti di Western blot dimostrano che il recettore è presente sia nel comparto somatico che germinale dei complessi cumulo-ovocita. Precedenti studi condotti su cellule embrionali renali transfettate (HEK293) per CaSR e in cellule paratiroidee bovine hanno dimostrato la presenza di bande immunoreattive in un range da 120 a 200 kDa. La banda a 120 kDa rappresenta la forma non-glicosilata di CaSR e le due bande a 130-140 e a 150-160 kDa corrispondono a differenti stadi di glicosilazione^{7,8}. L'espressione proteica di CaSR è risultata più abbondante nelle cellule del cumulo che negli ovociti denudati. L'immunofluorescenza eseguita sugli ovociti ha dimostrato che CaSR è localizzato all'interno del citoplasma e sulla membrana plasmatica in tutti i piani e in tutti gli stadi maturativi analizzati. Come osservato in altri sistemi cellulari, il recettore presente sulla superficie della cellula è una piccola frazione del CaSR totale e potrebbe rappresentare la forma matura del recettore. Il CaSR citoplasmatico osservato potrebbe rappresentare la proteina di recettore nascente anche se non si può escludere che possa avere una distinta funzione biologica come Ca²⁺

sensing intracellulare⁷. Una volta accertata l'espressione e localizzazione del CaSR si è voluto valutare la sua risposta funzionale ad agenti agonisti in esperimenti di IVM. La sperimentazione condotta con NPS-R-467 alla concentrazione di 5µM ha avuto l'obiettivo di valutare l'effetto di questo calciomimetico sulle percentuali di maturazione in vitro degli ovociti. In precedenti studi condotti in cellule HEK293 transfettate per CaSR, l'NPS-R-467 è stato utilizzato alle concentrazioni comprese tra 1 e 10 µM e si è osservato che variazioni massimali dei livelli della concentrazione intracellulare di Ca²⁺ si verificavano dopo incubazione con NPS-R-467 1 µM e 5 µM⁹. Zhang et al. nel 2002 hanno dimostrato inoltre che questo composto calciomimetico si comporta come modulatore allosterico positivo in grado di aumentare le sensibilità del CaSR all'attivazione da parte del Ca²⁺ extracellulare ed anche l'affinità del CaSR per la sua proteina G coniugata¹⁰. L'aggiunta di NPS-R-467 5µM nelle condizioni standard del nostro sistema sperimentale, ha determinato effetti significativi sull'andamento della maturazione meiotica degli ovociti Esp trattati. Nella sperimentazione nella quale, dopo 1 ora di incubazione con un antagonista di CaSR, l'NPS2390 10µM, è stato aggiunto NPS-R-467 5µM al terreno di IVM, ha determinato una riduzione statisticamente significativa dell'effetto dell'agonista in ovociti recuperati con cumulo Esp ed nessun effetto in ovociti recuperati con cumulo Cp. Questa differente risposta al trattamento suggerisce una differenziale espressione e/o localizzazione di CaSR tra ovociti Cp e Esp oppure il verificarsi di modificazioni morfo-funzionali del recettore nel passaggio dallo stadio con cumulo Cp a quello con cumulo Esp. I dati ottenuti confermano che l'effetto stimolatorio sulle percentuali di maturazione in vitro degli ovociti è dovuta alla specificità dell'agonista verso il recettore. I nostri dati consentono di concludere che: 1) CaSR è presente ed è attivo in COCs equini; 2) i dati delle colture in vitro ne costituiscono dimostrazione indiretta e confermano i dati sull'espressione; 3) NPS-R-467 ha un effetto stimolatorio nelle nostre condizioni di coltura e che il CaSR potrebbe avere un ruolo importante nella maturazione meiotica negli ovociti equini. In considerazione della differente competenza meiotica tra ovociti Cp e Exp sono necessari altri studi per definire condizioni di coltura (differente concentrazione dell'NPS-R-467 o una diversa concentrazione di calcio nel medium) nelle quali potrebbe essere osservato un effetto significativo anche nei Cp.

BIBLIOGRAFIA - 1. Brown, E.M. et al., Cloning and characterization of an extracellular Ca⁺⁺ sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 366, 575-580, (1993). 2. Hofer, A.M., Brown, E.M. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nature*, 4, 530-538, (2003). 3. Brown, E.M., MacLeod, R.J. Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling. *Physiol Rev*, 81, 239-297, (2001). 4. Dell'Aquila, M.E. et al., Localization and quantitative expression of the Calcium Sensing Receptor (CaSR) protein in human oocytes. *Fertil Steril*, 85, 1240-1247, (2006). 5. Nemeth, E.F. et al., Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci, USA* 95, 4040-4045, (1998). 6. Dell'Aquila, M.E. et al., Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 44, (2004). 7. Bai, M. et al., Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca²⁺-sensing receptor. *J Biol Chem*, 271, 19537-19545, (1996). 8. Bai, M., Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium*, 35, 197-207, (2004). 9. Mun, H.C. et al., The Venus Fly Trap domain of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor is required for L-amino acid sensing. *J Biol Chem*, 279, 51739-51744, (2004). 10. Zhang, Z. et al., L-phenylalanine and NPS R-467 synergistically potentiate the function of the extracellular calcium-sensing receptor through distinct sites. *J Biol Chem*, 277, 33736-33741, (2002).

Ricerca finanziata con Fondi MIUR COFIN PRIN 2003

**STUDIO FUNZIONALE SUI CANALI VOLTAGGIO DIPENDENTI DI TIPO L
NEGLI SPERMATOZOI EQUINI**
STUDY OF CAV L-TYPE CHANNELS ACTIVITY IN EQUINE SPERMATOZOA

Micera E., Surdo N.C., Nicassio M., Albrizio M., Zarrilli A., *Dipartimento di
Produzione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari.*

Parole chiave: Spermatozoi Equini, Concentrazione Calcio Intracellulare, Canali Ca²⁺
Tipo L.

Key words: Equine Spermatozoa, Intracellular Calcium Concentration, L-Type Calcium
Channel.

SUMMARY - We studied the activity of L-type voltage operated calcium channels (CaV) in living equine spermatozoa employing an agonist (Bay K-8644) and an antagonist (Nifedipina) of CaV L-type channels, and QuantiCell 900 Imaging System (VisiTech International). In this work the variations of intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) were recorded when each substance was added to the medium.

INTRODUZIONE - Numerosi studi sulla fisiologia della cellula spermatica attribuiscono un ruolo fondamentale alle variazioni della [Ca²⁺]_i¹: essendo motilità²⁻³, capacitazione⁴⁻⁵ e reazione acrosomiale⁶⁻⁷ processi calcio dipendenti. L'attività dei CaV, distinti in HVA- ad alta soglia (tipo L-N-P-Q-R)- ed LVA -a bassa soglia (T- type)-, è essenziale per tradurre segnali di varia natura in eventi fisiologici. I canali per il Ca²⁺ di tipo L sono i più diffusi, localizzati in tutti i tessuti eccitabili e in molti non eccitabili; in spermatozoi umani e murini⁸⁻⁹⁻¹⁰ è stato identificato l'mRNA della subunità $\alpha 1C$ dei canali di tipo L, studi di immunostochimica ne hanno confermato la localizzazione subcellulare¹¹.

In questo lavoro è stata valutata l'attività dei CaV di tipo L in singoli spermatozoi equini vitali e mobili, attraverso lo studio delle variazioni [Ca²⁺]_i in presenza di un agonista ed un antagonista degli stessi. È stato impiegato il QuantiCell 900 per la quantificazione e lo studio dello stato dinamico dello ione Ca²⁺ in spermatozoi semi-immobilizzati in una matrice di agar con una tecnica messa a punto modificando opportunamente il protocollo proposto da Wennemuth G. nel 1998¹².

MATERIALI E METODI - Tutti i reagenti se non indicato specificamente sono stati forniti da Sigma-Aldrich, Milano, Italia.

L'analisi è stata condotta su seme fresco. Il materiale seminale, è stato sottoposto a lavaggio in opportuno Buffer¹²; centrifugato per 5 min a 400xg a 37°C. Il pellet di spermatozoi è stato risospeso in 1ml di Buffer e sottoposto ad analisi mediante IVOS CASA Sistem (Hamilton Thorne Biosciences, USA) per valutarne concentrazione e motilità.

Al campione contenente 1·10⁸ spermatozoi è stato addizionato Fura-2AM 3μM¹³, dopo 45 min di incubazione a 37°C in 5% CO₂, il Fura-2AM è stato rimosso mediante 3 lavaggi consecutivi in 1ml di Buffer, 500 μl di PVP 2%. Il pellet è stato poi risospeso in 1ml di Buffer. Gli spermatozoi sono stati semi-immobilizzati con una soluzione di agarosio 0,6% (rapporto 3:1 v/v) sul fondo di micropiastre (Glass Botton Dish; WillCo-dish®KIT), mantenute a 37°C.

Per la quantificazione e lo studio dello stato dinamico del Ca²⁺ è stato impiegato il QuantiCell 900 (VisiTech International, Sunderland, UK)¹². Il software (Image Pro Plus, Media Cybernetics, USA) acquisisce l'intensità di fluorescenza elaborando le immagini e fornendo contemporaneamente la [Ca²⁺]_i dal rapporto tra i valori di fluorescenza ottenuti alle due lunghezze d'onda d'eccitazione: 340 nm e 380 nm¹³.

Sono state registrate, con obiettivo 100X, 100 immagini ad intervalli regolari. Per valutare l'attività dei canali CaV di tipo L, mediante perfusione sono stati aggiunti l'agonista specifico Bay K-8644 1 μM ¹⁴ o l'antagonista Nifedipina 1 μM ¹⁵. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test ANOVA su un totale di 50 cellule per ogni tipo di esperimento, ciascuno condotto in triplicato. Allo scopo di escludere che le variazioni di fluorescenza osservate fossero imputabili ad altri cationi bivalenti o al Ca^{2+} proveniente dagli organuli citoplasmatici è stato allestito un controllo, per entrambe le sostanze, impiegando il Buffer privo di Ca^{2+} addizionato di EGTA 0,6 mM.

RISULTATI - L'aggiunta di ciascuna sostanza ha determinato variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ degli spermatozoi equini. Il grafico 1 mostra i valori medi della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in assenza e in presenza di Bay K-8644 1 μM . In seguito all'aggiunta dell'agonista le cellule in osservazione hanno mostrato un incremento statisticamente significativo ($P < 0,001$) della concentrazione media intracitoplasmatica dello ione che è passata da 202 nM a 239 nM.

Come mostrato nel grafico 2 la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ da valori medi basali di circa 192 nM diminuisce a valori di 106 nM dopo l'aggiunta di Nifedipina 1 μM . L'antagonista ha quindi indotto un decremento statisticamente significativo ($P < 0,001$).

I controlli per ciascuna sostanza non mostrano variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dopo perfusione delle stesse con il medium (Graf. 3 e 4).

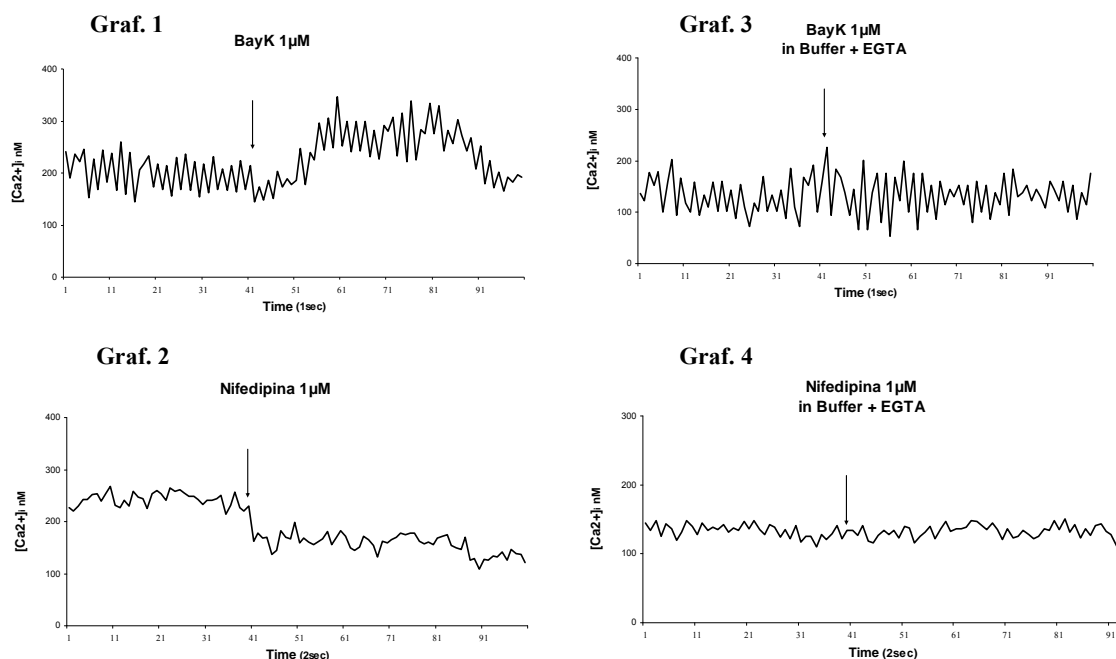


Grafico 1: Valori medi della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rilevati in presenza di Buffer contenente Ca^{2+} (scansioni 1-40) e dopo perfusione con Buffer contenente Ca^{2+} addizionato di Bay K-8644 1 μM (scansioni 41-100). Tempo di scansione 1 secondo.

Grafico 2: Valori medi della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rilevati in presenza di Buffer contenente Ca^{2+} (scansioni 1-40) e dopo perfusione con Buffer contenente Ca^{2+} addizionato di Nifedipina 1 μM (scansioni 41-100). Tempo di scansione 2 secondi.

Grafico 3: Valori medi della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rilevati in presenza di Buffer privo di Ca^{2+} e contenente EGTA 0.6 addizionato di Bay K-8644 1 μM (scansioni 41-100). Tempo di scansione 1 secondo.

Grafico 4: Valori medi della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rilevati in presenza di Buffer privo di Ca^{2+} e contenente EGTA 0.6 addizionato di Nifedipina 1 μM (scansioni 41-100). Tempo di scansione 2 secondi.

CONCLUSIONI - La metodica di semi-immobilizzazione associata a tecniche di microspettrofluorimetria ci ha consentito, negli spermatozoi di equino, di studiare l'attività dei CaV di tipo L valutando le variazioni $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in presenza di un agonista ed un antagonista degli stessi. Le concentrazioni basali medie del Ca^{2+} riscontrate negli spermatozoi equini concordano con quanto riportato in bibliografia¹⁶. L'utilizzo di Bay

K-8644 e di Nifedipina, rispettivamente agonista specifico¹⁴ e antagonista¹⁵ dei canali di tipo L, ha indotto negli spermatozoi equini significative variazioni della $[Ca^{2+}]_i$. I nostri risultati indicano che, al Bay K-8644 gli spermatozoi rispondono con un incremento significativo della $[Ca^{2+}]_i$, attribuibile alla presenza e all'attivazione di canali di tipo L.

La Nifedipina, antagonista¹⁵ dei canali di tipo L, provoca un decremento significativo del $[Ca^{2+}]_i$, lasciando supporre che un certo numero di canali di tipo L possa essere attivo e partecipare alle normali fluttuazioni di Ca^{2+} nella cellula.

I risultati dei controlli ci permettono di escludere il coinvolgimento da parte di altri cationi bivalenti e degli stores intracitoplasmatici nelle modificazioni delle concentrazioni intracellulari dello ione calcio

BIBLIOGRAFIA - 1. Jimenez-Gonzalez C, et al., Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores, *Hum. Reprod. Update*, 12:253–267, (2005). 2. Ren D, et al., A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility, *Nature*, 413:603–609, (2001). 3. Suarez, S.S. and Ho, H.C., Hyperactivated motility in sperm. *Reprod Dom. Anim*, 38:119-124, (2003). 4. Arnoult, C., et al., Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96:6757–6762, (1999). 5. Darszon, A., et al., T-type Ca^{2+} channels in sperm function. *Cell Calcium*, 40(2): 241-52, (2006). 6. Arnoult, C., et al. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93: 13004–13009, (1996). 7. Publicover, S.J., Barratt, C.L.R., Voltage-operated Ca^{2+} channels and the acrosome reaction: which channels are present and what do they do? *Human Reproduction*, 14: 873–879, (1999). 8. Benoff, S., Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. *Front Biosci.*, 3: D1220-40, (1998). 9. Goodwin, L.O., et al., L-type voltage-dependent calcium channel alpha-1C subunit mRNA is present in ejaculated human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.*, 6(2): 127-36, (2000). 10. Park, J.Y., et al., Molecular identification of Ca^{2+} channels in human sperm. *Exp Mol Med.*, 35(4):285-92, (2003). 11. Jagannathan, S., et al., Voltage-operated calcium channels in male germ cells. *Reproduction*, 123(2): 203-15, (2002). 12. Surdo, N.C., Micera, E., Zarrilli, A., Nicassio, M., Albrizio, M., Variazioni di $[Ca^{2+}]_i$ in singoli spermatozoi di equino. *Convegno S.I.F.R.*, Abano Terme (PD), (2007). 13. Grynkiewicz, G., et al. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.*, 260(6):3440-50, (1985). 14. Shin, E.J., et al. Dimemorfan prevents seizures induced by the L-type calcium channel activator BAY k-8644 in mice. *Behav Brain Res.*, 151(1-2): 267-76, (2004). 15. Li, L., Liu, J., Li, J., Ye, Z., Pharmacological investigation of voltage-dependent Ca^{2+} channels in human ejaculatory sperm in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.*, 26(5):607-9, (2006). 16. Dragileva, E., Rubinstein, S., Breitbart, H., Intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod.*, 61(5): 1226-34, (1999).

DISTRIBUZIONE MITOCONDRIALE IN OVOCITI UMANI IN RELAZIONE AL REGIME DI STIMOLAZIONE OVARICA CONTROLLATA
MITOCHONDRIAL DISTRIBUTION IN HUMAN OOCYTES IN RELATION TO OVARIAN STIMULATION PROTOCOL

Ambrosi B., De Santis T., Iorga A.I.,¹Cho Y.S., Dell'Aquila M.E., *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari, ¹Centro di Procreazione Medicalmente Assistita, Casa di Cura Santa Maria, Bari.*

Parole chiave: Ovociti umani, Distribuzione mitocondriale, Iperstimolazione ovarica controllata (COH), Età materna, Microscopia Laser Scanning Confocale.

Key words: Human oocyte, Mitochondrial distribution, Controlled ovarian hyperstimulation (COH), Maternal age, Confocal Laser Scanning Microscopy.

SUMMARY - A current approach is guided in order to determine oocyte mitochondrial activity in relation to the type of controlled ovarian hyperstimulation (COH) protocol. A significantly higher rate of oocytes from subjects treated with GnRH agonists, for pituitary downregulation, showed a polarized mitochondrial distribution in the area corresponding to meiotic spindle, as compared with those from antagonist-treated subjects. In the group of GnRH antagonists-treated patients, significantly higher rates of oocytes showing heterogeneous distribution of actively respiring mitochondria were observed after the use of hCG, for ovulation induction, as compared with GnRH agonists. In the group of young women, significantly higher rates of oocytes showing heterogeneous and polarized mitochondrial distribution, after treatment with GnRH agonists, was found, compared with GnRH antagonists. We conclude that mitochondrial distribution may be used as a parameter for evaluation of ooplasmic quality to adapt the choice of clinicians.

INTRODUZIONE - Nelle scorse due decadi è notevolmente incrementato, nella popolazione mondiale, il numero di coppie che si rivolge a centri di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA) e i risultati clinici sono significativamente migliorati grazie all'attuale impiego di farmaci per l'induzione della crescita follicolare multipla. La discussione è ancora in corso e non ci sono risultati univoci sull'effetto dei vari tipi di protocolli di stimolazione ovarica controllata (COH) sulla qualità ovocitaria, la competenza embrionaria e le percentuali di gravidanza. La valutazione della qualità dell'ovocita umano è attualmente condotta seguendo parametri morfologici osservabili in microscopia a fresco¹. La ricerca in questo ambito tuttavia si va progressivamente volgendo verso approcci più specificamente molecolari con metodiche volte ad analizzare aspetti citoplasmatici della competenza dell'ovocita². Inoltre la recente introduzione in Italia della Legge n. 40 ha eliminato la possibilità di effettuare la valutazione morfologica sull'embrione, pertanto questo ha consentito di spostare l'attenzione verso parametri di selezione ovocitaria la cui efficacia è ancora tutta da dimostrare. La messa a punto di adeguati test per la determinazione della competenza dell'ooplasma, come la valutazione della distribuzione mitocondriale, può consentire di analizzare la condizione energetica degli ovociti in relazione al tipo di trattamento in vivo o in vitro da cui sono derivati. Un'adeguata distribuzione spaziale e una continuativa attività metabolica dei mitocondri sono, infatti, caratteristiche necessarie per la ripresa della meiosi e il raggiungimento della piena maturità citoplasmatica e influenzano il successivo sviluppo embrionale dopo la fecondazione^{3,4}. Obiettivo dello studio è stato valutare gli effetti di differenti protocolli di COH sulla condizione energetica di ovociti umani analizzando la distribuzione e l'attività ossidativa dei

mitocondri nell'ooplasma. I dati ottenuti sono stati analizzati anche in relazione all'età dei soggetti esaminati.

MATERIALI E METODI - Lo studio è stato condotto con ovociti soprannumerari, maturi ed immaturi, prelevati con consenso informato da donne sottoposte a cicli PMA. Per la soppressione dell'attività ipofisaria sono stati utilizzati agonisti (gruppo A) o antagonisti (gruppo B) del GnRH. Nell'ambito dei soggetti trattati con antagonisti sono stati impiegati, per l'induzione dell'ovulazione, hCG (gruppo B1) o analoghi del GnRH (gruppo B2). **Denuding e colorazione degli ovociti** Gli ovociti sono stati privati del cumulo ooforo e della corona radiata mediante breve incubazione in 80 UI/ml di ialuronidasi e pulitura meccanica. Al fine di evidenziare i mitocondri gli ovociti sono stati incubati per 30 minuti, a 38.5°C in 5% di CO₂, in un medium contenente 280 nM di MitoTracker Orange CMTM Ros (Molecular Probes) una sonda fluorescente, permeabile alle membrane cellulari, che si lega selettivamente ai mitocondri attivi dal punto di vista ossidativo. Al termine dell'incubazione gli ovociti sono stati fissati overnight a 4°C con paraformaldeide al 2% in PBS. La valutazione della cromatina nucleare degli ovociti è stata effettuata in microscopia in epifluorescenza dopo colorazione con 2,5 µg/ml di Hoechst 33258 (Sigma B-1155) disciolto in soluzione 3:1 di PBS e glicerolo. **Valutazione della distribuzione mitocondriale** È stata effettuata, osservando gli ovociti in microscopia laser scanning confocale (ingrandimento 600x). I patterns di distribuzione mitocondriale osservati sono stati: granulare con granuli piccoli o grandi diffusi nel citoplasma, clusterato (granuli particolarmente grandi) e polarizzato (aggregazione di granuli grandi nell'emisfero contenente le strutture nucleari). Le morfologie eterogenee (granuli grandi, clusterati e polarizzati) sono state considerate indicative di maturità citoplasmatica. **Statistica** I dati sono stati analizzati mediante il test del Chi quadro.

RISULTATI - Sono stati analizzati 307 ovociti provenienti da 59 soggetti. Di questi ovociti 26 sono stati riscontrati allo stadio di GV, 26 allo stadio di MI, 225 allo stadio di MII, 22 presentavano anomalie della cromatina e 8 citoplasma degenerato. **Patterns di distribuzione mitocondriale in relazione allo schema di trattamento.** Nei 212 ovociti dei 225 riscontrati in MII, aventi zona pellucida ed ooplasma integro, una percentuale significativamente maggiore di ovociti appartenenti al gruppo A ha mostrato un pattern di aggregazione mitocondriale polarizzato rispetto a quelli provenienti dal gruppo B (52/147, 35% vs 9/65, 14%; P<0,05). Il gruppo B1 ha mostrato percentuali significativamente maggiori di ovociti con distribuzione eterogenea (21/37, 57% vs 4/28, 14%; P<0,001), tra i quali sono presenti percentuali significativamente elevate di distribuzione polarizzata (9/37, 24% vs 0/28, 0%; P<0,001), rispetto a quelli del gruppo B2. **Patterns di distribuzione mitocondriale in relazione all'età materna.** Negli ovociti provenienti da donne trattate con agonisti o antagonisti del GnRH questa analisi è stata condotta separando i soggetti in due categorie: ≤36 anni e >36 anni e confrontando nell'ambito di ciascun gruppo di età, i dati dei soggetti trattati con agonisti rispetto a quelli trattati con antagonisti. I risultati sono stati i seguenti: nel gruppo dei soggetti giovani le donne trattate con agonisti hanno mostrato una percentuale significativamente più alta di ovociti con pattern eterogeneo (68/119, 55% vs 15/52, 29%; P<0,05), tra i quali sono presenti elevate percentuali di ovociti con distribuzione polarizzata (44/119, 35% vs 9/52, 17%; P<0,05), rispetto agli antagonisti. Nel gruppo dei soggetti con età >36 anni, il trattamento con antagonisti ha determinato il recupero di ovociti con pattern eterogeneo in percentuale significativamente più alta rispetto agli agonisti (10/13, 77% vs 9/28, 32%; P<0,05), tuttavia questo risultato è ascrivibile all'alta percentuale di ovociti con granuli grandi (9/13, 69% vs 1/28, 3%, P<0,001),

mentre la configurazione polarizzata è stata osservata solo negli ovociti ottenuti dalle donne trattate con agonisti (8/28, 29% vs 0/13, 0%; $P < 0,05$).

DISCUSSIONE - In letteratura è riportato un limitato numero di studi sulla localizzazione e attività mitocondriale in ovociti umani^{3,4,5}. Per quanto a noi noto questo è il primo studio che analizza le correlazioni fra questi parametri e i più diffusi tipi di trattamento di COH utilizzati nella clinica PMA. Le nostre osservazioni evidenziano una condizione energetica più adeguata in ovociti prelevati dopo trattamento con agonisti. Questi dati contribuiscono a spiegare l'attuale controversia sull'outcome dei cicli PMA dopo trattamento con agonisti o antagonisti del GnRH. La maggior parte degli autori riporta risultati equivalenti tra i due tipi di trattamenti nelle donne giovani "normal responders", per qualità ovocitaria, embrionaria e percentuali di impianto e di gravidanze ed evidenziano gli aspetti positivi legati alla riduzione di effetti collaterali e dei costi, dopo impiego di antagonisti^{6,7}. Altri autori riportano percentuali di gravidanze cliniche significativamente più basse in soggetti trattati con antagonisti rispetto a quelli trattati con agonisti⁸. Dal confronto dei dati dei gruppi B1 e B2 emerge un effetto benefico dell'hCG sulla distribuzione dei mitocondri attivi. Questi dati potrebbero essere correlati con quelli di alcuni autori che riportano percentuali di impianto e di gravidanze cliniche maggiori nei soggetti trattati con hCG⁹. I nostri risultati sono in accordo con quelli di altri autori che riportano, in donne di età maggiore di 37 anni, significative riduzioni di gravidanze cliniche e di impianto^{10,11} e potrebbero giustificare i risultati ottenuti con i diversi trattamenti. In conclusione, lo studio dell'organizzazione e dell'attività dei mitocondri può contribuire alla valutazione degli effetti dei protocolli di COH sulla qualità ovocitaria e ad orientare le scelte degli operatori. L'età gioca un ruolo chiave nel determinare la risposta a tali trattamenti.

BIBLIOGRAFIA - **1.** Ubaldi, F.M., Rienzi, L., Minasi, M.G., Greco, E., Criteri morfologici di selezione ovocitaria. *Repronews*, 3, 19, (2004). **2.** Sirard, M.A. et al., The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. *Reproduction*, 61, 117-129, (2003). **3.** Wilding M et al., Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and pre-implantation embryos. *Hum Reprod.*, 16, 909-17, (2001). **4.** Van Blerkom J, Davis P, Mathwig V, Alexander S., Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse oocytes and early embryos. *Hum Reprod.* 17, 393-406, (2002). **5.** Van Blerkom J., Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*, 128, 269-280, (2004). **6.** Corona, J., Requena, A., De Pablo, J.L., Garcia Velasco, J.A., Pellicer, A., GnRH antagonist versus GnRH agonist in oocyte donation: a matched, case-control study. *Proc 19th ESHRE Congr.*, 308, Madrid, Spain, (2003). **7.** Olivennes, F., The use of gonadotropin-releasing hormone antagonist in ovarian stimulation. *Clin Obstet Gynecol.*, 49, (5): 12-22, (2006). **8.** Al-Inany, H., Abou-Setta, A., Mansour, R., Serour, G., Aboulghar, M., GnRH agonist vs. antagonist in assisted reproduction: an updated systematic review. *Proc 22th ESHRE Congr.*, Prague, 18-21 June, O-005, (2006). **9.** Westergaard, L. et al., Significant reduction of clinical pregnancy and implantation rates by use of GnRH agonist (Buserelin) as compared to hCG to induce ovulation in FSH/GnRH antagonist treated IVF/ICSI cycles. *Proc 20th ESHRE Congr.*, Berlin, 27-30 June, O-009, (2004). **10.** Jouan, C. et al., IVF treatment results according to woman's age and health insurance coverage. *Proc 19th ESHRE Congr.*, Madrid, 29 June-2 July, (2003). P 318. **11.** Orvieto, R. et al., GnRH agonist versus GnRH antagonist in ovarian stimulation: is the emperor naked? *Clin Exp Obstet Gynecol.*, 33(4), 197-9, (2006).

VALUTAZIONE STRUTTURALE DI SPERMATOZOI UMANI MEDIANTE BIRIFRANGENZA E IMPLICAZIONI SUGLI ESITI DELLA METODICA DI INIEZIONE INTRACITOPLOSMATICA DELLO SPERMATOZOO (ICSI)
STRUCTURAL EVALUATION OF HUMAN SPERMATOZOA THROUGH BIREFRINGENCE AND ITS IMPACT ON THE OUTCOME OF INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI)

Filannino A., Dell'Aquila M.E.,¹Gianaroli L.,¹Ferraretti A.P.,¹Magli M.C.,
Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari; ¹Società Italiana Studi Medicina della Riproduzione (S.I.S.Me.R.), Bologna

Parola chiave: Spermatozoi umani, Birifrangenza, Microscopia a luce polarizzata, Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI).

Key words: Human spermatozoa, Birefringence, Light polarized microscopy, Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI).

SUMMARY - This study considers the birefringence of human spermatozoa, evaluated by polarized microscopy, as an in vivo structural evaluation parameter and analyzes its effects on the outcome of ICSI. The percentages of birefringent sperm cells changed in relation to semen category (normozoospermia, oligoasthenoteratozoospermia, cryptozoospermia and obtained by MESA - Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration) and conditions (analyzed immediately after collection or after procedures for the separation of highly motile spermatozoa). Significant correlations with total and progressive motility were found. Embryo quality was significantly improved for patients whose spermatozoa were selected through birefringence during the insemination procedure compared to the control group. Birefringence evaluation can be considered as a new and accurate method for sperm selection during ICSI.

INTRODUZIONE - Al fine di migliorare le percentuali di successo delle tecniche di fecondazione assistita è importante avere a disposizione tecnologie che consentano di effettuare, immediatamente prima del processo fecondativo, una prognosi di un singolo gamete funzionale e, quindi, biologicamente attivo. La birifrangenza è la doppia rifrazione della luce, ossia il cambiamento di velocità e di direzione della radiazione in un materiale "molecolarmente ordinato". Il fenomeno è visibile solo in materiali con proprietà ottiche anisotrope, ossia in sistemi nei quali la luce si scopone in due raggi che avranno un diverso indice di rifrazione e quindi un diverso cammino ottico (con diversa direzione e velocità). Gli spermatozoi umani sono naturalmente birifrangenti grazie all'anisotropia delle loro strutture protoplasmatiche, in particolare, la birifrangenza è osservabile in corrispondenza del nucleo, dell'acrosoma e della coda. La birifrangenza nello spermatozoo è associata nel nucleo all'orientamento dei filamenti delle nucleoproteine complessate con il DNA, disposti parallelamente all'asse lungo della testa dello spermatozoo, nell'acrosoma a filamenti proteici orientati longitudinalmente e nella coda all'organizzazione microtubulare dell'assonema¹. Introducendo in un normale microscopio invertito lenti polarizzanti e un compensatore è possibile osservare la birifrangenza delle cellule spermatiche¹ e trarne, così, informazioni sull'orientamento di tali strutture. Lo spermatozoo ottimale al microscopio a luce polarizzata è quello mobile e che presenta una birifrangenza riscontrabile soprattutto a livello della testa. In caso di spermatozoi che hanno subito reazione acrosomiale, la birifrangenza non è osservata in corrispondenza dell'acrosoma. In condizioni patologiche, gli spermatozoi incapaci di fecondare, immobili o necrotici sono privi di birifrangenza a causa dell'assenza di una corretta struttura cellulare. Obiettivi del presente lavoro sono stati: a) analizzare le correlazioni fra le percentuali di

spermatozoi birifrangenti e i più importanti parametri utilizzati routinariamente per la caratterizzazione di un liquido seminale e b) valutare gli effetti dell'analisi della birifrangenza sugli esiti della metodica ICSI nella clinica di fecondazione assistita.

MATERIALI E METODI - I liquidi seminali esaminati sono stati ottenuti da pazienti in trattamento al Centro S.I.S.Me.R. di Bologna. I criteri di classificazione per l'analisi dei campioni di seme sono stati quelli della World Health Organization². Per la valutazione della morfologia, si è ricorsi ai criteri restrittivi di Kruger³. Valutazione macroscopica e microscopica dei campioni Per ognuno dei campioni di seme è stato effettuato lo spermioγραμμα. I parametri seminali ai quali si è fatto riferimento in questo studio sono stati: concentrazione spermatica (valutata con camera di Neubauer), motilità, morfologia (analizzata con tecnica di Papanicolau) e vitalità (valutata mediante l'utilizzo del colorante sopravvital e eosina). Preparazione del liquido seminale per l'inseminazione Per la preparazione del campione seminale per l'inseminazione degli ovociti sono state utilizzate, in relazione alle differenti tipologie di seme, le tecniche di swim-up, separazione su gradiente di densità (Pure Sperm) e lavaggio e separazione per centrifugazione, al fine di recuperare la frazione caratterizzata dalla percentuale più elevata di spermatozoi con motilità rapida progressiva. Il microscopio a luce polarizzata La birifrangenza degli spermatozoi è stata valutata mediante il microscopio invertito a luce polarizzata Leica DMIRB. La luce emessa da una sorgente luminosa dopo aver attraversato un polarizzatore illumina il campione posto su un contenitore trasparente. Il raggio di luce polarizzata, attraversato il campione, continua in un analizzatore ed un condensatore che elaboreranno l'immagine, visualizzabile su di un monitor e al computer mediante l'applicazione al microscopio di due camere. Dei campioni di seme osservati prima e dopo il trattamento per l'inseminazione sono state calcolate le percentuali di spermatozoi mobili birifrangenti, mobili non birifrangenti, immobili birifrangenti ed immobili non birifrangenti. Dopo ICSI i parametri, adoperati per valutare l'andamento dei cicli di fecondazione assistita, ai quali si è fatto riferimento in questo studio sono stati: la percentuale di embrioni di buona qualità (superiori a sei cellule, di grado 1 e in terza giornata), la percentuale di gravidanze cliniche (rapporto fra numero di gravidanze cliniche e numero di cicli di fecondazione assistita) e l'indice di impianto (rapporto fra numero di camere gestazionali e numero di embrioni trasferiti). Statistica La linearità della relazione, tra gruppi di misure di diverse variabili, è stata analizzata con il test di correlazione ed espressa mediante il "coefficiente di correlazione lineare", R. Gruppi di misure con $R > 0,5$ sono stati considerati statisticamente correlati. Le significatività statistiche dei dati ottenuti dopo l'applicazione della tecnica ICSI sono state calcolate mediante i test di Fisher e T di Student. Valori di $P < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI - Nel corso dello studio sono stati seguiti 49 cicli di fecondazione medicalmente assistita. I campioni di seme, in relazione ai valori ottenuti dallo spermioγραμμα, sono stati classificati come: campioni normozoospermici (N; $n^{\circ}=5$) con concentrazione spermatica $\geq 20 \times 10^6$ spermatozoi/ml, percentuale di spermatozoi rapidamente progressivi $\geq 25\%$ o di quelli mobili totali $\geq 50\%$ e percentuale di spermatozoi morfologicamente normali $> 14\%$; oligo-asteno-teratozoospermici (OAT; $n^{\circ}=33$) con concentrazione spermatica $< 20 \times 10^6$ spermatozoi/ml, percentuale di spermatozoi rapidamente progressivi $< 25\%$ o di quelli mobili totali $< 50\%$ e percentuale di spermatozoi morfologicamente normali $\leq 14\%$; campioni criptozoospermici (Cripto; $n^{\circ}=7$), con una concentrazione spermatica $\leq 1 \times 10^6$ spermatozoi/ml e con percentuali di motilità progressiva comprese tra zero e 10% e, infine, campioni ottenuti in seguito alla tecnica di aspirazione microchirurgica di spermatozoi epididimali⁴ (MESA; $n^{\circ}=4$). Lo studio è stato strutturato in due parti. Studio 1 In questo studio sono state confrontate le

percentuali di birifrangenza in soggetti N e OAT analizzate prima e dopo trattamento per l'inseminazione. Si è osservata una diminuzione significativa dei valori di birifrangenza nei soggetti OAT rispetto agli N nel seme fresco ($P=0,006$) e nel seme trattato ($P=0,027$). Un aumento significativo è risultato nel seme trattato rispetto a quello fresco sia per gli OAT ($P=3,7E^{-7}$) che per gli N ($P=0,001$). Inoltre è stata analizzata l'eventuale correlazione fra la birifrangenza e i singoli parametri di base, quali concentrazione spermatica, motilità totale, motilità progressiva rapida, morfologia e vitalità. Sono state riscontrate significative correlazioni fra le percentuali di birifrangenza calcolata sul totale degli spermatozoi e i valori di motilità totale ($R=0,72$) e di motilità progressiva rapida ($R=0,78$). Studio 2 In questa parte dello studio è stato valutato l'andamento dei cicli di fecondazione assistita relativi a 11 pazienti (7 Cripto e 4 MESA), per i quali l'analisi della birifrangenza è stata effettuata direttamente sugli spermatozoi selezionati per il processo fecondativo, al momento dell'inseminazione. Dati relativi all'uso della metodica applicata a soggetti N e OAT sono stati riportati in un precedente lavoro⁵. I dati ottenuti hanno dimostrato come la percentuale di embrioni di buona qualità risulti significativamente più elevata nel gruppo di studio (33.3%) rispetto a quello di controllo (9,5%; $P=0,04$), entrambi costituiti da soggetti Cripto e MESA. Analogamente la percentuale di gravidanze cliniche e il tasso d'impianto sono migliorati, rispetto ai controlli, anche se le differenze riscontrate non hanno raggiunto una significatività statistica, probabilmente a causa delle ridotte dimensioni del campione.

DISCUSSIONE - I risultati ottenuti dallo studio 1 hanno confermato come la valutazione della birifrangenza sia legata alla qualità spermatica. Una maggior frequenza di birifrangenza è risultata associata agli spermatozoi mobili e vitali, infatti i valori più elevati sono stati riscontrati in campioni seminali normozoospermici e nella frazione recuperata dopo trattamento, e una significativa correlazione è stata osservata fra i valori di birifrangenza e la motilità. Lo studio 1 ha posto le basi per strutturare lo studio 2, nel quale la birifrangenza degli spermatozoi ha rappresentato un criterio aggiuntivo di selezione per l'ICSI e dal quale è emerso come l'uso di spermatozoi dotati di birifrangenza, parametro predittivo dell'integrità delle strutture intracellulari sia importante nel determinare un regolare sviluppo embrionale. In conclusione, i dati presentati in questo studio mostrano come la valutazione della birifrangenza possa rappresentare, nell'ambito della riproduzione medicalmente assistita, un nuovo ed accurato metodo per la selezione spermatica, al momento dell'ICSI. La possibilità di far riferimento, per la selezione degli spermatozoi, a parametri che vanno oltre quelli classici di motilità e morfologia, potrebbe permettere di generare embrioni di miglior qualità.

BIBLIOGRAFIA - 1. Baccetti B., Microscopical advances in assisted reproduction. *J. Submicrosc Cytol Pathol*, 36(3-4), 333-339, (2004). 2. World Health Organization, *Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Semen-Cervical Mucus Interaction*, 4rd Edn. Press, Syndicate for the University of Cambridge, Cambridge, (2000). 3. Kruger, T.F. et al., Predictive value of abnormal sperm morphology *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, 49, 112-117, (1988). 4. Shrivastav, P., Nadkarni, P., Wensvoort, S., Craft, I., Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Hum Reprod*, 9, 2058-61, (1994). 5. Crippa, A., Sperm selection for ICSI according to the presence of birefringence in the sperm head. *Proc. 22th ESHRE Congr*, Prague, 18-21 June 2006.

SVILUPPO EMBRIONALE DI OOCITI DI OVINO DOPO ICSI: EFFETTO DELL'ATTIVAZIONE E DEL TRATTAMENTO DEL MATERIALE SEMINALE

OVINE EMBRYO DEVELOPMENT FOLLOWING ICSI: EFFECT OF ACTIVATION AND SPERM TREATMENT

Bogliolo L., Ariu F., Fois S., Rosati I., Zedda M.T., Pau S., Ledda S., *Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari*

Parole chiave: Ovino, ICSI, Attivazione

Key words: Ovine, ICSI, Activation

SUMMARY - The effect of oocyte activation and sperm treatment on development of sheep embryos derived from ICSI of IVM oocytes was analyzed. Oocytes were injected with frozen-thawed ram semen; motile spermatozoa, selected by swim up technique, were used immediately, or after incubation with 0.1% Triton X-100 for 5 min. The injected oocytes were activated by exposure to 5 μ M ionomycin for 5 min followed by culture for 3 h and a further 3 h culture in 2mM 6-DMAP or cultured without activation. After 8 days of in vitro culture, embryo development was recorded. Results evidenced that i) sperm treatment significantly decreased cleavage rate both in activated and not activated groups; ii) activation without sperm treatment allowed to obtain the highest cleavage rate and development to blastocyst stage. iii) sperm treatment combined with activation did not increase blastocyst development. These results demonstrated that oocyte activation but not sperm treatment is necessary for increasing embryo development in sheep oocytes.

INTRODUZIONE - A tutt'oggi, nelle specie animali, la tecnica della microiniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI), non ha subito lo stesso impulso registrato nell'uomo e non ha ancora raggiunto un grado di efficienza soddisfacente¹.

Nella specie ovina, nonostante la nascita di un agnello dopo trasferimento di embrioni ottenuti mediante microiniezione della spermatozoo², le ricerche sulla ICSI sono scarse^{3,4,5} e riportano percentuali esigue di fertilizzazione e sviluppo embrionale⁶. Tali problemi potrebbero essere ascrivibili a numerosi fattori e tra questi la difettosa attivazione dell'oocita e decondensazione dello spermatozoo. Infatti mentre nell'uomo⁷, topo⁸ e coniglio⁹ la sola microiniezione è sufficiente ad indurre la ripresa del ciclo meiotico dell'oocita, in altre specie, come il bovino¹⁰ e il suino¹¹ è necessario indurre artificialmente l'attivazione dell'oocita dopo la ICSI.

Anche il trattamento del materiale seminale prima della microiniezione può costituire un'utile strategia per migliorare l'efficienza della ICSI. Esperienze in altre specie animali^{10,11} hanno evidenziato come l'incubazione del seme con sostanze come il dithiothreitol che agiscono riducendo i ponti disulfidrici delle protamine nucleari dello spermatozoo, e il Triton X-100, un detergente anionico che rimuove le membrane dello spermatozoo, determini un significativo incremento delle percentuali di formazione del pronucleo maschile.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di verificare l'effetto dell'attivazione dell'oocita e del trattamento del materiale seminale, utilizzati singolarmente o in combinazione, sullo sviluppo embrionale dopo ICSI di oociti di pecora maturati in vitro.

MATERIALI E METODI - Gli oociti sono stati prelevati da ovaie di pecore regolarmente macellate. La maturazione in vitro è stata effettuata in TCM 199 + 10% di FCS + LH/FSH (0,1 UI/ml), cisteamina (100 μ M) a 38,5°C con il 5% di CO₂ per 24

ore. Per la ICSI è stato utilizzato seme di ariete congelato. Dopo lo scongelamento il seme è stato sottoposto a swim-up per 1 ora in SOF + 2% siero di pecora in estro + eparina ed ipotaurina e :

- utilizzato immediatamente per la ICSI (t-)

- incubato con 0,1% Triton X-100 per 5 min. prima della microiniezione (t+)

Gruppo di oociti microiniettati con seme trattato (t+) e non trattato (t-) sono stati successivamente:

- attivato con ionomicina (Iono, 5 μ M) per 5 min, coltivati in TCM199 for 3 h, incubati in 2mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) per ulteriori 3 ore (a+).

- coltivati in vitro senza attivazione (a-).

Dopo 24 di coltura gruppi di oociti dei 4 sistemi sperimentali sono stati fissati e colorati con aceto:lacmoid per valutare le percentuali di fertilizzazione e di attivazione partenogenetica.

Si è proceduto alla coltura degli zigoti in SOF + 0,4% BSA + aa essenziali e non essenziali per 8 giorni e alla verifica dello sviluppo embrionale.

RISULTATI - Le percentuali di fertilizzazione degli oociti microiniettati con il seme trattato con Triton X-100 e non attivati (t+/a-, 23,1%) sono risultate significativamente ($P<0.01$) più basse rispetto ai gruppi: (t+/a+): 48,2%; (t-/a+):70,5; (t-/a-): 64,3%. Percentuali significativamente più alte ($P<0,01$) di attivazione partenogenetica sono state registrate negli oociti (t-/a+: 18,5%) e (t+/a+: 23%) rispetto ai gruppi (t-/a-: 9,2%) e (t+/a-: 2,1%).

Come si evince dall'analisi dei dati riportati nella Tab.1 le più elevate percentuali di divisione embrionale sono state ottenute dopo attivazione dell'oocita senza trattamento del materiale seminale (t-/a+: 88,2%). L'incubazione del materiale seminale con il Triton X-100 ha determinato un significativo ($P<0,01$) decremento delle percentuali di divisione embrionale sia dopo attivazione dell'oocita (t+/ a+: 45,2%) che nel gruppo non attivato (t+/a-: 27,5%). Lo sviluppo embrionale allo stadio di blastocisti è risultato significativamente più elevato nei gruppi di oociti attivati indipendentemente dal trattamento del materiale seminale (t-/a+: 29,4%; t+/a+: 25,8%).

Trattamento del seme (Triton X-100)	Attivazione (Iono-6DMAP)	n° oociti	n° oociti degenerati dopo ICSI	n° divisi	n° blastocisti
-	-	32	4 (12,5%)	19 (67,8%) ^a	2 (7,1%) ^a
+	-	32	3 (9,3%)	8 (27,5%) ^b	0 (0%) ^a
-	+	37	3 (8,1%)	30 (88,2%) ^c	10 (29,4%) ^b
+	+	34	3 (8,8%)	14 (45,2%) ^{ab}	8 (25,8%) ^b

Tab. 1 - Sviluppo embrionale di oociti di pecora dopo trattamento del materiale seminale con Triton X-100 e attivazione con Iono-6DMAP (Chi Square test, a,b,c $P<0,01$)

DISCUSSIONE - Nel complesso i risultati della presente sperimentazione dimostrano come l'attivazione dell'oocita con Iono-6-DMAP permette di incrementare le percentuali di divisione e di sviluppo embrionale dopo microiniezione di spermatozoi crioconservati di pecora. Il trattamento del materiale seminale con Triton X-100, invece, non ha influenzato lo sviluppo embrionale ma, al contrario, ha determinato una riduzione delle percentuali di divisione. L'incubazione con il detergente anionico potrebbe aver determinato alterazioni della cromatina della cellula germinale maschile con un effetto concentrazione e tempo dipendente. Recenti esperienze sottolineano l'importanza nel minimizzare i tempi che intercorrono tra il trattamento con il Triton X-100 e la microiniezione e hanno dimostrato come endonucleasi possono agire sul DNA dello spermatozoo quando il nucleo dello spermatozoo è esposto direttamente ai terreni colturali¹². Tali Autori hanno, inoltre, riportato che il trattamento individuale degli

spermatozoi con il Triton X-100 immediatamente prima della microiniezione permette di aumentare l'efficienza della ICSI. Le minori percentuali di divisione embrionale dopo trattamento del seme potrebbero essere anche relazionabili ad un effetto citotossico del Triton X-100 sull'ocita di questa specie con una conseguente alterazione dei processi di fertilizzazione e prima divisione embrionale.

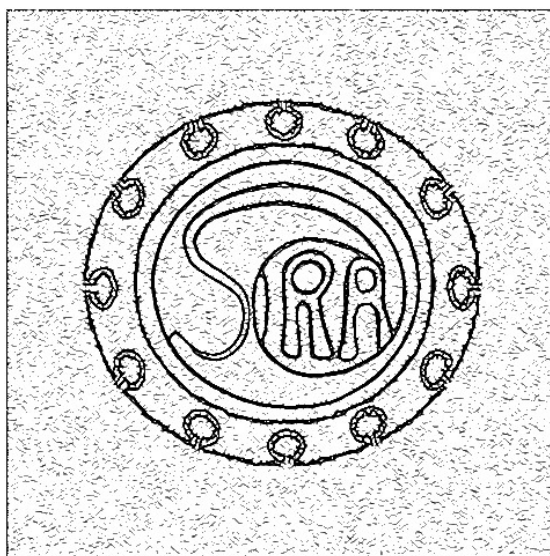
In conclusione i risultati della ricerca indicano che l'attivazione dell'ocita, ma non il trattamento del materiale seminale, sono necessari per incrementare lo sviluppo embrionale dopo ICSI. L'applicazione di tale tecnica potrebbe costituire un'importante strumento da utilizzare nella specie ovina per la produzione in vitro di embrioni in alternativa alla fertilizzazione in vitro convenzionale (IVF) nei casi di scarsa disponibilità di materiale seminale o per la fecondazione con seme presessato.

BIBLIOGRAFIA - 1. Catt, J.W., Rhodes, L., Comparative intracytoplasmic sperm injection in human and domestic species. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 161-167, (1995). 2. Catt, S.L et al., Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet. Rec.*, 16, 494-495, (1996). 3. Gomez, M.C. et al., Effect of culture, incubation and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed spermatozoa for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.*, 9, 665-673, (1997). 4. Gomez, M.C. et al., Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod. Fertil. Dev.*, 10, 197-205, (1998). 5. Gomez, M.C. et al., Time course of pronuclear formation and fertilization after insemination in vitro and intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured sheep oocytes. *Zigote*, 6, 261-270, (1998). 6. Gomez, M.C. et al., Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 49, 1143-1154 (1998). 7. Palermo, G. et al., Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into a oocyte. *Lancet*, 340, 17-18, (1992). 8. Kimura, Y., Yanagimachi, R., Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development*, 12, 2394-2405, (1995). 9. Keefer, C.L., Fertilization by sperm injection in the rabbit. *Gamete Res.*, 22, 59-69, (1989). 10. Galli et al., Bovine oocyte development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pretreatment with dithiothreitol. *Theriogenology*, 60, 1467-1480, (2003). 11. Thian, J.H. et al., Effects of oocyte activation and sperm preparation on the development of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes and intracytoplasmic. *Theriogenology*, 66, 39-448, (2006). 12. Morozumi, K. et al., Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation and embryonic development. *PNAS*, 103, 17661-17666, (2006).

ATTI DELLA GIORNATA DI EDUCAZIONE CONTINUA IN MEDICINA

STRATEGIE PER IL MIGLIORAMENTO DELL'EFFICIENZA RIPRODUTTIVA NEGLI OVINI

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA
Via Vienna 2, SASSARI
19 maggio 2007



5 CREDITI

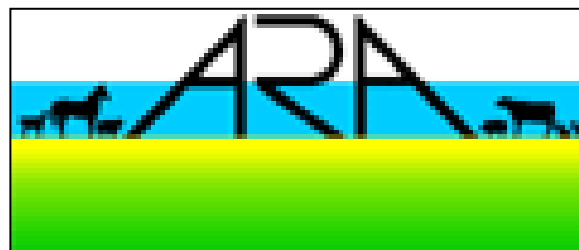
IN COLLABORAZIONE
CON



**Istituto Zooprofilattico Sperimentale
per la Sardegna**



AGRIS Sardegna



SARDEGNA

**ASPETTI CLINICO PATOLOGICI DELL'ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA
NELL'ARIETE**
CLINICAL-PATHOLOGICAL ASPECTS OF REPRODUCTIVE ACTIVITY IN
RAM

Zedda M.T., *Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari*

SUMMARY - Breeding soundness examination should be taken routinely before breeding season in all rams used as semen donors. It consists in general physical examination, physical examination of external and internal genitalia and complementary diagnostic exams in order to point out anomalies and/or pathologies causing hypofertility or sterility. External genitalia examination puts in evidence size and texture anomalies often symptoms of orchitis and/or epididymitis. Semen evaluation, ultrasonography and testicular biopsy are the most common diagnostic procedures used in ram. Semen evaluation, collected by electroejaculation in field (in general anaesthesia to respect animal welfare) is of primary importance in hypofertility diagnosis in particular to identify etiologic agents able to cause testicular and epididymal pathologies in ram.

INTRODUZIONE - Un ariete "ideale" dovrebbe possedere le seguenti qualità:

1. Avere ottima genealogia
2. Essere fertile
3. Possedere un'ottima libido
4. Avere un'elevata circonferenza scrotale
5. Essere in buona salute e privo di difetti fisici

In Sardegna, attualmente, la gestione aziendale prevede la presenza di più maschi nel gregge; questa consuetudine consente la presenza di soggetti con ridotta capacità riproduttiva in quanto la fertilità dell'allevamento è mantenuta dagli altri arieti. Solo nel caso in cui i soggetti ipofertili siano dominanti e quindi in grado di inibire l'attività sessuale dei riproduttori subordinati si ha una riduzione della fertilità del gregge; per evitare di allevare soggetti non fertili è necessario effettuare un esame andrologico in tutti gli arieti prima della stagione riproduttiva.

L'esame andrologico di un riproduttore deve comprendere un esame obiettivo generale, un accurato esame dell'apparato riproduttore e delle indagini complementari quali la valutazione della libido, del seme e l'esame ecografico.

Una visita clinica completa, nella maggior parte dei casi, è in grado di evidenziare patologie che riducono o impediscono la normale capacità riproduttiva. Un ariete eccessivamente magro o, al contrario, molto grasso può presentare una libido ridotta. Dovrebbero essere esaminati scrupolosamente tutti gli apparati che potrebbero interferire direttamente o indirettamente sulla monta. Si deve quindi escludere la presenza di parassiti interni ed esterni, di ascessi, di alterazioni a carico dei denti e di lesioni alle articolazioni e ai piedi.

In seguito si effettua un accurato esame dell'apparato genitale in modo da rilevare anomalie e/o patologie in grado di ridurre il potenziale riproduttivo.

ESAME DELLO SCROTO - Un attento controllo dello scroto può rivelare la presenza di lesioni traumatiche, ernie, ascessi scrotali, dermatiti, lesioni parassitarie.

In caso di ernia scrotale, tra testicolo e parete addominale si apprezza una massa molle di dimensioni variabili che con appropriate manovre è almeno in parte riducibile¹.

In questa specie, non è raro il riscontro di ascessi scrotali che determinano alterazioni degenerative testicolari a causa della compressione e della ipertermia locale.

Il *Chorioptes bovis* è causa, anche a questo livello, di una dermatite essudativa e l'essudato, conglutinando la lanugine e trattenendo detriti tissutali e polvere, può formare croste anche di 5 cm di spessore. Le lesioni possono provocare alterazioni della termoregolazione e conseguente degenerazione testicolare². Le affezioni scrotali, infatti, se accompagnate da aumento della temperatura locale, spesso compromettono la spermatogenesi. Condizione necessaria per la normale spermatogenesi è una temperatura dei testicoli più bassa di quella corporea. Nell'ariete la temperatura del sangue nell'arteria testicolare scende di 4-5°C nel tragitto dall'anello inguinale esterno alla superficie del testicolo, mentre a livello del parenchima testicolare è uniformemente di 34°C; a questo livello, un aumento di 1,6°C comunemente determina alterazioni degenerative.

Particolare attenzione deve essere riservata nella valutazione della circonferenza scrotale che varia con l'età, lo stato di nutrizione, la razza ed è strettamente associata alla stagionalità. In questa specie, è strettamente correlata alle dimensioni testicolari e, quindi, alla produzione spermatica giornaliera. È stato inoltre dimostrato che gli agnelli figli di arieti con dimensioni scrotali elevate raggiungono più precocemente la pubertà.

ESAME DEI TESTICOLI - Dei due testicoli si devono valutare la corretta collocazione, le dimensioni, la simmetria, la mobilità all'interno della loggia scrotale e la consistenza.

L'assenza di uno o di entrambi i testicoli è comunemente indicativo di criptorchidismo. Una consistenza molle elastica, associata ad una riduzione delle dimensioni, è, invece, sintomo di degenerazione testicolare; mentre una consistenza dura fibrosa è indicativa di un processo degenerativo che, protrandosi per lungo tempo, ha determinato l'atrofia dell'organo. Fibrosi con relativa atrofia può riscontrarsi anche in seguito a lesioni traumatiche od orchite⁴.

Testicoli più piccoli della norma, valutati genericamente come ipoplasici od atrofici, possono indirizzare alla trisomia XXY: sindrome associata ad ipoplasia testicolare bilaterale congenita, azoospermia ed infertilità per l'assenza della linea germinale^{5,6}.

Aumenti delle dimensioni testicolari sono comunemente dovuti ad orchiti e a tumori (sebbene il riscontro sia raro, nell'ariete, sono stati comunque segnalati seminomi, sertoliomi e leiomiomi⁷).

La calcificazione testicolare è una patologia legata all'età e si riscontra in soggetti anziani occasionalmente durante l'esame ecografico.

ESAME DELL'EPIDIDIMO - L'esame dell'epididimo deve comprendere la valutazione di testa, corpo e coda che va eseguita tratto per tratto bilateralmente, a scopo comparativo, per poi fare una valutazione complessiva. Entrambe le teste devono essere simmetriche per grandezza, forma e posizione. Alla palpazione, oltre ad una consistenza tesa elastica, si può percepire una struttura finemente granulosa che ne evidenzia la conformazione lobulata. Il corpo, per la sua posizione medio caudale e per la sua collocazione rispetto al mesorchio è più facilmente accessibile dalla faccia caudale e la sua consistenza è analoga a quella della testa. La coda, per la sua posizione è particolarmente accessibile e per questo tratto deve essere valutata in particolare la simmetria.

A carico dell'epididimo è possibile riscontrare patologie congenite quali l'aplasia segmentaria dovuta ad uno sviluppo anomalo dei dotti del Wolff. L'anomalia è causa di stasi spermatica con accumulo nella porzione prossimale all'ostruzione. L'aplasia può essere monolaterale o bilaterale e in quest'ultimo caso vi è sterilità e l'esame dell'eiaculato rivela azoospermia⁸.

Le cisti epididimali, anomalie congenite vestigia del dotto mesonefridico, si riscontrano fra testa dell'epididimo e testicolo, ma non sono causa di gravi alterazioni nel trasporto degli spermatozoi.

Le patologie infiammatorie dell'epididimo sono le più frequenti cause di ridotta fertilità nell'ariete. I microrganismi comunemente isolati sono *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis*, *Corynebacterium spp.*, *Pasteurella pseudotuberculosis* e occasionalmente da altri batteri.

La diagnosi clinica di epididimite è relativamente facile: l'epididimo interessato è aumentato di volume ed alla palpazione è caldo e dolente; la patologia spesso coinvolge il testicolo. Tuttavia, l'agente eziologico responsabile può essere identificato solo dopo esame batteriologico del seme.

Non raramente è possibile riscontrare un granuloma spermatico, localizzato più frequentemente a livello della coda e/o della testa. È conseguente ad una dilatazione cistica unica o multipla dell'epididimo o del deferente (spermatocele). L'accumulo di spermatozoi in degenerazione porta a rottura della parete e lo stravasamento degli spermatozoi nel parenchima interstiziale dà luogo ad una reazione granulomatosa con la formazione del granuloma spermatico. L'origine dello spermatocele può essere congenita in seguito ad aplasia segmentaria o, più spesso, traumatica od infettiva¹⁰. Il granuloma spermatico, se bilaterale, è causa di infertilità. L'organo interessato si presenta tumefatto, duro fibroso con aderenze di vario grado fra foglietto viscerale e parietale della tunica vaginale nell'area della lesione e riduzione o impedimento del normale scorrimento all'interno della cavità vaginale.

ESAME DEL CORDONE SPERMATICO - Un'attenta valutazione del cordone spermatico permette di identificare la presenza di un varicocele, caratterizzato da dilatazioni sacciformi per trombosi delle vene del plesso pampiniforme ed è causa di un'alterazione del circolo testicolare. La sua incidenza è dell'1% nei soggetti di 2- 3 anni fino al 7% in quelli di maggiore età. L'eziopatogenesi non è stata ancora completamente chiarita: si ipotizza una correlazione con l'alta pressione locale e le alterazioni della parete della vena spermatica interna. Dal punto di vista sintomatologico si riscontra algia alla deambulazione e tumefazione, mono o bilaterale, della porzione dorsale dello scroto. In alcuni soggetti il varicocele può raggiungere dimensioni fino a 117 mm di larghezza e 64 mm di diametro. La palpazione provoca dolore e permette di percepire le tipiche formazioni nodulari. L'esame ecografico evidenzia la presenza di aree tortuose ipoecogene. Le pareti delle vene interessate sono assottigliate e a tratti sclerotiche. A causa della stasi venosa che si stabilisce si ha un'alterata termoregolazione e accumulo di catecolamine con conseguente degenerazione testicolare. L'esame del seme di questi soggetti rivela oligospermia, diminuzione della mobilità spermatica e presenza di un gran numero di spermatozoi immaturi^{11,12}.

ESAME DEL PENE E DEL PREPUZIO - Il prepuzio deve essere esaminato attentamente al fine di evidenziare la presenza di lesioni traumatiche, ulcere o scolo prepuziale.

Nell'ovino è presente una particolare postite ulcerativa (sheath-rot, pizzle-rot) conseguente a diete ad elevato contenuto proteico ed all'azione concomitante del *Corynebacterium renale* presente nel cavo prepuziale. L'elevato apporto proteico (pari al 18% o superiore) favorisce la produzione di alte quantità di urea che il *Corynebacterium*, mediante l'enzima ureasi, trasforma in ammoniaca. L'ammoniaca esplica un'azione citotossica inducendo una continua irritazione della mucosa del prepuzio e del pene con la formazione di ulcere. Con alimentazione iperproteica le prime manifestazioni si riscontrano già dopo 1-2 settimane. Le ulcere si localizzano inizialmente a livello dell'orifizio prepuziale per poi estendersi alla mucosa prepuziale

ed al glande. L'eventuale retrazione cicatriziale causa restringimento dell'ostio prepuziale con conseguente fimosi¹³.

L'esteriorizzazione del pene, in questa specie, è facilitata dalla contenzione dell'animale in posizione seduta. L'esaminatore fissa il pene con una mano a livello della flessura sigmoidea e spinge il pene verso l'alto, mentre con l'altra mano spinge in basso il prepuzio. La manovra è essenziale per verificare che non ci siano impedimenti all'esteriorizzazione, che il processo uretrale sia integro ed evidenziare eventuali lesioni. Nell'ariete è stata segnalata l'ipospadia peniena a livello prepuziale, scrotale e/o perineale, difetto congenito dell'uretra dovuto alla mancata fusione delle pieghe uretrali che comporta l'ectopia del meato uretrale¹⁴.

A carico del pene si osservano frequentemente lacerazioni più o meno estese.

È inoltre possibile riscontrare ferite penetranti che, talvolta, possono verificarsi in seguito ad accoppiamento con pecore che trattengono in vagina ossa di feti macerati.

Le lesioni a carico del processo uretrale sembrano avere risvolti sulla fertilità. Le alterazioni patologiche del processo uretrale si riferiscono principalmente all'escissione durante la tosatura o conseguenza di manovre improprie durante l'esteriorizzazione del pene. Discussa è l'ipofertilità o sterilità dell'ariete per la perdita del processo uretrale².

In seguito ad urolitiasi si può riscontrare l'occlusione del processo uretrale con conseguente necrosi e perdita della parte; il processo necrotico può estendersi anche al pene. Una particolare alterazione è la cubitatura del processo uretrale per aderenza di porzioni dello stesso. La lesione può interessare solo l'apice o tratti più lunghi del processo (il processo uretrale è lungo circa 4 centimetri) e consegue a traumatismi durante l'accoppiamento o a processi infiammatori. La flessione dell'appendice uretrale comporta un'alterazione dell'ejaculazione e della minzione, con flusso retrogrado del seme o delle urine. In quest'ultimo caso può conseguire una balanopostite per la continua irritazione della mucosa del prepuzio e del pene¹⁵.

VALUTAZIONE DELLA LIBIDO - La libido è una componente essenziale della performance riproduttiva, ma la sua valutazione non è semplice. Per stimare la libido si colloca l'ariete alla presenza di pecore in estro e si registra il numero delle monte effettuate in un periodo di tempo (usualmente 20-30 minuti). Questo parametro può essere influenzato dall'età, dall'esperienza e da patologie.

Si può quindi utilizzare il *mating test* che stima il numero degli accoppiamenti.

Perkins et al. (1992) ritengono che migliori risultati si ottengano mediante il *serving capacity test* che abbina i due parametri. L'esame può essere utilizzato per valutare uno o più riproduttori. In un paddock adeguato, ad ogni ariete vengono assegnate 4 o 5 pecore in calore. Gli arieti sono osservati per un periodo di tempo che va da 20 minuti ad un'ora registrando sia il numero delle monte che gli accoppiamenti.

PRELIEVO DEL SEME - L'esame ecografico, del seme e la biopsia testicolare sono tra gli esami complementari utilizzabili nella diagnostica clinica del maschio. L'esame del seme riveste un significato particolare sia nella valutazione della fertilità sia nell'isolamento dei microrganismi responsabili di orchiti ed epididimiti.

Il prelievo del seme, ottenibile con la vagina artificiale solo nei soggetti addestrati, è invece possibile mediante l'elettroeiaculazione. Attualmente per il prelievo si usa uno strumento strutturato in un corpo unico, alimentato a pile, relativamente leggero (340 grammi) e della lunghezza di 34 cm. L'ariete è contenuto in decubito laterale con gli arti posteriori estesi in avanti. Si effettua la tricotomia del prepuzio che viene quindi lavato con fisiologica o con PBS ed asciugato con una garza. Esteriorizzato il pene, trattenendolo con una garza sterile, si introducono il suo apice ed il processo uretrale nel raccoglitore. L'elettroeiaculatore è inserito, previa lubrificazione, per la profondità di 10 cm circa nel retto svuotato dalle feci e, quindi, con movimenti leggeri si porta verso il

pavimento pelvico in modo che gli elettrodi siano posizionati in prossimità delle vescichette seminali e del plesso ipogastrico. Si procede con uno stimolo di quattro secondi seguito da una pausa di altri 4 secondi; l'operazione va ripetuta sino all'eiaculazione (comunemente sono necessari 3-4 stimoli).

L'impulso elettrico stimola inizialmente il centro pelvico che controlla l'erezione e successivamente il centro dell'eiaculazione¹⁷.

BIOPSIA TESTICOLARE - La biopsia testicolare deve essere impiegata solo in casi di assoluta necessità in quanto estremamente invasiva. La tecnica è utilizzata in particolare nella diagnosi di ipoplasia testicolare, arresto o limitata spermatogenesi, neoplasie ed infertilità immunologica. Il prelievo biotico, anche se effettuato correttamente, può essere causa di emorragie, ematomi testicolari, calcificazioni, fibrosi, infezioni e reazioni autoimmuni. Nell'ariete, così come nel toro, a causa di un'albuginea relativamente sottile ed una vascolarizzazione testicolare notevole, tali complicanze sono più accentuate. Nell'ovino, inoltre, si deve tener presente che l'arteria spermatica, rispetto al bovino, forma un plesso arterioso accessorio nella porzione ventrale del testicolo; per cui l'applicazione della tecnica aumenta ulteriormente la possibilità di emorragie¹⁸.

BIBLIOGRAFIA - 1. Roberts, S.J., Scrotal hernia in rams. A case report. *Cornell Vet*, 78, 351-362, (1988). 2. Bruere, A.N, Examination of the ram for breeding soundness. In: *Morrow D.A., Current Therapy in theriogenology*, II. W:B: Saunders Comp., Philadelphia, USA, 874-880, (1986). 3. Boundy, T., Routine ram examination. In: *Pratice* 219-228, (1992). 4. Ott, R.S., Meason, M.J., Breeding soundness examination of rams and bucks, A review. *Theriogenology*, 13, 155-164, (1980). 5. Galloway, D.B., et al., An Outbreak of gonadal hypoplasia in a sheep flock: clinical, pathological and endocrinological features and aetiological studies. *Vet. Rec.*, 131, 506-512, (1992). 6. Bruere, A.N., et al., Testicular hypoplasia and XXY sex chromosome complement in two rams: the ovine counterpart of Klinefelter's syndrome in man. *J. Reprod. Fert.*, 19, 103-108, (1969). 7. Foster, R.A., et al., Testicular leiomyoma in a ram. *Vet. Pathol.* 36, 184-185, (1989). 8. Mcentee, K., Reproductive Pathology of Domestic Mammals. *A. Press Inc.*, San Diego, California, USA, (1990). 9. Watt, D.A., Congenital retention cysts of the epididimis in rams. *Aust. Vet. J.*, 47, 287-288, (1971). 10. Karaca, F., et al., Spermatic granuloma in the ram: diagnosis by ultrasonography and semen characteristics. *Vet. Rad. Ultrasound*, 4, 402-406, (1999). 11. Ezzi, A., et al., Pathology of varicocele in the ram. *Aust. Vet. J.*, 65, 11-15, (1988). 12. Ott, R.S. et al., Abnormal spermatozoa, testicular degeneration, and varicocele in a ram. *Am.J.Vet.Res.*, 42, 241-245, (1982). 13. Loste, A., et al., Higt prevalence of ulcerative posthitis in raso aragonese rams associated with a legume-rich diet. *J. Vet. Med.Ass.*, 52, 176-179, (2005). 14. Smith, K.C., et al., Hipospadias in rams., *Vet. Rec.*, 158, 789-794, (2006). 15. Zedda, M.T., Retroflessione del processo uretrale dell'ariete. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 4, 73-74, (1987). 16. Perkins, A., et al., Sexual performance of rams in serving capacity test predict success in pen breeding. *J. Anim. Sci.*, 70, 2722-2725, (1992) . 17. Martin I.C.A. Semen collection and evaluation. In: *Morrow D.A., Current Therapy in Theriogenology*, II. W:B: Saunders Comp., Philadelphia, USA, 880-882, (1986). 18. Sartori, R., et al., Testicular biopsy with tra-cut needle in conjunction with fibrin adhesive or nylon suture: assessment of post-biopsy testicular function in rams. *Small Rum. Res.*, 45, 25-31, (2002).

**TECNOLOGIE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE: PRELIEVO,
VALUTAZIONE E CONSERVAZIONE DEL MATERIALE SEMINALE**
ARTIFICIAL INSEMINATION TECHNOLOGIES: SEMEN COLLECTION,
EVALUATION AND PRESERVATION

Gallus M., *AGRIS, Sardegna.*

SUMMARY - Use of semen obtained by artificial vagina from Sardinian breed rams is a very time consuming procedure since lambs need a long and accurate period of training. Exam of ejaculates immediately after collection is done in order to select semen with optimal sperm concentration and motility. Handling, dilution and packaging in straws at controlled temperature (15° C) permit distribution of quality semen all over Sardinia to improve genetic value of the Breed. The speech will deal with lamb training; artificial vagina; semen collection, frequency and evaluation; semen dilution parameters and materials; semen preservation technique for cervical AI within 7 hours; other preservation techniques.

INTRODUZIONE - I programmi di selezione genetica per il miglioramento della Razza ovina Sarda permettono di raggiungere notevoli incrementi genetici grazie all'utilizzo dell'inseminazione strumentale con seme fresco¹. Rispetto alla monta naturale l'utilizzo del materiale seminale fresco distribuito in paillettes da 400 milioni di spermatozoi consente: di accrescere il numero di discendenti per padre, di distribuire in diversi ambienti, anche a distanza, la progenie degli arieti (migliore correzione dei fattori ambientali con riduzione dell'effetto dell'interazione genotipo-ambiente), di realizzare accoppiamenti programmati sulle migliori pecore, permettendo così una più precisa stima del valore genetico degli arieti.

ADDESTRAMENTO DEGLI AGNELLI - Gli agnelli possono cominciare a essere addestrati al salto in vagina artificiale dall'età di 6 mesi. Uno degli aspetti di maggior importanza nel loro addestramento è l'abitudine degli stessi a essere avvicinati e manipolati dall'operatore. Per sua natura, l'agnello, le prime volte che viene avvicinato da uno sconosciuto, è timoroso ed irrequieto: tende ad allontanarsi e rintanarsi in un angolo del ricovero sino a tentare, quando possibile, di celarsi alla vista con tentativi che possono essere molto pericolosi per la sua incolumità. Gli agnelli comunemente sono tenuti in piccoli gruppi (10-15) in box di grandi dimensioni e basta che solo uno di loro manifesti paura nei confronti dell'uomo perchè tutti gli altri, anche se maggiormente confidenti, lo seguano agitandosi e correndo per nascondersi. Il primo passo dell'addestramento è, quindi, quello di entrare spesso nel box degli agnelli e deporre gli alimenti in mangiatoie situate all'interno del box stesso e non limitarsi a distribuire la razione nelle mangiatoie esterne. Inoltre è fondamentale che le persone deputate al prelievo del materiale seminale siano sempre le stesse e soprattutto che siano esclusivamente loro ad avere i primi contatti con gli animali particolarmente in queste primissime e delicatissime fasi dell'addestramento. Molto utile al fine di abituare gli animali alla presenza e alla manipolazione da parte di persone è che i pochi addetti indossino sempre lo stesso abbigliamento o quantomeno che gli abiti siano dello stesso tipo e colore.

Dopo due o tre mesi di questi semplici ma fondamentali accorgimenti, ripetuti quotidianamente, gli agnelli possono essere trasferiti in box più piccoli, a gruppi di 5-6, dove rimarranno per tutta la loro carriera di donatori di seme.

Una volta superata la fase di diffidenza si può introdurre una pecora nel box degli agnelli. Nelle prime fasi la pecora non deve essere necessariamente in calore ma

l'importante è che i giovani animali si fidino dell'operatore al punto da avvicinarsi ad annusare la femmina, serenamente, anche in sua vicinanza.

Il passo successivo è quello di indurre artificialmente il calore nella pecora (5 mg di estradiolo benzoato i.m. in un'unica somministrazione inducono manifestazioni del calore in 24-48 ore) e lasciarla per circa un'ora insieme al gruppetto di agnelli nella sala di monta, sempre in presenza dell'operatore.

Un operatore esperto individua con facilità chi fra gli agnelli dimostra un "interesse" per la pecora tale da far supporre che nel giro di pochi giorni sarà pronto a saltarla con lui al suo fianco. La presenza di uno o due maschi confidenti e molto interessati alla pecora fa sì che anche gli altri tendano a seguire il loro esempio. Tuttavia circa il 30% degli agnelli non si adatterà mai a saltare in vagina artificiale per il permanere della paura verso l'uomo.

Il ciclo di addestramento, dalle prime fasi sino al salto in vagina artificiale, richiede una decina di mesi; l'ariete non dimenticherà più ciò che ha imparato e sarà in grado di saltare anche dopo lunghi periodi di inattività.

L'addestramento al salto in vagina artificiale di animali già adulti e già avvezzi alla monta naturale presenta, invece, enormi difficoltà. Anche se si tratta di animali abituati all'uomo, difficilmente accettano di montare una pecora non in caldo, in particolare con accanto l'operatore o di subire la deviazione del pene per eiaculare in vagina artificiale.

LA VAGINA ARTIFICIALE - La vagina artificiale per ovini (IMV Technologies, Italia) è composta da un corpo principale in materiale plastico spesso e da una camicia di gomma che va introdotta all'interno del corpo principale rivoltandone le estremità sui bordi del corpo e, quindi, fissata ad entrambi i lati da diversi giri di nastro isolante. Al momento dell'utilizzo tramite una valvola situata sul corpo si immette acqua a 38-40°C ed aria in maniera da realizzare una sorta di tunnel dal turgore e temperatura simile alla vagina naturale. Al corpo centrale si raccorda un cono di raccolta in lattice collegato ad una provetta graduata. Tutto il materiale finora descritto è lavato, sterilizzato e tenuto in una stufa termostata (45°C) dotata di lampada ad U.V. per almeno 12 ore.

Ogni ariete utilizzerà una vagina a lui riservata che dovrà essere sterilizzata prima di ogni seduta di prelievi. Tutte queste operazioni preliminari devono essere svolte, da personale competente, in un locale attiguo alla sala di monta e dotato di acqua corrente. Se i prelievi del seme si susseguono a ritmo serrato è necessaria una stufa a doppia porta, termostata a 45°C, che permetta sia di immettere dal locale di preparazione le vagine pronte all'uso sia agli operatori di prelevarle dalla sala di monta.

SALA DI MONTA - Durante una campagna di F.A. si arriva a fornire 20.000 dosi in 8 settimane ed è, quindi, importante disporre di strutture e locali altamente funzionali e adeguati alle numerose esigenze sia degli animali che degli operatori. È perciò indispensabile una sala di monta che sopporti di poter gestire gli animali col minor sforzo possibile e permetta di controllare e valutare immediatamente il materiale seminale prelevato. Per questo è fondamentale un collegamento fra sala di monta e laboratorio; questo perché il materiale seminale appena prelevato possa essere immediatamente controllato e se idoneo diluito e refrigerato. Per le norme vigenti non può esserci un passaggio completo tra sala di monta e laboratorio, ma è sufficiente una finestrella che consenta sia comunicazioni verbali tra operatori e tecnici sia il passaggio dell'eiaculato.

I locali di monta (saletta d'attesa e sala prelievi) devono essere facilmente raggiungibili dalle stalle dove sono ricoverati i maschi che, comunque, se ben addestrati li raggiungono facilmente, anche percorrendo tratti relativamente lunghi.

Particolare attenzione va riservata all'aggressività dell'ariete di razza Sarda; la mole e la grande agilità, quando è determinato ad attaccare una persona o un altro ariete, ne fanno un animale potenzialmente molto pericoloso. Nonostante l'assenza delle corna come canone di razza è in grado, con pochi passi di rincorsa, di dare delle testate di notevole potenza. Quindi quando si avvicinano a questi animali, gli operatori, accanto alla calma ed alla compostezza, non devono mai distrarsi o dare loro le spalle.

LA MONTA - Dalla saletta di attesa gli arieti entrano ad uno ad uno nello spazio dove si trovano la pecora trattenuta da una cattura e l'operatore con la vagina artificiale. Comunemente, il maschio addestrato, dopo un'annusata frettolosa alla pecora, effettua la monta senza indugi. L'operatore, quindi, devia prontamente il pene indirizzandolo verso la vagina artificiale. Immediatamente dopo una bella spinta di reni avviene l'eiaculazione e la discesa del maschio dalla groppa della pecora.

L'operatore controlla l'eiaculato dopo aver effettuato una manovra particolare di scuotimento della vagina protetta da una guaina termica. La manovra ha lo scopo di far defluire lo sperma, di per sé denso e vischioso, il più velocemente possibile all'interno della provetta di raccolta. L'operatore lega, quindi, il maschio per permettergli di riposare qualche minuto prima di effettuare il secondo salto. Nel frattempo la vagina, contenente il primo eiaculato, è disposta verticalmente con la provetta verso il basso, in un supporto apposito. In attesa del secondo prelievo, l'eiaculato è protetto dagli shock termici grazie alla guaina termica.

In questo tempo di attesa e con un'altra vagina già pronta si può far saltare un altro maschio. Subito dopo si slega il primo che non esiterà a rimontare immediatamente la pecora eiaculando per la seconda volta.

PRELIEVI E LORO FREQUENZA - Gli arieti addestrati alla vagina artificiale non hanno alcuna difficoltà ad effettuare due salti consecutivi nel giro di pochi minuti. È stato accertato che, quando il seme ha caratteristiche soddisfacenti per la conservazione, non vi sono differenze significative fra il primo e il secondo eiaculato². Questo fatto permette di utilizzare la medesima vagina e la stessa provetta di raccolta nei due salti, consentendo di avere a disposizione un volume di seme più interessante per la lavorazione³. Gli animali ricoverati nella saletta d'attesa aspetteranno il momento di entrare singolarmente in sala monta.

Gli arieti giovani hanno un volume di eiaculato molto maggiore rispetto agli anziani (dai 5-6 anni in poi): si sono verificati casi dove dai due eiaculati di un "saccaio" (maschio fra 1 e 2 anni) sono state ottenute oltre 50 dosi di seme. Tuttavia i giovani, talvolta, tardano un poco ad avvicinarsi alla pecora, vuoi per un ancora non perfetto livello di addestramento vuoi per una naturale giocosità che lo porta a distrarsi per qualsiasi cosa si discosti dalla normale routine: abbigliamento della persona addetta al prelievo, presenza di estranei nelle vicinanze della sala monta, rumori o voci forti o comunque inconsueti in quei momenti.

Inoltre è molto importante che gli animali da utilizzare continuativamente per un lungo periodo come donatori di seme devono necessariamente essere tenuti in un ambiente a temperatura controllata⁴; la loro alimentazione deve essere studiata appositamente e non devono essere sottoposti a shock di nessun tipo circa 2 mesi prima del periodo dei prelievi (un ciclo di spermatogenesi nell'ariete dura 49 giorni)⁵.

VALUTAZIONE DELL'EIACULATO: STRUMENTI E PARAMETRI DI DILUIZIONE - Una volta effettuato il secondo prelievo con le manovre necessarie per far arrivare tutto il seme prodotto dal cono di raccolta alla provetta, questa viene passata, attraverso l'apposita finestrella, all'interno del laboratorio per i controlli e la lavorazione. È importante non lasciare il seme in attesa per più di pochi secondi e

nell'impossibilità di controllarlo immediatamente è opportuno porlo a bagnomaria a 38°C. Sul seme si effettuano i seguenti controlli: volume, motilità e concentrazione.

Volume - La lettura del livello del seme utilizzando provette graduate sarà sempre per difetto perché una parte dell'eiaculato tende a aderire alle pareti della provetta. È preferibile, quindi, ricavare il volume dell'eiaculato dal suo peso. All'uopo andrà benissimo utilizzare una bilancia di precisione alla quale si è fatto lo zero con una provetta vuota, identica a quelle utilizzate per la raccolta.

Motilità - La motilità del seme si valuta su una goccia osservata a un microscopio dotato di un tavolino riscaldato a 37°C per evitare shock termici agli spermatozoi. Infatti una temperatura anche di due o tre gradi sotto i 37 inibisce i movimenti di massa, non permettendo di valutarne correttamente le potenzialità. La goccia di seme (pochi microlitri) si osserva ad un ingrandimento di 10x10 (100x) e si attribuisce al movimento massale una valutazione stimata 1 a 5: 1 (uno) corrisponde al movimento del 20 % degli spz della goccia; 2 (due) del 40% e così via. Si tratta ovviamente di una valutazione soggettiva, ma che non presenta difficoltà in quanto dopo qualche determinazione è facile intuirne la scala di utilizzo. Solo il materiale seminale con una motilità massale da 3 (tre) in su viene avviato alla diluizione. Capita a volte di trovare un seme valutato 4 ma è assolutamente impossibile trovare un eiaculato valutabile 5 (cinque) 100%.

Concentrazione - Per calcolare la concentrazione degli spermatozoi nell'eiaculato si utilizza un fotocolorimetro tarato opportunamente che permette di stabilire il numero di spermatozoi (spz) presenti in un ml di seme. Per far ciò è necessario diluire 10 microlitri di seme in 4 ml di soluzione fisiologica. La lettura effettuata dall'apparecchio è in miliardi di spz/ml. Il seme, per essere utilizzato dopo diluizione, deve avere una concentrazione di almeno tre miliardi di spz/ml. Concentrazioni inferiori richiederebbero quantità di diluente molto piccole che non consentono una soddisfacente sopravvivenza degli spermatozoi durante le fasi di abbassamento della temperatura ed il trasporto verso gli allevamenti.

PARAMETRI DI DILUIZIONE - Sulla base dei dati così raccolti si passa alla diluizione del seme in modo da ottenere dosi inseminanti contenute in paillettes da 0,25 millilitri (1/4 di cc) ciascuna con 400 milioni di spermatozoi (dose ottimale al fine della fecondazione).

Per la diluizione si applica la seguente formula:

$$\frac{\text{Concentrazione} \times \text{Volume dell'eiaculato}}{160}$$

MESTRUE DILUITORE - Una volta conosciuta la quantità di mestruo da aggiungere al volume del seme (volume totale meno volume dell'eiaculato), si utilizza un mestruo al latte per portare l'eiaculato alla concentrazione voluta.

Preparazione e composizione mestruo - Il mestruo è composto da latte bovino in polvere con aggiunta di Sulfanilamide, Streptomina e Penicillina. Il latte in polvere, ricostruito con H₂O Milli Q sterile (11,11 g in 100 ml), deve essere portato a 92°-98°C e tenuto a questa temperatura per 10' allo scopo di inattivare la lactenina, sostanza tossica per gli spermatozoi. Il trattamento termico favorisce anche la trasformazione del lattosio in glucosio e galattosio (fonte energetica dei nemasperi).

È possibile preparare il mestruo dal giorno precedente purché stoccato subito in frigorifero, dove può essere utilmente conservato per 48 ore. Mezz'ora prima dell'utilizzo, il mestruo va riscaldato a bagnomaria a 38°C dove va tenuto sino al momento dell'utilizzo.

LAVORAZIONE DEL SEME FRESCO PER INSEMINAZIONE STRUMENTALE CERVICALE⁶ - La diluizione del seme permette di ottenere più dosi fecondanti da un eiaculato in modo da migliorare le capacità riproduttive degli arieti e poter avere più nati in allevamenti situati su tutto il territorio regionale per valutarne il valore genetico⁷. Se si considera che gli allevatori desiderano che le gravidanze inizino in primavera (stagione dove l'attività riproduttiva del maschio è molto ridotta) per poter disporre di agnelli nei periodi più redditizi, si intuisce la grande necessità di disporre di seme di altissima qualità, garantita dai controlli effettuati sugli eiaculati⁸.

Le dosi ottenute vanno utilizzate entro 8-10 ore dalla preparazione per cui è necessario che i calori delle pecore da fecondare siano stati sincronizzati. Una volta conosciuto, mediante il calcolo su indicato, il volume del mestruo da aggiungere al seme, questo andrà aggiunto facendolo scorrere lentamente sulla parete della provetta. Effettuata la diluizione la provetta viene agitata delicatamente in modo da assicurare una omogenea distribuzione del mestruo diluitore. È importante imprimere alla provetta tappata un movimento circolare molto lento dall'alto in basso. Qualora il liquido da aggiungere sia tanto da non poter essere contenuto nelle provette normalmente utilizzate (10 ml), il materiale seminale deve essere trasferito con le dovute cautele in provettoni Falcon da 30 ml.

Ora il seme può iniziare la sua discesa di temperatura per arrivare dai 38°C ai 15° di conservazione e utilizzo. Il raffreddamento ottimale del materiale seminale si ottiene immergendo la provetta del seme in acqua a 30°C contenuta in un beaker della capienza di 250 ml all'interno del quale si tuffa una fiala da 10ml di acido acetico congelato con l'accortezza di tenerla separata dalla provetta mediante un termometro, che permette di controllare la discesa della temperatura. Sul beaker vengono riportati i dati dell'ariete, le dosi previste (volume finale x 4) e l'ora. Ora il seme può entrare in una cella frigorifera a 15°C (il materiale seminale si stabilizzerà alla temperatura della cella entro 30 minuti circa). Raggiunta la temperatura di 15°C il seme è pronto per essere confezionato in paillettes mediante una impaillettatrice. Sulle paillettes sono impressi i dati dell'ariete e la data del prelievo.

CONFEZIONAMENTO PER IL TRASPORTO DELLE DOSI E PROCEDURA DI DISTRIBUZIONE - Il seme confezionato in paillettes rimane in cella frigorifera a 15°C fino al momento del suo avvio verso gli allevamenti dove sarà utilizzato⁹.

Naturalmente sono necessarie delle rigide regole di trasporto per tenere costante a 15°C la temperatura delle paillettes¹⁰. Il problema è abbastanza complesso in quanto durante la campagna di F.A. le temperature esterne raggiungono facilmente anche i 40°C, per cui è necessario attuare diverse strategie al fine di mantenere i 15°C necessari. A tale scopo le paillettes vengono tenute dentro un termos avvolte in gomma piuma bagnata con acqua a 15°C al centro del quale (separato dalla gommapiuma che ne impedisce il contatto diretto con le paillettes del seme) viene messa una grossa fiala di acido acetico congelata (l'acido acetico scongela se si superano i 15°C). Questa caratteristica permette di verificare se la temperatura all'interno del termos è stata conservata intorno ai valori desiderati sino al momento dell'utilizzo del seme. Il termos viene ovviamente chiuso con un doppio tappo e trasportato all'interno di borse frigorifere. Tutto il materiale utilizzato per il trasporto del seme dai termos alle borse termiche devono essere tenute almeno per 12 ore a 15°C.

Altre metodiche di conservazione del materiale seminale

1) Seme a lunga conservazione - Già da diversi anni sono in corso studi per verificare la possibilità di conservazione del materiale seminale fresco per un tempo più lungo

(fino a 72 ore)¹¹; questa caratteristica permetterebbe di sfruttare in modo soddisfacente i calori naturali delle pecore anche nella prospettiva che l' unione europea vieti l'uso di prodotti per la sincronizzazione dei calori.

Molti studi sono in corso per verificare se alcuni antiossidanti, addizionati al mestruo diluitore, siano capaci di limitare i processi ossidativi che, determinando la liberazione-produzione di radicali liberi di ossigeno, intervengono negativamente sulla motilità degli spermatozoi e sulla loro capacità di risalire le vie genitali femminili per i danni alla membrana. Le tecniche di prelievo e di valutazione del seme sono le stesse descritte per il materiale seminale fresco. Dopo la valutazione dell'eiaculato si effettua una diluizione a 1,6 miliardi per ml a 30°C utilizzando un medium al sodio citrato addizionato con 2 Mm di TEMPOL (4-idrossi 2,2,6,6-tetrametilpiperidina).

Una volta effettuata la diluizione, la provetta contenente il seme viene introdotta all'interno di un becker con acqua a 30°C (separata dalla fiala di acido acetico congelata da un termometro) e posta a 4°C in frigorifero. Ora occorrerà guidare la discesa della temperatura, grazie al cambio della fiala ogni 30 minuti, affinché il seme raggiunga i 4°C in due ore; questo è utilizzabile dal momento in cui raggiunge i 4°C.

Un unico accorgimento importante è di confezionare le paillettes di volta in volta poco prima dell'utilizzo. Con questo metodo si dispone per 72 ore di materiale seminale pronto all'uso, per agire su calori naturali.

2) Seme congelato - La tecnica di conservazione del seme mediante congelamento in azoto liquido (-196°C) è attualmente problematica per motivi sanitari, legati alla trasmissione con il materiale seminale di determinate malattie infettive¹². L'utilizzo del seme congelato è vincolato alla fecondazioni intrauterina, che si rende indispensabile per ottenere una fertilità accettabile¹³. Infatti, negli arieti il condizionamento del seme a basse temperature comporta una drastica caduta del suo potere fecondante anche mutando mestruai diluitori e tecnica di congelamento¹⁴. Gli spermatozoi sottoposti a questa metodica di conservazione risultano non essere in grado di risalire le vie genitali femminili se depositati, così come per il seme fresco, nella porzione caudale della cervice.

Medium per il congelamento del seme ovino:

medium base		medium a 30°C		medium a 4°C	
TRIS	2,42 g	Medium base	33,60 ml	Medium base	33,60 ml
Acido Citrico	1,36g	H ₂ O Milli Q	6,40 ml	Glicerolo	6,40 ml
Fruttosio	1,00 g	Tuorlo d'uovo	10,00 ml	Tuorlo d'uovo	10,00 ml
Penicillina	100.000 U.I.				
Streptomicina	100 mg				
H ₂ O Milli Q	67,20 ml				

Il medium di base va diviso in due frazioni: ad una vanno aggiunti i componenti del medium a 30°C e all'altra quelli del medium a 4°C.

La formula per trovare la diluizione degli spermatozoi è la stessa che si utilizza per il seme fresco, ma varia il dividendo perché ciascuna paillette di seme congelato contiene 100 milioni di spermatozoi¹⁵:

$$\frac{\text{Concentrazione} \times \text{Volume eiaculato}}{40} = \text{Volume finale}$$

40

Il volume finale corrisponde al volume dell'eiaculato più il volume del medium da aggiungere. Quest'ultimo va ora diviso in due aggiungendo la parte di Medium a 30°C . A questo punto si abbassa la temperatura del seme così diluito da 30°C a 4°C in 2 ore. Quindi si aggiunge il Medium a 4°C ottenendo la composizione finale del materiale seminale da congelare e si può, quindi, procedere al confezionamento in paillettes.

Prima del congelamento è necessario stabilizzare a 4°C la temperatura delle paillettes per 2 ore. Successivamente si espongono le paillettes disposte orizzontalmente su una rampa ai vapori di azoto liquido (-75°C) per 5 minuti per poi essere tuffate direttamente nell'azoto liquido. Ora è possibile recuperare le paillettes e introdurle all'interno di un gobelet dove, qualora le paillettes non siano state marcate con il nome dell'ariete e la data del prelievo, è necessario inserire un cartoncino con questi dati. Il seme conservato in azoto liquido ha una durata praticamente illimitata. Al momento di essere utilizzate (su pecore sincronizzate a 60 ore dall'asportazione delle spugne) le paillettes prelevate dal bidone in cui sono stoccate vanno immerse per 30 secondi in acqua a 38°C.

BIBLIOGRAFIA - 1. Casu, S., Cappai, P., Branca, A., Fecondazione artificiale e miglioramento genetico nella pecora da latte. Aspetti tecnico-applicativi. In: *"Situazione e prospettive della Fecondazione artificiale nella specie ovina e caprina in Italia"*, Forlì 27/03/88, 21, (1988). 2. Ollero, M., Muino-Blanco, T., Lopez-Perez, M.J., Cebruan-Perez, J.A., Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *International Journal of andrology*, 19: 287-292, (1996). 3. Martini, G.B., Ford, J.R., Purvis, I.W., Environmental and genetic factors affecting reproductive activity in the merino ram. *Reproductive Physiology of merino sheep*, 9-109, (1990). 4. Ortavant, R., Thibault, C., Influence de la durée quotidienne d'éclairage sur la spermatogenèse du bélier C.R. *Séances Soc. Biol.*, Tome CL, 2, 358-36, (1956). 5. Manunta, G., Floris, B., Cappai, P., Attività circannuale delle gonadi nell'ariete di razza Sarda. *Arch. Vet. Ital.*, 32, (1981). 6. Colas, G., Dauzier, L., Courot, M., Ortavant, R., Signoret, J.P., Resultats obtenus au cours de l'étude de quelques facteurs importants de l'insemination artificielle ovine. *Ann. Zootech.*, 17 (7), 57, (1968). 7. Sanna, S.R., Carta, A., Cappai, P., Branca, A., Festante, G., Bitti, P.L., Environmental effects on fertility of artificially inseminated Sarda dairy ewes. *Sheep and Goat Production. AI in small ruminant: developments and practical applications*. FEZ, S5.5, (1997). 8. Timonier, J., Mauleon, P., Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovarienne et hypophysarie chez les ovins. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 9. 233-250, (1969). 9. Cappai, P., Tecnicas modernas in sa reproduzione de s'albeghe. *X Convegno Rievocazione della transumanza-Berchideddu*, (2005). 10. Cappai, P., Colas, G., Inseminazione artificiale e riproduzione nella specie ovina. *Atti XL SISVet.*, I, 271, (1986). 11. Mara, L., Accardo, C., Pilichi, S., Dattena, M., Chessa, F., Chessa, B., Branca, A., Cappai, P., Benefits of Tempol on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. *Theriogenology*, 63 (8): 2243-53, (2005). 12. Ministero delle risorse agricole, alimentari e forestali-Regolamento di esecuzione della legge n. 30 del 15.1.1991. 13. Cappai, P., Sanna, S.R., Branca, A., Fraghi, A., Bomboi, G., Comparison of laparoscopic and transcervical insemination with frozen semen in Sarda dairy ewes. *Animal Science*, 66, 369, (1998). 14. Cappai, P., Sanna, S.R., Branca, A., Laparoscopic and transcervical insemination with frozen semen in Sarda dairy ewes. *48th Annual Meeting of the EAAP*, Vienna, (1997) 15. Visser, D., Salamon, S., Fertility following insemination with frozen-thawed reconcentrated and unconcentrated ram semen. *Aust. J. Biol. Sci.*, 27, 423-425, (1974).

TECNOLOGIE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE: ESPERIENZE DI CAMPO IN SARDEGNA
ARTIFICIAL INSEMINATION TECHNIQUES: IN FIELD EXPERIENCES IN SARDINIA

Petretto G., *Associazione Regionale Allevatori (ARA), Sardegna*

SUMMARY - Since 1985 the Regional Breeders' Association of Sardinia (Associazione Regionale Allevatori della Sardegna, -ARA-) runs the artificial insemination (AI) plan together with ASSONAPA, IZCS and APA. Every year in Sardinia about 20000 instrumental inseminations are done on dairy ewes registered in the Genealogic Book and undergoing functional tests. ARA vets are in charge of AI execution starting from oestrus synchronization: intravaginal progestagen-impregnated sponges are inserted and left *in situ* for 14 days; on the day of sponge removal 400 IU PMSG are administrated and cervical artificial insemination is performed after 55 hours. Afterwards lambing is recorded and most valuable lambs are subjected to DNA testing to confirm paternity. Many are AI advantages: progeny genetic improvement, increased number of ewes bred to genetically superior rams vs. natural service, controlling transfer of reproductive (brucellosis, visna, etc.) or genetically controllable (scrapie) diseases.

RELAZIONE - Dal 1985 in Sardegna si effettua l'Inseminazione Artificiale (I.A.) finalizzata al miglioramento genetico degli ovini iscritti al Libro genealogico della razza Sarda; la gestione sin dall'inizio è stata affidata all' Associazione Regionale Allevatori della Sardegna (ARAS).

L'ARAS è socia dell'A.I.A.. Opera, nel quadro della politica generale e delle direttive organizzative dell'A.I.A., in armonia con la programmazione agricola regionale e con gli indirizzi delle Associazioni Nazionali per specie e razze di bestiame e settori di attività. Dal 1982 gestisce il Piano di Assistenza Tecnica (P.A.T.).

L'A.R.A.S. ha funzione di coordinamento tecnico delle attività di selezione delle quattro Associazioni Provinciali Allevatori (A.P.A.) della Sardegna che gestiscono i Controlli Funzionali ed i Libri Genealogici delle razze in purezza. Inoltre, su incarico della R.A.S. (Regione Autonoma della Sardegna), in concerto con le A.P.A., gestisce il Programma Regionale di Identificazione Elettronica degli animali iscritti ai Libri Genealogici.

Il piano di Inseminazione Artificiale viene svolto in collaborazione con:

- ASSONAPA: soggetto finanziatore
- IZCS: fornisce il seme e le codifiche per il suo abbinamento
- APA regionali: forniscono i dati genetico/produttivi
- ARAS: fornisce i veterinari operatori

Ogni anno si effettuavano in Sardegna circa 20.000 Inseminazioni Artificiali, ma negli ultimi anni la quota si è ridotta fino a 15.000 capi.

Perchè si effettua l'I.A.? I motivi che portano all'inseminazione sono diversi:

1. miglioramento genetico dei discendenti consente:
 - a) di allevare gli agnelli maschi nati dalle migliori femmine accoppiate con i migliori arieti della razza;
 - b) di fornire agnelle nate dai migliori arieti provati;
 - c) una corretta valutazione genetica delle pecore e degli arieti del gregge.
2. possibilità di fecondare con seme di ariete miglioratore più pecore rispetto alla monta naturale.
3. possibilità di controllare meglio sia le malattie trasmissibili per via sessuale (brucellosi, visna, ecc.) sia le malattie genetiche (scrapie).

Su quali pecore viene eseguita? Si effettua (20 maggio - fine giugno) nelle pecore iscritte al Libro Genealogico e sottoposte a controlli funzionali per i seguenti motivi:

- si conoscono le loro produzioni,
- si conoscono i loro ascendenti genitori-nonni,
- sono facilmente identificabili,
- si conosce il loro DNA.

I Veterinari A.R.A.S. sono delegati all'esecuzione dell'inseminazione artificiale partendo dalla sincronizzazione dei calori.

In una prima visita, presso le aziende che hanno fatto domanda di inseminazione, viene controllato il gregge per verificare se nulla osta all'esecuzione dell'inseminazione dal punto di vista sanitario; successivamente assieme all'allevatore si controlla il tabulato, fornito dall'APA, sull'indice genetico e sulle produzioni di ogni singolo capo ovino; il tutto per escludere dalla fecondazione le pecore che abbiano:

- un indice genetico troppo basso;
- età inferiore ai 3 anni o superiore ai 5;
- partorito dopo il 31 dicembre dell'anno precedente (se i parti sono avvenuti dopo tale data le pecore al momento dell'I.A. avrebbero ancora un'alta produzione lattea che implica un ritardo nella scarica preovulatoria delle gonadotropine e un conseguente ritardo delle ovulazioni).

Si è così venuti l'elenco delle pecore da sottoporre a inseminazione.

Dopo questa prima valutazione si passa al controllo dello stato di nutrizione mediante l'utilizzo dei tasti valutando la BCS per escludere le pecore troppo magre o eccessivamente grasse, l'ideale è utilizzare pecore con una BCS tra i 2,5 e 3,0. Successivamente, si provvede alla sincronizzazione dei calori che viene effettuata con l'immissione a livello vaginale di una spugna contenente 40 mg di fluorogestone acetato. Sulle spugne, prima dell'immissione, viene cosparso dell'antibiotico in polvere. Le spugne permangono per 14 gg ed il giorno dell'asportazione ad ogni pecora vengono somministrate 400 U.I. di PMSG. La mattina del giorno dell'inseminazione l'IZCS provvede al prelievo e alla preparazione del seme che verrà utilizzato nel pomeriggio. Assieme al seme viene fornito un tabulato con i numeri delle pecore sincronizzate e il numero dell'ariete assegnato ad ognuna: maggiore sarà l'indice genetico di una determinata pecora maggiore sarà quello dell'ariete abbinato. Dal 2006 assieme all'indice dell'ariete è stato inserito nel tabulato anche la sensibilità alla scrapie verificata mediante esame del DNA.

Nel piano di Inseminazione Artificiale si utilizza solo seme fresco, conservato a circa +15°C ed utilizzato entro un tempo non superiore alle 10 ore dal prelievo.

Dopo 55 ore dall'asportazione della spugna si passa all'esecuzione dell'inseminazione artificiale. Il seme viene confezionato in paillettes che presentano impresso l'identificativo dell'ariete corrispondente. La paillette viene posta in apposita pistolet con guaina monouso per ogni capo fecondato. Introdotto lo speculum con fonte luminosa in sede vaginale, per consentire la visualizzazione della cervice, il seme viene depositato in sede cervicale superficiale, in quanto la particolare conformazione anatomica della cervice impedisce alla pistolet di oltrepassarla.

Dopo 142-155gg dall'inseminazione i controllori dell'APA passano nelle varie aziende per verificare le pecore che hanno partorito e successivamente i maschi di particolare pregio saranno sottoposti a test del DNA per valutare l'effettiva paternità.

I dati disponibili fino al 1996 sono:

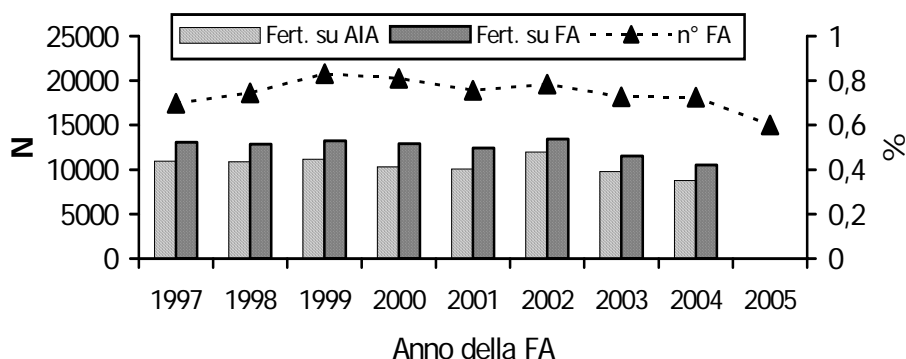
Anno	Capi fecondati	Fertilità %
1996	11376	43,6
1995	11200	42,0
1994	11233	41,0
1993	8516	44,0
1992	5218	42,0

Passiamo adesso ad analizzare i dati disponibili dal 1997 al 2005 sulla Inseminazione Artificiale.

Anno della F.A.	F.A. realizzate (A)	Parti disponibili c/o A.I.A. (B)	Parti attribuiti alla F.A. (C)	Distanza media F.A./parto (parti A.I.A.) (D)	% capi con data parto A.I.A. (B/A)	% parti da F.A. su F.A. realizzate (C/A)	% parti da F.A. su parti A.I.A. (C/B)
1997	17.468	14.637	7.643	165,39	0,838	0,438	0,522
1998	18.643	15.776	8.115	165,46	0,846	0,435	0,514
1999	20.773	17.492	9.261	166,4	0,842	0,446	0,529
2000	20.250	16.233	8.371	166,96	0,802	0,413	0,516
2001	18.896	15.311	7.601	166,94	0,81	0,402	0,496
2002	19.621	17.483	9.391	165,75	0,891	0,479	0,537
2003	18.197	15.507	7.142	167,77	0,852	0,392	0,461
2004	18.121	15.035	6.334	169,61	0,83	0,35	0,421
2005	15.008						

Dati forniti dall'IZCS

- (A) numero di FA realizzate,
- (B) numero di parti complessivi registrati presso gli archivi AIA nell'anno relativo alla FA per i soggetti sottoposti a FA con successiva (dopo 15 gg) presenza dell'ariete,
- (C) numero di parti attribuibili all'intervento fecondativo (parto compreso tra 142 e 155 giorni dalla FA) tra quelli complessivi,
- (D) distanza media tra data della FA e data del parto disponibile,
- (B/A) percentuale dei capi fecondati (FA e ariete) per i quali si dispone nell'intero anno di una data di parto c/o archivi AIA,
- (C/A) percentuale di parti (fertilità) esclusiva all'intervento di FA misurata sul totale dei capi fecondati,
- (C/B) percentuale di parti (fertilità) esclusiva all'intervento di FA misurata sui parti disponibili.



Dati forniti dall'IZCS.

Dall'analisi dei dati riportati in tabella e in grafico si evince un generale peggioramento negli ultimi anni dell'efficacia della Inseminazione Artificiale per il miglioramento genetico della razza ovina Sarda:

- il numero di inseminazioni realizzate è in calo,
- il numero di capi inseminati per i quali non esiste traccia di parto negli archivi AIA è ancora molto elevato (allevamenti non più iscritti, capi morti, capi che non hanno partorito ecc.) e non produce alcun vantaggio allo schema di selezione,
- le fertilità indicate sia sul totale delle pecore inseminate che sul totale delle pecore con parto registrato all'AIA, già basse sono in declino.

Si può in generale affermare che negli ultimi anni c'è stato un calo della fertilità nelle varie campagne riproduttive con monta naturale sia nelle pecore adulte che nelle saccaie (pecore di primo parto), possiamo perciò ritenere che lo stesso elemento non sia da sottovalutare anche nelle campagne di Inseminazione Artificiale. Un elemento da non dimenticare è l'arrivo della BTV nell'Agosto 2000 e successive campagne vaccinali contro la stessa BTV dalla primavera 2002.

Un punto da sottolineare è che il dato annuale sulla fertilità comprende anche tutta una serie di variabili che dal 1996 non vengono più registrate per problemi di competenze fra i vari enti che operano nel piano, comunque si può affermare che tutte queste variabili quando sono state accertate hanno interferito con la fertilità in una percentuale intorno al 10-11%.

Queste variabili sono date:

- alcune pecore il giorno dell'inseminazione possono presentare patologie riguardanti la sfera genitale (vulvovaginiti, corpi estranei (forasacchi e ossa di feti macerati) e miasi); talvolta, in sede vaginale, sono presenti anche delle leggere emorragie che interferiscono sulla vitalità degli spermatozoi.
- durante la gravidanza possono verificarsi eventuali aborti, che vengono spesso denunciati dall'allevatore, mentre altre volte l'allevatore non denuncia l'aborto o perchè passa inosservato o perché trattasi di riassorbimento embrionale.
- alcuni capi fecondati possono venire a morte per varie patologie.

La strategia della selezione con il metodo della Inseminazione Artificiale oggi non si deve solo limitare ai soli aspetti produttivi, ma deve puntare a trasferire agli animali resistenza ad importanti patologie, fra queste ricordiamo la scrapie e le TSE.

TECNOLOGIE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE: INSEMINAZIONE ARTIFICIALE INTRAUTERINA ED EMBRYO TRANSFER NEI PICCOLI RUMINATI: SVILUPPI TECNICI E POSSIBILITÀ APPLICATIVE NELLA PECORA DI RAZZA SARDA

ARTIFICIAL INSEMINATION TECHNIQUES: INTRAUTERINE ARTIFICIAL INSEMINATION AND EMBRYO TRANSFER IN SMALL RUMINANTS: TECHNICAL DEVELOPMENTS AND POSSIBLE APPLICATION IN SARDINIAN DAIRY EWES

Rosati I., *Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari*

SUMMARY - In sheep animal size and particular cervical conformation negatively influence intrauterine artificial insemination (iAI) and transcervical embryo transfer (ET) applicability. Frozen semen use demands sperm deposition directly in uterine lumen to obtain satisfactory pregnancy rates (>50%). Several techniques have been designed to overcome anatomical obstacle. Laparoscopic technique is the most used for iAI and ET, but it is an invasive procedure and it cannot be used routinely for economical and practical reasons. Transcervical AI technique designed at Guelph University is little expansive and gives good results in meat breeds, but its application in Sardinian ewes gave unsatisfactory pregnancy rates. Cervical folds incision proposed at Sassari University gives permanent access to uterus through cervix for iAI and ET.

I.A. INTRAUTERINA - L'inseminazione artificiale (IA) è un mezzo fondamentale per il miglioramento genetico ed il controllo della diffusione di diverse malattie infettive. Nonostante i notevoli progressi compiuti negli ultimi decenni in tema di IA in diverse specie domestiche la tecnica ha avuto una limitata applicazione nell'allevamento ovino. In Sardegna, attualmente, lo schema selettivo per la creazione e la diffusione del progresso genetico della razza Sarda si avvale di arieti miglioratori impiegati per la maggior parte in monta naturale e limitatamente tramite IA. Nell'Isola si realizzano annualmente circa 20.000 inseminazioni strumentali con seme fresco, deposto in prossimità dell'ostio cervicale vaginale, o congelato deposto direttamente in utero per via laparoscopica. Il 70% delle inseminazioni è finalizzato alla valutazione sulla progenie di giovani arieti (60-80 arieti/anno); il rimanente 30% è riservato alla fecondazione delle pecore più produttive con il seme dei migliori arieti.

Il management riproduttivo, comune nell'Isola, prevede un parto all'anno con un periodo di mungitura condizionato dal periodo di apertura degli impianti di trasformazione casearia (da dicembre a luglio compresi). Questo sistema di produzione impone una stagione di monta concentrata nel periodo maggio-giugno per le pecore adulte (agosto-settembre per le "agnelle"), così da registrare il massimo dei parti all'inizio della campagna casearia. La concentrazione degli accoppiamenti in questi periodi porterebbe ad un surmenage degli arieti con decremento della fertilità; per ovviare a tale evenienza si rende necessario l'incremento del loro numero all'interno del gregge od il ricorso all'IA. Queste motivazioni, unite ad una più precisa valutazione dei riproduttori e a un'adeguata valorizzazione degli arieti migliori, hanno stimolato l'utilizzo dell'IA anche nella razza Sarda.

Attualmente l'IA è praticata in Sardegna quasi esclusivamente con seme fresco che viene deposto a livello cervico-vaginale. Tale metodica consente mediamente la realizzazione di 300 fecondazioni/anno per ariete adulto miglioratore¹. Nel caso di soggetti di particolare valore genetico, le possibilità riproduttive potrebbero essere notevolmente incrementate ed ottimizzate con l'impiego del seme congelato; fattore

limitante, però, è che il suo utilizzo prevede necessariamente la sua deposizione direttamente nel lume uterino per ottenere una fertilità accettabile.

Negli ovini alcune caratteristiche anatomiche proprie della specie condizionano negativamente le possibilità di IA intrauterina per via transcervicale; in particolare intervengono sfavorevolmente la mole dell'animale (troppo piccola per consentire l'esecuzione della tecnica bimanuale retto-vagina praticata comunemente nella bovina) e la particolare conformazione del canale cervicale (tortuoso e relativamente lungo e ristretto), entrambe di ostacolo al cateterismo uterino con una comune siringa da inseminazione per via trans-vaginale. I tentativi d'impiego del seme congelato per questa via nella pecora Sarda sono sfociati in una fertilità molto modesta². La causa è conseguente alla lenta progressione ed alla breve sopravvivenza nelle vie genitali femminili degli spermatozoi sottoposti a pratiche di congelamento e scongelamento³.

Per superare l'ostacolo anatomico sono state messe a punto alcune tecniche che permettono la deposizione del materiale seminale direttamente nell'utero. Tra queste, attualmente, la più diffusa è IA per via laparoscopica. La metodica porta a soddisfacenti livelli di fertilità (oltre il 50%), ma è invasiva e non trova applicazione routinaria per il costo elevato dello strumentario, per la necessità d'alta specializzazione dell'inseminatore e, spesso, per l'impossibilità di operare in allevamenti dotati di strutture appropriate.

Più recentemente in Canada, presso l'Università di Guelph, è stata messa a punto una tecnica di IA transcervicale, di basso costo e di facile applicazione in campo, che ha dato ottimi risultati^{4,5} in razze da lana e da carne. Tale tecnica, caratterizzata dall'impiego di una pistola con particolare puntale metallico, ha permesso la deposizione del seme in utero nell'87% dei soggetti con un tasso di fertilità del 50% circa. Sperimentazioni sulla pecora di razza sarda hanno portato però a tassi di fertilità che non superano il 25%^{6,7,8}. Tale problematica è, a nostro avviso, da attribuire al fatto che le pecore di razza Sarda sono più piccole e, conseguentemente, maggiori sono le difficoltà che si incontrano nel superare le pliche cervicali causa frequente di sanguinamento (notoriamente spermiotossico).

Presso il nostro Istituto è stata ideata e sperimentata una tecnica di preparazione chirurgica della cervice finalizzata alla risoluzione del problema del cateterismo uterino per via transcervicale⁹⁻¹¹.

L'intervento, basato sulla resezione parziale o sull'incisione delle pliche cervicali, deve essere effettuato dopo il secondamento e comunque entro le 24 ore dal parto.

Nell'immediato post-partum, infatti, le pliche cervicali sono ipertrofiche e possono essere facilmente esteriorizzate facendo prollassare la cervice previa anestesia epidurale sacro-coccigea (5-8 ml lidocaina 2%). Posizionata la pecora in decubito dorsale e preparato il campo operatorio, previo svuotamento del retto e della vescica, viene visualizzata la portio vaginale della cervice con l'ausilio di apposito speculum vaginale. La plica più caudale viene fissata con pinze Bozeman e portata a livello vulvare. A questo punto si provoca il prollasso della cervice esercitando una trazione moderata con pinze Duval sulle pliche man mano che si esteriorizzano.

In ogni plica sono state praticate, a partire dall'ultima esteriorizzata, quattro incisioni (dorsale, ventrale e laterali) con elettrobisturi suddividendo le pliche in quadranti. Per una migliore emostasi le zone da sezionare sono delimitate con pinze Dandy. L'intervento può essere semplificato effettuando due incisioni per plica.

E' presente una variabilità soggettiva nel numero e nella conformazione delle pliche: comunemente sono presenti 6-7 pliche con limiti da 5 a 8. In alcuni soggetti la conformazione è anulare in tutte le pliche, ma nella maggior parte delle pecore tra le pliche anulari si interpongono pliche incomplete, falciformi o, talvolta, con andamento a spirale. Nei soggetti pluripari alcune pliche possono presentare frangiature, probabile esito di lacerazioni verificatesi durante il parto.

Talvolta, quando si interviene ad eccessiva distanza dal parto, non è possibile far prolapsare interamente la cervice per cui una o più pliche craniali rimangono intatte.

Durante l'intervento il sanguinamento è minimo nella maggioranza dei soggetti e solo in qualche caso, quando l'incisione interessa i vasi sanguigni localizzati alla base delle pliche, si rende necessaria un'emostasi con elettrobisturi.

Per ultimo, prima di liberare la plica cervicale caudale dalle pinze, si effettua un trattamento topico a livello del canale cervicale con una pomata antibiotica contenente penicillina iodidrata e diidrostreptomina solfato (MAMYZIN L[®], Boehringer Ingelhe). Il trattamento antibiotico viene completato con la somministrazione i.m. di amoxicillina triidrato in preparazione ritardo (CLAMOXYL LONG ACTING[®], Pfizer Italia). Le pecore, superato l'effetto dell'epidurale, vengono reintrodotte nel gregge senza altra precauzione che la comune osservazione quotidiana.

L'intervento è abbastanza agevole in allevamento e i tempi impiegati sono mediamente di $30 \pm 6,6$ minuti. La pervietà del lume cervicale ad una pistola da inseminazione tipo Cassou è definitiva nel tempo; è stato possibile accedere all'utero nel 100% degli animali sottoposti ad intervento ed il tempo impiegato per attraversare la cervice è risultato sempre inferiore al minuto (mediamente $13,8 \pm 14$ secondi)

A fine maggio le pecore sono state sottoposte a sincronizzazione degli estri mediante l'uso di spugnette vaginali contenenti fluorogestone acetato per 14 giorni. Al momento della rimozione dei pessari si somministravano 300 UI di PMSG i.m. e le pecore erano inseminate 52-58 ore dopo.

Le pecore sono state immobilizzate in apposita gabbia di contenimento (cradle) che consente un veloce ribaltamento dell'animale facendogli assumere la posizione supina che limita tensioni e/o contrazioni della muscolatura addominale.

Detersa la vulva con una salvietta imbevuta di soluzione antisettica, viene visualizzata la cervice con l'ausilio di apposito speculum vaginale; si fissa, quindi, una plica con pinze Bozeman e si avvicina l'ostio cervicale a livello vulvare.

Il seme viene deposto nel corpo dell'utero per via transcervicale utilizzando una pistola di Cassou completa di guaina sanitaria del diametro di 3 mm.

Per contenere i tempi delle operazioni è bene avvalersi di tre aiuti (due per la preparazione degli animali ed uno per lo scongelamento del seme e preparazione delle pistolette).

La fertilità, dopo IA intrauterina con seme congelato, come mostrato nelle tabelle 2 e 3, oscilla negli anni dal 53% al 73%.

Le tecniche sinora proposte per l'inseminazione intrauterina nella pecora spesso incidono negativamente nel rapporto costo-beneficio o presentano dei limiti nell'impiego routinario di massa.

Un nostro studio basato sull'applicazione della tecnica canadese di Guelph, ma con modifiche al puntale della pistola per adattarlo alla pecora sarda, ha portato risultati incoraggianti: la fertilità generale delle 25 pecore sottoposte a sperimentazione è stata buona (32%) con un tasso di fertilità ottimo (64%) negli 11 soggetti in cui è stato possibile deporre il seme in utero (Tab. 4).

EMBRYO TRANSFER - La tecnica di embryo transfer nella specie ovina si pratica attualmente per via laparotomica o laparoscopica e ha un impiego attualmente limitato rispetto al bovino. Le cause sono da ricercare nell'applicazione delle suddette tecniche chirurgiche sia per l'alto costo, non adeguato al valore dell'animale, sia per la limitata ripetitività di recupero embrionale a causa delle aderenze che comunemente seguono all'intervento.

I tentativi di recupero embrionale transcervicale nella specie ovina sono limitati. Coonrod et al.¹² hanno effettuato per tale via il flushing uterino in 11/26 pecore recuperando degli embrioni.

Barry et al.¹³, per facilitare la penetrazione del catetere, utilizzarono 6 giorni dopo l'estro le Prostaglandine E₂ e l'Estradiolo cipionato che inducono dilatazione cervicale. La raccolta degli embrioni è stata effettuata 24 ore dal primo trattamento. Nei soggetti in 10/10 soggetti è stato possibile entrare in utero. La percentuale di embrioni recuperati, rispetto al numero dei corpi lutei è stata del 65%.

Un simile protocollo è stato utilizzato anche da Mylne et al.¹⁴ in 92 pecore di diversa età e razza. Il tentativo di recupero embrionale è stato effettuato, in anestesia generale, tramite un catetere di Foley introdotto in utero per via transcervicale. Fu possibile penetrare in utero nel 5% delle nullipare e nel 46% delle pluripare. Differenze, anche se non significative, sono state rilevate fra le diverse razze. Il superamento della cervice risulta più facile nei soggetti di razza Texael. Il recupero embrionale, rispetto al numero di corpi lutei osservati, è stato del 60%; leggermente inferiore (58%) quello ottenuto mediante laparoscopia nei soggetti in cui non fu possibile entrare in utero per via cervicale.

Wulster-Radcliffe et al.¹⁵ hanno proposto una nuova tecnica di trasferimento embrionale e per preparare la cervice si servirono dell'ossitocina associata all'estradiolo. Gli embrioni (blastocisti o morule), ottenuti mediante laparotomia da soggetti donatori a 6 giorni dall'inseminazione, venivano trasferiti alle riceventi al 6° giorno dall'estro mediante un catetere in acciaio lungo 17,5 cm con diametro esterno di circa 1,47 mm ed apice bottonuto del diametro di 4 mm. Il passaggio del catetere in cervice, fino al corno uterino, avviene in meno di 30 secondi. Gli AA hanno riscontrato che il numero di embrioni ritrovati in utero dopo qualche giorno dal trasferimento embrionale con tale tecnica (68,75%), non presenta differenze significativa rispetto a quello laparoscopico (72,73%). Inoltre la sopravvivenza degli embrioni trasferiti per via transcervicale è risultata maggiore (73,33%) rispetto a quella laparoscopica (66,75%).

La via cervicale è sicuramente più veloce e meno traumatica rispetto a quella laparoscopica, sebbene senza trattamento farmacologico solo occasionalmente sia possibile superare la cervice.

Un tentativo di recupero embrionale è stato fatto presso il nostro Istituto in 6 pecore sottoposte ad incisione delle pliche nel periodo gennaio-aprile 2002. Gli animali, sottoposti a sincronizzazione degli estri mediante l'uso di spugnette vaginali contenenti 40 mg di Fluorogestone Acetato, sono stati trattati con gonadotropine ipofisarie suine per stimolare una superovulazione (FSH 250 UI, LH 250 UI); il tutto è stato diluito in 8 ml di fisiologica e frazionato in dosi scalari (2; 1,5; 1,5; 1; 1; 1 ml) iniettate i.m. ogni 12 ore a partire da 24 ore prima dell'espianto delle spugnette. L'inseminazione con seme congelato (100 x 10⁶ spermatozoi totali) è stata effettuata per via transcervicale mediante pistolet di Cassou 52 ore dopo l'estrazione dei pessari.

Le pecore sono state sottoposte a flushing uterino per il recupero degli embrioni 5 giorni dopo l'inseminazione. Per il flushing, effettuato per via transcervicale, è stato utilizzato un catetere a 3 vie (Ø 3,8 mm) in acciaio e munito di palloncino; lo strumento è commercializzato dalla "IMV Italia" per il recupero di embrioni mediante laparoscopia nella pecora. Le modalità di preparazione della regione perineale e la tecnica d'introduzione del catetere in utero rispecchiano quella già esposta precedentemente per l'inseminazione strumentale. Raggiunto l'utero il catetere è stato posizionato in un corno uterino e fissato insufflando 3/4 ml di aria nel palloncino. Venivano quindi effettuati 3 lavaggi, ognuno con 20 ml di PBS addizionato con 5 mg/ml di albumina serica bovina ed antibiotici (50 UI/ml penicillina, 50 µg/ml streptomina) a 37° C. Terminato il flushing ed estratta l'aria del palloncino, il catetere è stato reintrodotto sino al corpo dell'utero facendolo scorrere sulla parete mediana del corno sino a raggiungere il margine caudale del setto intercornuale; il catetere è stato quindi posizionato e fissato nell'altro corno prima di procedere al lavaggio come descritto precedentemente.

L'esito della ricerca degli embrioni è riportato in Tabella 5.

CONCLUSIONI - I risultati dimostrano che, con l'incisione delle pliche, il canale cervicale assume caratteristiche che consentono la via transcervicale sia per l'IA intrauterina sia per il recupero degli embrioni ed eventualmente il loro trasferimento. La possibilità del flushing uterino, nel 100% dei soggetti, lascia intravedere buone prospettive applicative delle tecniche di ET. Resta inoltre da verificare se con questo tipo di catetere sarà possibile superare la cervice anche nei soggetti sottoposti ad intervento semplificato (2 incisioni). Tuttavia, allo stato attuale, le sue possibilità applicative sono indirizzate in particolare ai nuclei di selezione, in grado di produrre soggetti miglioratori che possono spuntare prezzi di mercato abbastanza alti. Non è ipotizzabile, invece, un'applicazione di massa dell'intervento esclusivamente in funzione della fecondazione strumentale intrauterina per l'utilizzo del seme congelato. A tal fine è certamente più pratica e conveniente, da un punto di vista economico, la tecnica di "Guelph" adattata alla pecora di razza Sarda. I risultati ottenuti con la modifica del puntale, se confermati su un numero adeguato di soggetti, indicano infatti la possibilità di messa a punto di una tecnica che consenta routinariamente l'inseminazione strumentale per via transcervicale; è perciò doveroso l'impegno scientifico in tal senso. Un risultato positivo permetterebbe una gestione ottimale del materiale seminale dei soggetti di elevata genealogia; inoltre porterebbe un contributo all'applicazione delle biotecnologie riproduttive che tendono in generale ad implementare la valorizzazione del patrimonio genetico delle pecore migliori.

Tabella 1 - Analisi della fertilità dei soggetti inseminati per via transcervicale in funzione dei tempi di inseminazione e del numero di pliche cervicali incise.

Tipo inseminazione	n° soggetti	Tempi inseminazione Media ± D.S (sec.)	Pliche cervicali Media ± D.S	Parti n° (%)
I.S. transcervicale	26	20,3 ± 22	6,4 ± 1	15 (57,7 %)
		38,7 ± 36	5,7 ± 0,8	0
I.S. laparoscopica	27			18 (66,7 %)

Tabella 2 - Risultati pecore nelle quali è stato effettuato l'intervento di preparazione delle pliche (4 incisioni).

Pecora	Pliche sezionate	Pliche non sezionate	Tempi intervento	Anno 2001			Anno 2002		
				n°	n°	n°	minuti	deposizione del seme (sito)	tempi penetrazione (sec.)
1	6	1	26	4	15	◆	4	9	
2	2	4	14	4	30		deceduta		
3	5	1	38	4	2	◆	4	11	
4	7	1	32	4	2	◆	deceduta		
5	4	3	24	4	50		deceduta		
6	6	1	28	4	2		deceduta		
7	8		32	4	10	◆	deceduta		
8	5		38	4	40		4	5 -	deceduta
9	5	2	39	4	10		4	5	
10	7		32	4	3		4	1	◆
11	7		31	4	3		4	2	◆
12	6		32	4	5	◆	4	12	◆
13	5	2	22	4	8	◆	4	8	◆
14	6		28	4	20	◆	deceduta		
15	7	1	43	4	5		4	3	◆
16	6		29	4	5	◆	deceduta		
17	6	1	26	4	15	◆	4	10	◆
18	6	1	27	4	30	◆	4	9	◆
19	6		30	4	7		4	2	◆
20	6		37	deceduta					
21	4	2	22	deceduta					
22	6	1	29	deceduta					

Deposizione del seme: 4 (utero)

Tabella 3 - Risultati pecore nelle quali è stato effettuato l'intervento di preparazione delle pliche (2 incisioni).

Pecora	Pliche sezionate	Pliche non sezionate	Tempi intervento (minuti)	Deposizione del seme (sito)	Tempi penetrazione (secondi)	Parto
1	5		25	4	11	◆
2	7		26	4	4	◆
3	7		27	4	7	◆
4	4	2	21	2		
5	5	1	24	4	14	◆
6	6	2	28	4	17	
7	7		26	4	9	
8	6		25	4	2	◆
9	4	3	19	4	3	◆
10	6	1	25	4	2	◆
11	8		30	4	5	◆

Deposizione del seme: 2 (tratto intermedio della cervice) 4 (utero)

Tabella 4 - Pecore inseminate con metodo “Guelph” modificato.

n° pecore	Terminale del puntale della pistolette (mm)	Deposizione del seme (sito)				Parti	Decessi
		1°C	2°C	3°C	U		
11	8	2	4	4	1	1	1
7	3,5		3	4		1	1
9	5			2	7	5	

Deposizione del seme: 1°C (primo terzo cervice); 2°C (parte intermedia); 3°C (ultimo terzo); U (utero)

Tabella 5 - Risultati recupero embrionale per via transcervicale.

Pecora n°	RECUPERO EMBRIONI			
	data	oociti	morule	zona pellucida
1	8-0-02		3 (compatte)	
2	8-0-02	2	1 (precompatte)	
3	16-02-02			1
4	17-03-02			
5	17-03-02			
6	26-04-02		1 (precompatte)	

BIBLIOGRAFIA - **1.** Sanna, S.R. et al., Environmental effects on fertility of Sarda ewes submitted to artificial insemination. *Proc. Sci. Assoc. Anim. Prod.*, Grado, Italia, 91-92, (1995). **2.** Branca, A. et al., F.A. intrauterine con seme fresco e congelato negli ovini: effetto del tipo di seme, dei tempi di intervento e del numero di spermatozoi/dose sulla fertilità. *Atti IX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C.*, Grado, Italia, (1996) **3.** Salamon, S., Maxwell, W.M., Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:77-111, (2000). **4.** Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Buckrell, B.C., A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33:993-1010, (1990). **5.** Buckrell, B.C. et al., Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, 42:601-11, (1994). **6.** Cappai, P., Sanna, R.S., Branca, A., Fraghi, A., Bomboi, G., Comparison of laparoscopic and transcervical insemination with frozen semen in Sarda dairy ewes, *J. Anim. Sci.*, 66:369-373, (1998). **7.** Falaschi, U., Rassu, P.G., Enne, G., Inseminazione strumentale nella pecora, *Summa*, 8:21-27, (1998). **8.** Rassu, P.G. et al., Comparison between two different transcervical insemination techniques in Sarda ewes. *Proc. 54th E.A.A.P. Annual Meeting*, Roma, Italia, 339. (2003). **9.** Pau, S., Zedda, M.T., Cancedda, M., Tecniche chirurgiche sulla cervice di pecora ai fini del cateterismo uterino. *La Clinica Veterinaria*, 3:145-147, (1988). **10.** Pau, S. et al., Direct intrauterine insemination using an innovative approach to overcome the laparoscopic technique in sheep. *Theriogenology*, 57:383, (2002). **11.** Pau, S. et al., Risultati preliminari di una nuova tecnica di inseminazione strumentale negli ovini. *Atti XV Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C.*, Cagliari, Italia, 226, (2002) **12.** Coonrod, S.A., Coren, B.R., McBride, B.L., Bowen, M.J., Kraemer, D.C., Successful non-surgical collection of ovine embryos. *Theriogenology*, 25:149, (1986). **13.** Barry, D.M., van Niekerk, C.H., Rust, J., Vanderwalt, T., Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with Prostaglandin E₂ and estradiol. *Theriogenology*, 33:190, (1990). **14.** Mylne, M.J., McKelvey, W.A., Fernie, K., Matthews, K., Use of a transcervical technique for embryo recovery in sheep. *Vet. Rec.*, 130:450-451, (1992). **15.** Wulster-Radcliffe, M.C., Costine, B.A., Lewis, G.S., Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J. Anim. Sci.*, 77:2587-93, (1999).

DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE PIÙ FREQUENTI PATOLOGIE INFETTIVE CHE CONDIZIONANO LE PERFORMANCES RIPRODUTTIVE DELL'OVINO IN SARDEGNA.

LABORATORY DIAGNOSIS FOR MOST COMMON INFECTIOUS DISEASES CONDITIONING REPRODUCTIVE PERFORMANCES IN SHEEP IN SARDINIA.

Masala G., *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna*

SUMMARY - High incidence of infectious abortions in Sardinia is due not only to the large number of animals, but also to very high animal density. The economic losses are estimated in about 10 million Euros per year. Unfortunately correct diagnosis is complicated by difficult availability of pathological material and bacterial and protozoon isolation. Furthermore, serological techniques used are not always specific and sensible and do not permit diagnosis confirmation immediately, but seroconversion is needed. All these limitations prolong time for diagnosis and negatively influence veterinarian intervention in herds. Epidemiological data obtained in last years by our laboratory about *Salmonella abortusovis*, *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus* put in evidence that in Sardinia most ovine abortions are caused by *Salmonella abortusovis* and *Toxoplasma gondii*.

RELAZIONE - Il patrimonio ovino e caprino della Sardegna è stimato in circa 4 milioni di capi che corrispondono ad 1/3 dell'effettivo nazionale. Gli aborti rappresentano uno dei principali problemi di natura sanitaria ed economica negli allevamenti ovini. Malgrado i numerosi studi sull'argomento è noto che oltre il 50% degli eventi abortigeni spesso non risulta diagnosticato. L'aborto costituisce spesso un epifenomeno di natura complessa al cui instaurarsi concorrono varie cause. Inoltre l'incidenza degli aborti infettivi in Sardegna è molto elevata, in relazione non solo all'alto numero di capi ma anche all'alta densità di animali per km². Il danno economico, dovuto alla perdita degli agnelli ed alla mancata lattazione, è molto rilevante e si aggira sui 10 milioni di euro/anno. Purtroppo, la diagnosi di tutti gli agenti infettivi che possono essere responsabili di aborto è alquanto complicata ed è legata ad una serie di cause indirette e dirette. La prima è strettamente connessa al reperimento del materiale patologico; non è facile, considerando le condizioni strutturali degli allevamenti della Sardegna (pascolo brado, scambio incontrollato degli animali), reperire immediatamente feti e placente per le analisi batteriologiche. La seconda causa è legata alle tecniche diagnostiche utilizzate per isolare batteri e protozoi: le tradizionali tecniche colturali, adottate in prima istanza, permettono la crescita di batteri poco esigenti dal punto di vista nutrizionale ma non favoriscono la crescita di batteri o protozoi particolarmente "difficili" che necessitano di lunghi tempi di crescita e di un substrato cellulare per l'isolamento. A questo va aggiunto che le tecniche sierologiche, utilizzate come ausilio diagnostico, non sempre risultano specifiche e sensibili e, benché consentano di rilevare il movimento anticorpale nei confronti di agenti abortigeni, non permettono di confermare immediatamente la diagnosi e quasi sempre è necessario ricorrere ad un secondo prelievo che consenta di valutare una eventuale sieroconversione. Tutte queste limitazioni allungano i tempi di refertazione degli esami di laboratorio e condizionano di fatto l'intervento del veterinario in azienda, costringendolo ad adottare misure non sempre mirate ed efficaci.

Il sistema diagnostico dovrebbe essere la risultante delle informazioni acquisite in azienda integrate con l'interpretazione dei risultati delle prove condotte in laboratorio. Allo scopo di migliorare, ai fini diagnostici, le informazioni utili da acquisire in allevamento è stata predisposta una scheda di rilevamento dati anamnestici che accompagni sempre, in focolai di aborto, il campione clinico. Purtroppo in tutti questi

anni la maggior parte delle schede pervenute sono risultate compilate in maniera incompleta. Il quadro epidemiologico che viene illustrato deriva dall'analisi dell'attività del nostro Istituto che in questi anni ha investito notevoli risorse per la messa a punto di tecniche biomolecolari per la diagnosi di: *Salmonella abortusovis*, *Toxoplasma gondii*, *Chlamydomphila abortus* e *Coxiella burnetii*. L'analisi biomolecolare, applicata ai prodotti di aborto, ha evidenziato che la *Salmonella abortusovis* non ha un ruolo esclusivo negli aborti ovini e caprini della Sardegna. Il dato significativo emerso è a carico del *Toxoplasma gondii*; infatti in molti organi analizzati (feti e placenti) è stato riscontrato prevalentemente questo agente abortigeno.

Negli anni 1999-2005 su un totale di 29886 emosieri analizzati per *Toxoplasma gondii* è stata evidenziata una sieroprevalenza media del 19,2% per le IgG con oscillazioni dal 11,7% al 44,5%, mentre per la positività per IgM oscillava dal 1,1% al 21,6% con una media del 5,4%. Questa positività sierologica potrebbe essere sottostimata poiché si sono esclusi i risultati dubbi delle analisi in immunofluorescenza che una eventuale sierconversione avrebbe potuto consentire di sommare in parte o del tutto alla risultante positiva. L'analisi biomolecolare degli organi fetali e delle placenti ha evidenziato la presenza di DNA di *T. gondii* in 358 organi fetali - muscolo, fegato, abomaso, milza e cervello - (9,7% degli organi esaminati) ed in 52 placenti (36% di quelle analizzate).

Durante gli anni 1999-2002 sono stati esaminati 7194 sieri ovini provenienti da 675 aziende per la ricerca di anticorpi anti-*Coxiella burnetii*, la metodica utilizzata è sempre stata l'immunofluorescenza indiretta. Sono risultati positivi il 9% dei sieri (652/7194) i quali provenivano da 255 aziende che rappresentavano il 38% di quelle analizzate. In PCR sono stati esaminati 372 feti e 50 placenti, il DNA di *C. burnetii* è stato riscontrato in 87 organi (muscolo, fegato, abomaso, milza e cervello), l'8% di quelli analizzati, che appartenevano a 40 feti (10% di quelli analizzati). Nelle placenti la *C. burnetii* è stata evidenziata nell'11% di quelle esaminate (9/83).

L'analisi per *Chlamydomphila abortus* compiuta negli anni 1999-2003 su 12506 emosieri ovini provenienti da 807 allevamenti ha evidenziato 1163 positivi che rappresentavano il 9,2% dei totali. Questa prima analisi è stata eseguita con una metodica ELISA che evidenziava la produzione di anticorpi anti-*Chlamydomphila spp.* compresi quindi anche i ceppi patogeni ma non abortigeni e quelli non patogeni. I sieri risultati positivi con questo esame di screening sono stati successivamente analizzati con una ELISA di controllo che discriminava gli anticorpi prodotti verso ceppi abortigeni. Dei 1163 positivi sono stati confermati solo 611 emosieri pari al 4,8% dei campioni analizzati. Su 1913 organi fetali (muscolo, fegato, abomaso, milza e cervello derivati da 439 feti) sono risultati positivi in PCR solo 22 organi pari al 1,1%, mentre di 137 placenti analizzate sono risultate positive 7 pari al 5,1%.

L'analisi biomolecolare negli anni 2003-2005 applicata ad un totale di 292 feti per la ricerca di *Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila abortus*, *Salmonella abortusovis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* ha evidenziato la presenza di questi microrganismi nel 41% (120/292), in 87 feti (29,7%) è stato riscontrato un singolo agente ma in 33 feti (11,3%) sono stati evidenziati agenti multipli. Il *T. gondii* è stato evidenziato in 53 feti (18,1%), la *Salmonella abortusovis* in 38 feti (13%), la *C. burnetii* in 32 feti (10,9%), *Chlamydomphila abortus* in 7 feti (2,4%) e *Neospora caninum* in 6 feti (2%).

Sempre negli stessi anni l'analisi di 76 placenti ha messo in evidenza agenti abortigeni in 28 placenti (36,8%) di cui in 19 (25%) un singolo agente mentre in 9 (11,8%) agenti multipli. Il microrganismo più frequentemente riscontrato nella placenta è stata la *Salmonella abortusovis* con valori del 14% (11/76), seguito dal *Toxoplasma gondii* con il 13,1% (10/76; *C. burnetii* e *C. abortus* sono state riscontrate rispettivamente nel 9,2% (7/76) e 6,5% (5/76), la *Neospora caninum* non è stata riscontrata in nessuna placenta.

In conclusione anche se le percentuali riscontrate riconducibili alla *Coxiella burnetii* e alla *Chlamydophila abortus* sono relativamente basse bisogna effettuare una accurata sorveglianza per poter prevenire un eventuale contagio all'uomo considerato che questi microrganismi sono agenti zoonosici. È doveroso sottolineare che le percentuali di positività sierologiche ottenute sono da interpretare con le dovute precauzioni in quanto potrebbero essere sovra o sottostimate. Ad esempio, nel caso della *Salmonella abortusovis*, la percentuale di positività può essere sovrastimata in virtù del fatto che in Sardegna da oltre 30 anni si vaccina nei confronti della Salmonella, è quindi molto importante nella interpretazione dei risultati di laboratorio conoscere se in allevamento sono stati utilizzati vaccini e soprattutto conoscere esattamente il periodo della vaccinazione per poter eventualmente attribuire la risposta anticorpale svelate con le metodiche sierologiche ad un trattamento vaccinale oppure ad un recente contatto con l'agente abortigeno. I dati ottenuti in questi anni della nostra attività e relativi agli agenti *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii* e *Chlamydophila abortus* hanno messo in evidenza che, in Sardegna, il primato degli aborti è conteso tra *Toxoplasma gondii* e *Salmonella abortusovis* che sino a qualche anno fa era ritenuto il microrganismo più importante nel determinare l'aborto nella nostra regione.

Quindi i veterinari aziendali una volta "chiusa la diagnosi" cioè identificato con certezza l'agente responsabile del focolaio di aborto dovranno affrontare almeno due ordini di problemi:

- 1) di ordine igienico-sanitario qualora il microrganismo in causa sia un agente zoonosico come *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii* e *Chlamydophila abortus*
- 2) di management aziendale perché non sempre esiste una terapia farmacologica diretta né un vaccino utilizzabile.

A questo si aggiunge che, le misure di profilassi indiretta (derattizzazione, controllo dei vettori passivi, allontanamento dei gatti) indispensabili per risolvere il problema della Toxoplasmosi ovina non risultano di facile applicazione nelle aziende sarde.

BIBLIOGRAFIA - **1)** Masala, G., Porcu, R., Daga, C., et al., Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest*, 19: 96-98, (2007). **2)** Masala, G., Porcu, R., Sanna, G., et al., Role of *Chlamydophila abortus* in ovine and caprine abortion in Sardinia, Italy. *Vet Res Commun*, 29: 117-123, (2005). **3)** Masala, G., Porcu, R., Sanna, G., et al., Occurrence, distribution and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy. *Vet Microbiol*, 99: 301-305, (2004). **4)** Masala, G., Porcu, R., Madau, L., et al., Survey of ovine and caprine toxoplasmosis by IFAT and PCR assays in Sardinia, Italy. *Vet Parasitol.*, 117: 15-21, (2003). **5)** Masala, G., Porcu, R., Rocchigiani, A.M., et al., Aborti ovini e caprini in Sardegna: analisi del biennio 1999-2001. *SUMMA*, (7): 19-23, (2002). **6)** Balzano, F., Masala, G., Schiaffino, A., et al., Studio della dinamica anticorpale in pecore di razza Sarda a seguito della vaccinazione contro *Salmonella abortus ovis*. *Large Animals Review*, 8, 4: 47-50, (2002).

**INDAGINI ECOGRAFICHE DEL TRATTO RIPRODUTTIVO DELL'OVINO:
METODOLOGIE E PROSPETTIVE APPLICATIVE**
ULTRASONOGRAPHIC EXAMINATION OF OVINE REPRODUCTIVE TRACT.
METHODS AND APPLICATION PERSPECTIVES

Ledda S., *Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari*

SUMMARY - The use of ultrasonographic examination to evaluate the ovarian activity and determine early gestational condition in sheep represent an important tool for the development of modern reproductive program. Actually several relative low cost devices are available and with their use it is possible to follow the synchronization and superovulation treatments (ovarian examination by trans-rectal probes) as well to evaluate early gestation stages (by trans-rectal, trans-vaginal and trans-abdominal ultrasonography). Developments of new ultrasonography examinations could improve the development of reproductive management programs in sheep livestock. The aim of this talk is to examine the currently use of these techniques in sheep breeding enterprise.

INTRODUZIONE - L'impiego delle tecniche ultrasonografiche per la valutazione della funzionalità ovarica e per la diagnosi di gravidanza nei piccoli ruminanti, in particolare nella specie ovina, ha assunto negli ultimi anni sempre maggiore rilevanza. Tali indagini permettono infatti di ottimizzare i programmi di riproduzione e selezione e, monitorando l'attività riproduttiva, intervenire in modo efficace per identificare e risolvere eventuali situazioni di ipofertilità. Mediante queste tecniche è infatti possibile identificare specifiche "défaillances" riproduttive tra le quali: mancata ripresa dell'attività ovarica¹; mortalità embrionale e mortalità fetale² nonché, in relazione all'attività riproduttiva stagionale di questa specie, poter verificare il reale potenziale riproduttivo in differenti condizioni ambientali e manageriali. Mediante ultrasonografia è attualmente possibile stimare la risposta ovarica dopo interventi di sincronizzazione³, l'efficacia dell'effetto maschio e la risposta ovarica dopo la somministrazione di molecole capaci di regolare in modo mirato la dinamica follicolare⁴.

Accurate indagini ecografiche della situazione ovarica possono rendere maggiormente efficienti i protocolli di stimolazione ovarica nei programmi MOET (Multiple Ovulation Embryo Transfer). Si è osservato come una prevalutazione della popolazione follicolare può di fatto ottimizzare i protocolli di superovulazione e destinare a queste procedure solo i soggetti potenzialmente più idonei⁵. Le indagini ultrasonografiche sembrano potere trovare utile impiego anche nella determinazione del numero e del sesso dei feti⁶ e permettere di valutare, mediante osservazioni morfologiche, le caratteristiche e la capacità funzionale del o dei corpi lutei⁷.

In ultimo la specie ovina è stata utilizzata come modello sperimentale per valutare a livello ovarico, mediante indagini ecografiche con mezzo di contrasto, i cambiamenti della funzionalità microcircolatoria durante le diverse fasi del ciclo⁸.

Ultrasonografia ovarica e uterina

La maggior parte delle indagini ecografiche nella specie ovina hanno riguardato il monitoraggio dell'attività ovarica e osservazioni a livello uterino per la diagnosi di gravidanza durante diverse fasi gestazionali

Più precisamente l'impiego dell'ecografia ha permesso di meglio definire:

In ambito ovario:

- a) Dinamica follicolare nei periodi di stagionalità riproduttiva e non;
- b) Effetto di sostanze capaci di stimolare positivamente o negativamente l'attività ovarica;

- c) Dinamica follicolare in genotipi differenti;
- d) Efficacia degli stimoli sociali e feromonal (effetto maschio e effetto femmina);
- e) Morfologia e funzionalità del corpo luteo.

In ambito e uterino:

- a) Numero ed età gestazionale dei feti;
- b) Caratteristiche placentari;
- c) Riassorbimento embrionale e morte fetale;
- d) Messaggio.

Indagini ecografiche ovariche - L'impiego di sonde trans-rettali a frequenza variabile (5-7,5 Mhz) hanno reso possibile, anche nella specie ovina, la valutazione della crescita follicolare e la formazione ed evoluzione delle strutture luteali in diversi momenti del ciclo riproduttivo. Queste indagini permettono con buona accuratezza di rilevare sia il numero sia le dimensioni dei follicoli e di monitorarne le diverse fasi evolutive in cicli naturali e in cicli indotti da trattamenti di sincronizzazione⁹. La capacità di identificare le strutture ovariche è ovviamente legata alle dimensioni e densità delle stesse. Si è osservato che il livello di accuratezza è particolarmente elevato per i corpi lutei e per i follicoli >3 mm mentre risulta inferiore per quelli di minori dimensioni. Le indagini ecografiche ovariche hanno permesso di individuare anche nella specie ovina la presenza di ondate follicolari correlabili a differenti livelli di FSH e di inibina. Tali dinamiche sono influenzate da aspetti nutrizionali e genetici (ovini ad alta fecondità e bassa fecondità¹⁰).

Studi ecografici ovarici sono stati effettuati anche in pecore sottoposte a trattamenti di superovulazione per programmi di embryo transfer. Si è infatti osservato come le caratteristiche delle ondate follicolari⁵, siano legate alla presenza di un follicolo dominante e di uno o più corpi lutei funzionanti¹¹. Di conseguenza la risposta superovulatoria e la qualità embrionale appaiono condizionate favorevolmente o negativamente dalla presenza di queste strutture al momento del trattamento di stimolazione ovarica.

Valutazioni ultrasonografiche della dinamica follicolare sono state effettuate dopo stimolazione con GH⁴, con FSH di derivazione porcina ed ovina^{11,12} con eCG³.

Sono stati inoltre effettuate osservazione sulla dinamica follicolare dopo trattamenti con antagonisti del GnRH.

Da un punto di vista pratico l'applicazione maggiormente rilevante e diffusa dell'ecografia nella specie ovina è il suo impiego per la diagnosi di gravidanza. Nel corso degli anni diverse metodiche sono state messe a punto con l'utilizzo di sonde trans-addominali¹³, sonde endovaginali¹⁴ e sonde trans-rettali². Il loro impiego si differenzia per la semplicità d'uso, qualità visiva, accuratezza, precocità temporale e costi. Infatti le indagini trans-addominali, risultano le più diffuse, per il minore costo dell'attrezzatura e per la semplicità di esecuzione. Non permettono di ottenere tuttavia una buona definizione delle singole componenti fetali e buoni livelli di sensibilità quando s'intende ottenere una diagnosi precoce¹⁵. Con l'impiego di sonde rettali ed endovaginali viceversa è possibile effettuare diagnosi di gravidanza più precocemente e rilevare con maggiore dettaglio delle strutture fetali pur richiedendo tuttavia tempi più lunghi di esecuzione e una maggiore organizzazione logistica.

Indagini ecografiche in ambito uterino - È intuibile come da un punto di vista pratico-applicativo la definizione di uno stato gravidico precoce rivesta un notevole importanza in quanto può permettere di quantizzare quanto l'incidenza della mortalità embrionale precoce e mortalità fetale possano incidere nella gestione economico riproduttiva della filiera ovina².

Il sistema che permette di ottenere una diagnosi precoce e senza dubbio l'ecografia trans-rettale. Con questo sistema il grado di attendibilità tra il 20-25 giorno di gestazione può arrivare al 92% circa. L'indagine viene effettuata con l'animale in decubito dorsale o più comodamente in stazione quadrupedale. Nel primo caso si ottiene una maggiore definizione grazie allo scivolamento delle corna uterine verso il retto e quindi verso la sorgente ultrasonica. Recentemente tuttavia ricercatori israeliani hanno osservato come definizioni simili si possono avere anche in animali in stazione dopo un preventivo digiuno ed effettuando un sollevamento della pelvi¹⁵. Nostre prove personali sulla pecora sarda sembrano indicare che livelli di accuratezza elevati si ottengano anche senza digiuno e manipolazione della pelvi. Verosimilmente le minori dimensioni dei soggetti di razza Sarda non rendono necessarie queste specifiche preparazioni.

L'impiego di sonde endovaginali con frequenze variabili (5-7,5 Mhz) ugualmente sembrano fornire risultati interessanti da un punto di vista applicativo. Risulta infatti possibile effettuare una diagnosi di gravidanza precoce con buoni livelli di sensibilità (24-27 giorni di gestazione). La diagnosi anche in questo caso può essere effettuata con l'animale in stazione che rende agevole e applicabile l'esecuzione sul campo di questa metodologia.

L'indagine ultrasonografica dell'utero, oltre che stabilire quanto più precocemente lo stato gravidico dei soggetti impiegati nello schema di selezione, può fornire utili informazioni anche sul numero di feti per singolo individuo e dare perciò valutazioni predittive sulla prolificità. Per questa indagine risulta maggiormente efficace effettuare un esame ecografico trans-addominale mentre una valutazione mediante sonde trans-rettali ed endovaginali, per le limitazioni anatomiche, risulta meno attendibile. Si è inoltre osservato come la sensibilità sia maggiore in un arco temporale tra i 45-77 giorni di gestazione e quando sono presenti uno o due feti. In presenza di un numero maggiore di feti la loro precisa quantificazione risulta meno agevole.

Recentemente è stato dimostrato come le indagini ecografiche possono essere effettuate anche per avere informazioni sul sesso dei feti. È stato dimostrato come mediante ecografia trans-rettale sia possibile determinare il sesso dei feti intorno al 50 giorno di gestazione valutando la posizione anatomica finale del tuberculo genitale⁶. Tali indagini tuttavia richiedono maggiore esperienza e comportano tempi di esecuzione non brevi che spesso non giustificano l'eventuale interesse applicativo di questa tecnica.

Infine le indagini ecografiche a livello ovarico nella pecora stanno offrendo valide informazioni di carattere biomedico. Studi recenti hanno mostrato, impiegando tecniche ecografiche con mezzi di contrasto, come si instaurino delle modificazioni funzionali del microcircolo a livello uterino e follicolare durante le diverse fasi della follicologenesi sotto l'azione delle gonadotropine ipofisarie. Le modificazioni sembra che in parte rispecchiano quanto avviene anche nella specie umana. Inoltre informazioni in tal senso potrebbero essere utilmente impiegate per monitorare l'efficacia di protocolli di superovulazione nei programmi di miglioramento genetico.

In conclusione i recenti progressi nelle indagini ecografiche nei piccoli ruminanti e la visibile diminuzione dei costi delle apparecchiature potranno favorire sempre più un estensivo impiego di queste tecniche nella filiera produttiva dell'allevamento ovino contribuendo al miglioramento della efficienza riproduttiva e della gestione aziendale.

BIBLIOGRAFIA - 1. Kaulfuss, K.H., Giucci, E., Suss, R., Wojtowki, J., An ultrasonographic method to study reproductive seasonality in ewes isolated from rams. *Reprod Domest Anim*, 5, 416-422, (2006). 2. Dixon, A.B., et al., Patterns of late embryonic and foetal mortality and association with several factors in sheep. *J Anim Sci*, 15, In stampa, (2007). 3. Barrett, D.M., et al., Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestagen-releasing intravaginal sponges in the breeding and non-breeding

seasons in ewes. *Theriogenology*, 61, 311-327, (2004). **4.** Gonzales Anover, P., et al., Effects of growth hormone and gonadotrophin releasing hormone antagonists on ovarian follicle growth in sheep. *J Vet Pharmacol*, 29, 373-377, (2006). **5.** Mossa, F, Duffy, P., Naitana, S., Lonergan, P., Evans, A.C., Association between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes. *Anim Reprod Sci*, 11, In stampa, (2006). **6.** Santos, M.H., et al., Sexing of Dorper sheep foetuses derived from natural mating and embryo transfer by ultrasonography. *Reprod Fertil Dev*, 19, 365-369, (2007). **7.** Davies, K.L., Bartlewski, P.M., Person, R.A., Rawling, N.C., Computer assisted image analyses of corpora lutea in relation to peripheral concentrations of progesterone: a comparison between breeds of sheep with different ovulation rates. *Anim Reprod Sci*, 12, 165-175, (2006). **8.** Marret, H., et al., Ovine model to evaluate ovarian vascularization by using contrast-enhanced sonography. *Comp Med* 2005, 55, 150-155, (2005). **9.** Vinales, C., Meikle, A., Forsberg, M., Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography in ewes. *Anim. Reprod Sci.*, 80, 69-79, (2004). **10.** Zieba, D.A., Murawski, M., Schwarz, T., Wierzchos, E., Pattern of follicular development in high fecundity Olkuska ewes during the oestrous cycle. *Reprod Biol*, 2, 30-58, (2002). **11.** Veiga Lopez, A., Gonzales Bulnes, A., Garcia Garcia, R.M., Dominguez, V., Cocero, M.J., The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology*, 63, 1973-1983, (2005). **12.** Berlinguer, F., et al., Effects of progestagens in follicular growth and oocyte development competence in FSH-treated ewes. *Domest Anim Endocrinol*, 32, 303-314, (2007). **13.** Taverne, M.A., Lavoit, M.C., van Oord, R., van der Weyden, G.C., Accuracy of pregnancy diagnosis and prediction of foetal numbers in sheep with linear-array real-time ultrasound scanning. *Vet Q.*, 7, 256-263, (1985). **14.** Aria, G., Zhang Shou, Vanozzi, I., Botta, R., Diagnosi ecografia di gravidanza per via trans-vaginale in bovini, ovini e suini: considerazioni tecnico applicative. *Atti III Convegno SIRA*, Roma, 84-87, (2005). **15.** Karen, A., Szabados, K., Reiczigel, J., Beckers, J.F., Szenci, O., Accuracy of transrectal ultrasonography for determination of pregnancy in sheep: effect of fasting and handling of the animals. *Theriogenology*, 61, 1291-1298, (2004).

**TECNOLOGIE RIPRODUTTIVE IN VITRO NEI PICCOLI RUMINANTI:
SVILUPPI RECENTI E PROSPETTIVE FUTURE**
IN VITRO REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES IN SMALL RUMINANTS:
RECENT DEVELOPMENTS AND POSSIBLE APPLICATIONS

Bogliolo L., *Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari.*

SUMMARY - Reproductive biotechnologies gained great importance in the scientific community worldwide causing a radical changing in animal breeding. Assisted reproductive technologies are of fundamental importance for improving reproductive efficiency and genetic characteristics in livestock breeding and represent a valid aid for endangered species safeguard and preservation. Possible applications of the most common reproductive biotechnologies in the ovine species will be examined, in particular: main in vitro embryo production techniques from adult and prepuberal oocytes, oocyte and embryo cryopreservation techniques, intracytoplasmic sperm injection and micromanipulation procedures, nuclear transfer.

INTRODUZIONE - Le biotecnologie riproduttive hanno guadagnato un ampio spazio nel panorama scientifico nazionale e internazionale e hanno determinato negli ultimi anni un radicale cambiamento dei sistemi riproduttivi degli animali. Le tecniche di riproduzione assistita si sono affermate prevalentemente nelle specie di interesse zootecnico, in relazione alla loro importanza economica, e tra queste la specie bovina è quella dove alcune di queste metodologie vengono ormai utilizzate con successo nella pratica operativa. Nella specie ovina, tali metodologie presentano ancora seri limiti di applicabilità. Anche in quelle zone dove la specie ovina ha un'importante impatto sull'economia, l'inseminazione artificiale rimane l'unica tecnologia riproduttiva largamente applicata. La ragione della mancata diffusione commerciale dei programmi di riproduzione assistita non risiede senz'altro nella scarsa efficienza di tali metodologie in questa specie, che è anzi sempre stata utilizzata come modello sperimentale, ma vanno ricercate negli elevati costi di attuazione in relazione al valore dell'animale.

Lo sviluppo di metodologie in vitro, che pur conservando un'elevata efficienza siano allo stesso tempo di basso costo e di semplice esecuzione, potrebbe costituire un strumento di fondamentale importanza dal punto di vista zootecnico per il miglioramento dell'efficienza riproduttiva degli animali e l'accelerazione della selezione genetica. Inoltre, nell'ambito di un generale interesse per conservazione della biodiversità animale, tali biotecnologie potrebbero trovare applicazione per il recupero e la salvaguardia di specie selvatiche in via di estinzione o a ridotta consistenza numerica.

PRODUZIONE IN VITRO DI EMBRIONI - Le tecniche di produzione *in vitro* di embrioni presentano potenzialità superiori a quelle *in vivo* in quanto scavalcano ostacoli di ordine tecnico e biologico che limitano l'efficienza del trattamento di superovulazione e del recupero embrionale e utilizzano le ovaie come fonte diretta del materiale germinale richiesto. Inoltre, con la maturazione e fertilizzazione in vitro dell'oocita si è potenzialmente in grado di produrre un'enorme numero di embrioni a costi irrilevanti.

La nascita, nel 1991, del primo agnello¹ dopo trasferimento di embrioni prodotti in vitro ha aperto le porte alla formulazione dei sistemi per la produzione in vitro di embrioni. Nel caso, poi, della specie ovina il miglioramento di queste tecniche è stato agevolato e stimolato dalla notevole disponibilità di gameti femminili che si possono reperire in sede di macellazione.

Un programma di produzione in vitro di embrioni include quattro tappe fondamentali:
-il recupero degli oociti dai follicoli ovarici; -la loro maturazione e fertilizzazione in vitro; - la coltura degli embrioni fino allo stadio di blastocisti.

Prelievo degli oociti - Il prelievo degli oociti dalle ovaie di soggetti destinati alla macellazione fornisce sicuramente una fonte economica e abbondante di oociti rispetto al prelievo in vivo. Tuttavia, tale metodologia è utilizzabile prevalentemente a scopo di ricerca ma non è proponibile per un'applicazione pratica nei programmi di miglioramento genetico. Il prelievo in vivo rappresenta una tecnica ripetibile nell'ambito degli stessi individui per periodi di applicazione prolungati e consente il recupero di una notevole quantità di oociti meioticamente competenti da un singolo donatore. La possibilità di operare prelievi di oociti da animali vivi fu prospettata per la prima volta da Snyder e Nellor (1975) che adottarono a tal fine la tecnica laparoscopica (OPU) che fu perfezionata successivamente in Nuova Zelanda da Tervit (1996) e in Argentina da Baldassarre (1996). Studi compiuti nel settore hanno evidenziato come numerose variabili possono influenzare l'efficienza di tale tecnica e la possibilità applicativa in campo risulta comunque ancora vincolata alla messa a punto di una tecnica OPU standardizzata. I trattamenti ormonali di stimolazione ovarica aumentano l'efficienza della tecnica sia dal punto di vista quantitativo, incrementando il numero di oociti recuperati (9-16 oociti/animale) rispetto al prelievo da animali non trattati (3-6 oociti/animale) sia qualitativamente garantendo il prelievo di oociti maggiormente competenti poiché derivanti da follicoli di maggiori dimensioni ovarica². I diversi protocolli di stimolazione ovarica, l'intervallo tra la stimolazione e l'aspirazione dell'oocita, il flusso di aspirazione e il diametro dell'ago sono tutti fattori che possono incidere notevolmente sull'efficienza dell'OPU³.

Maturazione in vitro - Fisiologicamente questa fase si compie all'interno del follicolo in un ambiente che subisce profonde modificazioni nell'arco di poco tempo ed è pertanto un ambiente difficile da riprodurre in vitro. La maturazione meiotica avviene spontaneamente dopo la rimozione dell'oocita dal follicolo, ma l'aggiunta delle gonadotropine ipofisarie FSH, LH in vitro aumenta notevolmente la capacità degli oociti di raggiungere la metafase seconda pur non condizionando la capacità di sviluppo embrionale. Criteri di selezione basati sulla morfologia delle cellule della granulosa che circondano l'oocita, le dimensioni dello stesso, le caratteristiche del citoplasma, lo stadio del ciclo al momento del prelievo degli oociti sono tutti parametri che contribuiscono alla selezione della componente di oociti più idonea alla maturazione in vitro dopo il loro prelievo dalle ovaie. La maturazione in vitro dell'oocita nella pecora prevede l'incubazione per 24 ore a 38,5°C; il sistema colturale comunemente utilizzato è costituito dal terreno TCM 199 addizionati con siero fetale bovino o sieri di pecora in estro, gonadotropine ipofisarie (FSH, LH) e 17 β -estradiolo. Recenti esperienze hanno evidenziato come l'introduzione di fattori di crescita (EGF, IGF, FGF, TGF), sostanze ad azione antiossidante (cistamina, cisteina, b-mercaptoetanolo) che determinano un'incremento dei livelli di glutazione intracellulari, o sistemi co-culturali permette di migliorare la qualità dell'oocita maturato in vitro⁴. Tuttavia, le condizioni di maturazione in vitro sono ancora ben lontane dall'essere ottimali. Infatti, accanto a percentuali di maturazione nucleare elevate (circa 90%) i sistemi in vitro non garantiscono un'adeguata maturazione citoplasmatica dell'oocita. Tale carenza si ripercuote profondamente sul successivo sviluppo embrionale. Analisi comparative effettuate a livello molecolare sui pattern proteici, mRNA e l'attività di importanti proteine regolatrici tra gli oociti maturati in vitro e in vivo hanno spesso sottolineato la minore qualità dell'oocita maturato in vitro.

Fertilizzazione in vitro - Questa fase si articola nella capacitazione degli spermatozoi e nella successiva coincubazione dei gameti. Nel 1985, Cheng ha riportato percentuali elevate di fertilizzazione in vitro di oociti di pecora maturati in vitro utilizzando un

sistema di incubazione del materiale del materiale seminale con siero di pecora in estro. Tale sistema rimane ancora attualmente il sistema più efficiente per la capacitazione del materiale seminale ovino⁵. Un miglioramento dello stato di capacitazione degli spermatozoi è stato ottenuto introducendo nel sistema di fertilizzazione l'eparina e sostanze quali l'ipotaurina e la caffeina che stimolano la motilità degli spermatozoi. Anche la riproduzione in vitro dell'ambiente tubarico, ottenuta per esempio con monostrati di cellule dell'ovidotto, sfruttando le interazioni tra gli spermatozoi e le cellule tubariche, pare rappresentare una possibile alternativa per la capacitazione del materiale seminale e il prolungamento della sua vitalità in vitro.

La separazione delle frazioni più mobili e vitali di spermatozoi mediante centrifugazione su Percoll o la tecnica del Swim-up consente di ridurre la concentrazione di spermatozoi utilizzati nei programmi di fecondazione in vitro e quindi l'incidenza della polispermia.

Nel nostro laboratorio comunemente utilizziamo per la fertilizzazione in vitro con seme congelato il Synthetic Oviductal Fluid (SOF), supplementato con 2% siero di pecora in estro, eparina (10 µg/ml) ed ipotaurina (5µg/ml) ottenendo percentuali di fertilizzazione dell'80-90%. Un periodo di incubazione di circa 16-20 ore a 38.5 °C, 5% CO₂, 5% O₂ in atmosfera umidificata permette di ottenere percentuali di fertilizzazioni pari al 80-90%.

ICSI - Una tecnica alternativa di fertilizzazione in vitro è la microiniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) che consiste nella deposizione di un singolo spermatozoo nel citoplasma dell'oocita mediante l'ausilio di un micromanipolatore. A tutt'oggi, mediante la ICSI, nell'uomo, è stato possibile ottenere percentuali di gravidanza paragonabili a quelle ottenibili con la fertilizzazione in vitro. Nelle specie animali, invece, tale tecnica, non ha subito lo stesso impulso registrato nell'uomo e non ha ancora raggiunto un grado di efficienza soddisfacente. Lo scarso interesse risulta giustificato dalla notevole disponibilità di idoneo materiale seminale rispetto all'uomo e dagli elevati risultati di fertilità raggiunti impiegando le comuni metodiche di fertilizzazione in vitro. Nella specie ovina, nonostante la nascita di un agnello dopo trasferimento di embrioni ottenuti mediante microiniezione della spermatozoo⁶ e ricerche sulla ICSI sono scarse e riportano percentuali esigue di fertilizzazione e sviluppo embrionale. Tali problemi potrebbero essere ascrivibili a numerosi fattori e tra questi la difettosa attivazione dell'oocita e decondensazione dello spermatozoo. L'attivazione dell'oocita, che si esplica con il completamento della meiosi e la formazione del pronucleo femminile, è provocata da oscillazioni multiple del calcio intracellulare libero (Ca²⁺) ed in vitro può essere indotta con l'ausilio di agenti attivanti quali il Ca ionoforo, la ionomicina, l'etanolo e il pulse elettrico che provocano un incremento transitorio del livello del calcio intracellulare. Anche il trattamento del materiale seminale prima della microiniezione può facilitare la decondensazione della cromatina della cellula germinale maschile e la formazione del pronucleo. Le tecniche sperimentate hanno previsto l'impiego di differenti metodiche quali la rimozione dell'acrosoma e della coda dello spermatozoo mediante sonicazione, la immobilizzazione dello spermatozoo con la pipette da microiniezione, il congelamento-scongelo del materiale seminale prima della ICSI, l'incubazione del seme con dithiothreitol (DTT) o Triton X-100 determinando un significativo incremento delle percentuali di formazione del pronucleo maschile. Recenti esperienze compiute nel nostro laboratorio hanno dimostrato come l'attivazione dell'oocita con ionomicina e un inibitore delle protein chinasi (6-DMAP) permette di incrementare le percentuali di divisione e di sviluppo embrionale dopo microiniezione di spermatozoi crioconservati di pecora ottenendo dopo coltura in vitro il 29.5% di sviluppo a blastocisti. L'applicazione di tale tecnica potrebbe costituire un'importante strumento da utilizzare nella specie ovina per la produzione in vitro di embrioni in alternativa alla

fertilizzazione in vitro convenzionale nei casi di scarsa disponibilità di materiale seminale, come nelle specie selvatiche o in via di estinzione, o per la fecondazione con seme presettato.

Coltura in vitro - Una delle problematiche più rilevanti della coltura in vitro ha riguardato la fase di “blocco” che si manifesta durante lo sviluppo embrionale e nell’ovino si verifica allo stadio di 8-16 cellule in concomitanza con l’attivazione del genoma dell’embrione. Il superamento di questa delicata fase è stato attuato grazie all’impiego di sistemi co-culturali con cellule somatiche di varia origine e la coltura con cellule oviduttali ha offerto le maggiori garanzie per un buon sviluppo embrionale. Tuttavia, l’impiego di tali sistemi alquanto complessi e poco adatti per la conoscenza dei bisogni metabolici dell’embrione attualmente è stato in parte abbandonata a favore di sistemi più semplici a composizione definita. In tal senso Tervit et al. (1972), hanno messo a punto un medium di semplice composizione (SOF) che rispecchia la costituzione del liquido oviduttale ovino. Tale terreno addizionati con aminoacidi essenziali e non essenziali e albumina sierica bovina viene normalmente impiegato per la coltura degli embrioni di pecora sostenendo una produzione di blastocisti del 40-70% dopo 7 giorni di coltura a 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ in atmosfera umidificata. Nonostante la formulazione di sistemi colturali più appropriati il sistema di coltura in vitro necessita di ulteriori perfezionamenti per migliorare la qualità delle blastocisti prodotte in vitro. Studi comparativi tra embrioni prodotti in vivo e in vitro hanno infatti mostrato come la coltura in vitro determina un’alterazione nel rapporto tra cellule embrionali e trofoblastiche, una minore compattazione dei blastomeri allo stadio di morula, un ritardo nella formazione della cavità blastocelica ed un aumento del contenuto lipidico delle cellule dell’embrione. Queste anomalie sono ascrivibili ad alterazioni dei meccanismi di regolazione dell’espressione genica dell’embrione con conseguenti modificazioni del normale sviluppo dell’embrione e del feto. La presenza di derivati ematici come il siero o albumina sierica bovina potrebbe contribuire al determinismo di tale fenomeno. Tali evidenze, associate alle modificazioni che si osservano dopo trasferimento degli embrioni prodotti in vitro come l’allungamento del periodo gestazionale, un incremento del peso alla nascita (Large Offspring Syndrome), una più alta mortalità pre e post natale, alterazioni a carico della placenta sollevano ancora serie perplessità sulla possibilità di trasferire in campo pratico i risultati della tecnologia della produzione in vitro di embrioni⁷. Attualmente le ricerche si stanno indirizzando nello studio di più sistemi colturali che prevedono la sostituzione dei derivati ematici con macromolecole e che rispondano in maniera più precisa alle esigenze metaboliche dell’embrione nel corso del suo sviluppo embrionale.

Produzione in vitro di embrioni da soggetti prepuberi - La possibilità di produrre in vitro embrioni da oociti prelevati da ovaie di soggetti prepuberi. è di grande rilevanza per il maggior numero di oociti recuperabili e per il vantaggio di poter accorciare l’intervallo generazionale. Risultati ottenuti nel nostro laboratorio e le ricerche di altri Autori hanno evidenziato che seppur l’oocita degli animali prepuberi raggiunga percentuali di maturazione nucleare paragonabili all’adulto lo sviluppo embrionale è molto più esiguo⁸. Tale deficit è relazionabile alla difettosa capacità maturativi del citoplasma dell’oocita come evidenziato dalla presenza di anomalie a carico delle componenti citoscheletriche, sintesi proteica e fattori di regolazione.

CRIOCONSERVAZIONE DEL GERMOPLASMA ANIMALE

Crioconservazione degli embrioni - La conservazione del germoplasma animale riveste un ruolo strategicamente importante nell’ambito delle biotecnologie riproduttive. I vantaggi acquisibili in campo veterinario mediante la crioconservazione sono innumerevoli. In primo luogo la costituzione di una banca di embrioni con sesso predeterminato, tratti genetici noti e paternità accertata di soggetti appartenenti a

particolari linee genetiche o specie in via di estinzione, allargamento della valutazione genetica in programmi di selezione e l'interscambio di materiale genetico. Inoltre, la disponibilità di materiale seminale ed embrionale crioconservato permette il loro impiego nei programmi di inseminazione artificiale ed embryo-transfer ad un costo irrilevante migliorando, tra l'altro, le condizioni di benessere animale, eliminando lo stress indotto dal loro spostamento e prevenendo la possibilità di propagazione delle malattie infettive ed infestive. Il congelamento del materiale seminale è attualmente una tecnica affermata efficacemente mentre la crioconservazione degli embrioni resta al momento una tecnica ancora poco standardizzata applicata solo in zone ad alta vocazione zootecnica ed in tutti i casi eseguita prevalentemente nella specie bovina.

Recentemente è stata proposta un'innovativa metodologia di crioconservazione, la vitrificazione, che sfrutta la capacità di elevate concentrazioni di crioprotettori di formare una sorta di trama vetrosa attorno all'embrione durante il passaggio dallo stato liquido a quello solido evitando la formazione di cristallo di ghiaccio. Questa metodologia, poco costosa e di rapida esecuzione, è stata introdotta recentemente quale tecnica per la crioconservazione degli embrioni. Nella specie ovina numerosi sono stati i progressi nella messa a punto di protocolli di vitrificazione efficaci. Da tali studi è emerso come l'efficienza di tale tecnica dipende da numerosi fattori. Un primo aspetto riguarda lo stadio di sviluppo dell'embrione. È stato riscontrato che gli embrioni ad uno stadio di sviluppo avanzato manifestano minore sensibilità agli insulti derivanti dall'esposizione ai crioprotettori ed alle basse temperature rispetto a quelli ad uno stadio più precoce. La blastocisti espansa rappresenta lo stadio più adatto per la vitrificazione degli embrioni la sopravvivenza in vitro di questo stadio di sviluppo si aggira intorno al 90% rispetto al 30% della morula precompatta e al 58% della giovane blastocisti. Anche la derivazione degli embrioni assume un ruolo determinante. Gli embrioni derivati dalla tecnologia in vitro mostrano una sensibilità alle basse temperature più elevata rispetto a quelli ottenuti dagli animali sottoposti al trattamento di superovulazione manifestando una minore riespansione della cavità blastocelica, maggiore mortalità cellulare e minore attività di sintesi proteica dopo vitrificazione rispetto agli embrioni prodotti in vivo⁹. Tali alterazioni si riflettono su una diminuzione delle percentuali di sopravvivenza dopo trasferimento su riceventi.

La scelta del crioprotettore costruisca una fase importante nelle procedure di vitrificazione e al momento il glicole etilenico è quello utilizzato preferenzialmente in virtù proprio delle caratteristiche di alta permeabilità e di bassa tossicità.

L'elevato grado di accuratezza raggiunto può rendere nella specie ovina la costituzione di banche di embrioni a sesso determinato un obiettivo a portata di mano. Naturalmente numerosi sforzi devono essere ancora compiuti per l'applicabilità di questi risultati sul campo.

Crioconservazione dell'oocita - Per quanto riguarda il gamete femminile molte sono ancora le problematiche legate alla sua crioconservazione. La possibilità di conservare l'oocita rappresenta un traguardo importante per lo la formazione di banche di gameti di femmine di elevato pregio genetico o in via di estinzione o che presentano potenzialità miglioratrici. Tuttavia, malgrado le numerose ricerche compiute in differenti specie animali, la sopravvivenza degli oociti dopo crioconservazione è molto bassa.

Le esperienze riportate in letteratura evidenziano come l'oocita risulta particolarmente sensibile alla crioconservazione. Tali difficoltà sono ascrivibili all'alto rapporto superficie-volume della cellula germinale femminile, alla presenza di un'alta concentrazione di lipidi nel citoplasma e alla particolare sensibilità delle strutture citoscheletriche al raffreddamento. Inoltre, è stato ampiamente evidenziata, che lo stadio meiotico dell'oocita influenza profondamente la sopravvivenza del gamete dopo il ripristino della temperatura. La maggior parte delle ricerche sono state indirizzate alla crioconservazione dell'oocita maturo riportando, però, come tale processo induca

disorganizzazione del fuso meiotico con conseguente anomala distribuzione dei cromosomi, alterata distribuzione dei microfilamenti e dei granuli corticali. Poiché l'oocita immaturo (GV) non presenta ancora un fuso meiotico organizzato, la crioconservazione a tale stadio potrebbe costituire una possibile alternativa.

Differenti strategie sono state sperimentate al fine di meglio preservare l'oocita dagli insulti della crioconservazione quali la riduzione dei volumi di vitrificazione (e.g. OPS, Cryloop, Cryotop, Microgrids), l'aumento del gradiente termico (Super cooled system–VitMaster); l'utilizzo di inibitori delle strutture citoscheletriche (citocalasina, taxolo), la rimozione della componente lipidica dell'oocita. Tuttavia anche nelle condizioni più favorevoli i risultati non sono ancora soddisfacenti. Nella specie ovina le prove sperimentali di crioconservazione dell'oocita sono al momento molto esigue e riportano una drastica riduzione dello sviluppo embrionale in vitro dopo vitrificazione sia di oociti immaturi che maturati in vitro¹⁰. Il numero limitato di sperimentazioni e i risultati molto variabili richiedono sicuramente ulteriori studi mirati alla formulazione di un sistema idoneo per la crioconservazione dell'oocita di ovino.

CLONAZIONE - La possibilità di generare individui biologicamente identici, ha sempre attratto l'interesse dei ricercatori e già nel 1936, Hans Spemann pose con i suoi esperimenti, le basi della clonazione.

La clonazione embrionale mediante separazione di blastomeri, splitting embrionale o trasferimento di cellule dell'embrione a primi stadi di sviluppo in citoplasmi riceventi è una tecnica utilizzata da tempo in numerose specie animali. Tuttavia il limitato numero di cloni ottenibili non ne hanno permesso un'ampia diffusione. La nascita di Dolly, la prima pecora clonata, nel 1996 ha introdotto un nuovo metodo di clonazione: la clonazione mediante trasferimento nucleare di cellule somatiche adulte. Tale tecnica consiste nell'introduzione in micromanipolazione del nucleo di una cellula somatica sincronizzata allo stadio G₀/G₁ del ciclo cellulare nel citoplasma di un oocita maturo previamente enucleato con la formazione di un embrione "ricostruito". Dalla nascita di Dolly a tutt'oggi le prove di trasferimento nucleare hanno portato alla clonazione di animali di numerose specie animali¹¹. Inoltre la notizia degli ultimi anni della nascita del muflone clonato, dopo trasferimento di cellule della granulosa prelevate post-mortem in un citoplasma di pecora avvalorava la possibilità di impiego di tale tecnologia per la salvaguardia delle specie selvatiche oltre la diffusione di un numero infinito di animali di importante valore genetico¹². Tuttavia tale tecnica offre ancora numerose limitazioni. Il numero di embrioni ottenibile in vitro è molto limitato a causa in parte dei danni meccanici indotti dalle procedure di micromanipolazione, ai non idonei sistemi di attivazione dell'embrione ricostruito dopo il trasferimento del nucleo e ai sistemi di coltura in vitro. Anche il tipo di cellula utilizzata per il trasferimento nucleare e la qualità del citoplasma ricevente (oocita maturato in vivo o in vitro) sono fattori che influiscono profondamente sull'efficienza della tecnica. Generalmente le percentuali di embrioni ricostruiti che dopo embryo transfer originano la nascita di soggetti vitali è molto bassa. Infatti si registrano perdite prenatali sia nel primo periodo della gravidanza che nella fase finale dovuto prevalentemente ad alterazioni ed anomalie della placenta; molto frequente è anche la mortalità postnatale spesso associata a gravidanze più lunghe e distociche. I feti sono generalmente affetti da LOS con alterazioni a livello di numerosi organi. Tutte queste alterazioni sembrano prevalentemente attribuibili a difetti durante la riprogrammazione genetica dopo il trasferimento nucleare¹³.

L'impiego delle cellule staminali ha apportato importanti risvolti nel campo della clonazione. Tali cellule con caratteristiche di totipotenza possono essere prelevate dall'organismo adulto o alternativamente dal nodo embrionario di embrioni allo stadio di blastocisti e utilizzate per le tecniche di trapianto nucleare le cellule staminali, proprio per il loro carattere di totipotenza si prestano meglio alla riprogrammazione

genica e soprattutto alla transgenesi. Tuttavia, le limitazioni dovute alla difficoltà di coltura in vitro in uno stadio indifferenziato limitano ancora notevolmente la loro possibilità di impiego nelle specie animali. Anche le cellule germinali primordiali (PGC) sono cellule potenzialmente utilizzabili per la clonazione. Tali cellule possono essere isolate da embrioni di circa 30 giorni (nell'ovino), sono localizzate a livello della cresta genitale. La coltura in opportuni sistemi colturali determina la proliferazione in vitro di tali cellule in modo da riacquistare le caratteristiche di pluripotenza. Al momento attuale quindi siamo consapevoli di avere a disposizione uno strumento dalle enormi potenzialità ma bisogna sicuramente effettuare ulteriori studi soprattutto focalizzati alla comprensione dei meccanismi di riprogrammazione nucleare per rendere attuabile l'attuazione di tale tecnica.

BIBLIOGRAFIA - **1.** Pugh et al. Developmental ability of in vitro matured sheep oocytes collected during the nonbreeding season and fertilized in vitro with frozen ram semen. *Theriogenology*, 36, 771-778, (1991). **2.** Locatelli, Y., et al., FSH treatment before laparoscopic ovum pick-up in sheep and in goat influences quantity and quality of recovered oocytes. *Reprod. Fert. Dev.*, 16, (2004). **3.** Cogniè, et al. State of art production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 16, 437-445, (2004). **4.** Guler A., et al., Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Theriogenology*, 54, 209-218, (2000). **5.** Crozet, et al., In vitro fertilization with normal development in sheep, *Gemete Res.*, 16, 159-170, (1987). **6.** Catt, S.L., et al., Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet. Rec.*, 16, 494-495, (1996). **7.** Walker et al., The production of unusually large offspring following embryo transfer manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*, 45, 111-120, (1996). **8.** Ledda et al., Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 109, 73-79, (1997). **9.** Naitana et al., Development potential of in vivo and in vitro produced ovine embryos after vitrification. Proceeding of First Integrated European Conference on "Progress in Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle And Sheep Breeding, 244-245, (1994). **10.** Ledda et al., Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. *Reproduction Fertility and Development*, 19, 13-23, (2007). **11.** Loi et al. Amphibian and mammalian somatic-cell cloning: different species, common results? *Trends in Biotechnology*, 21, 471-473, (2003). **12.** Loi et al., Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature*, 19, 962-964, (2001). **13.** Gurdon et al., The future of cloning. *Nature*, 402, 743-746, (1999).