

# INDICE

## RELAZIONI

**BASIC ABDOMINAL CANINE ULTRASOUND** *Tomas Baker, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis* Pag. 1

**PEDIATRIC ABDOMINAL ULTRASOUND IN DOG: DIFFERENTIATING CONGENITAL DISORDERS** *Tomas Baker & Autumn Davidson, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis* 4

**THE MEDICAL AND SURGICAL MANAGEMENT OF LABOUR AND DELIVERY IN THE BITCH** *Autumn Davidson DVM, MS, Dipl ACVIM,* 8

## Riproduzione nei ruminanti

**NEUTROFILI E LORO FUNZIONE NELLE PATOLOGIE RIPRODUTTIVE: METODICHE E DATI PRELIMINARI** (NEUTROPHILES AND THEIR FUNCTION IN THE REPRODUCTIVE PATOLOGIES: METHODS AND PRELIMINARY DATA IN BOVINE) *Ricci A., Galvao K.N., Brittin S.B., Fajblat M., Vincenti L., Gilbert R.* 15

**EFFETTI IN VITRO DELL'hCG SULLA CONTRATTILITÀ DEL FOLLICOLO OVARICO NELLA SPECIE BOVINA** (IN VITRO EFFECTS OF hCG ON BOVINE OVARIAN FOLLICULAR CONTRACTILITY) *Cosola C., Rizzo A., Minoia G., Spedicato M., Trisolini C., Mutinati M., Roscino M.T., Punzi S., Pantaleo M., Sciorsci R.L.* 19

**CALCEMIA, FOSFATEMIA E MAGNESEMIA DURANTE LA FASE DI TRANSIZIONE DELLA BOVINA DA LATTE AD ALTA PRODUZIONE. IMPLICAZIONI SULL'ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA** (PATTERNS OF CALCIUM, PHOSPHORUS AND MAGNESIUM PLASMA CONCENTRATIONS IN HIGH PRODUCTIVE DAIRY COWS DURING TRANSITION. IMPLICATIONS ON REPRODUCTIVE ACTIVITY) *Esposito L., Macchia G., Toce V., Di Trana A., Boni R.* 23

**APPLICAZIONE DELLA SINCRONIZZAZIONE DEI CICLI NELLA BOVINA DA LATTE: ESPERIENZA IN UN ALLEVAMENTO PROBLEMA DELLA PROVINCIA DI TORINO** (CYCLE SYNCHRONIZATION PROTOCOLS IN MILKING COWS: PRACTICAL EXPERIENCE IN PROBLEM COWS) *Casalone M., Donalisio C., Ruta F., Vincenti L.* 28

**UTILIZZO DI DILUITORI COMMERCIALI PER SEME REFRIGERATO IN PROGRAMMI DI SINCRONIZZAZIONE DELL'OVULAZIONE E INSEMINAZIONE ARTIFICIALE A TEMPO FISSO IN MANZE INCROCIO IN ARGENTINA** (USE OF TWO DIFFERENT EXTENDERS FOR CHILLED SEMEN IN FIXED TIME A.I. PROGRAMS IN CROSS BREED BEEF HEIFERS IN ARGENTINA) *Avilés M., Cuestas G., Brandán A., Piccardi M., Quiñones G., Boretti L., Tríbulo H., Vincenti L.* 32

**RELAZIONE TRA LA QUALITÀ SEMINALE E LA PERCENTUALE DI GRAVIDANZA: ESPERIENZA DI LAVORO IN CAMPO** (ANALYSIS OF SPERM QUALITY AND PREGNANCY RATE: EXPERIENCE OF WORK IN THE FIELD) *Quiñones G., Avilés M., Cuestas G., Brandán A., Piccardi M., Boretti L., Tríbulo H., Vincenti L.* 36

**TRATTAMENTI DI SUPEROVULAZIONE E INDUZIONE DELL'OVULAZIONE PER L'INSEMINAZIONE ARTIFICIALE A TEMPO FISSO NELLE BOVINE PIEMONTESE. RISULTATI PRELIMINARI** (SUPEROVULATORY TREATMENT AND INDUCTION OF OVULATION FOR FIXED-TIME ARTIFICIAL INSEMINATION IN PIEMONTESE CATTLE. PRELIMINARY RESULTS) *Mogentale S.M., Quiñones G.A., Dominici A., Vincenti L.* 40

<b>AUSILIO DI SISTEMI COMPUTERIZZATI PER LA CRIOCONSERVAZIONE E LA VALUTAZIONE PRE E POST CONGELAMENTO DI MATERIALE SEMINALE DI BOVINI AUTOCTONI IN CONTESTO TROPICALE</b> (USING COMPUTERIZED SYSTEMS FOR CRYOPRESERVATION AND EVALUATION PRE- AND POST-FREEZING OF INDIGENOUS BULL SEMEN IN A TROPICAL CONTEXT) <i>Semita C., Nervo T., Issa M., Calavita A., Chanono M.</i>	44
<b>MONITORAGGIO DELLE RELAZIONI ESISTENTI TRA CONTA CELLULARE DEL LATTE E INDICI RIPRODUTTIVI DI BUFALAE ALLEVATE IN NORD-ITALIA</b> (RELATIONSHIP BETWEEN MILK CELLS COUNT AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN DAIRY BUFFALOES RAISED IN NORTHERN ITALY) <i>Stelletta C., Guizzo L., Sabino D., Giancesella M., Romagnoli S.</i>	48
<b>COMPLICAZIONE LETALE DELLA MACERAZIONE FETALE IN UNA PECORA</b> (LETHAL COMPLICATIONS OF FETAL MACERATION IN A EWE) <i>Barna A., Marino G., Quartuccio M., Lanteri G., Mazzullo G.</i>	52
<b>VALUTAZIONE DI DUE MESTRUI DILUITORI NELLA CONSERVAZIONE A 15° C DEL SEME DI ARIETE</b> (EVALUATION OF TWO EXTENDERS IN RAM SEMEN STORAGE AT 15° C) <i>Mara L., Gallus M., Rosati I., Bogliolo L., Zedda M.T.</i>	56
<b>LESIONI UTERINE AD EZIOLOGIA BRUCELLARE IN OVINI E CAPRINI SICILIANI</b> (BRUCELLAR UTERINE LESIONS IN SICILIAN EWES AND DOES) <i>Tucci A., Dauccia M., Di Marco V., Reale S., Marino G., Mannarino C., Zanghì A.</i>	60
<b>VARIAZIONI DELLA FUNZIONALITÀ TESTICOLARE NEI BECCHI IN SEGUITO A SOMMINISTRAZIONE PROTRATTA DI BUSERELIN</b> (TESTICULAR FUNCTIONALITY IN MALE GOATS AFTER PROLONGED ADMINISTRATION OF BUSERELIN) <i>Binetti F., Aiudi G., De Sandro Salvati A., Matarrese R., Caira M., Lacalandra G.M.</i>	64
 <b>Riproduzione nella specie equina</b>	
<b>ASPETTI MORFOLOGICI ED ISTOCIMICI DELL'EPITELIO DI RIVESTIMENTO DELL'OVIDUTTO DI CAVALLA</b> (ULTRASTRUCTURAL FEATURES AND HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF GLYCOCONJUGATES IN MARE OVIDUCT) <i>Desantis S., Ventriglia G., Zizza S., Rossi R., Di Summa A., Losurdo M., De Metrio G.</i>	68
<b>ATTIVITÀ STEROIDOGENETICA E SENSIBILITÀ ALLE PGF<sub>2α</sub> DEL CORPO LUTEO NELLA CAVALLA</b> (CORPUS LUTEUM STEROIDOGENIC ACTIVITY AND SENSITIVITY TO PGF <sub>2α</sub> IN THE MARE) <i>Panzani S., Faustini M., Tosi U., Quartuccio M., Galeati G., Cairoli F.</i>	72
<b>PROFILASSI DEL RIASSORBIMENTO EMBRIONALE E DELL'ABORTO DI TIPO ORMONALE NELLA CAVALLA TRAMITE SOMMINISTRAZIONE DI UNA ASSOCIAZIONE DI P<sub>4</sub>, hCG E VIT. E</b> (EMBRYONIC LOSS AND HORMONAL ABORTION PROPHYLAXIS IN THE MARE BY MEANS OF AN ASSOCIATION OF PROGESTERONE (P <sub>4</sub> ), hCG AND VITAMIN E) <i>Parmigiani E., Bigliardi E., Morini G., Bresciani C., Di Ianni F., Vecchi I., Ferrari L., Di Ciommo F., Magnani E.</i>	76
<b>MONITORAGGIO ECOGRAFICO DELLA GRAVIDANZA DELL'ASINA DAL 10° AL 150° GIORNO</b> (ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION OF DONKEY PREGNANCY FROM DAY 10 TO DAY 150) <i>Crisci A., Panzani D., Rota A., Camillo F.</i>	79
<b>L'ENDOMETRITE POST COITALE DELLA CAVALLA: CORRELAZIONE TRA CITOLOGIA UTERINA E RISULTATO INSEMINATIVO</b> (POST BREEDING ENDOMETRITIS IN THE MARE: CORRELATION BETWEEN UTERINE CYTOLOGY AND FERTILITY RATE) <i>Nervo T., Semita C., Gay P.</i>	83
<b>CONGELABILITÀ E FERTILITÀ DEL SEME DI STALLONI DI RAZZA MURGESE</b> (FREEZEABILITY AND FERTILITY OF MURGESE STALLION SEMEN) <i>Nicassio M., Aiudi G., Matarrese R., Silvestre F., Leoci R., Lacalandra G.M.</i>	87

## **Biotecnologie**

- EFFETTO DOSE-RISPOSTA DELLA MICOTOSSINA ZEARALENONE E SUOI DERIVATI SULLA STABILITÀ DELLA STRUTTURA CROMATINICA (SCSA) DI SPERMATOZOI DI CAVALLO** (DOSE-RESPONSE EFFECT OF MYCOTOXIN ZEARALENONE AND ITS DERIVATIVES ON SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA) IN STALLIONS) *Filannino A., Giannoccaro A., Minervini F., Nicassio M., Dell'Aquila M.E., Visconti A., Lacalandra G.M.* 91
- AGGREGAZIONE POLARE DI GRANULI LIPIDICI CITOPLASMATICI IN OVOCITI EQUINI. UN MARCATORE DI COMPETENZA OVOCITARIA?** (POLAR AGGREGATION OF CYTOPLASMIC LIPID DROPLETS IN EQUINE OOCYTES. A MARKER FOR OOCYTE COMPETENCE?) *Ambruosi B., Iorga A.I., De Santis T., Matarrese R., Dell'Aquila M.E.* 95
- ATTIVITÀ DEL NALOXONE SULLA MATURAZIONE IN VITRO DI OVOCITI DI CAGNA: EFFETTO ENHANCER NELLA FASE ANESTRALE** (ACTIVITY OF NALOXONE ON IN VITRO MATURATION OF CANINE OOCYTES: ENHANCER EFFECT IN THE ANESTROUS PHASE) *Iorga A.I., Valentini L., Ambruosi B., De Santis T., Caira M., Dell'Aquila M.E.* 99
- IMPORTANZA DELLE AQUAPORINE NELL'EQUILIBRIO IDRICO DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DELLA CAGNA: BILANCIAMENTO DEI FLUIDI OVIDUTTALI E POSSIBILE RUOLO NEL MECCANISMO DI IMBIBIZIONE UTERINA** (IMPORTANCE OF AQUAPORINS IN THE WATER HANDLING OF THE BITCH REPRODUCTIVE APPARATUS: OVIDUCTAL FLUID BALANCE AND POTENTIAL ROLES IN UTERINE IMBIBITION MECHANISMS) *Aralla M., Groppetti D., Cremonesi F., Arrighi S.* 103
- VALUTAZIONI FUNZIONALI DELL'EPIDIDIMO DI GATTO CORRELATE ALL'ESPRESSIONE DELLE AQUAPORINE E DI SITI LECTINO-LEGANTI** (FUNCTIONAL EVALUATIONS OF THE CAT EPIDYDIMIS RELATED TO THE EXPRESSION OF AQUAPORINS AND LECTIN-BINDING SITES) *Ventriglia G., Aralla M., Desantis S., Arrighi S.* 107
- IMMUNOLocalizzazione DELLA LEPTINA (OB) E DEL RECETTORE (OB-R) NELL'OVAIO E NEGLI OVOCITI PRE E POST MATURAZIONE IN VITRO NELLA CAVALLA: EFFETTO DELLA PREPUBERTÀ E DELLA RAZZA** (IMMUNOLocalIZATION OF LEPTIN (OB) AND LEPTIN RECEPTOR (OB-R) IN THE OVARY AND IN PRE AND POST IN VITRO MATURED HORSE OOCYTES: PREPUBERTY AND BREED EFFECT) *Lange Consiglio A., Arrighi S., Bosi G.P., Aralla M., Cremonesi F.* 111
- EFFETTO DELLA FITOEMAGGLUTININA SULLO SVILUPPO EMBRIONALE IN VITRO DI OOCITI DI OVINI PREPUBERI** (THE EFFECT OF PHYTOEMAGGLUTININ ON IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENT OF OVINE PREPUBERTAL OOCYTES) *Bogliolo L., Fois S., Ariu F., Rosati I., Zedda M.T., Pau S., Ledda S.* 115
- ## **Riproduzione nella specie canina e felina**
- VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ NEONATALE CANINA MEDIANTE IMPIEGO DI APGAR SCORE IN ASSOCIAZIONE A CARDIOTOCOMETRIA E MISURAZIONE DEL LATTATO FETALE** (EVALUATION OF NEWBORN VITALITY IN THE DOG BY MEANS OF APGAR SCORE, UTERINE TOCOMETRY AND FETAL LACTATE LEVELS) *Groppetti D., Pecile A., Copley K., Cremonesi F.* 119
- L'UTILIZZO DELL'AGLEPRISTONE NEL CONTROLLO DELLA GLICEMIA NELLA CAGNA DIABETICA IN FASE DIESTRALE** (THE USE OF AGLEPRISTONE FOR THE CONTROL OF GLYCEMIA IN DIABETIC BITCH DURING DIESTRUS) *Bigliardi E., Parmigiani E., Morini G., Ferrari L., Di Ianni F., Bresciani C., Vecchi I., Magnani E.* 123
- VALUTAZIONE DELLA VASCOLARIZZAZIONE OVARICA MEDIANTE ESAME DOPPLER DURANTE LA FASE FOLLICOLARE NELLA CAGNA** (EVALUATION OF OVARIAN BLOOD FLOW BY DOPPLER ULTRASONOGRAPHY DURING FOLLICULAR PHASE IN THE BITCH) *Scotti L., Orlandi R., Ercoli L., Brecchia G., Polisca A.* 128

CONTRIBUTO CLINICO SULL'USO DELL'hCG PER IL TRATTAMENTO DELLE CISTI FOLLICOLARI NELLA GATTA (USE OF hCG FOR FOLLICULAR CYSTS TREATMENT IN THE CAT. CLINICAL REPORT) <i>Valentini L., Paoletti M., Leoci R.</i>	132
CITOLOGIA TESTICOLARE PER AGOASPIRAZIONE NEL CANE E NEL GATTO (TESTICULAR FINE NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY IN CAT AND DOG) <i>Stelletta C., Mollo A., Milani C., Tramontano A., Baccolini M., Ferro S., Romagnoli S.</i>	136
CICLO ESTRALE DELLA CAGNA: RILIEVI VIDEOCOLPOSCOPICI (OESTROUS CYCLE IN THE BITCH: VIDEO-COLPOSCOPIC PROFILES) <i>Minoia G., Rizzo A., Trisolini C., Mutinati M., Spedicato M., Roscino M.T., Sciorsci R.L.</i>	140
UNA MANGANESE SUPEROSSIDO DISMUTASI RICOMBINANTE (rMnSOD) DI ORIGINE UMANA, COME MARKER TUMORALE PER NEOPLASIE MAMMARIE CANINE ESTROGENO-POSITIVE (ER <sup>+</sup> ). STUDI PRELIMINARI (A RECOMBINANT MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (rMnSOD) ACTING AS A SPECIFIC AND SELECTIVE TUMOR MARKER FOR IMAGING ANALYSIS IN ER <sup>+</sup> CANINE BREAST CANCER; PRELIMINARY STUDIES) <i>Sica A., Cocchia N., Russo M., Tortora G.</i>	144
URETROPLASTICA CON LEMBO DI MUCOSA BUCCALE PER LA CORREZIONE DI UNA STENOSI URETRALE IN UN CANE RIPRODUTTORE (URETHROPLASTY USING BUCCAL MUCOSA GRAFT FOR TREATMENT OF AN URETHRAL STENOSIS IN A REPRODUCTIVE DOG) <i>Zambelli D., Cunto M., Raccagni R., Regazzini M.</i>	148
OVARIOISTERECTOMIA E VULVOVAGINECTOMIA PER IL TRATTAMENTO DI RECIDIVE DI NEOPLASIE VAGINALI IN UNA CAGNA (OVARIOHYSTERECTOMY AND VULVOVAGINECTOMY FOR THE TREATMENT OF VAGINAL NEOPLASMS RELAPSES IN A BITCH) <i>Zambelli D., Cunto M., Raccagni R., Regazzini M.</i>	152
STUDIO MORFOLOGICO DELLE GONADI IN CANI GIOVANI CON ALTERATA DISCESA TESTICOLARE MONOLATERALE (MORPHOLOGICAL STUDY OF TESTES IN YOUNG DOGS AFFECTED BY UNILATERAL MALDESCENDED TESTIS) <i>Rota A., Riccardi E., Grieco V., Veronesi M.C.</i>	156
L'IMPIEGO DELLA PGF <sub>2α</sub> PER L'INTERRUZIONE DELLA GRAVIDANZA INDESIDERATA NELLA CAGNA: NOSTRA ESPERIENZA A TIRANA (USE OF PGF <sub>2α</sub> FOR INTERRUPTING UNWANTED PREGNANCY IN THE BITCH: OUR EXPERIENCE IN TIRANA) <i>Turmalaj L., Selami F., Lika E., Degl'Innocenti S.</i>	160
VALUTAZIONE RETROSPETTIVA DELL'APPROCCIO LAPAROSCOPICO NELLA CRIPTORCHIDECTOMIA DEL CANE (RETROSPECTIVE EVALUATION OF LAPAROSCOPIC CRIPTORCHIDECTOMY IN DOG) <i>Vannozzi I., Innocenti V. M., Aria G.</i>	164
OSSERVAZIONI SULLA PRESENZA DI BATTERI E MICOPLASMI NEL TRATTO VAGINALE E NEL LATTE DELLA CAGNA NEL PERIPARTUM: DATI PRELIMINARI (RELEVANCE OF BACTERIA AND MYCOPLASMA ISOLATION IN THE VAGINAL TRACT AND IN THE MILK OF PERIPARTURIENT BITCHES, PRELIMINARY RESULTS) <i>Milani C., Faccioli G., Mollo A., Tramontano A., Corrà M., Rota A.</i>	168
L'ATTIVITÀ TIROIDEA E RIPRODUTTIVA NEL CANE: CORRELAZIONI ESISTENTI TRA FEMMINE EUTIROIDEE E CLINICAMENTE IPOTIROIDEE IN DIVERSE RAZZE (THYROID AND REPRODUCTIVE ACTIVITIES IN DOGS: CORRELATIONS BETWEEN EUTHYROIDAL AND CLINICALLY HYPOTHYROIDAL BITCHES IN DIFFERENT BREEDS) <i>Ponzio P., Macchi E., Lanza M., Burlina V., Bonet S.</i>	172
<b>Riproduzione in altre specie</b>	
PROTOCOLLI ANESTESIOLOGICI PER LA CASTRAZIONE DELL'ALPACA ( <i>Lama pacos</i> ) (ANAESTHETIC PROTOCOLS FOR THE NEUTERING OF ALPACAS - <i>Lama pacos</i> -) <i>Vullo C., Catone G., Scrollavezza P.</i>	176

<p>INTEGRITÀ MORFOFUNZIONALE DI SPERMATOZOI DI VERRO IN DIFFERENTI DILUITORI: VALUTAZIONE CON TRIPLA COLORAZIONE FLUORESCENTE E SISTEMA “CASA” (MORPHO-FUNCTIONAL INTEGRITY OF BOAR SPERMATOOA PRESERVED IN DIFFERENT EXTENDERS: ASSESSMENT BY TRIPLE FLUORESCENT STAINING AND COMPUTER ASSISTED SEMEN ANALYZER (CASA)) <i>Maggio V., Lange Consiglio A., Bassini P., Gottardi L., Cremonesi F.</i></p>	180
<p>L’OSSIDO NITRICO NELLA SPECIE SUINA: DALLA GRAVIDANZA AL POST PARTUM (NITRIC OXIDE IN SWINE: FROM PREGNANCY TO POST PARTUM) <i>Minoia R., Pavone L., Massari P., Simone N., Lacalandra G.M</i></p>	184
<p>DETERMINAZIONE CON METODO IN CHEMILUMINESCENZA DEI LIVELLI EMATICI DI PROGESTERONE E TESTOSTERONE IN ALPACA (<i>Lama pacos</i>) ALLEVATI IN ITALIA (CHEMILUMINESCENT METHOD FOR DETERMINING PROGESTERONE AND TESTOSTERONE BLOOD LEVELS IN ALPACA (<i>LAMA PACOS</i>) REARED IN ITALY) <i>Stelletta C., D’Alterio G., Stefani A., Moro L., Bevilacqua F., Romagnoli S.</i></p>	188
<p>DETERMINAZIONE DEL SESSO DA MEMBRANA TESTACEA MEDIANTE PCR-RFLP NELLA QUAGLIA GIAPPONESE (<i>Coturnix japonica</i>) (SEX DETERMINATION OF JAPANESE QUAIL (<i>Coturnix japonica</i>) BY PCR-RFLP FROM EGG SHELL MEMBRANE SAMPLES) <i>Costantini V., Guaricci A.C., Bucci F.A., Inglese G., Rausa F., Lacalandra G.M.</i></p>	192
<p>IMPOSEX (PSEUDOERMAFRODITISMO FEMMINILE) IN MURICI SICILIANI (IMPOSEX (FEMALE PSEUDOHERMAPHRODITISM) IN SICILIAN MURICIDS) <i>Pino C., Macrì D., Basile F., Marino G.</i></p>	196
<p>CRIOCONSERVAZIONE DI SPERMATOZOI EPIDIDIMALI FELINI (CRYOPRESERVATION OF FELINE EPIDIDYMAL SPERMATOOA) <i>Cocchia N., Russo M., Tortora G., Lorzio R</i></p>	200
<p>VALUTAZIONE MORFOMETRICA COMPUTERIZZATA DELLA TESTA DI SPERMATOZOI DI TIGRE (<i>Panthera tigris</i>): NOTA PRELIMINARE (COMPUTERIZED MORPHOMETRIC EVALUATION OF <i>PANTHERA TIGRIS</i> HEAD SPERMATOOA: PRELIMINARY STUDY) <i>Acierno C., De Vico G., Carella F., Tortora G., Lorzio R.</i></p>	204
<p><b>Giornata di Studio</b></p>	
<p>“DAL GENITAL CONDITION SCORE ALLE TECNOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE: MANTENERE UNA ELEVATA EFFICIENZA RIPRODUTTIVA NELL’ALLEVAMENTO BOVINO”</p>	
<p>GYNECOLOGICAL SYSTEM SCORE (GSS) NELLA VALUTAZIONE DELL’APPARATO RIPRODUTTORE DELLA BOVINA DA LATTE <i>Parmigiani E.</i></p>	209
<p>TECNOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE E SESSAGGIO DEL SEME <i>Cremonesi F.</i></p>	216
<p>RELAZIONE TRA FATTORI METABOLICI E DISFUNZIONI OVARICHE POST PARTUM NELLA BOVINA DA LATTE <i>Veronesi M.C.</i></p>	222
<p>GLI INTERFERENTI ENDOCRINI <i>Sciorsci R.L.</i></p>	227
<p>DIARREA NEONATALE NEL VITELLO - DIAGNOSI, TERAPIA E PROFILASSI <i>Morandi N.</i></p>	231

## **BASIC ABDOMINAL CANINE ULTRASOUND**

**Tomas Baker MS, Chief Ultrasonographer**

*School of Veterinary Medicine, University of California, Davis*

**Summary** - Small animal patients are commonly presented to the veterinarian because of signs referable to the abdominal cavity due to congenital anomalies, dietary indiscretion, parasitic infestation and infectious or inflammatory disease. Abdominal ultrasound provides valuable clinical information about the peritoneal cavity, great vessels, abdominal viscera and lymph nodes obtained in a non invasive fashion, with no confirmed adverse biologic effects, and usually not necessitating sedation or anesthesia. This paper reviews the techniques for performing the pediatric abdominal ultrasound scan.

**Introduction** - The use of ultrasound during evaluation of the pediatric patient with signs referable to the abdominal cavity provides valuable information obtained in a non invasive fashion with no confirmed adverse biologic effects. Additionally, minimal or no sedation is generally required to complete an abdominal scan in the pediatric patient. Abdominal ultrasound provides useful data in a short period of time. The normal paucity of intra abdominal fat in pediatric patients results in less informative abdominal radiography, but actually improves ultrasonographic imaging. (Abdominal fat attenuates the ultrasound beam.) Image quality is improved with small patient size as a higher frequency scanhead can be employed. Acquisition of special equipment for pediatric ultrasonography is usually not necessary as scanheads selected for small animal (especially feline) clinical use are appropriate for most pediatric cases.

### **Equipment**

Small animal patients are best evaluated using an ultrasound machine equipped with a curvilinear variable frequency scanhead (6.0-8.0 MHz). Many portable machines now have available a high frequency linear scanhead (8.0-10.0 MHz) which will improve quality and also allow evaluation of smaller regional anatomy (thyroid, parathyroid, cryptorchid testes).

### **Preparaion**

The small animal patient should be placed in dorsal recumbency within a padded V-trough, and gently restrained by assistant(s) holding the forelimbs and hindlimbs. (Figure 1) Sedation is rarely required for the basic abdominal scan unless marked pain or apprehension is present. Allowing the patient to become accustomed to this restraint before initiating clipping or scanning usually minimizes struggling and resultant aerophagia.

Clipping the cranioventral abdominal hair using a No. 40 blade and wetting the skin with water, tincture of zephiran or 70% isopropyl alcohol, followed by a liberal amount of ultrasound gel permits the best acoustic coupling of the scanhead to the patient, improving the image obtained. Some pediatric patients have scant ventral hair coats and will not require clipping. Care should be taken to avoid excessive chilling of pediatric patients secondary to the application of room temperature liquids followed by evaporation. Electric warming devices (warm water blankets) may cause electronic interference with the ultrasound equipment; warm water bottles or their equivalent are superior.

Fasting as much as is safely possible in the small animal patient minimizes gastric ingesta obscuring imaging of the liver and gastrointestinal gas accumulation interfering

with visualization of other abdominal viscera. Preventing urination immediately prior to the examination permits better evaluation of the urinary bladder.

Serial evaluations can provide useful information when the clinical status of the small animal patient has changed; clinicopathologic deterioration, progressive lethargy or obtundation, acute pain, changes in abdominal palpation findings or refractory vomiting or diarrhea warrant repeat evaluation for ultrasonographic signs indicating intussusception, perforation and/or peritonitis have evolved.

### **The Normal Abdomen**

Regardless of the clinical history, the abdomen should be evaluated methodically with the animal in dorsal decubency. Place the scanhead under the xyphoid with the beam in sagittal plane. Visualization of the liver is achieved by fanning the beam from right to left. The gall bladder is seen on the right; the left liver lobes are seen ventral and sometimes caudal to the stomach. Turning the beam to transverse allows for visualization of the liver between stomach and gall bladder. This view is good for evaluation of the hepatic border, echogenicity of hepatic parenchyma and portal architecture. The portal vessels have very echogenic walls.

Resuming the sagittal plane, scan to the left of the dog past the stomach to the spleen. The spleen will be visualized ventrally in the near field. Splenic border, parenchyma and shape should be evaluated. Following the spleen transversely down the left body wall, you will see the left kidney.

Once visualization of the kidney is achieved, turn to the sagittal plane and evaluate the renal border, cortical echogenicity and pelvic architecture. Dilatation of the renal pelvis is best seen in the transverse plane. The adrenal is located medial to the cranial pole of the kidney. In sagittal, maintaining strong hand pressure, scan medially to visualize the linear aorta and the renal artery. The left adrenal is located cranial to the left renal artery and caudal to the left cranial mesenteric artery. The left adrenal is visualized as a bi-lobed structure with the phrenicoabdominal vein at its waist.

With a transverse beam back in the middle of the abdomen, scan caudally to a large hypoechoic structure, the urinary bladder. Evaluate bladder wall and lumen contents, and, dorsal to the bladder, the major vessels (caudal vena cava and aorta). Sub lumbar lymph nodes will be seen at the aortic bifurcation into the iliac arteries, adjacent to the bladder wall. Sagittal scanning of the urinary bladder caudally will allow visualization of the urethra (and prostate in the male).

At the edge of the right ribcage at the renal fossa of the liver the right kidney will be found. The right kidney should be evaluated as was the left (renal border, cortical echogenicity and pelvic architecture). By scanning sagittally between the right kidney and the caudal vena cava with a fanning technique, the right adrenal is visualized just lateral to the caudal vena cava. In transverse, find the right kidney, and lateral to the kidney, the duodenum.

At the cranial end of the kidney medial to the duodenum will be the right limb of the pancreas. The right pancreatic limb is identified by visualizing the caudal pancreaticoduodenal vein within the structure. Turning to the sagittal plane, follow the pancreas, scanning medially to the angle of the body and left limb, or sagittally scan the caudal border of the stomach. The pancreatic body is seen caudal to the stomach, cranial to the splenic vein. The left limb is found caudal to the splenic vein and midline to the cranial pole of the left kidney.

Returning to the transverse plane in mid abdomen at the mesenteric root, scan for mesenteric lymph nodes and small bowel wall changes. It may take 2-3 passes to evaluate the entire abdomen scanning in a uniform serpentine fashion.

**References:**

1. Nyland TG, Mattoon JS, Herrgesell EJ, Wisner ER. Physical principles, instrumentation, and safety of diagnostic ultrasound. In: Nyland TG, Mattoon JS. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders, 2002, p. 1-18.
2. Penninck DG. Artifacts. In: Nyland TG, Mattoon JS. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders, 2002, p. 19-29.
3. Baker TW. Performing the complete abdominal ultrasound evaluation. In: *Proceedings, 2004 Swedish Annual Course in Small Animal Reproduction*, Uppsala, Sweden.
4. Penninck DG. Gastrointestinal tract. In: Nyland TG, Mattoon JS. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders, 2002, p.207-230.
5. Suter PF. Abnormalities of the diaphragm. In: Suter PF, Lord PF. *Thoracic radiography: A Text Atlas of Thoracic Disease in the Dog and Cat*. Wettswil, Switzerland, 1984, p. 180-204.
6. Nyland TG, Hager DA. Sonography of the liver, gallbladder, and spleen. In: *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1985; 15:1123-1148.
7. Nyland TG, Mattoon JS, Herrgesell EJ, Wisner ER. Urinary tract. In: Nyland TG, Mattoon JS. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders, 2002, p.158-195.
8. Lamb CR. Ultrasonography of the ureters. In: *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1998; 28:823-848.
9. Eilts BE, Pechman RD, Hedlund CS. Use of ultrasonography to diagnose Sertoli cell neoplasia and cryptorchidism in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 192:533-534.



## **PEDIATRIC ABDOMINAL ULTRASOUND IN DOG: DIFFERENTIATING CONGENITAL DISORDERS**

**Tomas Baker MS**, *Chief Ultrasonographer*

*Autumn P. Davidson DVM, MS, Dipl ACVIM, Clinical Professor  
School of Veterinary Medicine, University of California, Davis*

**Summary** - Pediatric patients are commonly presented to the veterinarian because of signs referable to the abdominal cavity due to congenital anomalies, dietary indiscretion, parasitic infestation and infectious disease. Abdominal ultrasound provides valuable clinical information about the peritoneal cavity, great vessels, abdominal viscera and lymph nodes obtained in a non invasive fashion and usually not necessitating sedation or anesthesia. Ultrasonography thus greatly facilitates diagnostic differentiation between congenital and acquired disorders; techniques will be described in this paper.

### **Disorders of Urogenital Development**

Veterinary pediatric ultrasonography has been hampered by the small size of neonatal organs, but advances in pediatric veterinary ultrasonography have been encouraging. Abdominal ultrasound can facilitate the diagnosis of congenital urogenital disorders, because ectopic, distended ureters and changes in renal architecture are usually readily seen. The presence and location of cryptorchid testes can often be detected with ultrasound. Ultrasonographic examination of the bladder disclosing urolithiasis can provide information suggesting congenital hepatic vascular anomalies.

The most common familial disorders in cats and dogs include renal agenesis, renal dysplasia, polycystic kidneys, renal amyloidosis, basement membrane disorders, and tubular dysfunction (Fanconi's syndrome).

### **Renal Agenesis**

Congenital renal agenesis resulting in the absence of a kidney can be confirmed with ultrasound. The contralateral kidney typically has normal internal anatomy, but is enlarged as a consequence of obligatory hypertrophy. Renal function of the pediatric patient does not equate that of the adult until 4-6 months of age, compensatory renomegaly may not be apparent until that time.

### **Renal Dysplasia**

Until reliable genetic markers are available for the various breed specific congenital renal dysplasias, ultrasound provides the best method of screening young dogs and cats for these likely heritable disorders. Early ultrasonographic screening is possible in platycephalic breeds in which morphologic changes are grossly evident (i.e. Persian cats, Cairn Terriers, German Shepherd Dogs).

### **Ectopic Ureter**

Congenital ectopic placement of the distal ureter into the urethra, vestibule or vagina is usually associated with ureteral dilation with or without renal pelvic dilation. Dilation of the ureter improves the sensitivity of the ultrasound study; however, the diagnosis can be elusive. Visualization of a non vascular fluid filled structure with a hyperechoic wall passing dorsal to the urinary bladder, or obvious insertion of the structure into the proximal urethra suggest the diagnosis. Visualization of the ureteral jets in the bladder suggests normalcy, however some ectopic ureters insert initially into the bladder and additionally tunnel distally to terminate in an abnormal site. Visualization of the dilated

ureter usually occurs near the urinary bladder. Visualization of the bladder neck and proximal urethra may be obscured by pubic bone, making identification of such termination difficult.

Hydronephrosis can eventually result from an uncorrected ectopic ureter due to flow impedance at the abnormal site of insertion. Urinary tract infection is commonly associated with ectopia, due to accompanying urethral sphincter mechanism anomalies, and if not detected and treated, can progress to pyelonephritis and ureteritis. Infection and its associated inflammation in the tract can further alter the ultrasonographic appearance of the kidneys, bladder, ureters and urethra (see below).

Contrast enhanced computed tomography is the most sensitive and specific modality for the diagnosis of ectopia, but, like double contrast radiography, requires anesthesia, making initial evaluation with ultrasound desirable when ectopia is suspected clinically. The condition is thought to be heritable, and is more common in females.

### **Ureterocele**

A ureterocele is an uncommon congenital dilation of the ureter near the bladder, appearing as a cystic structure within the bladder lumen or wall. The ureterocele occurs most commonly in association with an ectopic ureter. Diagnosis can be made by scanning the urinary bladder in the transverse plane and watching for strong peristalsis of the adjacent ureter

### **Patent Urachus**

The urachus permits the flow of urine from the bladder into the allantoic sac of the fetus, and normally atrophies at birth. A patent urachus in the neonate is characterized clinically by urine dribbling from the umbilicus. The fluid filled urachus can be identified ultrasonographically, extending cranially from the cranioventral bladder wall. If an incompletely patent urachus is present in the neonate, a urachal diverticulum may result, seen as a divot in the apex of the bladder. [7] Urachal diverticula can predispose the bladder to recurrent infection because of abnormal bladder flow in the region, surgical excision can be indicated.

### **Cryptorchidism**

Ultrasound localization of cryptorchid testis (es) can confirm the condition in pediatric patients with bilateral involvement whose neutering status is unknown, and assist the surgeon in planning the approach (i.e. inguinal vs cranial abdominal). The retained testis can be positioned anywhere between the ipsilateral kidney and the scrotum. A systematic evaluation of the region from the caudal renal pole to the inguinal canal can identify an oval, homogeneously echogenic structure with a mildly hyperechoic border representing the parietal and visceral tunics. The epididymis is usually distinctly less echogenic than the testicular parenchyma, as in the scrotal testis. The cryptorchid testis will maintain the anatomic structure, the median testes (a hyperechoic slash), and normal testicular echogenicity despite being reduced in size as compared to a scrotal testis.

Ultrasound is also the test of choice to detect non descended testicles in adult dogs and cats. Ultrasound may also detect non palpable testicular tumors which are more prevalent in this group of patients.

## **DISORDERS OF THE DIGESTIVE SYSTEM DEVELOPMENT**

### **Hernia**

Congenital peritoneopericardial diaphragmatic hernias occur in both the dog and cat; ultrasonography provides an additional modality for their diagnosis. As with other

diaphragmatic hernias, careful evaluation for continuity of the echogenic diaphragm differentiates a true hernia from mirror image artifacts. Evaluation of the pericardial contents can be made from the subcostal (across the liver) or intercostal (using the heart as an acoustic window) approach. Abnormal pericardial contents can include falciform fat, liver, gall bladder and/or intestines. Congenital inguinal hernias can similarly be confirmed by ultrasonographic identification of intestines in the subcutaneous space of the affected groin. This can be a dynamic finding. Mesenteric fat may alternatively be entrapped through the hernia.

Congenital hiatal hernias are more difficult to confirm with ultrasound because of the inherent difficulty imaging the gas filled stomach and the intermittent nature of the disorder. Stomach wall with characteristic rugal folds can be imaged crossing the diaphragm into the thoracic cavity. Fluoroscopic evaluation can be more informative in these cases.

A developmental anomaly resulting in extrusion of a portion of the gastrointestinal tract outside of the body wall, occurring within the umbilical canal (omphalocele) or lateral to the umbilical canal (gastroschisis), has been reported in humans and occurs in both dogs and cats. The condition is usually hopeless in small pediatric patients presented to the veterinarian hours after birth; however, a 30-70% survival rate is reported in humans with immediate post partum surgical intervention. Diagnosis is made pre partum with abdominal ultrasound, based on the recognition of fetal gastric wall (rugal) structures or intestinal contents in an abnormal location. Earlier surgical intervention before inevitable septic contamination occurs may improve the prognosis in veterinary patients.

### **Enteric Anomalies**

Pyloric stenosis secondary to hypertrophic gastritis has been reported in a pediatric dog. Focal circumferential thickening of the pylorus primarily involving the muscularis is typical.

Enteric duplication or agenesis can be confirmed ultrasonographically in pediatric patients. Duplication is rare, can occur anywhere in the intestinal tract and the clinical signs may be nonspecific. A fluid filled juxtaintestinal formation with variable peristalsis and contents can be seen. Enteric agenesis usually results in severe clinical signs in the neonatal period. Ultrasonographic findings usually include marked fluid and gas distention of bowel proximal to the defect.

Several breeds of dogs have a reported genetic predilection to small intestinal disease. Normally, the small bowel appears sonographically as four distinct layers. The bowel lumen is hyperechoic, as gas and ingesta are compressed. The layer just outside the lumen is the mucosa; it is hypoechoic and normally the thickest appearing section. Outside the mucosa is the submucosa, it is hyperechoic to the mucosa and about one third the thickness. The muscularis, the bowel muscle layer, is outside of the submucosa and appears as a very thin hypoechoic black line. An immunoproliferative enteropathy is seen in the Basenji breed which is characterized by lymphangectasia, intermittent diarrhea, weight loss, hypoalbuminemia and hyperglobulinemia, and lymphoplasmacytic mucosal infiltrates throughout the GI tract. Histopathology is diagnostic, however abdominal ultrasonography can identify bowel in which disruption of the normal layering has occurred. Chinese Sharpei dogs have been identified with a lymphoplasmacytic-eosinophilic infiltrative enteropathy that is characterized by poor weight gain, weight loss, or intermittent diarrhea episodes, with onset of signs typically between 2 to 6 months of age. Infiltrative enteropathies can be characterized ultrasonographically as having changes in the normal bowel wall layering.

### **Portosystemic Shunt**

Portosystemic shunts (PSS) are congenital malformations of the hepatic portal venous drainage system and can have either a familial, i.e. genetic, or random occurrence. Congenital PSS can be either intrahepatic or extrahepatic; breed predilections for extrahepatic shunts include Yorkshire terrier, Maltese, Poodle, Miniature Schnauzer, Dachshund, Lhasa Apso, Pekingese, Pug, and Shih Tzu, whereas intrahepatic shunts are more commonly identified in large breed dogs such as Golden Retrievers, German Shepherds, Irish Wolfhounds, Irish Setters, and Samoyeds. PSS are uncommon in cats.

Ultrasonography provides a rapid and noninvasive method for screening patients suspected to have congenital portosystemic shunts. Although scintigraphy (transcolonic portal scintigraphy or transsplenic portography) is considered the most reliable noninvasive method of documenting a portosystemic shunt, its availability is limited to specialty and university practices, and its use dictates special handling of the radioactive patient for at least 12 hours. Mesenteric portography, although more invasive and requiring general anesthesia, is a highly reliable method of confirming and localizing PSS.

Abdominal ultrasonography is a useful diagnostic and is routinely done when PSS is suspected. It is non-invasive and requires no anesthesia however diagnostic accuracy is highly operator dependent, and the PSS will be confirmed in only approximately 60-80% of cases. The liver may be small and difficult to image in patients with congenital portosystemic shunts. Imaging the liver from the standard ventral approach can be improved in some cases by using the left ventral intercostal and right dorsal intercostal approaches. The presence of ascites can facilitate the study, as can adding fluid to the stomach, and positioning the patient to shift gas away from the scanhead and shift abdominal organs caudally. Ultrasound evaluation of portosystemic anomalies can be facilitated by positive pressure ventilation under anesthesia for the same reason.

Post operatively, ultrasound can be used to evaluate portal blood flow following surgical banding or coil embolization. Extrahepatic shunts most commonly arise from the portal vein, splenic vein or left gastric vein in the dog, and from the left gastric vein in the cat. Identification of a shunting vessel emptying into the caudal vena cava is difficult but confirmatory. Intrahepatic shunts can be more difficult to identify because of patient size, bowel gas and liver size. Clipping the hair coat intercostally on the right can allow for transverse vessel stacking (of the aorta, vena cava and portal vein) and allow visualization of ductal shunts. There can be right and left shunting of the ductus.

### **References**

1. Suter PF. Abnormalities of the diaphragm. In: Suter PF, Lord PF. Thoracic radiography: A Text Atlas of Thoracic Disease in the Dog and Cat. Wettswil, Switzerland, 1984, p. 180-204.
2. Nyland TG, Hager DA. Sonography of the liver, gallbladder, and spleen. In: Vet Clin North Am Small Anim Pract 1985; 15:1123-1148.
3. Nyland TG, Mattoon JS, Herrgesell EJ, Wisner ER. Urinary tract. In: Nyland TG, Mattoon JS. Small Animal Diagnostic Ultrasound, 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders, 2002, p.158-195.
4. Lamb CR. Ultrasonography of the ureters. In: Vet Clin North Am Small Anim Pract 1998; 28:823-848.

## **THE MEDICAL AND SURGICAL MANAGEMENT OF LABOR AND DELIVERY IN THE BITCH**

*Autumn P. Davidson DVM, MS, Dipl. ACVIM  
Clinical Professor  
University of California, Davis*

Summary - Although many bitches and queens deliver in the home or kennel/cattery setting without difficulty, requests for veterinary obstetrical assistance are becoming more common. The increased financial and emotional value of stud dogs, brood bitches, toms, queens and their offspring to the pet fancy makes the preventable loss of even one neonate undesirable. Breeding colonies in academic, scientific and industrial facilities need to maximize neonatal survival for financial and ethical reasons. Veterinary involvement in canine and feline obstetrics has several goals: to increase live births (minimizing stillbirths resulting from the difficulties in the birth process), to minimize morbidity and mortality in the dam, and to promote increased survival of neonates during the first week of life. Neonatal survival is directly related to the quality of labor. Optimal management of whelping/queening requires an understanding of normal labor and delivery in the bitch and queen, as well as the clinical ability to detect abnormalities in the birthing process. This paper reviews optimal medical and surgical management of labor and delivery.

### **Dystocia (Abnormal Parturition)**

Dystocia is defined as difficulty in the normal vaginal delivery of a neonate from the uterus. Dystocia must be diagnosed in a timely fashion for medical or surgical intervention to improve outcome. Additionally, the etiology of dystocia must be identified for the best therapeutic decisions to be made.

### **Normal Parturition**

#### **Gestation**

Clinicians are commonly asked to ascertain if a bitch or queen is at term pregnancy, ready chronologically to deliver a litter, and then to intervene if labor has not begun. An accurate determination of gestational length can be difficult, especially if numerous copulations occurred and no ovulation timing was performed. Prolonged gestation is a form of dystocia. Gestation in the bitch is more challenging to calculate than in the cat, because bitches are spontaneous ovulators. Normal gestation in the bitch is 56 to 58 days from the first day of diestrus (detected by serial vaginal cytologies, defined as the first day that cytology returns to  $\leq 50\%$  cornified/superficial cells), 64 to 66 days from the initial rise in progesterone from baseline (generally  $>2\text{ng/mL}$ ), or 58 to 72 days from the first instance that the bitch permitted breeding. Predicting gestational length without prior ovulation timing is difficult because of the disparity between estrual behavior and the actual time of conception in the bitch, and the length of time semen can remain viable in the bitch reproductive tract (often up to  $>7$  days). Breeding dates and conception dates do not correlate closely enough to permit very accurate prediction of whelping dates. Additionally, clinical signs of term pregnancy are not specific: radiographic appearance of fetal skeletal mineralization varies at term, fetal size varies

with breed and litter size, and the characteristic drop in body temperature (typically less than 99 degrees Fahrenheit) may not be detected in all bitches and varies in many. Breed, parity and litter size can also influence gestational length. Because the queen is an induced ovulator (ovulation follows coitus by 24-36 hours), gestational length can be predicted more accurately from breeding dates, assuming copulation provided adequate coital stimulation for the LH surge and subsequent ovulation, and a limited number of copulations were permitted. The gestational length of queens ranges from 52-74 days from the first to last breeding. The mean gestational length is 65-66 days. Because of the poor outcome with the delivery of premature puppies and kittens, elective intervention is best delayed until stage I labor has begun, or prolonged gestation confirmed.

## **Labor and Delivery**

Bitches typically enter stage I labor within 24 hours of a decline in serum progesterone to below 2-5 ng/mL, which occurs in conjunction with elevated circulating prostaglandins and is commonly associated with a transient drop in body temperature, usually to <100 degrees Fahrenheit. Queens typically enter stage I labor 24 hours after serum progesterone levels fall to less than 2 ng/mL. Monitoring serial progesterone levels for impending labor is problematic due to the fact that in house canine kits enabling rapid results are inherently less accurate between 2-5 ng/mL, and a rapid decline in progesterone levels can occur over a period of a few hours. Commercial laboratories offering quantitative progesterone by chemiluminescence typically have a 12 to 24 hour turn around time, which is not rapid enough to enable decisions about an immediate indication for obstetrical intervention.

Stage I labor in the bitch normally lasts from 12 to 24 hours, during which time the uterus has myometrial contractions of increasing frequency and strength, associated with cervical dilation. No abdominal effort (visible external contractions) is evident during stage I labor. Bitches may exhibit changes in disposition and behavior during stage I labor, becoming reclusive, restless, and nesting intermittently, often refusing to eat and sometimes vomiting. Panting and trembling may occur. Vaginal discharge is clear and watery.

Normal stage II labor in the bitch is defined to begin when external abdominal efforts can be seen, accompanying myometrial contractions to culminate in the delivery of a neonate. Presentation of the fetus at the cervix triggers the Ferguson reflex, promoting the release of endogenous oxytocin from the hypothalamus. Typically, these efforts should not last longer than 1-2 hours between puppies, although great variation exists. The entire delivery can take between 1 to >24 hours, however normal labor is associated with shorter total delivery time and shorter intervals between neonatal births. Vaginal discharge can be clear, serous to hemorrhagic, or green (uteroverdin). Typically bitches continue to nest between deliveries, and may nurse and groom neonates intermittently. Anorexia, panting and trembling are common.

Stage III labor is defined as the delivery of the placenta. Bitches typically vacillate between stages II and III of labor until the delivery is complete. During normal labor, all fetuses and placentae are delivered vaginally, although they may not be delivered together in every instance.

The stages of labor in the queen can be similarly defined. Stage 1 labor in the queen is reported to last 4-24 hours and stages II and III from 2 to 72 hours, although completion of delivery of neonates within 24 hours is expected with normal queening.

## **Dystocia**

### **Etiology**

Dystocia results from maternal factors (uterine inertia, pelvic canal anomalies, intrapartum compromise), fetal factors (oversize, malposition, malposture, anatomic anomalies) or a combination of both. For effective management, the recognition of dystocia must be made in a timely manner, and identification of etiologic factors made correctly.

Uterine inertia is the most common cause of dystocia. Primary uterine inertia results in the failure of delivery of any neonates at term, and is thought to be multifactorial, including metabolic defects at the cellular level. An intrinsic failure to establish a functional, progressive level of myometrial contractility occurs. A genetic component may be present. Secondary uterine inertia results in the cessation of labor once initiated, and consequential failure to deliver the entire litter. Secondary inertia can result from metabolic or anatomic (obstructive) causes, and is also thought to have a genetic component. Birth canal abnormalities such as vaginal strictures, stenosis from previous pelvic trauma or particular breed conformation, and intravaginal or intrauterine masses can cause obstructive dystocia. In most cases, canal abnormalities can be detected in the pre breeding examination, and resolved or avoided by elective cesarean section. Causes of intrapartum compromise rendering the dam unable to complete delivery include metabolic abnormalities such as hypocalcemia and hypoglycemia, systemic inflammatory reaction, sepsis, and hypotension (due to hemorrhage or shock).

Fetal factors contributing to dystocia most commonly involve mismatch of fetal and maternal size, fetal anomalies and fetal malposition and/or malposture. Prolonged gestation with small litter size can cause dystocia due to an oversized fetus(es). Fetal anomalies such as hydrocephalus and anasarca similarly can cause dystocia. Fetal malposition (ventrum of fetus proximal to the dam's dorsum) and fetal malposture (flexed neck and scapulohumeral joints most commonly) promote dystocia as the fetus cannot transverse the birth canal smoothly.

### **Diagnosis**

An efficient diagnosis of dystocia is dependent upon taking an accurate history and performing a thorough physical examination in a timely manner. The clinician must quickly obtain a careful reproductive history detailing breeding dates, any ovulation timing performed, historical and recent labor, as well as a general medical history. The physical examination should address the general status of the patient, as well as include a digital and /or vaginoscopic pelvic exam for patency of the birth canal, evaluation of litter and fetal size (radiography most useful), assessment of fetal viability (doppler or real time ultrasound ideally) and uterine activity (tokodynamometry most useful)

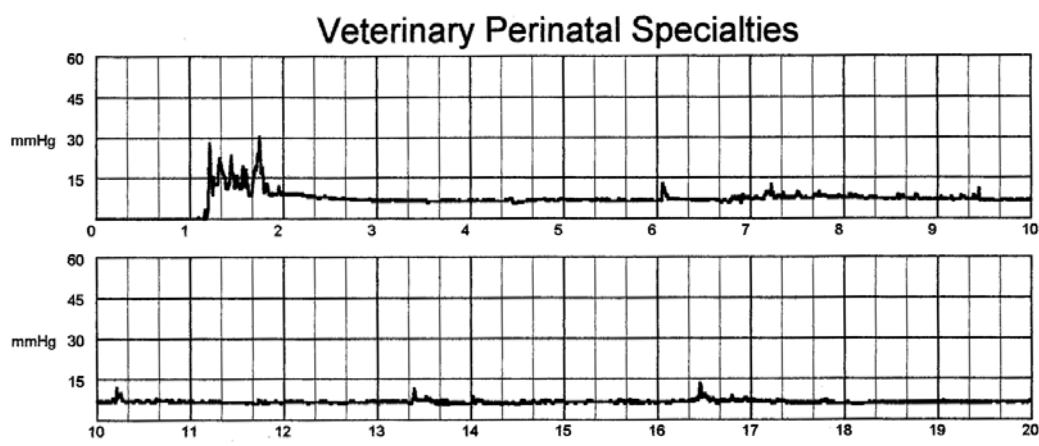
A novel approach to veterinary obstetrical monitoring in use in the United States involves the use of external monitoring devices using tokodynamometry (Healthdyne Inc., Marietta, GA, USA) and a hand held doppler (Sonicaid, Oxford Instruments, England) to detect and record uterine activity and fetal heart rates.<sup>a</sup> These devices can

be used either in the home setting or at the veterinary clinic. Their use requires that the hair coat be lightly clipped caudal to the ribcage, over the gravid area of the lateral flanks, to allow proper contact of the uterine sensor and fetal doppler. The uterine sensor detects changes in intrauterine and intra amniotic pressures. The sensor is strapped over the lightly clipped area of the bitch's/queen's caudolateral abdomen using an elasticized strap. The sensor's recorder is worn in a small backpack placed over the caudal shoulder area. Bitches/queens are at rest in the whelping/queening box or in a crate or cage during the monitoring sessions. The monitoring equipment is well tolerated. Subsequent to each recording session, data is transferred from the recorder via a modem using standard telephones. Fetal doppler monitoring is performed bilaterally with a hand held unit with bitches/queens in lateral recumbency, using acoustic coupling gel. Directing the doppler perpendicularly over a fetus results in a characteristic amplification of the fetal heart sounds, distinct from maternal arterial or cardiac sounds, which enables determination of fetal heart rates.

Interpretation of the contractile pattern in strips produced by the uterine monitor requires training and experience. Data is transferred by modem to obstetrical personnel capable of interpretation, who subsequently consult with the attending veterinary clinician and client. Recordings are made on a twice daily, hour long basis when home monitoring is performed, then intermittently on bitches or queens at home as indicated during active labor, or on site in the veterinary clinic for shorter periods of time (minimally 20 minutes) when patients are being evaluated for suspected dystocia.

The canine and feline uterus each have characteristic patterns of contractility, varying in frequency and strength before and during different the stages of labor.

**Figure 1:** Graph of uterine monitoring recordings, mmHg vs. time in minutes. Normal baseline myometrial tracing, no contractions, pre labor. Variation off baseline at attachment of sensor (1-2 minutes).

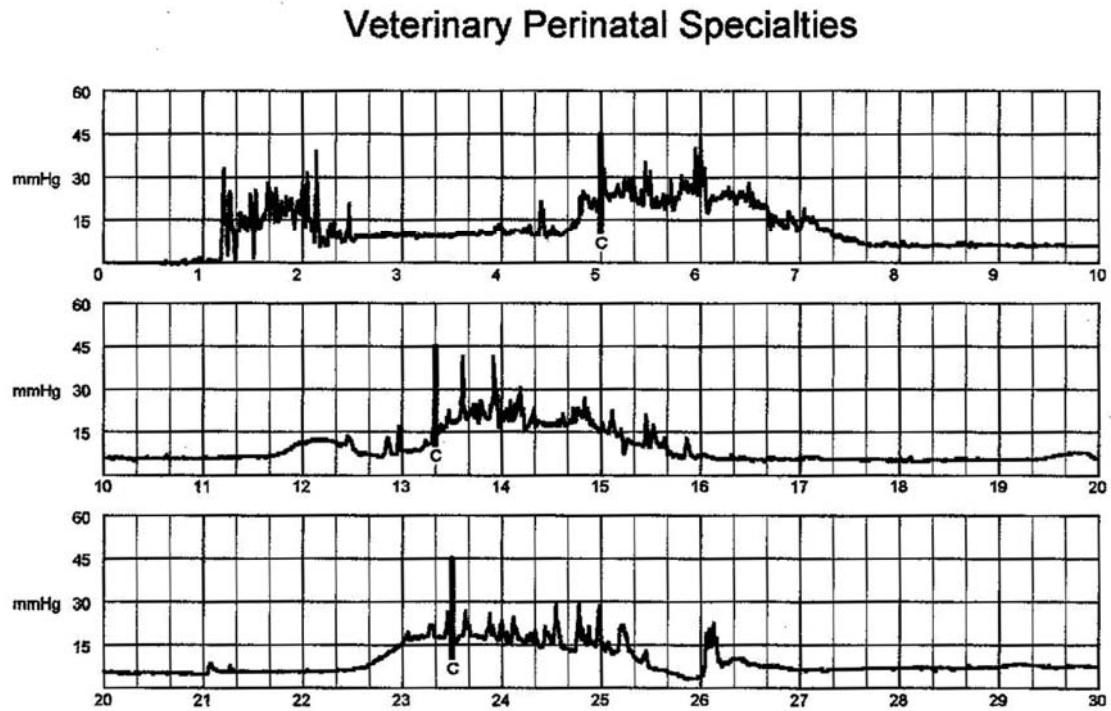


Serial tokodynamometry in the bitch and queen permits evaluation of the progression of labor. During late term, the uterus may contract once or twice an hour before actual stage I labor is initiated. During stage I and II labor, uterine contractions vary in frequency from 0 to 12 per hour, and in strength from 15 to 40 mm Hg, with spikes up to 60 mm Hg. Contractions during active labor can last 2 to 5 minutes in duration. Recognizable patterns exist during pre labor and active (stages 1-3) labor. Aberrations

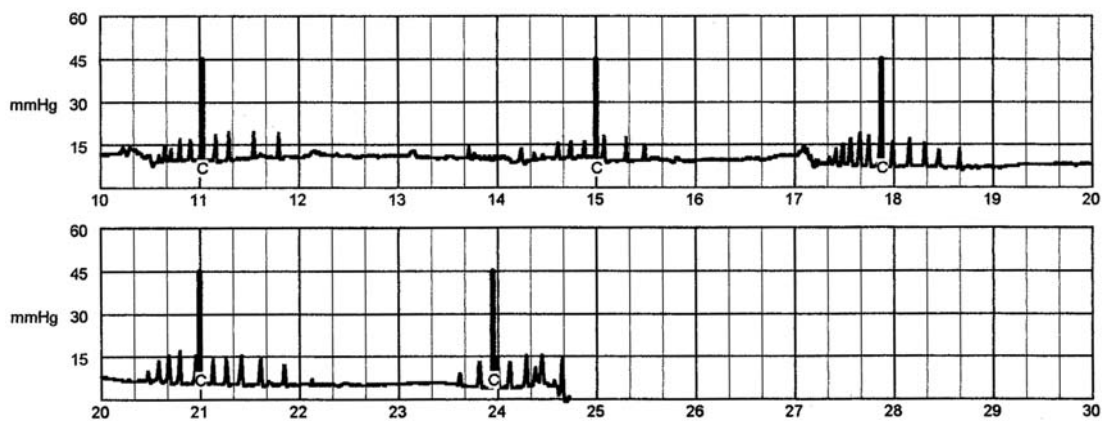


is uterine contractility can be detected during monitoring. Abnormal, dysfunctional labor patterns can be weak or prolonged, and often are associated with fetal distress. Additionally, the completion of labor (or lack there of) can be evaluated via tokodynamometry.

**Figure 2:** Early active labor, stage II, uterine contractions and abdominal pushing. "C"=contraction

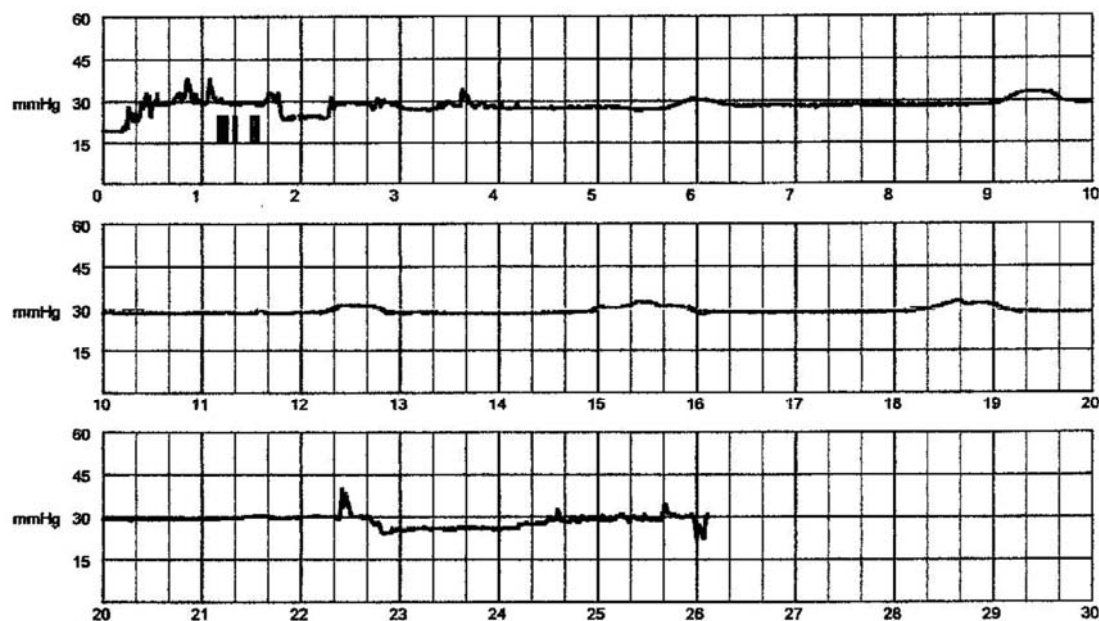


**Figure 3:** Active labor, abdominal pushing with uterine inertia. Vertical spikes (c) indicate abdominal efforts.



**Figure 4:** Empty post partum uterus.

### Veterinary Perinatal Specialties



The presence of fetal distress is reflected by sustained deceleration of the heart rates. Normal canine and feline fetal heart rates at term are from 170 to 230 beats per minute (bpm), or at least 4X the maternal heart rate. In the periparturient period the cardiac output of the fetus/neonate is mainly dependent on heart rate as the right ventricle is relatively stiff (low compliance) and the autonomic nervous system is immature (minimal inotropic response to catecholamines). Decelerations associated with uterine contractions suggest mismatch in size between the fetus and dam, or fetal malposition or malposture. Transient accelerations occur with normal fetal movement. Fetal heart rates of  $\leq 150$  to 160 bpm indicate stress. Fetuses with heart rates  $\leq 130$  bpm have poor survival if not delivered within 2 to 3 hours, and fetuses with heart rates  $\leq 100$  bpm are an indication for immediate intervention to hasten delivery (medical or surgical) before their demise.

Serial tokodynamometry in the bitch and queen permits evaluation of the progression of labor. During late term, the uterus may contract once or twice an hour before actual stage I labor is initiated. During stage I and II labor, uterine contractions vary in frequency from 0 to 12 per hour, and in strength from 15 to 40 mm Hg, with spikes up to 60 mm Hg. Contractions during active labor can last 2 to 5 minutes in duration. Recognizable patterns exist during pre labor and active (stages 1-3) labor. Aberrations in uterine contractility can be detected during monitoring. Abnormal, dysfunctional labor patterns can be weak or prolonged, and often are associated with fetal distress. Additionally, the completion of labor (or lack thereof) can be evaluated via tokodynamometry.

### Treatment

The use of uterine and fetal monitors allows the veterinary clinician to detect and monitor labor, as well as manage labor medically or surgically with insight instead of guesswork. At Guide Dogs for the Blind, inc., the overall stillbirth rate declined from

9.2% to 2.5% with incorporation of uterine and fetal monitoring into the whelping process. Medical therapy for dystocia, based on the administration of oxytocin and calcium gluconate, can be directed and tailored based on the results of monitoring. Generally, the administration of oxytocin increases the frequency of uterine contractions, while the administration of calcium increases their strength. Oxytocin, 10 USP u/ml (American Pharmaceutical Partners Inc., Los Angeles, California, USA) is effective at mini doses, starting with 0.25 units SC or IM to a maximum dose of 4 units per bitch or queen. Higher doses of oxytocin or intravenous boluses can cause tetanic, ineffective uterine contractions that can further compromise fetal oxygen supply by placental compression. The frequency of oxytocin administration is dictated by the labor pattern, and it is generally not given more frequently than hourly. Calcium gluconate 10% solution with 0.465 mEq Ca<sup>++</sup>/ml (Fujisawa Inc., USA) is given SC at 1 ml/5.5 kg BW as indicated by the strength of uterine contractions, generally no more frequently than every 4-6 hours. Calcium is given before oxytocin in most cases, improving contraction strength before increasing frequency. Additionally, the action of oxytocin appears to be improved when given 15 minutes subsequent to calcium. Most bitches/queens are eucalcemic, suggesting that the benefit of calcium administration is at a cellular or subcellular level.

Surgical intervention (cesarean section) is indicated if a bitch or queen fails to respond to medical management, or if fetal distress is evidenced despite adequate to increased uterine contractility (suggesting mismatch of maternal birth canal to fetal size, or fetal malposition or malposture incompatible with vaginal delivery), or if aberrant contractile patterns are noted by uterine monitoring. Well orchestrated cesarean sections result when anesthetic and neonatal resuscitative protocols are established and coordinated, and the preoperative preparation of the dam optimized.

<sup>a</sup> VPI - Veterinary Perinatal Specialties Inc., 9111 W. 38<sup>th</sup> Ave., Wheat Ridge, CO 80033, USA (303)423 3429 Fax: (303) 423 8242 email wlpwise@aol.com

## References

1. Davidson AP: Obstetrical monitoring in dogs. *Vet Med* 6: 508, 2003.

## NEUTROFILI E LORO FUNZIONE NELLE PATOLOGIE RIPRODUTTIVE: METODICHE E DATI PRELIMINARI NELLA BOVINA

Ricci A., <sup>1</sup>Galvao K.N., <sup>1</sup>Brittin S.B., <sup>1</sup>Fajblat M., Vincenti L., <sup>1</sup>Gilbert R.,  
*Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Facoltà di  
Medicina Veterinaria;* <sup>1</sup>*Department of Animal Science, Cornell University, School of  
Veterinary Medicine, Ithaca, NY.*

**Parole chiave:** NEB, PMN, citologia, endometrite subclinica

**RIASSUNTO** - Sono state osservate associazioni tra l'insorgenza di patologie metaboliche e infettive e decremento delle capacità chemotattiche e battericide dei leucociti durante il periodo di transizione. Su 555 bovine di razza Frisona, nell'area di New York, è stato eseguito un flushing uterino al giorno 21, 35, 49 e successiva citologia (DIFF QUICK). I neutrofili (PMN) già a 35-49 DIM presentano correlazione significativa con la metrite subclinica ( $P=0,0,8$ ) e il cut off è stato fissato al 3% PMN. Per i soggetti con percentuale di PMN  $>3\%$  il periodo parto concepimento aumentava (151 gg Vs 121 gg) a 35 DIM, (159 gg vs 131 gg) a 49 DIM. I macrofagi a 49 DIM sono correlati positivamente con la metrite subclinica ( $P=0,04$ ), mentre i linfociti non sono utilizzabili come indicatore di patologia ( $P>0,15$ ).

**INTRODUZIONE** - Nelle bovine lo sviluppo e la persistenza di patologie uterine dipendono da molte cause esogene quali inadeguata alimentazione, errori manageriali, cattiva igiene al parto, ma anche da imperfetta attivazione dei meccanismi di difesa immunitaria. Questo aspetto ha stimolato l'interesse e ricerche sempre più approfondite riguardo la funzionalità immunitaria soprattutto nel periodo di transizione e nel primo periparto.

Il periodo di transizione (3 settimane prima e 3 settimane dopo il parto) è uno dei periodi più delicati di tutto il ciclo produttivo/riproduttivo della vacca: in questo periodo infatti, si può riscontrare la maggior incidenza di patologie infettive – podoflemmatiti, metriti, mastiti – e metaboliche - ketosi, acidosi, lipidosi epatica<sup>1</sup>.

Questa fase generalmente è caratterizzata da uno stato di bilancio energetico negativo (NEB) nel quale si può riscontrare ipoglicemia e iperlipidemia generale, si ha inoltre una diminuzione delle capacità ossidative del fegato con accumulo di trigliceridi a livello epatico e successivo aumento di corpi chetonici con susseguente ketosi e eventuale dislocazione di abomaso.

Sono state osservate associazioni tra l'insorgenza di patologie metaboliche e decremento delle capacità chemotattiche e battericide dei leucociti, che espongono gli animali a maggior rischio di contrarre patologie.

I leucociti possono manifestare delle alterazioni nella loro funzionalità: nei soggetti nei quali l'immunodepressione è più marcata, si sviluppano spesso patologie di tipo infettivo (metriti e mastiti).

Le capacità immunitarie dei neutrofili o polimorfonucleati (PMN) diminuiscono già 3-5 settimane prima del parto, raggiungono il valore minimo tra il parto e 1 settimana dal parto per poi risalire lentamente 2-4 settimane dopo il parto<sup>2</sup>

I PMN sono i primi ad intervenire nel momento in cui si verifica un'infezione, sono i più veloci ad essere reclutati localmente dal circolo ematico e i più veloci ad intervenire localmente nel focolaio di infiammazione, sono spesso definiti come “ la prima linea di difesa immunitaria”<sup>3</sup>.

Queste caratteristiche permettono quindi di giustificare alcuni fenomeni fisiologici, quali il reclutamento nelle caruncole uterine di PMN che favoriscono il distacco della placenta e di risposta immunitaria.

Nel caso di patologie riproduttive è stato osservato che localmente, nei tessuti colpiti da infiammazione, è sempre presente un consistente numero di PMN, determinato alla forte produzione di sostanze chemotattiche - interleuchine e interferone - che richiamano queste cellule localmente nei tessuti<sup>3,4</sup>.

Ciò ha permesso la possibilità di utilizzare l'individuazione dei PMN nei tessuti come indicatore (tramite dei valori precisi di cut off) di patologie anche sub-cliniche, dove cioè mancano le manifestazioni conclamate, oppure come marker precoce di predisposizione allo svilupparsi della patologia, divenendo un sistema di screening e di diagnosi precoce. A livello sistemico, tramite prelievo ematico e valutazione della conta leucocitaria totale con camera di New Bauer, o tramite un leucogramma con colorazione su vetrino, si possono verificare le condizioni generali di un soggetto.

Soltanto tramite l'isolamento dei leucociti dal sangue si può analizzare con precisione la funzionalità di queste cellule e la capacità di risposta immunitaria. Si può quindi ricorrere all'isolamento dei PMN dal sangue prelevato con EDTA dalla vena giugulare: tramite centrifugazione (1000 giri per 30 min), eliminazione di plasma e del buffy coat, seguite da varie fasi di lisi con soluzione ipotonica e successive centrifugazioni 300 giri per 10 min., con risospensione in soluzione isotonica (PBS, HBSS) e aggiustamento a concentrazione finale di  $5-10 \times 10^6$  di PMN/ml.

In questo modo si possono analizzare per esempio, l'attività battericida (attività mileoperossidativa e riduzione del citocromo c), fagocitaria e la capacità di immagazzinare glucosio ecc.

I PMN vengono richiamati localmente solo nel momento in cui è attivo un focolaio infiammatorio, divenendo reperibili a livello tissutale o mucosale ed evidenziabili tramite tamponi, cito-brush, flushing<sup>4</sup>: Tramite esame citologico si può determinare l'esatta percentuale di PMN presenti in quell'organo, ciò consente di fornire un parametro diagnostico rilevante, soprattutto nel caso di forme subcliniche.<sup>4</sup>

E' stato evidenziato che al momento del parto la percentuale di PMN nell'utero aumenta notevolmente per poi diminuire drasticamente già il giorno successivo al parto.

L'obiettivo del lavoro descritto è definire un valore di cut-off del valore di PMN per diagnosticare l'endometrite subclinica in differenti periodi di lattazione.

**MATERIALI E METODI** - Sono state arruolate nell'esperimento 555 bovine di razza Frisona, ripartite in 7 differenti allevamenti, situati nell'area di New York. Per ogni soggetto è stato eseguito un flushing uterino al giorno 21, 35, 49 post parto tramite un catetere monouso collegato ad una siringa da 60ml. Per ogni soggetto venivano utilizzati almeno 30 ml di soluzione salina, il liquido era introdotto per via trans cervicale nell'utero ed era recuperato dopo massaggio trans rettale nella medesima siringa che veniva sigillata ed identificata. I campioni erano conservati a temperatura ambiente fino all'arrivo in laboratorio dove veniva citocentrifugato: il sedimento era posto su vetrini che poi erano fissati e colorati con colorante eosina e tiazina fosfato (Diff Quick). Sui vetrini, osservati al microscopio (40x) è stata calcolata la proporzione dei leucociti su 200 cellule contate, includendo anche cellule epiteliali ma escludendo gli eritrociti.

E' stata utilizzata una ROC per definire il cut-off a 21-35-49 DIM per linfociti, i macrofagi e neutrofili per predire gravidanza a 150 DIM e il tempo parto-concepimento è stato valutato usando la Kaplan-Meier survival Analysis.

In 382 soggetti, di cui è stato possibile reperire anamnesi completa, è stato applicato il modello di COX per la survival analysis che ha fornito le correlazioni con l'endometrite subclinica.

**RISULTATI** - La presenza di PMN a 35-49 post-parto è un indicatore attendibile di gravidanza a 150 DIM ( $P=0,08$ ) ed endometrite subclinica ed il cut-off è stato riscontrato essere del 3% PMN su 200 cellule contate.

Nei soggetti con percentuale di PMN  $>3\%$  il periodo parto concepimento aumentava (151 gg vs 121 gg) a 35 DIM, (159 gg vs 131 gg) a 49 DIM. La presenza di un solo macrofago a 49 DIM, si è rivelato un indicatore significativo ( $P=0,04$ ) di gravidanza a 150 DIM, così come di endometrite subclinica.

L'analisi evidenzia che i linfociti non sono correlati a gravidanza a 150 DIM, così come non sono indicatori di endometrite subclinica ( $P>0,15$ ).

**DISCUSSIONE** - A 21 giorni la presenza di nessun tipo leucitario è risultata correlata a gravidanza a 150 DIM né ad endometrite subclinica, la presenza di macrofagi fino a 35 DIM e di linfociti in generale non sono risultate correlate né ad endometrite subclinica né a gravidanza a 150 DIM e il punto di cut-off è stato fissato al 3% PMN a 35-49 DIM la sola presenza di un macrofago a 49 DIM è invece risultata significativa ( $P=0,04$ ).

Il parametro costituito dalla presenza o meno di anche solo un macrofago per definire la positività ad endometrite subclinica è ancora discusso, i dati però sembrano dimostrare la correlazione tra la presenza di macrofagi a 49 DIM e allungamento del parto concepimento, ma anche a maggiore esposizione al rischio di patologia, al contrario invece per i PMN tra i 35-49 DIM, i dati dimostrano correlazione tra allungamento parto concepimento con un cut-off del 3%. Alcuni autori<sup>5</sup> hanno osservato una correlazione tra diminuzione dell'attività battericida dei PMN nel sangue e la percentuale di PMN fagocitari nei tessuti con infiammazione. È inoltre riportato come una diminuzione della capacità ossidativa dei polimorfonucleati nel sangue nella prima settimana sia un importante indicatore - significativamente correlato - con il rischio di endometrite nel primo postparto, ma rileva anche che un incremento postparto di PMN in ambiente intrauterino - soprattutto nel fluido intrauterino - in quelle vacche con risoluzione spontanea. Sono ora in corso studi riguardanti la capacità di immagazzinamento del glicogeno nei PMN e la diminuzione dell'attività chemotattica, battericida in animali che sviluppano metrite rispetto ai sani.

Come noto infatti, i polimorfonucleati utilizzano la glicolisi anaerobia per attuare le principali funzioni immunitarie e nel periodo di NEB gli animali sono soggetti a forte

## NEUTROFILES AND THEIR FUNCTION IN THE REPRODUCTIVE PATOLOGIES: METHODS AND PRELIMINARY DATA IN BOVINE

**Ricci A., <sup>1</sup>Galvao K.N., <sup>1</sup>Brittin S.B., <sup>1</sup>Fajblat M., Vincenti L., <sup>1</sup>Gilbert R.,**  
*Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Turin, Via Leonardo da Vinci, 44, 10095, Grugliasco, Italy: <sup>1</sup>Department of Animal Science, Cornell University, School of Veterinary Medicine, Ithaca, NY. Corresponding author: leila.vincenti@unit.it*

**Key words:** NEB, PMN, cytology, subclinical endometritis

In bovine the development and persistency of uterine pathologies is related to many causes – feeding or management mistakes, inadequate hygiene at partum – or due to detrimental immunological activity.

The transition period (3 weeks before and 3 weeks after calving) is a critical moment in determining the healthy of dairy cows, in this period. As a matter of fact, the incidence of infective pathologies (podophlegmatitis, metritis, mastitis) and metabolic diseases (ketosis, acidosis, fatty liver) is high.

During this period, the cow is in a Negative Energy Balance (NEB) situation characterized by hypoglycemia, hyperlipidemia and decreasing of the oxidative liver with augmented levels of triglyceride with ketosis, acidosis, and occasionally abomasum displacement.

Relations have been observed from metabolic disease with decrease in leukocyte chemotactil and bactericidal ability. The bovine PMN function begins to decline 3-5 weeks prior to parturition, reaches a nadir between calving and one week postpartum, and slowly returns to peripartum levels 2-4 weeks postpartum.

PMNs (or neutrophils) are the “first defence line”; they are recruited easily and quickly from the blood during inflammation. This sheds light on such physiological and infectious phenomena as the detachment of the placenta at partum or the recruitment of PMNs in the uterus in metritis. This raises the possibility of using PMNs as a predictive marker in subclinical pathologies (defining the critical cut-off point) or to predict a critical disease. PMNs can also be isolated to obtain information about phagocytosis or oxidative burst ability or to analyse other parameters in the cells. PMNs are recruited in the inflammation area, so other techniques can be used such as biopsy, cytobrush or uterine flushing to confirm the type and number of leucocytes in the inflamed tissue.

The objective of the present study was to define cut-off points for subclinical endometritis at different stages of lactation based on uterine cytology. Holstein cows (555) from 7 different herds had uterine cytology performed at 21, 35, and 49±7 days in milk (DIM)

Receiver operating characteristic (ROC) curves were performed at each time point for each leukocyte type to select the best cut-off point to predict pregnancy at 150 DIM. The proportion of neutrophils at 35 and 49 DIM tended to be a significant ( $P=0.08$ ) predictor of pregnancy and the cut-off point was 3.0% PMN in both time points. This cut-off point resulted in significant ( $P<0.01$ ) differences in time to conception at 35 DIM and in a tendency ( $P=0.10$ ) at 49 DIM. Median days to conception was longer for cows with more than 3% PMN both at 35 DIM (151 vs 121 d) and at 49 DIM (159 vs 131 d). The mere presence of one macrophage was a significant ( $P=0.04$ ) predictor at 49 DIM.

We infer from these data that leukocytes at 21 DIM, macrophages at 35 DIM, and lymphocytes at any stage are not diagnostic for subclinical endometritis and that the cut-off point for diagnosing subclinical endometritis should be 3% PMN at 35 and 49 DIM or the presence of LMN at 49 DIM.

## EFFETTI IN VITRO DELL'hCG SULLA CONTRATTILITÀ DEL FOLLICOLO OVARICO NELLA SPECIE BOVINA

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

**Parole chiave:** Contrattilità, Follicolo, Ovulazione, hCG, Bovina

**RIASSUNTO** - In questa sperimentazione abbiamo voluto indagare, *in vitro*, se l'hCG svolga la sua azione farmacologica anche attraverso un'azione diretta sulla contrattilità della parete follicolare, favorendo la deiscenza del follicolo ovarico. La somministrazione di hCG ha aumentato la contrattilità di strip di follicoli in fase preovulatoria e di follicoli in fase luteale. I risultati di questa sperimentazione, fanno luce su un nuovo aspetto dell'attività farmacologica dell'hCG, suggerendo un coinvolgimento diretto nei meccanismi che regolano la contrattilità ovarica.

**INTRODUZIONE** - Le gonadotropine, *Luteinizing Hormone* (LH) e *human chorionic gonadotropin* (hCG), derivano dalla famiglia degli ormoni glicoproteici e posseggono due differenti subunità:  $\alpha$  e  $\beta$ . Le subunità  $\beta$  di LH e hCG sono simili ad eccezione di 30 aminoacidi addizionali al terminale carbossilico dell'hCG<sup>1</sup>. I recettori per l'LH, LH-Rs, appartengono alla famiglia dei "*G-coupled receptors*"<sup>2</sup>. Non ci sono recettori specifici per l'hCG, che si lega agli LH-Rs con un'affinità maggiore<sup>3</sup>. Studi *in vitro* hanno dimostrato che le cellule muscolari lisce della teca esterna dell'ovaio bovino sono innervate da fibre adrenergiche, che si intensificano ulteriormente nel corso dello sviluppo follicolare, in coincidenza con una maggiore contrattilità della parete, al momento dell'ovulazione<sup>4</sup>. La contrattilità della parete sarebbe determinata principalmente dalla norepinefrina (NE), attraverso l'attivazione dei recettori  $\alpha$ -adrenergici<sup>5</sup>. Al contrario, la stimolazione dei recettori  $\beta_2$ -adrenergici determina un rilassamento della muscolatura liscia, attraverso l'attivazione dell'adenilato ciclasi e conseguente produzione di AMP ciclico (cAMP)<sup>6,7</sup>. E' stato evidenziato che l'LH aumenta, *in vitro*, la contrattilità delle tube bovine, in parte attraverso l'incremento del rilascio locale di prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> )<sup>8</sup>. Inoltre, l'hCG è in grado di aumentare la sintesi di prostaglandine attraverso l'induzione della Prostaglandin G/H sintasi-2 (PGHS-2) in follicoli preovulatori bovini<sup>9</sup>. Pertanto ci proponiamo di verificare se l'hCG svolga la sua azione farmacologica anche attraverso un'azione diretta sulla contrattilità della parete follicolare, favorendo la deiscenza del follicolo ovarico.

**MATERIALI E METODI** - Venti apparati genitali sono stati ottenuti da bovine abbattute presso un mattatoio locale. La fase del ciclo estrale e l'attività ovarica sono state determinate, *ante mortem*, attraverso l'esame clinico e l'esplorazione rettale. Un campione di sangue, prelevato dalla vena coccigea di ciascuna bovina, è stato centrifugato a 1600xg per 10 minuti. Il siero così ottenuto è stato stoccato a -20° C per il dosaggio del progesterone, al fine di confermare la fase del ciclo. La determinazione quantitativa della concentrazione del progesterone sierico (P<sub>4</sub>) è stata ottenuta con metodo colorimetrico immunoenzimatico competitivo (Vidas<sup>®</sup> Progesterone-Bio Meriaux SA, Lyon, France; sensibilità 0,05 ng/mL; specificità 100%). Dopo l'abbattimento degli animali il tratto genitale e le strutture ovariche funzionanti sono state visualizzate per confermare la fase del ciclo estrale come descritto da Arthur e coll.<sup>10</sup> I campioni di tessuto ovarico utilizzati nella sperimentazione sono stati prelevati esclusivamente da animali con tratto genitale sano. Il tempo intercorrente tra la macellazione e il prelievo dell'apparato genitale è stato di circa 20 minuti. Le ovaie



sono state immediatamente poste in un recipiente contenente soluzione di Krebs modificata refrigerata (4°C) e trasferite nel nostro laboratorio in circa 30 min. Strip a tutto spessore (4-5 mm.) sono stati preparati dalla parete follicolare ovarica, secondo il metodo descritto in precedenti studi<sup>11</sup>, sia da vacche in fase preovulatoria che da vacche in fase luteale. Gli strip follicolari sono stati immediatamente posizionati in due bagni d'organo (mod. 4050 Ugo Basile, Milano, Italia) contenenti soluzione di Krebs (NaCl 113 mM, KCl 4,8 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucosio 5,5 mM, ascorbato di sodio 5,5 mM) a pH 7,4. Gli strip sono stati sospesi tra due uncini paralleli e connessi ad un trasduttore isometrico (mod. 7003, mod. 7004, Ugo Basile), sottoposti alla tensione di 1g e lasciati equilibrare per 60 minuti. Il bagno è stato mantenuto alla temperatura di 37°C e continuamente carbossigenato con una miscela di 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Durante il periodo di stabilizzazione, è stata registrata la contrattilità spontanea con un poligrafo unirecord (mod. 7050, Ugo Basile) e con un registratore digitale (mod. 17400, Ugo Basile) connesso ad un computer (software Data Capsule cat. 17400, Ugo Basile). Dopo il periodo di stabilizzazione i preparati sono stati esposti a dosi cumulative (0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, I.U.) di hCG (Sigma, Milano-Italia) per un periodo di 20 minuti, partendo da concentrazioni di LH già testate *in vitro* su miometrio di donna<sup>12</sup> e su tube di bovina<sup>8</sup>. Nel protocollo sperimentale sono stati utilizzati 6 strip di follicoli in fase luteale (diametro 7-15 mm., presenza di corpo luteo e P<sub>4</sub> >1 ng/m) e 6 strip in fase preovulatoria (diametro 17-20 mm., presenza di corpo luteo in regressione, P<sub>4</sub> <1 ng/ml.) che avevano mostrato contrazioni spontanee durante il periodo di stabilizzazione, focalizzando l'attenzione su concentrazioni di hCG (1, 5, 10, 15, 20, U.I.) efficaci in prove preliminari. Al termine di ogni esperimento è stato effettuato un lavaggio degli strip. Le risposte contrattili sono state espresse come incrementi o decrementi della tensione sviluppata dagli strip in condizioni isometriche e della frequenza di contrazione nell'unità di tempo, rispetto all'attività contrattile spontanea. I valori medi di tensione (misurati in grammi) e la frequenza media delle contrazioni (n° di picchi/20 minuti) sono stati valutati per periodi di 20 minuti prima (base) e dopo l'applicazione dell'hCG. I valori sperimentali sono stati espressi come media ± SEM e sottoposti ad analisi statistica con ANOVA ad una via e *Tukey's Multiple comparison test*. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per p<0,05.

**RISULTATI** - I follicoli in fase luteale, hanno esibito motilità spontanea caratterizzata da ampiezza ridotta e bassa frequenza (fig. 1).

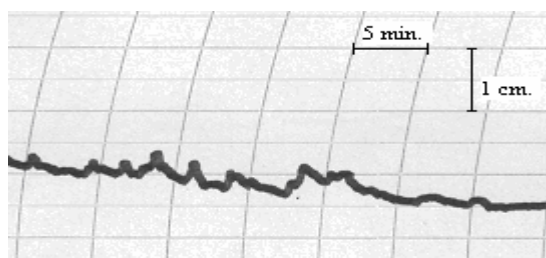


Fig. 1 - Tracciato originale: motilità spontanea in strip di parete di follicolo in fase luteale.

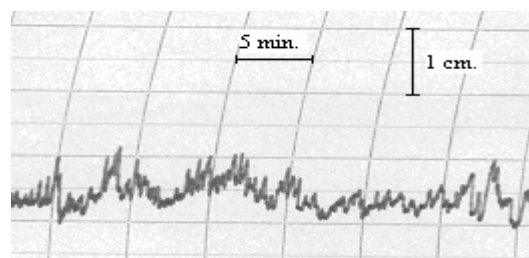


Fig. 2 - Tracciato originale: motilità spontanea in strip di parete di follicolo preovulatorio.

Al contrario i follicoli in fase preovulatoria hanno esibito contrattilità spontanea, contrassegnata da ampiezza e frequenza maggiori (fig. 2). La somministrazione di hCG (1, 5, 10, 15, 20, I.U.) ha aumentato l'ampiezza delle contrazioni, in maniera non concentrazione dipendente, sia nei follicoli in fase luteale (fig. 3; tab. 1) che nei follicoli in fase preovulatoria (fig.4; tab.1), mentre non ne ha modificato la frequenza (tab. 2). L'attività dell'hCG (10, 15, 20, U.I.) è stata significativamente maggiore nella fase preovulatoria rispetto alla luteale (tab. 1).

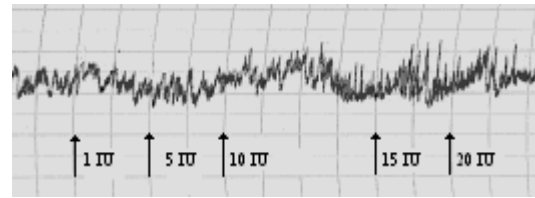
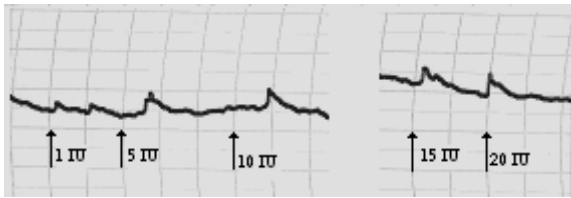


Fig. 3 - Strip di follicolo in fase luteale: effetti dell'hCG

Fig. 4 - Strip di follicolo preovulatorio: effetti dell'hCG

Tab. 1 - Valori medi di tensione dell'attività contrattile di follicoli in fase preovulatoria e in fase luteale. Confronto statistico dei valori ottenuti prima (base) e dopo la somministrazione di hCG. I dati sono espressi come media±S.E.M. (n = 6).

Fasi del ciclo estrale	Tensione di base (g)	Tensione media				
		Tensione hCG (gr)				
		1 U.I.	5 U.I.	10 U.I.	15 U.I.	20 U.I.
Follicoli in fase preovulatoria	0,09±0,02 <sup>c,g</sup>	0,09±0,02 <sup>c,g</sup>	0,11±0,02 <sup>a,e</sup>	0,19±0,02 <sup>A,b,d</sup>	0,2±0,02 <sup>A,d,f</sup>	0,21±0,02 <sup>oA,f,h</sup>
Follicoli in fase luteale	0,08±0,003 <sup>c,g</sup>	0,09±0,003 <sup>a,c,e</sup>	0,14±0,01 <sup>d</sup>	0,14±0,01 <sup>B,b,d</sup>	0,15±0,01 <sup>B,f,h</sup>	0,15±0,01 <sup>B,f,h</sup>

Sulla riga: a≠b: p<0,05; c; e≠f: p<0,01; g≠h: p<0,001. In colonna: A≠B: p<0,05.

Tab. 2 - Valori medi di frequenza dell'attività contrattile di follicoli in fase preovulatoria e in fase luteale. Confronto statistico dei valori ottenuti prima (base) e dopo la somministrazione di hCG. I dati sono espressi come media ± S.E.M. (n = 6).

Fasi del ciclo estrale	Frequenza di base (n° picchi /20')	Frequenza media				
		Frequenza hCG (n° picchi /20')				
		1 I.U.	5 I.U.	10 I.U.	15 I.U.	20 I.U.
Follicoli in fase preovulatoria	11,67±1,38	13±2,22	14±3,18	15,33±2,23	14±2,53	16±3,18
Follicoli in fase luteale	9,33±2,56	11±1,93	11,33±2,11	12,67±2,01	12,67±1,73	13,67±2,2

**DISCUSSIONE** - La contrattilità follicolare potrebbe contribuire alla deiscenza del follicolo ovarico al momento dell'ovulazione come si evince dai tracciati relativi alla diversa motilità spontanea dei follicoli in fase preovulatoria e di quelli in fase luteale. I risultati di questa sperimentazione suggeriscono un ruolo dell'hCG anche nei meccanismi che regolano la contrattilità ovarica. L'aumento della contrattilità follicolare hCG-indotta potrebbe essere mediata in parte dalla secrezione locale di PGF<sub>2α</sub> come già evidenziato da altri autori<sup>7</sup>, a livello di tube. La maggiore attività dell'hCG nei follicoli preovulatori potrebbe essere il risultato della maggiore induzione della PGHS-2, prima dell'ovulazione.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Pierce J.G., Parsons T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 466-495 (1981). 2. Catt K. and Dufau M.L. Gonadotropic hormones: biosynthesis secretion, receptors and actions. In Yen and RB Jaffe EDS., *Reproductive Endocrinology* pp 105-155, Saunders Philadelphia (1991). 3. Huhtaniemi I.T. and Catt K.J. Differential binding affinities of rat testis luteinizing hormone (LH) receptors for human chorionic gonadotropin, human LH and ovine LH. *Endocrinol* 108:1931-1938 (1981). 4. Morimoto K. et al. The adrenergic nerve supply to bovine ovarian follicles. *Int. J. Fertil.* 26 (1):14-9 (1981). 5. Wallis B., Owman C., Sjöberg N.O. Contraction of the ovarian follicle induced by local stimulation of its sympathetic nerves. *Brain Res. Bull.* 9 (1-6): 757-760 (1982). 6. Di Giovanni L., Austin R., Philippe M. Steroid hormone modulation of AMPc production in response to β-adrenergic receptors stimulation in genital tract myocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28A: 509-514 (1992). 7. Cosola C., Minoia R., Rizzo A., Sciorci R.L. Attività in vitro del carazololo su strips di cisti follicolari bovine. *Atti 3° Congresso S.I.R.A.* 28-30 aprile Roma, 68-72 (2005). 8. Wijayagunawardane M.P.B. et al. In vitro regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. *J Endocrinol* 168, 117–130 (2001). 9. Sirois J. Induction of prostaglandine endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinol* 135:84-848 (1994). 10. Arthur G.H., Noakes D.E., Pearson H., Parkinson T.J. *Veterinary Reproduction and Obstetrics (7th ed.)*, W.B. Saunders, London, pp. 17–30 (1996). 11. Wallis B., Edvinsson L., Owman C., Sjöberg N.O. and Svensson K-G. Mechanical response in the wall of ovarian follicles mediated by adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1, 460-473 (1974). 12. Doheny et al., Human Chorionic Gonadotrophin Relaxation of Human Pregnant Myometrium and Activation of the BKCa Channel. *J Clin Endocrinol Metab* 88(9):4310–4315 (2007).

## IN VITRO EFFECTS OF hCG ON BOVINE OVARIAN FOLLICULAR CONTRACTILITY

Cosola C., Rizzo A., Minoia G., Spedicato M., Trisolini C., Mutinati M., Roscino M.T., Punzi S., Pantaleo M., Sciorsci R.L., *Department of Animal Production, University of Bari, Italy. Corresponding author: r.sciorsci@veterinaria.uniba.it*

**Key words:** Contractility, Follicle, hCG, bovine

The gonadotropins, *Luteinizing Hormone* (LH), and *human chorionic gonadotropin* (hCG), belong to the family of glycoprotein hormones. There are no specific receptors for hCG, which binds to the LH receptors, LH-Rs. LH has been shown to increase the contraction of the bovine oviduct, at least in part, as it promotes prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) release<sup>1</sup>. Moreover, hCG stimulates the secretion of  $PgF_{2\alpha}$  in bovine preovulatory follicles as it induces Prostaglandin G/H synthase-2 (PGHS-2)<sup>2</sup>. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of hCG on the contractility of the ovarian follicular wall, during estrus and diestrus and its role as mechanical factor involved in ovulation. Twenty uteri were obtained from cows slaughtered at a local abattoir. The phases of the estrous cycle and ovarian activity were determined by clinical examination, *ante mortem* and evaluating the aspect of the ovaries, *post mortem*. The phases were confirmed by quantitative determination of serum progesterone ( $P_4$ ) concentration (Vidas<sup>®</sup> Progesterone-Bio Meriaux A, Lyon, France; sensitivity 0.05 ng/mL; specificity 100%). Full-thickness strips (4-5 mm.) were cut from the follicular wall of ovaries, from cows with a healthy genital tract. Six follicular strips in luteal stage and six follicular strips in preovulatory stage were placed in two jacketed organ baths (mod. 4050 Ugo Basile, Italy) containing Krebs' solution. The strips were suspended between parallel hooks and connected to an isometric force transducer (mod. 7003, mod. 7004, Ugo Basile, Italy), balanced with 1g loading and allowed to equilibrate for 60 minutes at 37°C, with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Spontaneous contractility was recorded with an unirecord polygraph (mod. 7050, Ugo Basile) and with a digital recorder (mod. 17400, Ugo Basile) connected to a computer (software Data Capsule cat. 17400, Ugo Basile). The strips were exposed to cumulative doses (1, 5, 10, 15, 20, I.U.) of hCG, (Sigma-Aldrich, Italy) for 20-minute periods and then underwent a wash out. The mean values of tension (grams) and frequency (number of peaks/20 minutes) of contractions were evaluated for 20-minute periods, both before (base) and after hCG application. Values were expressed as mean  $\pm$  SEM and evaluated for statistical significance with one way ANOVA and Tukey's Multiple comparison test, and were considered statistically significant for  $p < 0.05$ . hCG increased the amplitude of follicular contractions, not dose-dependently, both in the luteal and the preovulatory phase. This effect was higher ( $p < 0.05$ ) in the preovulatory phase.

These results suggest a role for hCG in the control of follicular contractility at ovulation. The increase of follicular contractility may be due, in part, to PGHS-2 induction and  $PGF_{2\alpha}$  release, activities abundantly evident in preovulatory follicles.

**References - 1.** Wijayagunawardane M. P. B. et al. In vitro regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. *J Endocrinol* 168, 117–130 (2001). **2.** Sirois J. Induction of prostaglandine endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinol* 135:84-848 (1994).

## CALCEMIA, FOSFATEMIA E MAGNESEMIA DURANTE LA FASE DI TRANSIZIONE DELLA BOVINA DA LATTE AD ALTA PRODUZIONE. IMPLICAZIONI SULL'ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA

**Esposito L.,<sup>1</sup> Macchia G.,<sup>1</sup> Toce V., Di Trana A., Boni R.,** *Dipartimento di Scienze delle Produzioni Animali, Università della Basilicata;* <sup>1</sup>*Associazione Prov. Allevatori (APA), PZ.*

**Parole Chiave:** Bovine, periparto, calcemia, fosfatemia, magnesemia

**RIASSUNTO** - In bovine lattifere ad alta produzione sono stati analizzati durante il periparto alcuni parametri produttivi e riproduttivi e i livelli plasmatici di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  e  $\text{Mg}^+$ . Gli animali, allevati in 2 aziende vicine, presentavano simile efficienza produttiva ma diversa efficienza riproduttiva. Le bovine dell'azienda A erano in gran parte caratterizzate da lenta ripresa riproduttiva *postpartum*, con utero ipotensivo ed ipotrofia ovarica ad un mese dal parto; situazione opposta era rilevata nell'azienda B. La calcemia dei soggetti dell'azienda B è risultata più elevata sia una settimana prima ( $10,2 \pm 0,5$  vs  $8,1 \pm 0,5$  mg/dl;  $P < 0,01$ ) e sia una settimana dopo ( $10,1 \pm 0,5$  vs  $7,6 \pm 0,5$  mg/dl;  $P < 0,01$ ) il parto. Stesso andamento è stato osservato per la magnesemia. La fosfatemia nelle bovine dell'azienda B è risultata inferiore ( $5,6 \pm 0,4$  vs  $6,8 \pm 0,3$  mg/dl;  $P < 0,01$ ) due settimane *antepartum* divenendo superiore ( $5,5 \pm 0,4$  vs  $4,1 \pm 0,4$  mg/dl;  $P < 0,01$ ) nella 1<sup>a</sup> settimana *postpartum*.

**INTRODUZIONE** - Il ritardo dell'involuzione uterina rappresenta una delle principali problematiche del *postpartum* della bovina da latte. Tale condizione è talora associata allo sviluppo di fenomeni patologici che compromettono la sanità dell'animale con un inevitabile allungamento dell'intervallo interparto. Al determinismo della ritardata involuzione uterina contribuiscono numerosi fattori tra i quali squilibri ormonali ed effetti ambientali assumono un ruolo primario. Squilibri del ricambio minerale possono essere variamente coinvolti nei meccanismi di involuzione uterina *postpartum*<sup>1</sup>. È noto il ruolo svolto dal calcio nei meccanismi di contrazione muscolare; le modificazioni dell'omeostasi di questo ione, assieme al fosforo e magnesio, durante il periodo di transizione assumono un ruolo chiave nella patogenesi del collasso puerperale nella bovina. A livello molecolare, inoltre, lo ione calcio costituisce il secondo messaggero di numerosi segnali di natura ormonale, di processi enzimatici, interviene nel meccanismo di maturazione dell'ovocita e di fecondazione, nei processi apoptotici, etc.<sup>2</sup>. Studi specifici sul ruolo dei macroelementi sulla ripresa dell'attività riproduttiva *postpartum* sono limitati in letteratura. Campanile et al.<sup>3</sup> osservarono in bufale sottoposte ad un'integrazione di fosfato tricalcico durante l'asciutta una minore incidenza di prolasso uterino. Nella patogenesi di tale tecnopatia veniva rilevato un marcato calo della calcemia e della magnesemia durante la fase di transizione, con conseguente alterazione dell'eccitabilità muscolare e atonia dell'organo. L'integrazione alimentare con fosfato tricalcico durante l'asciutta, produsse un aumento significativo della calcemia, riducendo sensibilmente l'incidenza di tale patologia. Nella bovina, Kamgarpour et al.<sup>4</sup> valutarono l'incidenza dell'ipocalcemia subclinica nelle prime settimane *postpartum* sia durante la stagione invernale che estiva. L'incidenza di tale fenomeno risultò quasi doppia durante l'estate. Una calcemia inferiore a 4 mg/dl nei primi 21 giorni *postpartum* era riscontrata nelle bovine con maggior peso corporeo e più elevata produzione di latte. L'involuzione uterina risultò correlata positivamente con la calcemia nei primi 30 giorni *postpartum*. Inoltre, nei soggetti con ipocalcemia subclinica le dimensioni dei primi follicoli ovulatori ed i livelli di progesterone nel sangue periferico risultarono ridotti.

Il presente lavoro ha come obiettivo l'analisi dell'andamento dei livelli plasmatici di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  e  $\text{Mg}^+$ , durante il periparto, in bovine da latte allevate presso due aziende con una diversa anamnesi riproduttiva.

**MATERIALE E METODI** - La prova è stata condotta nel periodo compreso tra ottobre 2006 e marzo 2007 in due aziende di bovine da latte ad alta produzione site nel territorio dell'alta Val d'Agri (PZ). L'anamnesi registrava una diversa dinamica nell'involuzione uterina tra gli animali delle due aziende. In particolare, dopo 30-40 gg *postpartum*, la maggior parte delle bovine dell'azienda A presentava utero atonico, debordante la cavità pelvica; le ovaie risultavano ipotrofiche. Situazione diversa era rilevata negli animali dell'azienda B che, già a 30 gg *postpartum*, presentavano l'utero completamente involuto, tonico e alloggiato in cavità pelvica; le ovaie mostravano segni di attività ciclica. In entrambe le aziende sono stati seguiti tutti gli animali che si trovavano nel periparto durante il periodo sperimentale. Basandosi sulla diagnosi di gravidanza, gli animali sono stati sottoposti ad osservazione e prelievi a partire da 2 settimane dalla data di parto presunta. Per ciascun animale sono stati considerati i seguenti parametri: età, razza, durata della lattazione, durata dell'asciutta, latte prodotto, interparto, ordine di parto, numero di inseminazioni e diagnosi di gravidanza. Gli animali coinvolti nella prova, dieci giorni prima e dopo il parto, sono stati sottoposti ad una doppia valutazione della condizione corporea (metodo BCS) eseguita dallo stesso operatore utilizzando una scala di valori arbitrari con punteggio da 1 a 5 con intervalli di 0,25 punti, attribuendo valore 1 alle vacche emaciate e 5 alle obese. Sono stati, inoltre, raccolti dati sulle caratteristiche della razione somministrata nel corso della fase di asciutta e di lattazione. I prelievi ematici sono stati eseguiti settimanalmente dalla vena coccigea, sempre alla stessa ora (all'incirca ore 9.00), subito dopo la mungitura e prima della foraggiata, assicurando il minimo stress per l'animale. I campioni di sangue sono stati sierati, centrifugati e congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino all'analisi. I livelli serici di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  e  $\text{Mg}^+$  sono stati determinati utilizzando kits commerciali (BioSystems, Barcellona, Spagna) e un'analizzatore automatico (ARCO BT 2245). I risultati ottenuti sono stati raggruppati in funzione delle settimane dal parto (-2, -1, 0, +1, +2, +3). L'elaborazione statistica è stata svolta mediante la procedura ANOVA per misure ripetute (Systat 11.0), considerando il fattore azienda (A vs B) e, come fattore ripetuto, la distanza dal parto. Il confronto tra i periodi è stato eseguito mediante il test Least Square Differences (LSD); per il confronto tra i tassi di gravidanza è stato utilizzato il Test del  $\chi^2$ .

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Nel corso della prova sono state seguite 20 bovine di razza Frisona nell'azienda A e 17 bovine, di cui 11 di razza Frisona e 6 di razza Bruna, nell'azienda B. Ciascun gruppo risultava, inoltre, costituito da soggetti pluripari e primipari (12 vs 8 e 11 vs 6, nell'azienda A e B, rispettivamente). In entrambe le aziende, la razione assicurava la copertura dei fabbisogni energetici, proteici, vitaminici e minerali secondo il modello proposto da NRC<sup>5</sup>. Gli apporti alimentari di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  e  $\text{Mg}^+$  forniti nel periodo di asciutta, transizione e lattazione assicuravano per entrambe le aziende la copertura dei fabbisogni teorici, con lievi eccessi per la quota del fosforo. Tuttavia, nella fase di asciutta nell'azienda B si rilevava un più basso apporto di calcio rispetto all'azienda A mentre nella fase di lattazione si rilevava un'inversione di tendenza con apporti di calcio maggiori nell'azienda B. La produzione media di latte, normalizzato al 4% di grasso, mostrava differenze trascurabili tra le aziende (32,8 kg in A vs 32,2 kg in B). L'analisi dei principali parametri riproduttivi registrava nell'azienda B un interparto (420 vs 438 gg) e numero di inseminazioni/gravidanza (2,0 vs 2,8) minore dell'azienda A. Limitatamente agli animali utilizzati per la sperimentazione nell'azienda A rispetto all'azienda B, non sono emerse differenze significative sulla produzione di latte normalizzato ( $40,6 \pm 9,1$  vs  $41,9 \pm 8,5$  kg/capo) e sulla durata

dell'intervallo interparto ( $484 \pm 129$  vs  $417 \pm 59$  gg) mentre significativamente inferiore è risultata la durata dell'asciutta nelle bovine dell'azienda B ( $73 \pm 15$  vs  $49 \pm 11$  gg;  $P < 0,01$ ).

Fig. 2 - Andamento della calcemia

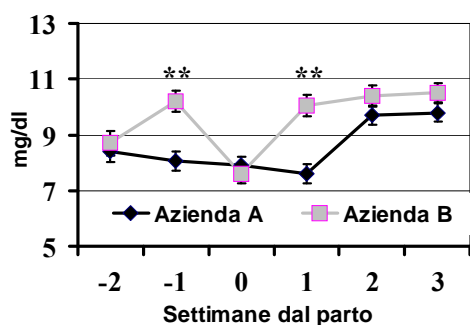
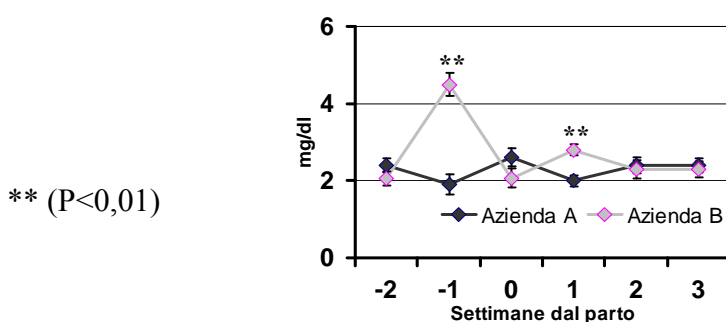
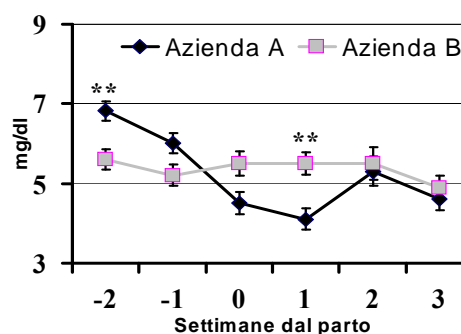


Fig. 2 - Andamento della fosfatemia



\*\* ( $P < 0,01$ )

Fig. 3 - Andamento della magnesemia

Gli animali dell'azienda A rispetto a B hanno mostrato differenze significative ( $P < 0,05$ ) del BCS in entrambi i periodi di osservazione (*antepartum*  $2,9 \pm 0,6$  vs  $3,3 \pm 0,5$ ; *postpartum*  $2,7 \pm 0,7$  vs  $3,1 \pm 0,4$ ). La fertilità, valutata come intervallo parto-1° intervento IS ( $91 \pm 40$  vs  $95 \pm 40$  gg), intervallo parto-concepimento ( $118 \pm 40$  vs  $122 \pm 41$  gg), numero di interventi inseminativi/gravidanza ( $2,1$  vs  $2,0$ ), tasso di concepimento al 1° intervento IS ( $58,8\%$  vs  $43,8\%$ ), tasso di concepimento totale ( $82,3\%$  vs  $81,2\%$ ), è risultata simile tra i due gruppi. Dall'analisi dei dati è emerso che l'età, la razza e la parità non hanno influenzato significativamente i parametri presi in esame ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  e  $\text{Mg}^{+}$ ). Gli andamenti ematici di calcio differivano invece sia tra le aziende ( $P < 0,01$ ) e sia tra gli intervalli di tempo considerati ( $P < 0,01$ ), con interazione tra i fattori considerati ( $P < 0,01$ ). Le differenze sostanziali tra gli andamenti della calcemia tra le 2 aziende (Figura 1) possono riassumersi nei maggiori livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  una settimana prima del parto nell'azienda B ( $10,2 \pm 0,5$  vs  $8,1 \pm 0,5$  mg/dl;  $P < 0,01$ ); tali andamenti si sovrappongono al momento del parto, per differenziarsi nella 1° settimana *postpartum* con valori più elevati nell'azienda B ( $10,1 \pm 0,5$  vs  $7,6 \pm 0,5$  mg/dl;  $P < 0,01$ ) e, quindi, uniformarsi successivamente. La fosfatemia (Figura 2) è risultata significativamente più bassa nell'azienda B ( $5,6 \pm 0,4$  vs  $6,8 \pm 0,3$  mg/dl;  $P < 0,01$ ) due settimane *antepartum*, portandosi la prima settimana *postpartum* a valori più elevati ( $5,5 \pm 0,4$  vs  $4,1 \pm 0,4$  mg/dl;  $P < 0,01$ ), per poi sovrapporsi a quella degli animali dell'azienda A. L'andamento della magnesemia (Figura 3) ha mostrato, similmente alla calcemia, valori superiori nell'azienda B sia una settimana *antepartum* ( $4,5 \pm 0,3$  vs  $1,9 \pm 0,3$  mg/dl;  $P < 0,01$ ) e sia una settimana *postpartum* ( $2,8 \pm 0,1$  vs  $2,0 \pm 0,1$  mg/dl;  $P < 0,01$ ). Tali risultati sono in accordo con quanto rilevato nelle bufale<sup>3</sup> e nelle bovine<sup>4</sup> e suggeriscono una relazione tra la pronta ripresa dei livelli di calcio ematico e l'involutione uterina *postpartum*. Il legame tra questi due eventi potrebbe ricondursi al ruolo svolto dal calcio nei meccanismi di contrazione muscolare e, nel caso specifico, nel ripristino della tonicità

uterina. Malgrado non sia stata evidenziata una differenza significativa nell'efficienza riproduttiva negli animali esaminati nelle 2 aziende, sono stati, tuttavia, delineati 2 distinti andamenti di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  e  $\text{Mg}^+$  nel *postpartum*, che potrebbero essere correlati alla diversa efficienza riproduttiva. Tali andamenti potrebbero dipendere dal diverso apporto alimentare dei macroelementi esaminati, dal cui rapporto deriverebbe una più o meno rapida risposta del sistema paratormone/calcitonina, ampiamente sollecitato ad inizio lattazione.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Goff J.P. Macromineral disorders of the transition cow. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20, 471-94 (2004). **2.** Boni R., Gualtieri R., Talevi R. & Tosti E. Calcium and other ion dynamics during gamete maturation and fertilization. *Theriogenology* 68 Suppl 1:S156-64 (2007). **3.** Campanile G., Di Palo R., Di Meo C. & Boni R. Effetti dell'integrazione con  $\text{P}^-$  durante l'asciutta sui livelli ematici di  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}^-$  e  $\text{Mg}^+$  nella bufala. Atti 43° Cong. SISVet, Pisa, 261-265 (1989). **4.** Kamgarpour R., Daniel R.C., Fenwick D.C., McGuigan K. & Murphy G. Postpartum subclinical hypocalcaemia and effects on ovarian function and uterine involution in a dairy herd. *Vet. J.* 158, 59-67 (1999). **5.** Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Seventh Revised Edition, NRC (2001).

## PATTERNS OF CALCIUM, PHOSPHORUS AND MAGNESIUM PLASMA CONCENTRATIONS IN HIGH PRODUCTIVE DAIRY COWS DURING TRANSITION. IMPLICATIONS ON REPRODUCTIVE ACTIVITY

Esposito L., <sup>1</sup>Macchia G., <sup>1</sup>Toce V., Di Trana A., Boni R., *Department of Animal Science, University of Basilicata. Potenza; <sup>1</sup>Breeders' Association of Potenza, Italy. Corresponding author: boni@unibas.it*

**Key Words:** Cow, transition, calcemia, phosphoremia, magnesemia

Uterine involution is one of the main concerns regarding reproductive activity in high productive dairy cows. Failures of uterine involution may be due to an imbalance of some minerals, such as calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), phosphorous ( $\text{P}_i$ ) and magnesium ( $\text{Mg}^+$ ) since: (i) calcium is involved in several biological activities, such as muscle contraction; (ii) homeostasis of these minerals is controlled by common mechanisms; (iii) homeostasis of these minerals is crucial to prevent diseases such as milk fever in cows and vaginal-uterine prolapses in buffalo; (iv) plasma levels of these minerals show dramatic changes during transition. In order to evaluate a relationship between these minerals and reproductive activity, we analyzed productive and reproductive parameters, dietary characteristics, and body condition scores together with  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  and  $\text{Mg}^+$  plasma concentrations during transition in high productive dairy cows. Animals were reared in two nearby farms with similar productive efficiency but different *postpartum* reproductive performances, i.e., cows from Farm A showed slow *postpartum* resumption associated with low uterine tonicity and ovarian activity, while cows from Farm B showed fast *postpartum* resumption associated with high uterine tonicity and ovarian activity. In addition, Farm A had a higher intercalving period (438 vs 420 d) and a higher number of inseminations per pregnancy (2.8 vs 2.0) than Farm B. Nutritional analysis did not show any relevant differences between farms; however, the diet on Farm B had a lower calcium content during the dry period and a higher calcium content during the lactation period than Farm A. A total of 37 cows were evaluated in Farm A (n=20) and Farm B (n=17). Blood was sampled once weekly from 2 weeks before presumed calving to 3 weeks after calving. Serum was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis for  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  and  $\text{Mg}^+$  content using an automatic analyzer (ARCO BT 2245) and standard kits (BioSystems, Barcelona, Spain). Data were analyzed by ANOVA for repeated measurements (Systat 11.0). Cows from Farm A showed a longer intercalving period ( $484\pm 129$  vs  $417\pm 59$  d) along with a longer dry period ( $73\pm 15$  vs  $49\pm 11$  d;  $P<0.01$ ) than Farm B cows. The body condition score of Farm A cows was lower ( $P<0.05$ ) both 1 week before calving ( $2.9\pm 0.6$  vs  $3.3\pm 0.5$ ) and 1 week after calving ( $2.7\pm 0.7$  vs  $3.1\pm 0.4$ ). There was little difference in the reproductive parameters, such as number of days open ( $118\pm 40$  vs  $122\pm 41$  d), number of inseminations/pregnancy (2.1 vs 2.0), conception rate at 1<sup>st</sup> service (58.8% vs 43.8%) and total conception rate (82.3% vs 81.2%) between the cows on Farms A and B, respectively. Calcemia was higher in Farm B than in Farm A cows at both 1 week before calving ( $10.2\pm 0.5$  vs  $8.1\pm 0.5$  mg/dl;  $P<0.01$ ) and 1 week after calving ( $10.1\pm 0.5$  vs  $7.6\pm 0.5$  mg/dl;  $P<0.01$ ). Phosphoremia in Farm B cows was lower 2 weeks before calving ( $5.6\pm 0.4$  vs  $6.8\pm 0.3$  mg/dl;  $P<0.01$ ) but became higher 1 week after calving ( $5.5\pm 0.4$  vs  $4.1\pm 0.4$  mg/dl;  $P<0.01$ ). Magnesemia pattern was similar to calcemia showing higher levels in Farm B both 1 week before calving ( $4.5\pm 0.3$  vs  $1.9\pm 0.3$  mg/dl;  $P<0.01$ ) and 1 week after calving ( $2.8\pm 0.1$  vs  $2.0\pm 0.1$  mg/dl;  $P<0.01$ ). In conclusion, cows reared in farms characterized by different fertility rates showed different patterns of calcemia, phosphoremia and magnesemia, which may be related to diets with different mineral contents. A relationship between these findings and *postpartum* uterine involution has been proposed.



## **APPLICAZIONE DELLA SINCRONIZZAZIONE DEI CICLI NELLA BOVINA DA LATTE: ESPERIENZA IN UN ALLEVAMENTO PROBLEMA DELLA PROVINCIA DI TORINO**

**Casalone M.,<sup>1</sup> Donaliso C.,<sup>2</sup> Ruta F.,<sup>1</sup> Vincenti L.,** *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova;* <sup>1</sup>*Dipartimento Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino;* <sup>2</sup>*Medico Veterinario libero professionista, Torino.*

**Parole chiave:** Bovina, Sincronizzazione, TAI, Ovsynch, Fergusson

**RIASSUNTO** - Lo studio ha verificato i risultati dell'applicazione del metodo di induzione dei cicli in una stalla della provincia di Torino di vacche da latte Frisone costituita da 155 capi adulti con performances riproduttive considerate scadenti in base a parametri analitici valutati con il Metodo Fergusson e con l'analisi di Nir. Nel periodo di applicazione del sistema alcuni parametri riproduttivi estrapolati dalla scheda Fergusson sono nettamente migliorati quali: parto/concepimento ridotto di circa 70 gg., numero di fecondazioni ridotto di un punto e passato a 2,5, CR nella finestra estrale tra i 100 e i 120 gg. del 50% con un PR del 25%. La scheda Nir invece evidenzia che alcuni punti critici - dislocazioni, metriti e chetosi - permangono, evidenziando ancora una volta la presenza di errori gestionali che dovranno essere comunque corretti.

**INTRODUZIONE** - Nell'allevamento intensivo si tendono a programmare tutti gli eventi in modo particolare: calori, fecondazioni e parti al fine di ottenere buoni risultati nella conduzione dell'allevamento con il minor impiego possibile di personale. Allo scopo possono essere utilizzati trattamenti con gonadotropine, con steroidi, con luteolitici, oppure trattamenti associati di progesterone ed agenti luteolitici. L'Ovsynch è un protocollo ormonale che sincronizza lo sviluppo follicolare, la regressione luteinica e l'ovulazione e consente quindi un'inseminazione artificiale programmata o TAI, senza la necessità di individuare l'estro. (1) Il protocollo Ovsynch è stato integrato mediante l'utilizzo della presincronizzazione che comporta due iniezioni di PGF<sub>2α</sub> somministrate a 14 giorni di distanza e facendo in modo che la seconda venga praticata 12-14 giorni prima dell'inizio dell'Ovsynch è aumentato il tasso di concepimento alla TAI di 10-12 punti rispetto all'Ovsynch (2). L'inizio di un protocollo di Ovsynch tra i giorni 5 e 12 del ciclo estrale migliora le risposte di questo trattamento nelle vacche da latte integrandosi con la fisiologia della dinamica follicolare. La presincronizzazione del ciclo estrale con iniezione di PgF<sub>2α</sub> 2 volte a 14 giorni e a 26 giorni prima dell'inizio dell'Ovsynch è stato usato come strategia per aumentare la percentuale di vacche che si trovano tra 5 e 12 del ciclo estrale all'inizio dell'Ovsynch. Questa strategia ha aumentato il pregnancy rate con timed insemination nelle vacche da latte (5). Il presente studio pertanto ha inteso verificare i risultati dell'applicazione del metodo d'induzione dei cicli in una stalla "problema".

**MATERIALI E METODI** - Lo studio ha verificato i risultati dell'applicazione del metodo d'induzione dei cicli in una stalla "problema" della provincia di Torino costituita da 155 vacche da latte Frisone - capi adulti - con performances riproduttive considerate scadenti in base a parametri analitici valutati con il metodo Fergusson e con l'analisi di Nir. I dati dell'anno senza trattamenti sono comparati con quelli ottenuti con l'applicazione del trattamento. I soggetti sono suddivisi in più gruppi in base alla distanza dal parto e alla situazione riproduttiva. Tutti gli animali si trovano su lettiera permanente e vengono alimentate con TMR (total mixed raction), l'allevamento non è autosufficiente per quanto riguarda le materie prime per cui talune vengono acquistate.

La media produttiva dell'allevamento è di 81 q.li/305 gg (inferiore alla media provinciale), in tutto l'anno si è avuta una media di 4 g/100 ml di grasso, di 3,60 g/100 ml di proteine e le cellule sono sempre state al di sotto delle 300.000/ml, la carica batterica non ha mai superato le 10.000 ufc/ml. Tutte le vacche sono vaccinate per IBR e BVD. La routine veterinaria comprende una visita settimanale con raccolta dati che vengono poi elaborati dal programma AFI MILK. Inoltre vengono esaminate tutte le vacche tra i 7 e i 14 giorni dopo il parto per la ricerca di patologie subcliniche e cliniche del post parto: ritenzione di placenta, metrite, chetosi, dislocazione dell'abomaso, mastite.(4) Nel medesimo intervallo di tempo si valuta il BCS (Body Condition Score) secondo il metodo Edmonson con score da 1 (magra) a 5 (grassa), lo stesso viene valutato tra i 40 e i 60 giorni di lattazione per stimare il dimagrimento al momento della prima IA e alla messa in asciutta. La visita ginecologica prende in considerazione i seguenti punti: patologie ovariche o anestro, endometriti di grado I, II e III grado, animali in calore, diagnosi di gravidanza tra i 29 e i 33 giorni dall'IA, presenza di gravidanze gemellari, riconferma di gravidanza di gestazioni a rischio e di routine alla messa in asciutta. Le vacche seguono un programma di sincronizzazione degli estri che prevede una prima prostaglandina tra i 27 e i 33 giorni dopo il parto, una seconda due settimane dopo, dopo 11 giorni GnRH, dopo 7 l'ultima prostaglandina e 17-19 ore più tardi l'IA. Gli animali diagnosticati non gravidi e quelli non fecondati in seguito al programma di Presynch vengono visitati ed inclusi in sincronizzazioni con Ovsynch o eseguita terapia a seconda della patologia e rimessi in lista per la settimana successiva. La scheda Ferguson è stata illustrata nel 1991 (3). La scheda permette la valutazione dell'efficienza riproduttiva di un'azienda; ha il vantaggio di fotografare una situazione dinamica in quanto permette di analizzare dei dati dinamici. E' suddivisa in quadranti: dati classici generali dell'azienda, dell'analisi riproduttiva, un'analisi per la prima fecondazione, le analisi dell'HDR relative alle fecondazioni successive alla prima fino alla quarta, un'analisi del CR per ciascuna fecondazione. L'ultimo quadrante contiene i sette dati sintetici di maggior peso nella valutazione di Ferguson, gli indici di fertilità composti. L'analisi di Nir si basa su un sistema di analisi integrata che si sviluppa su 2 livelli: la vacca e il gruppo. Per poter elaborare i dati sono richiesti un metodo di lavoro ed una routine di verifiche sulle singole vacche e la fissazione di obiettivi per i vari aspetti produttivi e riproduttivi considerati e un'analisi epidemiologica e statistica effettuata nei rapporti di monitoraggio e analisi causale. Gli obiettivi devono avere funzione di stimolo e l'analisi causale evidenzia i punti critici.

**RISULTATI** - I risultati sintetici sono esposti per brevità in due tabelle riassuntive che esprimono la sintesi dei dati della scheda Ferguson (Tab. 1) e quelli dell'analisi di Nir-Markusfeld - Veterinary Services and Animal Health, Ministry of Agriculture, Israel. (Tab. 2).

**CONCLUSIONI** - Il periodo di transizione, è fondamentale per il destino della vacca. Una delle metodiche per migliorare è la sincronizzazione degli estri. Questa presenta degli ottimi vantaggi quali avere un gruppo di animali in calore nel medesimo momento e in un periodo predeterminato in cui si presume che le bovine abbiano una buona probabilità di concepimento. L'azienda presa in esame presenta un'alta incidenza di patologie metaboliche, ne consegue come si può osservare analizzando la scheda Ferguson, che il periodo parto-concepimento risulta protratto nel tempo oltre ai limiti accettabili per quanto riguarda l'intera mandria. Per questa ragione si sta continuando a lavorare nell'azienda per cercare di ridurre le patologie metaboliche. Certamente per quanto riguarda la fertilità l'adozione di un programma di sincronizzazione ha ottenuto risultati inaspettati consentendo di ottenere una media di parto-concepimento di 111 giorni sui primi 60 animali. Ciò dimostra che un

programma di sincronizzazione se eseguito correttamente da allevatori, dipendenti e medici veterinari può essere un valido strumento per migliorare l'efficienza riproduttiva di una mandria, seppure vi siano fattori limitanti dovuti ad errori gestionali ad esempio agendo su una diversa distribuzione degli alimenti, attuando terapie di sostegno, incrementando l'attenzione e la diagnosi precoce delle patologie intercorrenti, curando le modalità dell'asciutta si potrà ottenere un ulteriore passo avanti.

Tab. 1 - Scheda Fergusson

INDICI DI FERTILITÀ COMPOSTI	ANNI	
	2006	2007
Pre-HDR MEDIO	55,7	59,2
Post-HDR MEDIO	45,54	20,09
HDR - (Tasso di inseminazioni)	52,07	44,11
PR (Tasso gravidanza corretto)	13,9	18,7
CR su tutte (Tasso di concepimento)	26,6	38,6
CR sulle gravide	25,8	44,2
CR CORRETTO	26,66	42,34

Tab. 2 - Analisi Nir-Markusfeld

MONITORAGGIO PARTI	PRIMIPARE			PLURIPARE		
	2007	2006	Ob.	2007	2006	Ob.
a. n Parti	31	39		59	90	
b. % gemelli	0,00	0,00	(1,00)	5,08	1,11	(6,00)
c. % morti al parto	3,23	5,13	(5,50)	10,17	10,00	(5,30)
d. % collasso	0,00	2,56	(0,00)	1,69	2,22	(2,00)
e. % Prolasso utero	0,00	0,00	(0,70)	0,00	0,00	(0,70)
f. % Dislocazione abomaso	9,68	7,69	(1,00)	6,78	3,33	(1,50)
g. % Ritenzione Placenta	16,13	17,95	(17,00)	23,73	20,00	(14,70)
h. % Metriti	64,52	56,41	(18,00)	32,20	40,00	(10,00)
i. % Chetosi	51,61	41,03	(1,50)	47,46	41,11	(6,00)
j. % Mastiti al parto	0,00	5,13	(1,00)	0,00	1,11	(5,00)
k. % Giorni d'asciutta >70 gg				40,68	0,00	(15,00)
l. % Giorni d'asciutta <57 gg				15,25	0,00	(15,00)
n. BCS al parto (n osservazioni)	30	33		55	82	
1. % con BCS >4,25	0	0,00	(15,00)	0,00	0,00	(15,00)
2. % con BCS <3	46,67	30,30	(15,00)	34,55	34,15	(15,00)
o. Variazione BCS in Asciutta (n oss.)				53	78	
1. % aumento >= 0,25 unità				13,21	10,26	(15,00)
2. % diminuzione >0,5 unità				47,17	23,08	(15,00)

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Frecke P.M., "Sviluppo di un programma di gestione della riproduzione" *Atti SIVAR*, 2007; 27-28. 2. Fricke et al "Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows" *Theriogenology* 1998; 50: 1275-1284. 3. Ferguson J.D. "Nutrition and reproduction in dairy cows" *Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice* 1991; 7,2: 483-501. 4. Lopez-Gatius F. et al "Pregnancy rate after timed artificial insemination in early post-partum dairy cows after Ovsynch or specific Synchronization protocols" *J. Vet. Med. A.* 2004; 51: 33-38 5. Moreira F. et al "Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows" *J. Dairy Science* 2001; 84: 1646-1659.

## **CYCLE SYNCHRONIZATION PROTOCOLS IN MILKING COWS: PRACTICAL EXPERIENCE IN PROBLEM COWS**

**Casalone M., <sup>1</sup>Donaliso C., <sup>2</sup>Ruta F., <sup>1</sup>Vincenti L.,**

*Department of Veterinary Clinical Sciences, University of Padua, Italy; <sup>1</sup> Department of Animal Pathology, University of Turin, Italy; <sup>2</sup> Practitioner, Turin, Italy;*

*Corresponding author: leila.vincenti@unito.it*

**Key words:** Bovine, synchronization, TAI, Ovsynch, Fergusson

Oestrus synchronization is performed on large bovine breeding farms for the purposes of planned reproduction. Ovsynch is a hormonal protocol that synchronizes follicular development, luteal regression and ovulation, thus enabling programmed artificial insemination or TAI to be applied, without having to identify the time of oestrus. This method is advisable in well managed herds as a way rationalizing tasks. On “problem cow farms” the system has to be tested. This study verified the application of the cycle induction method on a farm in Turin province. A herd of 155 adult Holstein milking cows with poor reproductive performance were submitted to analytical analyses evaluated with the Fergusson method and with Nir-Markusfeld analysis.

During the trial, some reproductive parameters clearly improved: the number of open days reduced by around 70 days from 182 to 111), number of AIs performed per cow reduced considerably from 3.88 to 2.5, the percentage of cows pregnant after the first insemination rose from 12.90 to 34.78 and after the second from 20.43 to 39.13, corresponding to a pregnancy rate of 73.91% after two inseminations, CR in the oestrus window between 100 and 120 days of 50% with a 25% PR. The Nir analysis underlined that some critical points – abomasal displacement, metritis and ketosis - remain, highlighting once more management errors that will have to be corrected. The cost of every treatment is high, around 43 Euros, but does help to recuperate part of the business deficit: at a cost of 5 Euros per day over the 100 "open" days, benefits begin to accrue once this parameter has been reduced by 10 days.

## UTILIZZO DI DILUITORI COMMERCIALI PER SEME REFRIGERATO IN PROGRAMMI DI SINCRONIZZAZIONE DELL'OVULAZIONE E INSEMINAZIONE ARTIFICIALE A TEMPO FISSO IN MANZE INCROCIO IN ARGENTINA

Avilés M.,<sup>1</sup> Cuestas G.,<sup>3</sup> Brandán A.,<sup>1</sup> Piccardi M.,<sup>2</sup> Quiñones G.,<sup>2</sup> Boretti L.,<sup>1</sup> Tríbulo H.,<sup>2</sup> Vincenti L., *Universidad Católica de Córdoba, <sup>1</sup>Instituto de Reproducción Animal, Universidad Nacional de Córdoba, <sup>2</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino, Italia; <sup>3</sup>Anglo Córdoba de Tierras.*

**Parole chiave:** Bovina, sincronizzazione, seme refrigerato, diluitori, crioprotettori.

**RIASSUNTO** - Lo scopo del lavoro è quello confrontare due diluitori con diversa concentrazione di glicerolo uno al 3% e l'altro al 6,3% studiando alcune caratteristiche del seme diluito e refrigerato a 5°C per un tempo di 24 ore, in trattamenti d'inseminazione a tempo fisso (IATF). Per la prova sono stati utilizzati 4 tori con fertilità comprovata; a questi è stato prelevato il seme, il quale è stato suddiviso in due parti. Un'aliquota è stata diluita col diluitore Andromed® (Minitub, Germania) con il 6,3% di glicerolo; l'altra aliquota con il diluitore Laiciphos® (IMV-Tecnologies) al 3% di glicerolo. Sono state inseminate 533 manze di 15 mesi di età sincronizzate a tempo fisso con protocolli già sperimentati. Non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa tra uno e l'altro diluitore (P=0,30), e un trend positivo (OR di 0,83) correlato con la percentuale di gravidanza a favore di diluitore Laiciphos®

**INTRODUZIONE** - I diluitori commerciali presentano nella loro composizione un crioprotettore cellulare che serve a proteggere gli spermatozoi alla temperatura di congelamento in azoto; tale sostanza ha un effetto citotossico e causa in qualche modo un danno cellulare che si ripercuote sulla capacità fecondante e/o sulla vita utile del seme, riducendole. A differenza dell'etilenglicole e del DMSO, il glicerolo è il crioprotettore di prima scelta per produrre un danno minore a livello cellulare (1;3). Si è visto che l'iperosmolarità generata per questo composto ha un effetto stimolatore sulla reazione acrosomica (2), come anche un effetto nocivo sulla cellula (4). Comunque si potrebbe ipotizzare che un diluitore con una percentuale di glicerolo alta potrebbe causare in maggiore o minore misura un danno a livello degli spermatozoi e conseguentemente si traduce in un basso tasso di gravidanza.

**MATERIALI E METODI** - Per la prova sono state utilizzate 533 manze, (Bos Indicus incrociati con tori di razza Britannica) di circa 15 mesi, con un BCS medio di circa 3-3,5 (scala da 1 a 5), sulle quali è stato utilizzato il seguente protocollo di sincronizzazione: giorno 1: 2 mg BE + P4 (impianto); giorno 7: 500 µg PGF<sub>2α</sub> + ritiro impianto; giorno 8: 1mg BE; giorno 9 IATF (52-56 h ritiro impianto), come illustrato nello Schema 1.

Schema 1



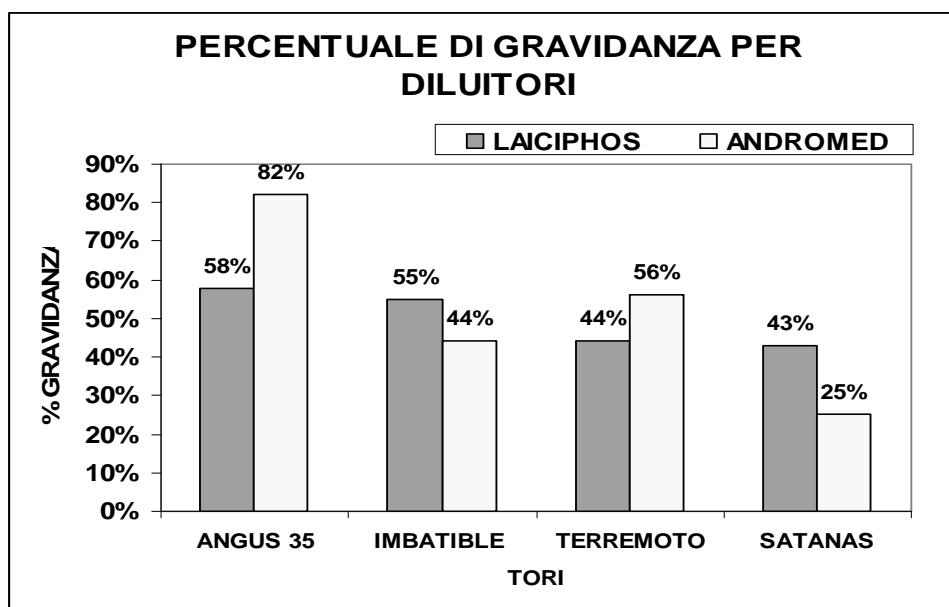
Il seme è stato raccolto di 4 tori di razza britannica mediante elettroeiaculazione (Lane Pulsator IV - Auto Adjust TM Electro-Ejaculator), nello stesso allevamento di mattina,

prima all'inseminazione. La valutazione del seme raccolto è stata fatta con microscopia a contrasto di fase (Nikon®), Sono state valutate: la percentuale di spermatozoi vivi, la motilità individuale (MB= 80-100%, B= 60-79%, R= 40-59% e P≤40%) il vigore (score 1-4) ottenendo i seguenti risultati: Toro Imbatible: Vivi: 70%, Motilità Individuale: 50%, Vigore: 4, Toro Angus 35: Vivi: 80%, Motilità Individuale: 60%, Vigore: 4, Toro Satanás: Vivi: 50%, Motilità Individuale: 30%, Vigore: 3, Toro Terremoto: Vivi: 60%, Motilità Individuale: 30%, Vigore: 3.

Ogni salto è stato suddiviso in due aliquote: ad una è stato aggiunto un diluente seminale semisintetico libero di proteine d'origine animale Andromed® (Minitub-Germania) con una concentrazione fissa di 6,3% di glicerolo, all'altra aliquota un diluente composto, a base di latte liofilizzato a cui è stato aggiunto tuorlo d'uovo al 20% e 3% di glicerolo Laiciphos® (IMV-Tecnology). Il seme è stato confezionato in paillettes da 0,52 ml e refrigerate a +5°C per 8 ore fino al momento dell'inseminazione. La diagnosi di gravidanza è stata eseguita 30 giorni post IATF con l'utilizzo di ultrasonografia (Aloka 500). I valori sono stati analizzati con regressione logistica.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Nel Grafico 1 sono riportati i risultati in termine di gravidanze ottenute da ogni soggetto.

Grafico 1



Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i diluitori per l'evento gravidanza ( $P = 0,30$ ), nonostante ciò si è stata osservata una possibilità OR di 0,83 maggiore per il diluente Laiciphos. E' in programma di aumentare il numero di campioni di tori per verificare se si conferma questo valore e di correlarlo con altre indagini sulle caratteristiche del seme nel periodo d'incubazione.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Gao GY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod.* 49: 112-123. 1993. 2. Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl.* 1983, 6: 180-193. 3. Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Crister JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition

and removal from human sperm spermatozoa. *Hum Reprod.* 1997; 12: 112-118. **4.** Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentration. *Cryobiology.* 1998, 37: 325-338. **5.** Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MC. Criopreservation effect on fertility. *Analecta Veterinaria* 2005; 25 (2): 28-35.

## USE OF TWO DIFFERENT EXTENDERS FOR CHILLED SEMEN IN FIXED TIME A.I. PROGRAMS IN CROSS BREED BEEF HEIFERS IN ARGENTINA

Avilés M., <sup>1</sup>Cuestas G., <sup>3</sup>Brandán A., <sup>1</sup>Piccardi M., <sup>2</sup>Quiñones G., <sup>2</sup>Boretti L., <sup>1</sup>Tríbulo H., <sup>2</sup>Vincenti L., *Universidad Católica de Córdoba, <sup>1</sup>Instituto de Reproducción Animal, Universidad Nacional de Córdoba, <sup>2</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino, Italia; <sup>3</sup>Anglo Córdoba de Tierras.*  
Corresponding author: leila@vincenti@unito.it

**Key words:** Bovine, synchronization, fresh semen, extenders, cryoprotectant.

In the composition of commercial semen extenders, there is a portion of cryoprotectant for the cells that is used to defend the spermatozoa from freezing injury. Therefore, this medium might have a toxic effect on cells causing some cellular damage and consequently reducing sperm life. The aim of the present work is to evaluate the performances of refrigerated semen, using two diluents with different concentrations of glycerol (3% and 6.3%) in fixed-time artificial insemination treatments (FTAI). Four proven fertility bulls were used for the trial. The semen was collected and divided into two aliquots: to one ANDROMED with 6.3% glycerol was added, and to the other, LAICIPHOS with 3% glycerol concentration. Five hundred and fifty three heifers (15 months old) submitted to a synchronization protocol were inseminated. The protocol was performed as follows: at day 0, injection of 2mg estradiol, followed at day 7 by a single injection of PGF<sub>2α</sub>, at day 8 by administration of 1 mg estradiol and at day 9 AI was carried out without estrus signs (IATF).

Semen of 4 proven fertility bulls was collected by electro-ejaculation (Lane Pulsator IV, Auto Adjust TM Electro-Ejaculator), and evaluated for percentage of gross motility (MB= 80-100%, B= 60-79%, R= 40-59% e P= $\leq$ 40%), percentage of living cells, individual motility and vigor (score 1-4) showing the following results: **Imbatible**: Live: 70%, Individual Motility: 50%, Vigor: 4; **Angus** 35: Live: 80%, Individual Motility: 60%, Vigor: 4; **Satanás**: Live: 50%, Individual Motility: 30%, Vigor: 3, **Terremoto**: Live: 60%, Individual Motility: 30%, Vigor: 3.

Each sample was divided into two aliquots, diluted with the two extenders and packaged in 0.52 ml straw refrigerated at +5°C for 8 hours until ready to be used.

Each cow was submitted to scanner pregnancy diagnosis at 30 days post IATF.

No statistical differences were noted between extenders (P=0.30); however, a positive trend was demonstrated for Laicyphos (OR: 0.83).



## RELAZIONE TRA LA QUALITÀ SEMINALE E LA PERCENTUALE DI GRAVIDANZA IN BOVINI DI CARNE: ESPERIENZA DI LAVORO IN CAMPO

<sup>3</sup>Quiñones G., <sup>1</sup>Avilés M., <sup>2</sup>Cuestas G., <sup>5</sup>Brandán A., <sup>4</sup>Piccardi M., <sup>3</sup>Boretti L., <sup>2</sup>Tribulo H., <sup>3</sup>Vincenti L., <sup>1</sup>Universidad Católica de Córdoba, <sup>2</sup>Instituto de Reproducción Animal Córdoba, <sup>3</sup>Universidad de Torino Italia, <sup>4</sup>Univ. Nacional de Córdoba, <sup>5</sup>Anglo Córdoba de Tierras. Corresponding author: leila.vincenti@unito.it

**Parole chiave:** Bovino, qualità seminale, microscopia ottica, Assisted Semen Analysis (CASA).

**RIASSUNTO** - L'obiettivo del lavoro è di confrontare l'osservazione diretta del materiale seminale utilizzato per l'IA con il microscopio ottico (MO), *metodo soggettivo* con la Computer Assisted Semen Analysis (CASA), *metodo oggettivo*. Il seme utilizzato è stato prelevato da 3 tori di razza britannica 8 ore prima dell'inizio dell'IA. Per mezzo di un MO a contrasto di fase è stata valutata la qualità seminale. In parallelo è stata realizzata una video registrazione in formato *mpeg2* del campo visivo del MO, inviata per via telematica al laboratorio per essere analizzata dal CASA. Sono stati considerati i valori di percentuale di cellule motili totali, percentuale di cellule con motilità progressiva e velocità (rapid, medium, slow, static). Le inseminazioni a tempo fisso (IATF) sono state eseguite in 522 manze. I dati ottenuti con il metodo CASA hanno coinciso maggiormente rispetto alla percentuale di gravidanza finale pur non registrando differenze significative.

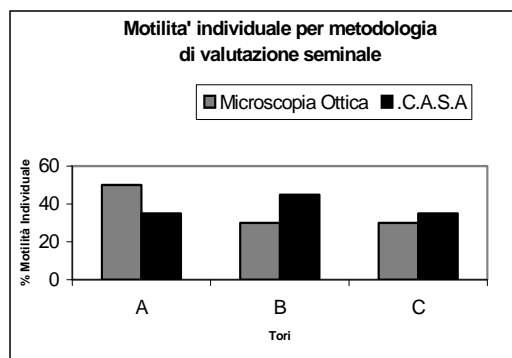
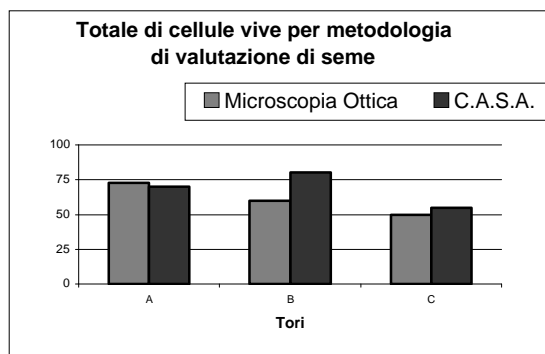
**INTRODUZIONE** - La metodologia maggiormente utilizzata per studiare la qualità seminale nei lavori di inseminazione artificiale a campo è la valutazione soggettiva con microscopio ottico della motilità spermatica<sup>1</sup>. La motilità è uno dei parametri più importanti dell'analisi seminale; questa valutazione determina una descrizione generale sulla qualità seminale, però l'esattezza e la precisione sono limitate alle condizioni del sistema e all'esperienza dell'operatore. Tale valutazione comunque, eseguita da personale esperto è sufficientemente precisa, i risultati sono immediati oltre che economicamente convenienti<sup>2,3</sup>. Le prime prove per rendere oggettivi tali dati (movimento cellulare) si basarono su video sequenze d'immagini o video registrazioni. Questi metodi erano complicati da realizzare, oltre che lunghi da leggere: per queste ragioni oggi non sono utilizzati<sup>4,5</sup>. Tuttavia, l'apparizione dei sistemi informatizzati di digitalizzazione di immagini aprì un nuovo campo nello studio della motilità degli spermatozoi. Questi sistemi, denominati genericamente CASA - Computer Assisted Motility Analysis - hanno automatizzato e semplificato il processo. La Casa stabilisce, in una maniera obiettiva, misure quantitative del movimento individuale degli spermatozoi<sup>6</sup>. Con questo tipo di analisi si ottengono misure corrette della motilità spermatica che forniscono informazioni indirette circa lo stato funzionale dell'assonema e delle membrane spermatiche. I parametri determinati per ogni spermatozoi sono la velocità di movimento sulla base di vari parametri, le traiettorie che realizza la testa dello spermatozoi e la frequenza dei cambiamenti di direzione che effettua<sup>7</sup>. Attualmente, esistono sul mercato vari tipi di Casa che catturano il movimento spermatico e l'analizzano, tanto in tempo reale, come in differita, apportando un gran volume di informazioni<sup>8,9</sup>.

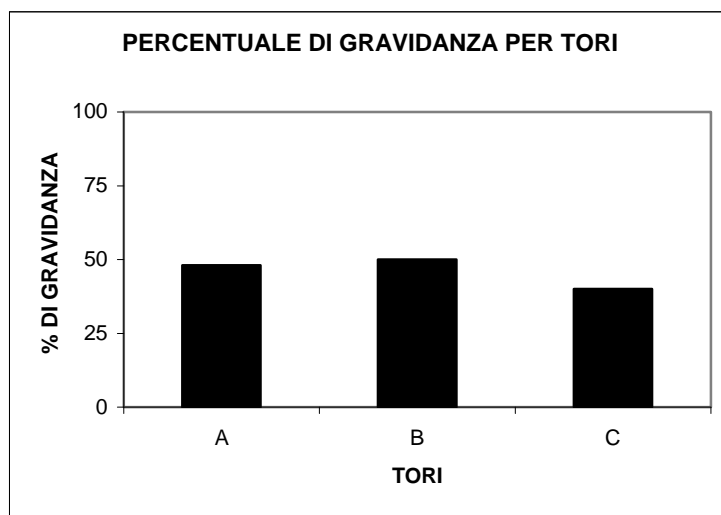
**MATERIALI E METODI** - Per questo lavoro sono state utilizzate 522 manze incrocio Bos Indicus x Britannico di approssimativamente 15 mesi di età che sono state sincronizzate per essere inseminate in tempo fisso (IATF). Il seme utilizzato nell'IATF

proviene da 3 tori di razza Britannica, di provata fertilità, raccolto mediante electroieiaculazione - Lane Pulsator IV - Auto Adjust Tm Elettro-Ejaculator - 8 ore prima dell'inseminazione. Il seme è stato diluito, uniformata la concentrazione su 40 milioni per ml e conservato in frigorifero a +5°C fino al momento dell'utilizzo. Per mezzo di un MO (Nikon®), a contrasto di fase (40x), è stata valutata la percentuale di spermatozoi vivi, la motilità individuale, classificando il seme: Molto Buono = 80-100%, Buono = 60-79%, Regolare =40-59% e Cattivo = <40%, ed il vigore con una scala da 1-4.

Nello stesso momento è stata realizzata una video-registrazione in contrasto di fase a 100X di almeno 4 campi microscopici di una diluizione seminale 1:200 o 1:100, che è stata inviata per via telematica con formato mpeg2 100X, alla Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, dove i files sono stati convertiti in formati VGA ed analizzati mediante l'Analizzatore Automatico Hamilton Thorne. Sono state considerate: la percentuale di cellule motili totali, la percentuale di cellule motili progressive e la velocità: Rapid Medium, Slow, Static. L'inseminazione è stata eseguita 52/56 ore dopo la rimozione dell'impianto di Progesterone in 7<sup>a</sup> giornata contemporaneo all'inoculazione di PGF<sub>2α</sub>. La diagnosi di gravidanza è stata eseguita 30 giorni post IATF per mezzo di ultrasonografia (Aloka 500). L'analisi statistica è stata realizzata mediante analisi multivariata delle componenti principali.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I coefficienti ponderati suggeriscono che tutte le variabili, per ogni metodo hanno uguale peso e non ci sono differenze significative tra le stesse. Inoltre, i parametri con valori più elevati si correlano altamente con la percentuale di gravidanza. Il ranking ottenuto per i componenti costruiti a partire dal metodo CASA è stato più coincidente con i risultati dei tori secondo percentuale di gravidanza, non parimenti si può affermare per il metodo per microscopia ottica. Sarebbe quindi importante ripetere l'esperienza con nuove osservazioni di questi e con più tori per confermare se questa correlazione si mantiene.





**BIBLIOGRAFIA** - 1. Almeida, G. 1985. Evaluación de la fertilidad seminal por métodos in vitro. Su relación con la fertilidad *CABIA*, 1:32-37. 2. P. J. Chenoweth; H. Rodriguez Martinez 2000, Evaluación del Semen Congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad International Veterinary Information Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Ithaca, New York, USA. 3. Barth, A. D. 1990. Evaluación de semen bovino congelado. *CABIA*, 21: 28-36. 4. Capdevielle, E. 1997. Semen bovino congelado: Calidad y evaluación. *Therios*. Suplemento especial, 27-34. 5. Amann, R.P.; Hammerstedt, R.H. 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. *Biol. Reprod.*, 23: 647. 6. Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computerassisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 1998; 49:871-879. 7. Foote, R.H. 1992. Preservación y predicción de fertilidad del semen. *CABIA*, 25: 22-27. 8. O'Connor, M.T.; Arnann, R.P.; Saacke, R.G. 1981. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory test and their use for predicting fertility. *J. An. Se.*, 53: 1368-1376. 9. Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 1998; 49:871-879.

## **ANALYSIS OF SPERM QUALITY AND PREGNANCY RATE: EXPERIENCE OF WORK IN THE FIELD**

<sup>3</sup>Quiñones G., <sup>1</sup>Avilés M., <sup>2</sup>Cuestas G., <sup>5</sup>Brandán A., <sup>4</sup>Piccardi M., <sup>3</sup>Boretti L.,  
<sup>2</sup>Tríbulo H., <sup>3</sup>Vincenti L., <sup>1</sup>Universidad Católica de Córdoba, <sup>2</sup>Instituto de  
Reproducción Animal Córdoba, <sup>3</sup>Universidad de Torino Italia, <sup>4</sup>Univ. Nacional de  
Córdoba, <sup>5</sup>Anglo Córdoba de Tierras. Corresponding author: [Leila.vincenti@unito.it](mailto:Leila.vincenti@unito.it)

**Key Words:** Bovine, Seminal quality, Contrast phase microscope, Assisted Semen Analysis (CASA).

The percentage of pregnancies following artificial insemination (AI) is consequent to a series of events. One of the factors that influences are the seminal quality that is reported to the fertility of the female and the used semen. Various methods and laboratory exams enable seminal quality to be assessed. The objective of the present work was to compare two of these analyses: direct observation performed by a trained expert through an optical microscope (MO), a subjective method vs. the objective method of Computer assisted semen analysis (CASA). For this trial 522 heifers Bos Índicus x British breed aged 15 months were inseminated at a "fixed time" (IATF). The semen of 3 proven fertility bulls of British breed was collected by electroejaculation 8 hours before insemination; the semen was diluted ( $40 \times 10^6$ ) and preserved at +5°C in refrigerator until use. Through a contrast phase MO, the percentage of alive sperms, individual motility and vigor were evaluated. In parallel, a video recording in mpeg2 was made of at least 4 microscopic fields. The files were sent to the Animal Pathology Department at the Faculty of Veterinary Medicine in Turin, Italy where they were converted into a VGA compatible format with the Hamilton Thorn CASA analyzer. Parameters considered were total motility, percentage of cells with progressive motility and speed (rapid, medium, slow, static). The diagnosis of pregnancy was performed through ultrasonography 30 days after AI. Each coefficient analyzed showed similar values: therefore no statistically significant difference was detected among the variables.

The data expressed by the CASA method mostly coincided with the final pregnancy rate.

## TRATTAMENTI DI SUPEROVULAZIONE E INDUZIONE DELL'OVULAZIONE PER L'INSEMINAZIONE ARTIFICIALE A TEMPO FISSO NELLE BOVINE PIEMONTESI: RISULTATI PRELIMINARI

**Mogentale M. S, Quiñones G.A., <sup>1</sup>Dominici A., Vincenti, L.,** *Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italia; <sup>1</sup>Libero professionista.*

**Parole chiave:** superovulazione; induzione dell'ovulazione; IATF; bovine Piemontesi

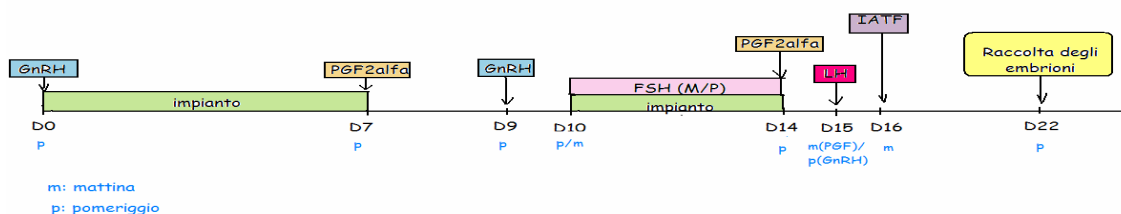
**Riassunto:** Al fine di migliorare la risposta superovulatoria e la sincronia follicolare durante le procedure di ET si è impostato un protocollo di superovulazione adattandolo alla procedura di CIDR-synch e riducendo la quantità di P4 del primo impianto. Con lo stesso scopo si è iniziato a monitorare ecograficamente la dinamica follicolare nella bovina piemontese: non è noto infatti se la razza sia caratterizzata da due o tre ondate follicolari. Anche questo aspetto interagisce con la risposta alla curva di superovulazione e sui protocolli di induzione e stimolazione dei cicli che sono stati messi a punto per le bovine da latte. Pur nel limite della casistica presentata la stimolazione sembra assicurare buone risposte, buona sincronia e qualità degli embrioni e gli studi della dinamica follicolare - tuttora in corso - suggeriscono che le manze piemontesi siano a 3 ondate ma che non siano infrequenti i perturbamenti dell'ovulazione.

**INTRODUZIONE** - Il lavoro si propone di testare l'applicazione di un protocollo di superovulazione seguendo uno schema di 22 giorni, basato sulla combinazione di FSH e trattamenti con GnRH e PGF<sub>2α</sub> – noti con il nome di CIDR-synch – nel tentativo di ridurre la variabilità della risposta superovulatoria e di migliorare la qualità degli embrioni prodotti, sincronizzando meglio il momento ovulatorio. Adattando il protocollo ad una razza da carne si è ridotto il tasso di P4 del primo impianto. Sono stati eseguiti 3 trattamenti che hanno dato risultati soddisfacenti con 23 embrioni trasferibili su 29 totali. Per migliorare l'applicazione del sistema sono in corso verifiche ecografiche della dinamica follicolare in soggetti di razza piemontese per modulare il timing dei vari trattamenti in rapporto a diverse modalità di emergenza dei follicoli o della taglia del follicolo ovulatorio.

L'obiettivo dell'ET è ottenere il massimo numero di embrioni fertilizzati e trasferibili, con alta probabilità di produrre delle gravidanze<sup>1</sup>. Comunque, la variabilità della risposta superovulatoria continua ad essere uno dei problemi più frustranti con l'ET nelle bovine<sup>2,3,5</sup>. La causa maggiore di questa variabilità è costituita dallo status dei follicoli ovarici al momento dell'inizio dei trattamenti con delle gonadotropine<sup>8</sup>. I dati in letteratura dimostrano i vantaggi dei trattamenti con gonadotropina al momento dell'emergenza dell'ondata follicolare. Un'alternativa per assicurare buoni risultati sull'ET sarebbe, utilizzare dei trattamenti che sono in grado di controllare dal punto di vista ormonale il *timing* dell'emergenza follicolare<sup>4</sup>.

**MATERIALI E METODI - Superovulazione e protocollo 22 giorni.** Al fine di evitare la presenza di un follicolo dominante all'inizio del trattamento superovulatorio, alcune strategie sono state sviluppate, come iniziare il trattamento con FSH nel primo giorno del ciclo estrale<sup>7,10,11</sup>. Combinazioni tra i protocolli GnRH e PGF<sub>2α</sub> sono state utilizzate con successo nei protocolli di sincronizzazioni<sup>9,13,12</sup>. Uno di questi trattamenti è conosciuto come CIDR-synch e consiste nell'amministrazione di GnRH e l'applicazione simultanea di un impianto progestinico (D0), seguito da una iniezione di PGF<sub>2α</sub> 7 giorni dopo (D7), una seconda iniezioni di GnRH 48h dopo il trattamento con PGF<sub>2α</sub>, e la rimozione dell'impianto (D9). Dopodiché, inizia un trattamento di 5 giorni

con FSH (D10-D14), e due iniezioni di PGF sono amministrate nei giorni D14 e D15, seguita dall'iniezione di GnRH (D15) per migliorare la sincronizzazione dell'ovulazione<sup>6</sup>. Siccome l'ovulazione accadrà tra 24 e 36 ore dopo l'iniezione del GnRH, l'IA è realizzata 12 ore dopo la somministrazione del GnRH (D16), evitando il disagio dell'osservazione del calore. La raccolta degli embrioni procede nel giorno D22 dall'inizio del trattamento. Nei Paesi in cui può essere usato l'estrogeno questo sembra avere ancora maggior effetto sincronizzativo sulle ondate follicolari ma in assenza di questo, è ipotizzabile che il GnRH possa sostituirlo. La particolarità di questo trattamento si basa anche sul fatto che il primo impianto di progesterone deve avere un dosaggio più basso di quello usuale e per questo sono utilizzati impianti "di secondo uso" e cioè che sono già stati utilizzati, rimossi dopo 7 giorni e, dopo essere stati sterilizzati con immersione in Betadine concentrato sono risciacquati, lasciati asciugare sotto cappa e impacchettati in carta di alluminio. Su questo aspetto e cioè sull'effetto che dosaggi ridotti di progesterone (>1,38 g) possono avere sul ciclo soprattutto nelle manze o sul priming dei follicoli, sono in corso numerosi esperimenti in America Latina (Baruselli P., Bo G., dati non pubblicati).



Il nostro gruppo ha investigato la funzionalità del suddetto protocollo in due bovine della razza Piemontese, con la finalità di verificare il numero e la viabilità degli embrioni raccolti. Un'osservazione è stata compiuta anche su una bovina della razza Frisona (\*) che, dopo aver avuto risultati insoddisfacenti su calore naturale, è stata sottoposta al protocollo 22 giorni. I risultati sono riportati in seguito nella Tabella 1.

Tab. 1 - Numero totale di strutture raccolte, embrioni viabili e classificazioni delle strutture

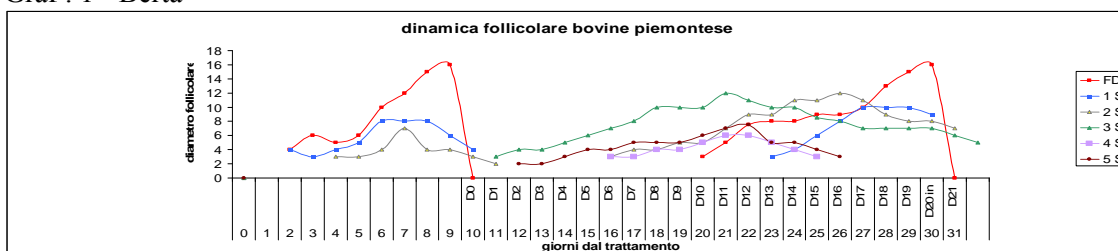
ANIMALE	STRUTTURE RACCOLTE	EMBRIONI VIABILI	CLASSIFICAZIONE
Isabella	13	7	5 mo/ 2 bl/ 6 nf
15200	5	5	3 mo/ 2 bl
101 *	11	11	4 mo/ 7 bl

*mo (morule); bl (blastocisti); nf (non fecondati)*

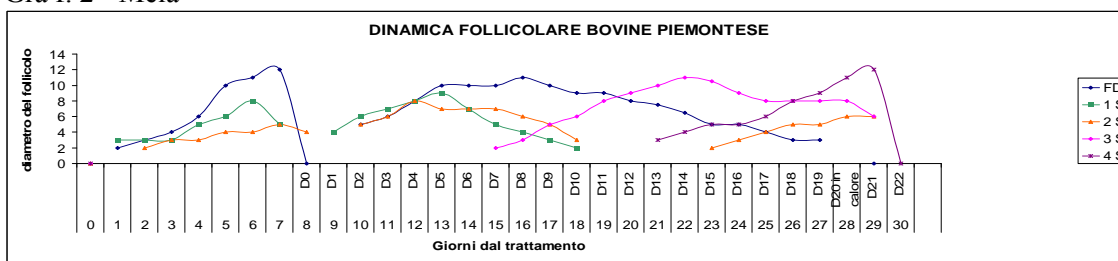
A completamento di questo lavoro ci si è proposti di seguire la dinamica follicolare di soggetti di razza piemontese per verificare se esistono delle peculiarità di razza o se esiste variabilità tra manze e vacche o tra i diversi soggetti. In questo momento abbiamo completato le indagini su due bovine (una adulta di 10 anni, Berta; e una manza di 12 mesi, Mela) dell'azienda agricola CISRA, attraverso l'ecografia giornaliera ed il prelievo di sangue della coda per successiva misurazione del progesterone. I due soggetti analizzati sono stati selezionati casualmente nella stalla e sono stati sottoposti al protocollo Ovsynch per sincronizzarne il ciclo, circa sette giorni dopo le bovine sono andate in calore, i risultati sono stati registrati quotidianamente.

I risultati fino ad ora ottenuti, mostrano, 3 onde follicolari per la manza e 2 per l'adulta; mentre il diametro del follicolo ovulatorio risulta essere di 12 mm per la manza e 16mm per l'adulta; la risposta al trattamento sembra essere buona così come da letteratura (benché siano presenti poche informazioni a riguardo).

Graf. 1 - Berta



Gra f. 2 - Mela



**DISCUSSIONE** - La conoscenza della dinamica follicolare nella piemontese permette di meglio comprendere i cicli delle bovine e di standardizzare i trattamenti senza extrapolare i dati dalla fisiologia delle bovine da latte. In effetti, ad oggi mancano dati sistematici sia sull'emergenza follicolare sia sul diametro del follicolo ovulatorio e gli schemi di sincronizzazione dei cicli non sono validati su questa razza. Inoltre le performances riproduttive su questa razza spesso sono insoddisfacenti ma non esistono lavori che abbiano approfondito i temi fondamentali di fisiologia ovulatoria e l'applicazione di schemi di trattamento reperibili in letteratura non sembrano apportare i benefici attesi. La miglior conoscenza della fisiologia ovulatoria e della dinamica follicolare ci permetterà di tarare meglio lo schema di superovulazione sia esso condotto su ciclo naturale che indotto. L'ET con la sincronizzazione dei cicli seguendo il metodo proposto e con basso dosaggio del progesterone nel primo impianto nelle bovine Piemontesi è un metodo riproduttivo che sembra poter essere utilizzato con successo e ha il vantaggio di iniziare i trattamenti a tempo fisso senza aver la necessità della osservazione del calore e senza sacrificare i risultati.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 39, 7-24, 1993. 2. Barros CM, Nogueira MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 56, 1483-1496, 2001. 3. Baruselli PS, De Sá Filho MF, et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65, 77-88, 2006. 4. Bó GA, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, 65, 89-101, 2006. 5. Boland MP, Roche JF. Embryo production: alternative methods. *Mol Reprod Dev*, 36, 266-270, 1993. 6. Brogliatti GM, Lagomarsino H, Adams GP. Follicle ablation for ovulation synchronization in cattle. *Theriogenology*, 49, 339 abstr., 1998. 7. Goulding D, Williams DH, Duffy P, Boland MP, Roche JF. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology*, 34, 767-78, 1990. 8. Mapletoft JR, Bennett Steward K, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev*, 42, 601-11, 2002. 9. Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci*, 80, 301-306, 1997. 10. Roberts AJ, Grizzle JM, Echternkamp SE. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology*, 42, 917-29, 1994. 11. Stock AE, Ellington JE, Fortune JE. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology*, 45, 1091-1102, 1996. 12. Thatcher Ww, Moreira F, Santos Jep, Mattos RC, Lopez FL, Pancarci SM, Risco CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55, 75-90, 2001. 13. Twagiramungu H, Guibault LA, Dufour JJ. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrous in cattle: A review. *J Anim Sci*, v. 73, p. 3141-3151, 1995.

## **SUPEROVULATORY TREATMENT AND INDUCTION OF OVULATION FOR FIXED-TIME ARTIFICIAL INSEMINATION IN PIEMONTESE CATTLE. PRELIMINARY RESULTS**

**Mogentale S.M., Quiñones G.A., <sup>1</sup>Dominici A., Vincenti L.,** *Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italia; <sup>1</sup>Veterinary Practitioner. Corresponding authors. Tel/Fax.: +39 011 670 9057; leila.vincenti@unito.it*

**Key words:** superovulation; induction of ovulation; FTAI; Piemontese cattle.

**INTRODUCTION** - The purpose of ET is to obtain the maximum number of fertilized and transferable embryos, with high probability of producing pregnancy<sup>1</sup>. However, the variability of the superovulatory response continues to be one of the most frustrating problems with ET in the bovine<sup>2</sup>. The major cause of this variability is due to ovarian follicular status at the beginning of treatment with gonadotropin<sup>3</sup>. Literature shows the advantages of treatments with gonadotropin at the beginning of a follicular wave emergence. An alternative to assure good results with ET is to utilize treatments that are able to control mechanically and hormonally the timing of follicular emergence<sup>4</sup>. This presentation will review the use of an efficient protocol designed to control both luteal and follicular function, permitting the initiation of superovulatory treatments at a self-appointed time and provide exciting possibilities for estrous synchronization without the need for estrous detection and that can be applied on Piemontese cattle under European regulations.

**SUPEROVULATION AND 22-DAY PROTOCOL** - To avoid having a dominant follicle at the beginning of SOV treatment, some strategies have been developed, such as starting FSH treatment at the first day of the estrous cycle. Combinations of GnRH and PGF treatments have been successfully used in synchronization protocols. One of these GnRH-PGF treatment protocols is known as the CIDR-synch protocol and consists in an injection of GnRH and simultaneous application of a progestogen device (D0), followed by PGF 7 days later (D7), a second injection of GnRH 48h after PGF treatment, and consequent removal of the device (D9). Afterwards, a 5-day FSH treatment begins (D10-D14), and a PGF injection is administered on D14 and D15, followed by GnRH treatment (D15) to further enhance synchrony of ovulation. AI is done on D16 and embryo collection on D22. Our research group has investigated the 22-day protocol in two Piemontese cows, to verify the number of collected structures and the viability of collected embryos. A further observation should be made in relation to a Friesian cow (\*) that, after being submitted to the traditional protocol on natural heat without any result, was submitted to the 22-day protocol as well. For the 2 Piemontese cows the collected structures (*c.s.*) and viable embryos (*v.e.*) were respectively 13 and 5 *c.s.*, 7 and 5 *v.e.* and the Friesian cow was 11 *c.s.* and 11 *v.e.*

**DISCUSSION** - Embryo transfer of Piemontese cattle is a technical reproductive method which can be successfully applied and offers the convenience of being able to initiate treatments at a self-appointed time without the need for estrous detection and without sacrificing results.

**REFERENCES** - 1. Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 39, 7-24, 1993. 2. Baruselli PS, De Sá Filho MF, et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65, 77-88, 2006. 3. Mapletoft JR, Bennett Steward K, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev*, 42, 601-11, 2002. 4. Bó GA, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, 65, 89-101, 2006.



## AUSILIO DI SISTEMI COMPUTERIZZATI PER LA CRIOCONSERVAZIONE E LA VALUTAZIONE PRE E POST CONGELAMENTO DI MATERIALE SEMINALE DI BOVINI AUTOCTONI IN CONTESTO TROPICALE

Semita C., Nervo T., <sup>1</sup>Issa M., Calavita A., <sup>2</sup>Chanono M., *Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino;* <sup>1</sup>*Faculté des Sciences, Université Abdou Moumouni, Niamey, Niger;* <sup>2</sup>*Centre de Multiplication du Bétail, S.S.E., Toukounous, Niger*

**Parole chiave:** zebù, materiale seminale, crioconservazione, CASA, Niger.

**RIASSUNTO** - Obiettivo del presente studio è confrontare due mestruai commerciali, utilizzati per la diluizione di materiale seminale congelato con un sistema computerizzato, tramite valutazione della motilità pre e post congelamento. Sono stati esaminati 40 campioni di materiale seminale prelevati con vagina artificiale da tre tori della razza zebuina Azawak e diluiti con Laiciphos<sup>®</sup> al 7% di glicerolo e 40 diluiti con Bioxcell<sup>®</sup>. Sono emerse differenze statisticamente significative ( $p < 0,001$ ) tra la motilità spermatica e tra i recovery rate dei campioni esaminati, registrando migliori risultati con la diluizione con Bioxcell<sup>®</sup>. L'analisi della termoresistenza, eseguita attraverso il sistema CASA, ha evidenziato una limitata sopravvivenza nel tempo dei campioni dopo scongelamento per entrambi i diluitori, pur mostrando migliori risultati con il Bioxcell<sup>®</sup>.

**INTRODUZIONE** - Da alcuni anni il Dipartimento di Patologia Animale dell'Università di Torino, in collaborazione con la Facoltà di Agraria dell'Università di Niamey, gestisce, in Niger, alcuni progetti per la diffusione dell'inseminazione artificiale come strumento di ausilio al miglioramento in loco della gestione dell'allevamento. Obiettivo dei progetti è quello di costituire una banca di germoplasma di tori geneticamente selezionati appartenenti ad una razza zebuina locale, l'Azawak, considerata un'ottima produttrice di latte<sup>1</sup>. Come riferito da alcuni Autori<sup>2,3,4</sup>, la valutazione con l'ausilio di mezzi computerizzati di dosi di materiale seminale congelato/scongelato permette di ottenere anche indicazioni utili circa la fertilità su campo. A tal fine, utilizzando tali sistemi di valutazione, si è cercato di mettere a punto protocolli di manipolazione e conservazione del materiale seminale ottimali per il mantenimento di una buona motilità e vitalità dopo il congelamento, indispensabili per garantire il successo delle fecondazioni artificiali. In un precedente lavoro<sup>5</sup>, sono stati riportati i risultati del confronto tra due mestruai commerciali utilizzati per la diluizione di seme di tori Azawak in prove di congelamento su vapori di azoto. In questo lavoro vengono confrontati gli stessi diluitori, utilizzati per la preparazione di dosi di materiale seminale di tori Azawak congelate con un sistema computerizzato (Micro Digitcool) di recente acquisizione nell'ambito dei progetti precedentemente descritti con lo scopo di standardizzare e migliorare le procedure di crioconservazione, sia determinando la sopravvivenza degli spermatozoi attraverso la valutazione della motilità pre e post congelamento, con osservazione diretta a microscopio ottico, sia attraverso la valutazione della termoresistenza degli stessi campioni dopo scongelamento, con ausilio di un analizzatore computerizzato CASA (HTM - CEROS - version 12).

**MATERIALI E METODI** - Tre tori di razza Azawak di età compresa tra i 6 ed i 9 anni, di peso tra i 500 ed i 700 kg ed allevati presso il Centre de Multiplication du Bétail, Station Sahélienne Expérimentale di Toukounous (lat. 14,5° N - long. 3° E), in Niger, sono stati sottoposti a prelievo di materiale seminale con vagina artificiale in presenza di una vacca in calore naturale o indotto farmacologicamente. Dopo il prelievo, per ciascun eiaculato, sono stati valutati: volume, motilità di massa ed

individuale, concentrazione e morfologia. Ogni campione, diviso in due aliquote, è stato successivamente diluito, per ottenere una concentrazione finale di  $80 \times 10^6$  spermatozoi/ml, con Laiciphos 488<sup>®</sup> (IMV Technologies, France) e Bioxcell<sup>®</sup> (IMV Technologies, France). Il primo, contenente il 10% di tuorlo d'uovo, viene addizionato in due passaggi: metà del volume finale del diluente contenente il 3% di glicerolo viene unito al seme, quindi sottoposto ad equilibratura per due ore fino a raggiungimento di +5°C (0,2°C/min) e quindi viene aggiunta la parte restante, contenente l'11% di glicerolo, per ottenere una concentrazione finale del 7% del crioprotettore. Il Bioxcell<sup>®</sup>, invece, richiede di un'unica diluizione ed una fase di equilibratura analoga alla precedente. Il materiale così diluito viene stabilizzato ancora per un'ora a +5°C. Il seme è stato confezionato in paillette mini ( $20 \times 10^6$  spermatozoi/paillette), utilizzando un'impaillettatrice automatica IMV, e sigillate per pressione a caldo. Le paillette sono quindi state congelate con un Micro Digitcool ZH300 (IMV Technologies, France), utilizzando la curva di congelamento standard per seme bovino (5°C/min, da +4°C a -10°C; 40°C/min, da -10°C a -100°C; 20°C/min, da -100°C a -140°C). Dopo 24 ore dal congelamento, per ciascuna aliquota, sono state scongelate due paillette a bagnomaria a 37°C per 30 secondi. Quindi, attraverso osservazione a microscopio ottico (400X), ne è stata valutata la motilità individuale. Inoltre, per ogni campione, è stato calcolato il recovery rate (RR), indicante la percentuale degli spermatozoi sopravvissuti al congelamento. Per la valutazione della termoresistenza, le paillette provenienti dagli stessi lotti, sono state scongelate, mantenute a bagnomaria a 37°C ed analizzate, ad intervalli di un'ora, con l'Hamilton Thorne Computer Assisted Sperm Analyzer – CEROS, version 12, con setup standard per bovino modificato (n° frames 30; frames/sec 60Hz; minimum contrast 30; minimum cell size 5 pixel; minimum static contrast 15; STR 80%; VAP cutoff 25µm/sec; VSL cutoff 20µm/sec). Per ciascun parametro misurato, sono state calcolate le medie e le deviazioni standard, successivamente sottoposte ad analisi statistica utilizzando il modello per più gruppi di dati One-Way ANOVA e confrontati tramite il test di Student-Newman-Keuls, al fine di valutare la significatività delle differenze riscontrate.

**RISULTATI** - I campioni diluiti con Laiciphos<sup>®</sup> prima del congelamento hanno presentato una motilità individuale pari a  $60,45 \pm 15,87\%$ , mentre quelli diluiti con Bioxcell<sup>®</sup> del  $66,32 \pm 15,35\%$ . Tale differenza non è statisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Allo scongelamento, la motilità è stata valutata essere  $30,00 \pm 13,54\%$  per i campioni diluiti con Laiciphos<sup>®</sup> e  $40,26 \pm 12,96\%$  per il Bioxcell<sup>®</sup>. Tale differenza è risultata essere significativa ( $p < 0,05$ ). La differenza riscontrata tra la motilità prima del congelamento e a 24h dal congelamento è statisticamente significativa per entrambi i diluitori ( $p < 0,001$ ). Il RR calcolato per i campioni diluiti con Laiciphos<sup>®</sup> è 50,36%, mentre per quelli diluiti con Bioxcell<sup>®</sup> è 62,28%; tale differenza è statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Dall'analisi effettuata con l'HTM-CEROS durante le prove di termoresistenza (Tab. 1 e Tab. 2) si nota come la percentuale di cellule mobili decresca più rapidamente nei campioni diluiti con Laiciphos<sup>®</sup> che in quelli con Bioxcell<sup>®</sup>. Infatti si nota una differenza significativa ( $p < 0,001$ ) tra 0h e 1h nel Laiciphos<sup>®</sup>, mentre nel Bioxcell<sup>®</sup> tale differenza non è significativa ( $p > 0,05$ ). Anche per la percentuale di cellule progressivamente mobili, il Bioxcell<sup>®</sup> risulta garantire i migliori risultati, ancora alla prima e seconda ora dallo scongelamento. Considerando la velocità media lungo la traiettoria (VAP, µm/sec), la velocità lungo traiettoria in linea retta (VSL, µm/sec) e la velocità curvilinea (VCL, µm/sec), si osserva come esse decrescano repentinamente per entrambi i diluitori, con una differenza tra le varie ore statisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Sebbene i campioni diluiti con Bioxcell<sup>®</sup> presentino velocità più elevate, esse decrescono più rapidamente rispetto ai campioni diluiti con Laiciphos<sup>®</sup>. L'ampiezza dei movimenti laterali della testa dello spermatozoo (ALH, µm), invece, si

riduce nelle prime ore in maniera relativamente uniforme per i due diluitori ( $p>0,05$ ). Se invece si considerano le differenze tra i diluitori alla stessa ora, si osserva presenza di significatività, soprattutto nelle prime ore, con valori maggiori riscontrati con Bioxcell<sup>®</sup>. La linearità del movimento degli spermatozoi (STR, %), infine, rimane costante nelle quattro ore esaminate per entrambi i diluitori.

**DISCUSSIONE** - Dall'analisi dei dati ottenuti in seguito alla valutazione della motilità spermatica pre e post congelamento, sia con osservazione a microscopio ottico sia con analisi CASA, il Bioxcell<sup>®</sup> sembra dare risultati migliori se confrontato con il Laiciphos<sup>®</sup>, come riportato per il congelamento sui vapori d'azoto<sup>5</sup>.

Tab. 1 - Analisi con CASA - Laiciphos<sup>®</sup>

	0h	1h	2h	3h
VAP	72,4	66,8	51,6	47,2
VSL	62,3	60,2	46,4	42,7
VCL	109,2	94,8	78,1	72,3
ALH	4,5	4,1	3,3	3,1
STR	85,0	87,6	73,8	75,8
MOT	39,1	22,4	12,4	7,6
PROG	16,0	9,0	4,6	2,6

Tab. 2 - Analisi con CASA - Bioxcell<sup>®</sup>

	0h	1h	2h	3h	4h
	90,7	78,6	63,4	42,8	49,5
	76,4	67,8	55,3	38,6	43,4
	148,1	120,9	97,9	65,7	84,4
	5,6	4,7	4,2	2,6	3,3
	83,5	85,7	87,2	76,9	84,9
	41,0	40,8	32,9	13,1	3,0
	18,8	18,0	13,9	5,0	0,8

L'analisi della termoresistenza ha invece mostrato scarsa sopravvivenza nel tempo degli spermatozoi ed un repentino calo della motilità già dopo le prime ore dallo scongelamento per entrambi i diluitori. Come segnalato in bibliografia<sup>2</sup>, per una corretta valutazione del materiale seminale sarebbe utile confrontare i parametri relativi la motilità spermatica con i risultati di ulteriori valutazioni, quali l'integrità di membrana e dell'acrosoma degli spermatozoi, anche dopo congelamento e scongelamento. Infatti, secondo alcuni Autori<sup>3,6</sup> gli spermatozoi dei campioni diluiti in mestruai contenenti soia presentano una velocità maggiore, in quanto si trovano in un mezzo meno viscoso, rispetto a spermatozoi diluiti in tuorlo d'uovo, come è stato riscontrato anche nel presente lavoro. Gli stessi campioni, però, mostrano una più alta percentuale di cellule con membrane alterate se diluiti in mestruai a base di soia, a causa del suo più basso potere protettivo dai danni causati dal freddo sulle cellule, rispetto al tuorlo d'uovo<sup>3,6,7</sup>. Alla luce di queste considerazioni sarà dunque prioritario approfondire e perfezionare gli studi finora eseguiti, correlando tra loro i diversi parametri relativi la motilità e l'integrità di membrana con la fertilità su campo, per poter identificare il miglior protocollo di congelamento del materiale seminale di tori Azawak. L'impiego di programmi computerizzati per il congelamento del materiale seminale e per l'analisi delle sue caratteristiche qualitative si è dimostrato essere di valido supporto al miglioramento delle tecniche di allevamento, anche in condizioni più disagiate, come quelle riscontrate in Niger, o nel Sahel in genere.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Achard, F., Chanono, M. Exemple d'une gestion pastorale réussie au Sahel: la station d'élevage de Toukounous. *Science et changements planétaires/sécheresse*. 17 (1), 76-82 (2006). 2. Tartaglione, C.M., Ritta, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62, 1245-1252 (2004). 3. van Wagendonk-de Leeuw, A.M., Haring, R.M., Kaal-Lansbergen, L.M.T.E., den Daas, J.H.G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 54, 57-67 (2000). 4. Januskauskas A., Zilinskas H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir zootechnika* 17 (39) (2002). 5. Quaranta, G. et al. Confronto tra due diluitori per il congelamento di seme di tori di razza zebuina Azawak. *Atti II Congresso Nazionale S.I.R.A.* (2004). 6. Aires V.A. et al. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60, 269-279 (2003). 7. Rasul, Z., Anzar, M., Jalali S., Ahmad, N. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosoma morphology of buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 59, 31-41 (2000).

## USING COMPUTERIZED SYSTEMS FOR CRYOPRESERVATION AND EVALUATION PRE- AND POST-FREEZING OF INDIGENOUS BULL SEMEN IN A TROPICAL CONTEXT

Semita C., Nervo T., <sup>1</sup>Issa M., Calavita A., <sup>2</sup>Chanono M., Department of Animal Pathology, University of Turin, Italy; <sup>1</sup>Sciences Faculty, University of Niamey, Niger. <sup>2</sup>Centre de Multiplication du Bétail, S.S.E., Toukounous, Niger.  
Corresponding authors: carlo.semita@unito.it; mgarbeye@yahoo.fr;

**Key words:** zebu, semen, cryopreservation, CASA, Niger

The use of Artificial Insemination in developing countries can be valuable in facilitating crossbreeding of more productive breeds. Production and cryoconservation of semen doses of the local Azawak zebu breed, with good adaptive qualities and good milking performances, are the objectives of the projects led by the Dept. of Animal Pathology, in collaboration with the University of Niamey (Niger) and the local Ministry of Animal Resources. Cryopreservation causes irreversible damage to sperm motility that can affect fertility. However, accurate laboratory tests, some performed with computer-assisted systems (CASA), can be used to predict the fertility of frozen-thawed bovine semen. The aim of the study is to evaluate the effects that cryopreservation performed with a programmable freezing device using 2 extenders, already compared for freezing semen on nitrogen vapours, has on sperm motility and heat-resistance, evaluated on post-thawed samples with optical microscopy and with CASA. Semen was collected using an artificial vagina from 3 Azawak bulls, aged 6-9 years old and 500-700 Kg weight, at the S.S.E Station of Toukounous. Volume, gross and individual motility, concentration and sperm morphology were evaluated. 2 aliquots for each ejaculate were diluted to a final concentration of  $80 \times 10^6$  spermatozoa/mL with Laiciphos 488<sup>®</sup> (IMV Technologies, France), with 10% of egg yolk and 7% of glycerol, and Bioxcell<sup>®</sup> (IMV Technologies, France). After equilibration of 3 hours, semen was loaded into 0.25 mL straws. Freezing was performed using a programmable freezing device (IMV Micro-Digitcool ZH300, France) with standard bovine semen protocol. Post-thaw motility was evaluated and recovery rate (RR) was calculated for each sample. Each hour after thawing, semen was further evaluated using CASA (HTM-CEROS version 12) with a pre-adjusted setup for bovine sperm analysis. Obtained data were subjected to analysis of variance (One-Way ANOVA) and to Student-Newman-Keuls test to compare sperm motility with the 2 extenders. Sperm motility evaluated before freezing is similar for both extenders ( $p > 0.05$ ), while in frozen-thawed samples it is greater when diluted in Bioxcell<sup>®</sup> than in Laiciphos<sup>®</sup> ( $30.00 \pm 13.54\%$  vs  $40.26 \pm 12.96\%$ ;  $p < 0.05$ ). Likewise, RR is greater in samples diluted in Bioxcell<sup>®</sup> than in Laiciphos<sup>®</sup> ( $62.28\%$  vs  $50.36\%$ ;  $p < 0.05$ ). During heat-resistance evaluation, CASA showed a greater loss of total and progressive motility in Laiciphos<sup>®</sup> than in Bioxcell<sup>®</sup> ( $p < 0.001$ ). Average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) and amplitude of lateral head displacement (ALH), higher in Bioxcell<sup>®</sup> than in Laiciphos<sup>®</sup>, show a sudden post-thaw decrease, greater in Bioxcell<sup>®</sup>. Straightness (STR) is more regular at all times during the examination. As reported after freezing essays on nitrogen vapours, samples diluted in Bioxcell<sup>®</sup> showed better motility than in Laiciphos<sup>®</sup>. This result may also be due to the different effects of soybean lecithin and egg yolk as extender components. Though further studies are needed into the effects of cryopreservation on sperm integrity, this study demonstrates the usefulness of programmable freezing devices and CASA in the Sahel environment as a factor in improving breeding management.

## **MONITORAGGIO DELLE RELAZIONI ESISTENTI TRA CONTA CELLULARE DEL LATTE E INDICI RIPRODUTTIVI DI BUFALAE ALLEVATE IN NORD-ITALIA**

**Stelletta C., Guizzo L., <sup>1</sup>Sabino D., Giancesella M., Romagnoli S.,** *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova;* <sup>1</sup>*Azienda Castello di Silea (TV)*

**Parole chiave:** bufale; cellule somatiche del latte; performance riproduttive

**RIASSUNTO** - L'influenza delle infezioni intrammarie causanti l'aumento delle cellule somatiche nel latte sulle performance riproduttive delle buffale è stato valutato considerando lo storico dei dati aziendali produttivi e riproduttivi e lo studio degli andamenti dei livelli di progesterone nel siero di latte in gruppi ad alto e basso contenuto in cellule durante i primi 90 giorni di lattazione. I dati ottenuti indicano l'esistenza di animali con tendenza alla destagionalizzazione che presentano anche una probabile capacità di migrazione leucocitaria a livello mammario diversa rispetto alle femmine stagionali. Sulla base dell'analisi effettuate non è emersa nella bufala una relazione significativa tra contenuto di cellule nel latte ed efficienza riproduttiva. Tale condizione necessita di ulteriori studi ed approfondimenti soprattutto per ciò che riguarda la possibile presenza di linee genetiche con deficienza di adesione leucocitaria.

**INTRODUZIONE** - L'influenza delle infezioni intramammarie sui parametri riproduttivi nell'allevamento bovino è stata evidenziata dimostrando che nei soggetti colpiti da mastite, durante l'inizio della lattazione, l'intervallo parto-1° servizio risulta prolungato rispetto ad animali nei quali non si osserva la patologia<sup>1</sup>. Il profilo endocrino delle bovine affette da mastite durante il primo periodo della lattazione è caratterizzato da un aumento dei livelli di cortisolo nel sangue e una maggiore produzione di prostaglandine, rispetto al gruppo di controllo<sup>2</sup>. Nelle bovine con mastite il numero di servizi/concepimento aumenta, così come aumentano l'intervallo parto-concepimento e l'intervallo parto-1° servizio. Le alterazioni endocrine indotte dalle mastiti prevengono l'ovulazione, inibendo il picco di LH e l'estro. I patogeni ambientali, gram-negativi tra cui E. coli, sono i maggiori responsabili di mastiti nel peri-parto e possono provocare luteolisi, prolungare la fase follicolare, ma soprattutto determinano un ritardo nella ripresa della normale ciclicità ovarica dopo il parto<sup>3</sup>. Dati riguardanti le bufale non sono ben documentati e riportano l'effetto delle infezioni uterine come principali cause del ritardo della ripresa dell'attività ciclica ovarica<sup>4</sup>. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare un metodo di monitoraggio delle relazioni esistenti tra indici riproduttivi e conta delle cellule somatiche nel latte in un allevamento del nord Italia. Tale metodo è basato sulla caratterizzazione di dette relazioni attraverso l'analisi dei dati storici aziendali e la scelta di ristretti gruppi di animali con valori di conta cellulare alti e bassi all'inizio della lattazione; su questi gruppi viene effettuato un monitoraggio post-partum che prevede la valutazione dei valori di progesterone nel siero di latte per individuare la ciclicità ovarica.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati presi in considerazione i dati relativi alle precedenti lattazioni degli animali dell'azienda Castello di Silea in provincia di Treviso con riferimento ai valori di interparto e della conta delle cellule somatiche del latte delle singole bufale. In tal senso sono stati valutati un totale di 814 interparti e 11845 controlli del latte distribuiti in 9 anni (1999-2007). Considerando il valore di 200.000 cellule/ml e un Linear Score (LS) pari a 5 come soglia di sanità dei quarti mammari nella bufala si è proceduto all'analisi della mandria come segue: individuazione dei

trends annuali di Linear Score, di interparto e dell'intervallo parto-concepimento; incidenza di  $LS > 5$  in base al mese di parto, ai giorni di distanza dal parto o periodo di lattazione, al numero di parto o lattazione e a seconda del valore di interparto espresso in giorni. Gli animali sono stati distinti per classi di appartenenza in dipendenza dei giorni di distanza dal parto, del valore di Linear Score, dell'intervallo parto-concepimento e di interparto. Calcolato l'interparto individuale delle bufale si è proceduto ad allinearlo con i valori dei controlli funzionali riguardanti le cellule somatiche della lattazione in cui avveniva il concepimento. Dai valori di interparto e considerando una lunghezza media di gravidanza pari a 315 giorni, sono stati calcolati l'intervallo parto-concepimento (IPC) e la distanza del singolo controllo funzionale dalla data teorica di concepimento all'interno di ogni singola lattazione. I dati di interparto sono stati sottoposti ad ANOVA considerando come variabili indipendenti classi di tempo (<2000, 2000-2005, >2005) e mese di parto. Inoltre per valutare l'effetto del mese di parto e delle cellule somatiche i dati ottenuti sono stati sottoposti ad ANOVA prendendo in considerazione come variabili indipendenti la classe di LS (10 classi suddivise per numero cellule da  $cLS1:0-9,9 \times 10^4$ ;  $cLS2:1 \times 10^5-1,99 \times 10^5$ ; fino a  $cLS10:9 \times 10^5-9,9 \times 10^5$ ) e come variabile dipendente l'IPC. Dall'analisi dei dati storici sono state individuate 8 femmine caratterizzate da livelli stabili di conta cellulare all'inizio della lattazione (3-4 lattazioni precedenti). Il gruppo è stato suddiviso in due sottogruppi con alto (M) e basso (C) conteggio delle cellule del latte. I due gruppi sono stati monitorati durante i 120 giorni successivi al parto, avvenuto nello stesso mese per tutti gli animali in questione. Durante tale periodo si è proceduto con frequenza bisettimanale alla raccolta di campioni di latte distinti per ogni quarto mammario ed è stata valutata, mediante analisi di laboratorio, la qualità del secreto mammario in termini di numero di cellule somatiche. Per descrivere l'influenza dell'eventuale infezione intramammaria, indicata da un'elevata conta cellulare, sulla ripresa della ciclicità ovarica post-parto nelle bufale sono stati presi in considerazione i livelli di progesterone nei campioni di latte raccolti attraverso la determinazione con metodica ELISA standardizzata per la specie bovina<sup>5</sup>. I dati riguardanti tale monitoraggio sono stati analizzati attraverso ANOVA prendendo in considerazione come variabili indipendenti classe di distanza dal parto e gruppo. Per indicare differenze significative è stato considerato un valore di  $P < 0,05$ .

**RISULTATI** - Il valore medio di interparto è stato di 504 giorni, con un valore massimo nel mese di aprile di 567 giorni e un valore minimo nel mese di ottobre di 474 giorni. In tabella 1 vengono riportati i valori di interparto riscontrati nell'allevamento oggetto di studio. Le bufale che partoriscono nel mese di aprile, nella classe di 110-130 giorni di distanza dal parto sono lontane dal concepimento 100-150 giorni mentre alla stessa distanza dal parto mostrano a settembre-ottobre di essere prossime al concepimento (50 giorni o concepimento avvenuto) indicando che il periodo favorevole per l'accoppiamento delle bufale è la stagione con fotoperiodo decrescente. Il LS risulta elevato (5,6) nei mesi di gennaio, febbraio, marzo, aprile ed agosto, mentre a settembre si osserva un valore medio di LS pari a 5,3. L'IPC risulta elevato nei mesi di gennaio (230 giorni), febbraio (210), marzo (216) ed aprile (217). Il valore medio più basso di IPC si ha nel mese di settembre (159 giorni). Il numero di lattazioni effettuate dai 4 soggetti per gruppo è stato pari a 16 per il gruppo C e 18 per il gruppo M. Non si è riscontrata una differenza significativa nei valori di IPC che sono stati pari rispettivamente a  $169,09 \pm 108,70$  e  $169,88 \pm 126,30$  per i gruppi C ed M. La distribuzione dei parti dei due gruppi manifesta una differente risposta alla stimolazione fotoperiodica; infatti mentre nel gruppo C i parti sono concentrati nei mesi di agosto, settembre, ottobre e gennaio, nel gruppo M la distribuzione risulta essere molto più ampia andando da settembre a novembre e da gennaio a maggio. I dati storici degli 8

soggetti hanno evidenziato una differenza significativa ( $P:0,026$ ) in termini di  $\text{Log}_{10}$  CCS tra i due gruppi. I valori riscontrati sono stati pari a  $5,37 \pm 0,53$  e  $5,58 \pm 0,70$  per il gruppo C ed M rispettivamente. I dati relativi al progesterone nel siero di latte mostrano dei picchi pari a 900 pg/ml corrispondenti al periodo di estrus. Nel gruppo M (CCS alto) si mettono in evidenza picchi di progesterone per tutti i soggetti entro il 65° giorno post-parto. Nel gruppo C soltanto 3 dei 4 soggetti monitorati mostrano un picco durante il periodo di osservazione ed inoltre, di questi, soltanto 2 entro il 65° giorno post-parto.

**DISCUSSIONE** - Dai dati ottenuti può essere proposta una differente risposta al fotoperiodo determinata da numerosi fattori ed anche la possibile influenza genetica su tale risposta. La diversa distribuzione dei parti nonostante la monta libera effettuata nell'allevamento indica una diversa capacità riproduttiva dei due gruppi indipendentemente dai livelli di cellule nel latte. Le diverse conte cellulari del latte, indipendenti dalla produzione, possono indicare una differente capacità di adesione e migrazione leucocitaria soprattutto in soggetti con tendenza alla destagionalizzazione. La condizione di deficiente migrazione leucocitaria descritta largamente nei bovini è stata poco studiata nella specie bufalina<sup>6</sup> e potrebbe essere caratterizzante anche soggetti con tendenza alla destagionalizzazione riproduttiva.

**CONCLUSIONE** - I dati ottenuti indicano l'esistenza di animali con tendenza alla destagionalizzazione che presentano anche una probabile capacità di migrazione leucocitaria a livello mammario diversa rispetto alle femmine stagionali. Tale condizione necessita di ulteriori studi ed approfondimenti soprattutto per ciò che riguarda la possibile presenza di linee genetiche con deficienza di adesione leucocitaria.

Tab. 1 - Interparto (giorni) nei periodi considerati (media $\pm$ SEM).

Mese di parto	<2000	2000-2005	>2005
Gennaio	609 $\pm$ 59,54 <sub>ab</sub>	478,75 $\pm$ 12,35 <sub>a</sub>	494,00 $\pm$ 13,94 <sub>abd</sub>
Febbraio	590,5 $\pm$ 84,20 <sub>ab</sub>	510,71 $\pm$ 13,57 <sub>ab</sub>	532,35 $\pm$ 14,13 <sub>ad</sub>
Marzo	626 $\pm$ 84,20 <sub>ab</sub>	544,52 $\pm$ 14,13 <sub>bd</sub>	554,82 $\pm$ 19,07 <sub>ad</sub>
Aprile	655,5 $\pm$ 84,20 <sub>b</sub> *	572,47 $\pm$ 19,32 <sub>b</sub> **	552,44 $\pm$ 19,85 <sub>a</sub> **
Maggio	647 $\pm$ 53,26 <sub>b</sub> *	550,07 $\pm$ 14,23 <sub>bc</sub> **	529,46 $\pm$ 14,66 <sub>a</sub> **
Giugno	5751 $\pm$ 19,08 <sub>ab</sub>	524,36 $\pm$ 12,55 <sub>ab</sub>	524,85 $\pm$ 13,31 <sub>ad</sub>
Luglio	560 $\pm$ 59,54 <sub>ab</sub>	503,60 $\pm$ 9,79 <sub>ab</sub>	482,35 $\pm$ 12,77 <sub>abd</sub>
Agosto	503,44 $\pm$ 39,69 <sub>a</sub>	486,82 $\pm$ 9,27 <sub>ac</sub>	441,35 $\pm$ 14,13 <sub>b</sub>
Settembre	435,81 $\pm$ 21,39 <sub>a</sub> *	483,60 $\pm$ 10,53 <sub>a</sub> **	475,47 $\pm$ 15,64 <sub>abd</sub> **
Ottobre	419,61 $\pm$ 28,07 <sub>a</sub>	478,43 $\pm$ 11,57 <sub>a</sub>	442,40 $\pm$ 17,19 <sub>bd</sub>
Novembre	419 $\pm$ 30,75 <sub>a</sub>	486,57 $\pm$ 13,57 <sub>acd</sub>	485,75 $\pm$ 22,51 <sub>abd</sub>
Dicembre	437,86 $\pm$ 25,99 <sub>a</sub> *	469,74 $\pm$ 14,34 <sub>a</sub> *	540,35 $\pm$ 24,83 <sub>ad</sub> *

Tra i mesi all'interno di ogni periodo (colonne), lettere diverse indicano una differenza significativa a,b,c,d:  $P < 0,05$ ; tra periodi all'interno di ogni mese (righe), numero di asterischi differenti indicano una differenza significativa \* \*\* :  $P < 0,05$ .

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Barker, A.R., Schrick, F.N., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., Oliver, S.P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *J.Dairy Sci.* 81:1285-1290 (1998). 2. Hockett, M.E. et al. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Animal Reprod. Sci.* 58:241-251(2000). 3. Huszenicza G., Jánosi S., Gáspárdy A., Kulcsár M. Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows. *Animal Reprod. Sci.* 82-83: 389-400 (2004) 4. Usmani, R.H. Ahmad, N., Shafiq P., Mirza, M.A. Effect of subclinical uterine infection on cervical and uterine involution, estrous activity and fertility in postpartum buffaloes *Theriogenology.* 55:563-571 (2001). 5. Comin A. et al. Technical Note: Direct Enzyme Immunoassay of Progesterone in Bovine Milk Whey. *J. Dairy Sci.* 88: 4239 - 4242 (2005). 6. Patel K.R. et al. Low incidence of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Indian cattle and buffalo breeds. *J.Appl.Genet.* 48:153-155 (2007).

## RELATIONSHIP BETWEEN MILK CELL COUNT AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN DAIRY BUFFALOES RAISED IN NORTHERN ITALY

Stelletta C., Guizzo L., <sup>1</sup>Sabino D., Giancesella M., Romagnoli S., *Department of Veterinary Clinical Sciences, University of Padua; <sup>1</sup>Castello di Silea Farm (TV). calogero.stelletta@unipd.it*

**Keywords:** dairy buffaloes; milk cellular count; reproductive performance

Intramammary infection may influence reproductive performance through the effect of endotoxins on pulsatility and surge of LH and/or the effect of inflammatory mediators on corpora lutea maintenance.<sup>1,2</sup> The aim of this work was to evaluate a monitoring model of the relationship between milk cell count and reproductive performance. A total of 814 calving intervals and the related monthly milk controls (11845) were analysed according to calving month. The mean SCS increased with DIM and tended to be greater in winter and spring (December to May) than during summer and fall (June to November). CI ranged from 475 to 567 days and CCI from 175 to 300 days for October and April as calving months, respectively. There was no significant influence of SCS on CI or CCI, though an increase in both parameters was evident simultaneously with the SCS increase to a score of 5.6 (up to 400,000 cells/ml).

Historical productive and reproductive data were evaluated to select two small groups (4 subjects) of animals with high (M) and low (C) milk cell counts. Milk whey progesterone content and cell count were carried out every 3 days for the first 120 DIM. Group M had a higher cell count than group C, during all monitoring times despite similar milk production. Resumption of ovarian cyclicity, evaluated through milk whey progesterone content, was evidenced more in Group M than in Group C, and was not linked to the cell count levels. Further detailed investigations are suggested to examine the effects of other relevant factors, i.e. granulocyte adhesion/migration capacities, on the reproductive performances of dairy buffaloes for appropriate intervention.

**References** - 1. Barker, A.R., Schrick, F.N., Lewis, M.J., Dowlen, H.H., Oliver, S.P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *J.Dairy Sci.* 81:1285-1290 (1998). 2. Hockett, M.E. et al. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Animal Reprod. Sci.* 58:241-251(2000).



## COMPLICAZIONE LETALE DELLA MACERAZIONE FETALE IN UNA PECORA

Barna A., Marino G., Quartuccio M., Lanteri G., Mazzullo G., *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli studi di Messina*

**Parole chiave:** pecora, utero, macerazione fetale, peritonite

**RIASSUNTO** - Viene descritto un caso di macerazione fetale in una pecora Comisana di 5 anni alla sua quarta gravidanza. Il processo, scaturito probabilmente da un parto distocico, veniva diagnosticato alla necropsopia. Quest'ultima rivelava un quadro di peritonite fibrinopurulenta con numerose aderenze tra apparato genitale e pacchetto intestinale. Un'ampia comunicazione si notava fra corno uterino dx e digiuno con passaggio reciproco di materiale intestinale e ossa fetali. L'esito infausto veniva attribuito all'alterata funzionalità intestinale e alla concomitante peritonite.

**INTRODUZIONE** - La macerazione fetale (MF) è un processo a carico del feto morto e trattenuto nell'utero, le cui parti molli si decompongono, ad opera di batteri, in una massa cremosa o liquida, mentre le ossa scheletriche, se sviluppate, si staccano nei loro punti di legame<sup>1</sup>. La MF si osserva in tutti gli animali domestici, con massima frequenza nella specie bovina e minima nella cavalla<sup>1</sup>. Diverse sono le segnalazioni nella pecora<sup>2,3,4,5</sup>. Tipicamente la MF consegue ad un parto distocico, a termine o prematuro, oppure ad un aborto incompleto<sup>6</sup>. In questi casi la dilatazione della cervice, anche parziale, e la permanenza del feto morto a temperatura corporea favoriscono una rapida moltiplicazione di vari microrganismi che giungono per via vulvo-vaginale<sup>1,7</sup>. Occasionalmente i microrganismi responsabili di MF possono pervenire per via linfematogena o essere già presenti in utero<sup>7,8</sup>. Nelle pecore viene descritta una MF con enfisema dovuta a *Clostridium chauvoei*, probabilmente secondaria a ferite, come quelle da tosatura<sup>6</sup>.

**MATERIALI E METODI** - Il caso riguarda una pecora Comisana di 5 anni proveniente da un allevamento semibrado della provincia di Enna, ufficialmente indenne da brucellosi e senza episodi pregressi di clostridiosi. L'allevamento era interessato da episodi sporadici di aborto, in parte riferibili alla presenza di una sieropositività per *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii* e *Clamydophila abortus*. Il soggetto aveva partorito tre volte con nascita di soggetti vivi e vitali e senza alcuna assistenza. Verso la fine della sua quarta gravidanza, l'animale si presentava improvvisamente abbattuto, in preda a sporadici premiti espulsivi; la zona vulvare era imbrattata di sangue con le membrane fetali parzialmente esposte. L'allevatore, sospettando un episodio abortivo con ritenzione placentare, isolava l'animale e, interpellato il veterinario aziendale, lo sottoponeva a terapia antibiotica (penicillina-diidrostreptomina) e antinfiammatoria (desametasone) per 3 giorni. In seguito al peggioramento dello stato generale la penicillina veniva sostituita con tilosina per 4 giorni. Lo stato del sensorio e l'appetito miglioravano lentamente e non venivano più notati scoli vaginali. Nei mesi successivi, il soggetto veniva sottoposto ad altri due cicli di antinfiammatori e antibiotici per ulteriori episodi di peggioramento delle condizioni generali. Dopo 3 mesi dal presunto aborto, il soggetto moriva improvvisamente e veniva sottoposto a necropsopia.

**RISULTATI** - L'esame necroscopico, effettuato in campo, rivelava, all'apertura dell'addome, una notevole quantità di liquido di aspetto torbido misto a pus e lacinie fibrose, così estese ed intrecciate da coinvolgere parte delle anse intestinali e l'utero in

un'unica massa. Tutto il peritoneo viscerale e parietale appariva opaco ed arrossato (peritonite fibrino-purulenta). L'apparato genitale era costituito dalle ovaie e da due corna uterine, in continuità con una struttura sacciforme (25x19 cm), assimilabile ad una porzione di utero dilatato, che però lateralmente si continuava con un'ansa del digiuno. Praticando un taglio in quest'ultima, si metteva in evidenza un contenuto costituito da foraggio parzialmente digerito e granaglie ancora intere e ossa fetali. Procedendo nella dissezione si accertava una continuità fra l'intestino e l'utero e il contenuto restava invariato. Rimosso il materiale, la mucosa sottostante appariva di aspetto marmorizzato, roseo-nerastro nella porzione uterina e rosea nella porzione intestinale. Nel punto di fusione fra parete uterina e intestinale era possibile identificare sulla mucosa una grossa briglia connettivale, interpretabile come uno dei punti di comunicazione tra i due organi. La porzione uterina dilatata veniva identificata come la base del corno dx, alla cui estremità si riscontravano altre ossa fetali, peli e materiale intestinale. Il corno uterino di sx non conteneva ossa né materiale intestinale, ma presentava la mucosa di colorito nerastro, sollevata nelle tipiche caruncole. L'esame delle ossa fetali permetteva l'identificazione di parte delle ossa del cranio, del costato, della colonna vertebrale, del bacino e degli arti. In particolare il radio misurava 7,5 cm che consentiva di stimare l'età gestazionale in circa 140 giorni<sup>9</sup>. L'esame istologico rivelava per il corno uterino sx un'endometrite linfoplasmacellulare con numerosi macrofagi. Le ghiandole endometriali erano scompagnate e in parte disepitelizzate. Vi era inoltre metaplasia squamosa dell'epitelio di superficie. Nel corno dx, l'endometrio era appena riconoscibile, sostituito da un'imponente reazione infiammatoria linfoplasmacellulare; l'epitelio di superficie era per lo più eroso mentre era ben visibile la formazione di tessuto di granulazione nell'area subepiteliale.

**DISCUSSIONI** - Il caso di MF descritto appare conseguenza di un parto prematuro distocico, come verificato dall'esame delle ossa fetali e non di un episodio abortivo. Un approccio clinico incompleto non ha permesso una diagnosi tempestiva di ritenzione fetale e un trattamento mirato. La parziale dilatazione della cervice consentiva l'ingresso dei germi e l'instaurarsi del processo di macerazione. Nella bovina la prognosi di macerazione fetale è considerata infausta per future gravidanze; si ritiene che le ossa fetali possano spingersi profondamente nella parete uterina, causando alterazioni infiammatorie e degenerative, con conseguente metrite e peritonite adesiva; possono inoltre formarsi ascessi che si aprono in cavità addominale o nei visceri circostanti<sup>1,7</sup>. Ciò spiegherebbe il rinvenimento occasionale, in sede di macellazione, di ossa fetali in cavità addominale, nel ruminante o nel retto<sup>7,8</sup>. Nella pecora non sono noti elementi prognostici in corso di MF; probabilmente, in molti casi, le ossa fetali vengono lentamente espulse. Ciò spiegherebbe il riscontro di queste in cavità vaginale in soggetti regolarmente macellati<sup>2,3</sup>. Nel caso descritto le ossa fetali, perforando la parete uterina, avrebbero contribuito a creare inizialmente una larga coalescenza, diventata poi una comunicazione vera e propria tra il corno uterino dx e un'ansa di digiuno con passaggio bidirezionale del materiale in essi contenuto. Il processo tuttavia ha progressivamente superato la barriera fibrinosa estendendo la flogosi a tutta la cavità addominale. La presenza delle ossa nel digiuno ha certamente alterato la funzione intestinale contribuendo allo scadimento delle condizioni generali, certamente complicate dall'instaurarsi della peritonite.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Richter, J. & Götze, R. *Ostetricia veterinaria*. Editoriale Grasso, Bologna (1986). 2. Biolatti, B., Pau, S. & Appino, S. Patologia dell'apparato genitale femminile degli ovini e dei caprini. *Atti giornata di studio su: Aborti infettivi e patologia da lentivirus degli ovini e dei caprini*. Palermo 25 ottobre (1991). 3. Hailat, N.Q., Lafi, S.Q., Al-Darraj, A., Al-Ani, F. & Fathalla, M. Ovine fetal maceration.

*Small Rum. Res.* 25, 89-91 (1997). **4.** Ortega-Pacheco, A.. Maceración fetal espontánea en una borrega: hallazgos ultrasónicos y cambios plasmáticos en proteína específica de la preñez ovina B y Progesterona. *Rev. Biomed.* 8, 33-36 (1997). **5.** Soto, A.T., Gomez, M.V., Silvestrini, M.P., Migliorisi, L. & Sota, R.L. Incidencia de patologías del aparato genital por diagnóstico ultrasonográfico en hembras ovinas. *Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Ruminantes y Camelidos Sudamericanos*, Mendoza, Ar. ([www.produccionbovina.com.ar/informacion\\_tecnica/ecografia\\_ultrasonido/16soto\\_patologia.pdf](http://www.produccionbovina.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/16soto_patologia.pdf)) (2007). **6.** Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. & Palmer N. *Pathology of domestic animals*. III. Academic Press, San Diego, California (1993). **7.** Drost, M. Complication during gestation in the cow. *Theriogenology* 68, 487-491 (2007). **8.** Roberts, S.J. *Veterinary Obstetrics and genital diseases (Theriogenology)*. Published by Author, Ithaca, New York (1986). **9.** Richardson, C., Herbert, C. N. & Terlecki, S. Estimation of the developmental age of the ovine fetus and lamb. *Vet. Rec.* 99, 22-26 (1976).

**RINGRAZIAMENTI** - Si ringrazia il Sig. Sebastian Mignacca per aver sottoposto il reperto anatomico-patologico alla nostra attenzione.

## LETHAL COMPLICATIONS OF FETAL MACERATION IN A EWE

**Barna A., Marino G., Quartuccio M., Lanteri G., Mazzullo G.,** *Department of Veterinary Public Health, University of Messina. Corresponding author: marinog@unime.it*

**Key words:** ewe, uterus, fetal maceration, peritonitis

**INTRODUCTION** - Fetal maceration (FM) has been observed in all species including the sheep<sup>1</sup>. Generally it follows an incomplete abortion and/or dystocia and bacterial agents come from the dilated cervix<sup>2</sup>. Rarely, FM can be caused by a variety of organisms already present in the uterus or following a wound-infection with lymph-haematogenous spread<sup>3</sup>.

**MATERIALS AND METHODS** - A 5 year old Comisana ewe with a regular reproductive history, close to the end of its fourth pregnancy, showed all the signs of premature expulsion of the fetus with retained placenta. The animal was treated with various cycles of antibiotic and anti-inflammatory drugs but died suddenly 3 months later.

**RESULTS** - At necropsy, the opening of the abdomen revealed a severe fibrinous-purulent peritonitis. In particular, the genital organs showed large coalescences with intestinal ansa. The right uterine horn was distended and connected laterally to a portion of the jejunum. On cutting both organs, a content of fetal bones and partially-digested food was detected and a large communication between uterus and intestine was evident. The radius measured 7.5cm, allowing estimation of a fetal age of about 140 days<sup>4</sup>. Histology confirmed severe inflammatory changes in the uterine horns including squamous metaplasia of surface endometrial epithelium.

**CONCLUSION** - Prognosis of FM in sheep is unknown. In most cases, the fetal bones are probably spontaneously expelled via the vagina<sup>5</sup> without important sequels. In this case the fetal bones are primarily responsible for perforation of the uterine wall leading to the development of adhesion followed by communication with intestinal ansa. The subsequent peritonitis together with an altered intestinal function caused the death of the animal.

**REFERENCES** - **1.** Richter, J. & Götze, R. *Ostetricia veterinaria*. Editoriale Grasso, Bologna (1986). **2.** Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. & Palmer N. *Pathology of domestic animals*. Vol. III. Academic Press, San Diego, California (1993). **3.** Roberts, S.J. *Veterinary Obstetrics and genital diseases (Theriogenology)*. Published by Author, Ithaca, New York (1986). **4.** Richardson, C., Herbert, C. N. & Terlecki, S. Estimation of the developmental age of the ovine fetus and lamb. *Vet. Rec.* 99, 22-26 (1976). **5.** Biolatti, B., Pau, S. & Appino, S. Patologia dell'apparato genitale femminile degli ovini e dei caprini. *Atti giornata di studio su: Aborti infettivi e patologia da lentivirus degli ovini e dei caprini*. Palermo 25 ottobre (1991).

## VALUTAZIONE DI DUE MESTRUI DILUITORI NELLA CONSERVAZIONE A 15° C DEL SEME DI ARIETE

Mara L., Gallus M., <sup>1</sup>Rosati I., <sup>1</sup>Bogliolo L., <sup>1</sup>Zedda M.T., *AGRIS Sardegna Agenzia per la Ricerca in Agricoltura, Dipartimento Produzioni Animali, Olmedo (SS)*;

<sup>1</sup>*Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari*

**Parole chiave:** ariete, conservazione del seme, antiossidanti, motilità, integrità di membrana

**RIASSUNTO** – Scopo del lavoro è stato valutare l'effetto dell'antiossidante TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) sulla motilità e vitalità del seme di ariete conservato a 15° C sino a 72 ore. Il seme di arieti di razza Sarda è stato diluito in due extender (tampone sodio citrato con TEMPOL e SKIMMED MILK) e refrigerato a 15° C. Di ogni campione, diviso in quattro parti conservate per tempi differenti (5 min, 24, 48 e 72 ore), sono state valutate la motilità di massa e l'integrità di membrana sia mediante la fluorocromatizzazione degli spermatozoi con ioduro di propidio e carbossifluorescina diacetata (PI-CFDA) sia mediante l'hypo-osmotic swelling test. Il seme diluito in TEMPOL, conservato a 15° C sino a 48 ore, ha dimostrato una migliore motilità ed integrità di membrana rispetto allo SKIMMED MILK.

**INTRODUZIONE** - L'inseminazione artificiale finalizzata al miglioramento genetico degli ovini di razza Sarda iscritti al Libro Genealogico si effettua in Sardegna dal 1985 e prevede l'utilizzo di seme fresco conservato a 15° C in un mestruo a base di latte scremato. La sua fertilità è circa del 50%<sup>1</sup>, ma perché essa si mantenga soddisfacente deve essere utilizzato entro le 8-10 ore dalla diluizione. La possibilità di conservare questo materiale seminale per un tempo più lungo, sino a 72 ore<sup>2</sup>, è oggetto di studio perché permetterebbe di sfruttare in modo più soddisfacente i calori naturali, anche nella prospettiva che la UE vieti l'uso degli ormoni steroidei per la sincronizzazione degli estri.

Negli ultimi anni diversi gruppi di ricerca rivolgono la loro attenzione al miglioramento della qualità del seme durante la conservazione e recentemente Foote e coll.<sup>3</sup> hanno evidenziato che l'aggiunta di antiossidanti nel mestruo diluitore migliora la sopravvivenza spermatica del seme di toro conservato a 25° C. Lo spermatozoo, al contrario di altri tipi cellulari, è carente<sup>3</sup> di sostanze con azione protettiva nei confronti dei ROS (*reactive oxygen species*)<sup>4</sup>. Inoltre, la membrana spermatica possiede un alto contenuto di acidi grassi insaturi che la rendono più sensibile ai danni da perossidazione<sup>5</sup>. Durante la preparazione per la conservazione il seme è esposto all'ossigeno e alle radiazioni luminose che possono portare alla formazione di ROS e quindi ad un danneggiamento della cellula spermatica e della sua integrità genomica<sup>6-7</sup>. In queste condizioni gli antiossidanti potrebbero avere effetti positivi nel mantenere la motilità e la sopravvivenza spermatica<sup>8,9</sup>.

Studi recenti dimostrano come il TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl), antiossidante con azione SOD simile, possa incrementare la sopravvivenza *in vitro* degli spermatozoi di toro<sup>3,10</sup> e tacchino<sup>11</sup>.

Fine di questo lavoro è di valutare la conservabilità sino a 72 ore del seme di ariete ad una temperatura di 15° C utilizzando un mestruo diluitore contenente TEMPOL.

**MATERIALI E METODI** - Per la nostra ricerca sono stati utilizzati 10 arieti di razza sarda di provata fertilità ed in attività (prelievi di seme mediante vagina artificiale a giorni alterni). Da ciascun ariete venivano prelevati a scadenza bimestrale (gennaio, marzo, maggio, luglio, settembre e novembre), fra le 8:30 e le 10:00, due eiaculati che

venivano stabilizzati immediatamente a 30° C. Sono stati utilizzati solo gli eiaculati con motilità superiore a 3 (scala 0-5, dove 5 indica movimenti vorticosi molto rapidi e 0 assenza di movimento) e concentrazione uguale o superiore a  $3 \times 10^9$ /ml. Gli eiaculati sono stati uniti a formare un unico pool diviso poi in due parti uguali, diluite a una concentrazione finale di  $1,6 \times 10^9$  spermatozoi/ml a 30° C con due mestruai diluitori: 1) tampone sodio citrato (0,1 M + MgSO<sub>4</sub> 5 mM + fruttosio 2mM) a cui veniva aggiunto il TEMPOL 2 mM; 2) SKIMMED MILK (90 ml H<sub>2</sub>O mQ sterile + 300 mg sulfanilammide + 10 g latte scremato in polvere + 100 mg streptomina solfato + 100.000 UI penicillina G). Il seme diluito veniva poi refrigerato a 15° C. Immediatamente dopo la diluizione (G0) e dopo 5 minuti (G0 15°C), 24 (G1), 48 (G2), 72 (G3) ore dal raggiungimento della temperatura di 15° C venivano valutate la motilità di massa e l'integrità di membrana sia mediante la fluorocromatizzazione degli spermatozoi con ioduro di propidio e carbossifluorescina diacetata (PI-CFDA) sia mediante l'hypo-osmotic swelling test (HOST) (soluzione iposmotica costituita da 7,35 g di citrato sodico 2H<sub>2</sub>O, 13,51 g di fruttosio - 100 mOsm)<sup>12</sup>. Per la colorazione PI-CFDA il seme veniva diluito con concentrazione finale di 10<sup>7</sup> spermatozoi/ml in SOF. Al campione diluito si univano 10 µl di formaldeide (0,5%), 10 µl di 6-CFDA (1mM = 0,46 mg/ml), 10 µl di PI (0,75 mM = 0,5 mg/ml) e i campioni erano quindi incubati per 30 min. a 37° C. Dopo incubazione la lettura era eseguita in fluorescenza con filtri standard per fluoresceina e rodamina osservando campi casuali e valutando 200 spermatozoi per vetrino. Per quanto riguarda la valutazione mediante l'HOS test un ml di soluzione era unito a 10 µl del campione ed il tutto era incubato a 37°C per un'ora. Immediatamente dopo incubazione i campioni venivano fissati con gluteraldeide al 3%. Due campioni di 5 µl della sospensione venivano quindi valutati mediante microscopio a contrasto di fase con obiettivo 40x osservando 200 spermatozoi per vetrino. Sui risultati è stata eseguita l'analisi statistica mediante GLM + Fisher LSD.

**RISULTATI** - Per quanto riguarda la motilità, vi sono nette differenze tra i campioni diluiti con SKIMMED MILK rispetto al TEMPOL. Il primo mestruo infatti mantiene valori ancora accettabili (compresi tra 2,75 e 3,25) dopo 24 ore di stoccaggio che invece si abbassano drasticamente dopo 48 (0,5 - 0,5 - 1,5 - 2,5 - 1,25 - 1,5 nei 6 mesi considerati) e 72 ore (assenza totale di movimento in tutti i mesi tranne 1,5 in novembre). Il TEMPOL, invece, dopo 48 ore presentava valori di motilità discreti (3 - 2,25 - 3,25 - 3,25 - 3 - 3,25 nei 6 mesi considerati) e dopo 72 ore la motilità era sempre presente (2,75 - 1,5 - 2,75 - 2 - 2,75 - 3,25).

Per quanto riguarda l'integrità di membrana i risultati sono illustrati nella tabella 1.

		Gennaio			Marzo			Maggio			Luglio			Settembre			Novembre			An. statistica	
		PI-CFDA	HOST	M (%)	PI-CFDA	HOST	M (%)	PI-CFDA	HOST	M (%)	PI-CFDA	HOST	M (%)	PI-CFDA	HOST	M (%)	PI-CFDA	HOST	M (%)	PI-CFDA	HOST
G0	SI	50	45	47,5	42	38	40	47	56	51,5	70	76	73	71	63	67	68	64	66		
	SM	50	41	46,5	40	37	38,5	44,5	55	50,25	70	74	72	70	58	64	48	56,5	52,25	A	A
	T	49	42	45,5	41	35	38	42,5	54	48,25	71	73	72	70	60	65	66	62	64	A	A
G0 15°C	SM	40	41	40,5	38	32	35,5	44	40	42	67	66	66,5	67	54	60,5	40	51	49,5	A	A
	T	41	40	40,5	39	34	36,5	49	47	48	63	63	63	61	57	59	58	53	55,75	A	A
G1	SM	27	33	30	32,5	28	30,5	38	35	36,5	41	37	39	48	32	40	43	40	41,5	A	A
	T	41	38	39,5	40	34	37	45	40,5	42,25	48	46	47	53	45	49	50	45	48	B	A
G2	SM	9	17	13	14	8	11	9,5	10,5	10	33	7	20	27	1	14	8	8	8	A	A
	T	40	35	37,5	38	22	30	41,5	34,5	38	46	40	43	50	43	46,5	48	43	45,5	B	B
G3	SM	0	4	2	0	0	0	3	5	4	23	4	13,5	15	0	7,5	5	6	5,5	A	A
	T	34	27	30,5	11	8	9,5	40	29	34,5	40	36	38	44	30	37	43	41	42	B	B

Tab. 1 - Risultati in percentuale relativi all'integrità di membrana con colorazione PI-CFDA e HOS test e alla media (M) tra le due tecniche (SI: seme intero; SM: skimmed milk; T: TEMPOL); A,B p<0,01.

**DISCUSSIONE** - I risultati ottenuti dimostrano come un mestruo diluitore contenente l'antiossidante TEMPOL protegga l'integrità di membrana degli spermatozoi conservati a 15° C e quindi ne migliori la motilità e la vitalità, confermando quanto già osservato da Mara e coll.<sup>2</sup>. Gli antiossidanti sono complessi enzimatici che si ritrovano nel citoplasma di tutte le cellule. Gli spermatozoi però, avendo un comparto citoplasmatico molto ridotto, che diminuisce ulteriormente durante la conservazione, posseggono quantità ridotte di queste sostanze<sup>13</sup> e sono così più sensibili agli stress perossidativi che condizionano negativamente la loro vitalità e capacità fecondante. Per questo motivo diversi autori hanno addizionato sostanze antiossidanti ai mestruoi diluitori utilizzati per la conservazione del seme e il TEMPOL ha dimostrato di avere effetti positivi sulla motilità e sopravvivenza del seme di toro<sup>10</sup>.

Nel nostro lavoro i campioni diluiti in TEMPOL presentavano valori di motilità dopo le 48 ore di stoccaggio a 15° C nettamente migliori rispetto allo SKIMMED MILK. Nei campioni diluiti con quest'ultimo, infatti, la motilità era pressoché assente, confermando che il seme così preparato deve essere utilizzato entro le 8-10 ore per mantenere percentuali di fertilizzazione accettabili. La motilità, di per se, potrebbe non essere correlabile con la capacità fecondante, ma diventa sintomo di una migliore qualità spermatica se messo in relazione con i dati ottenuti sulla integrità di membrana. Essa, infatti, era migliore nei campioni diluiti con TEMPOL già a partire dalla 24<sup>a</sup> ora quando la differenza iniziava ad essere statisticamente significativa per la colorazione con PI-CFDA. A partire dalla 48<sup>a</sup> ora la differenza tra i due mestruoi diventava più evidente ed era significativa anche per l'HOS test. Pertanto, l'attività antiossidante del TEMPOL permette anche nell'ariete una migliore conservazione del seme nel tempo rispetto allo SKIMMED MILK.

In conclusione si può affermare che l'utilizzo del TEMPOL permette un allungamento dei tempi di conservazione del seme di ariete a 15° C e svincolerebbe quindi l'inseminazione artificiale dalla necessità di sincronizzare i calori mediante progestinici. Tuttavia, resta da verificare in campo la fertilità del materiale seminale così conservato.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Sanna S.R., Branca A., Carta A., Molle G. Impiego dell'inseminazione artificiale strumentale nella razza ovina Sarda. Atti Seminario SIPAOC "Miglioramento genetico degli ovini e dei caprini: aspetti scientifici e problemi applicativi". Perugia 1995; pp. 55-77. 2. Mara L. et al. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. *Theriogenology* 63, 2243-53 (2005). 3. Foote R.H., Brockett C.C., Kaproth M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 71, 13-23 (2002). 4. Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 230, 472-7 (1983). 5. Jones R., Mann T., Sherins R.J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.* 116, 188-9 (1979). 6. Aitken R.J. et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59, 1037-46 (1998). 7. Bilodeau J.F., Blanchette S., Gagnon C., Sirard M.A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56, 275-86 (2001). 8. Alvarez J.G., Storey B.T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. *Biol. Reprod.* 28, 1129-36 (1983). 9. Berlinguer F. et al. Superoxide dismutase affects the viability of thawed European mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.* 15, 19-25 (2003). 10. Lindemann C.B., Kanous K. The cyclic nitroxide free radical, 4-hidroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL), is effective in prolonging the motility of bull sperm in vitro. *Biol. Reprod.* 44, 117 (1991). 11. Donoghue A.M., Donoghue D.J. Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poult. Sci.* 76, 1440-5 (1997). 12. Jeyendran R.S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70, 219-28 (1984). 13. Li T-K. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 12, 641-6 (1975).

## EVALUATION OF TWO EXTENDERS IN RAM SEMEN STORAGE AT 15° C

Mara L., Gallus M., <sup>1</sup>Rosati I., <sup>1</sup>Bogliolo L., <sup>1</sup>Zedda M.T., *AGRIS Sardegna Agenzia per la Ricerca in Agricoltura, Dipartimento Produzioni Animali, Olmedo (SS);*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Sassari*

**Key words:** ram, semen storage, antioxidant, motility, membrane integrity.

**Introduction** - Extending the preservation time of fresh semen is a very important goal in artificial insemination programs, in particular for ewes in natural oestrus, where insemination time is longer than for ewes synchronized with hormonal treatments.

In recent years, the addition of antioxidants to extenders seems to have improved preservation of semen quality during storage<sup>1</sup> and TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) has proved capable of prolonging the motility of bull sperm *in vitro*<sup>2</sup>.

The aim of this study was to evaluate the effect of the antioxidant TEMPOL on the maintenance of ram semen motility and viability in long term storage at 15° C.

**Materials and Methods** - Semen from Sarda breed rams was collected by artificial vagina every two months (January, March, May, July, September, November). It was diluted in two extenders (sodium citrate buffer with TEMPOL and SKIMMED MILK) and cooled at 15° C. Each sample was divided into four stocks and stored for different times (5 min, 24, 48 and 72 h). Each stock was then evaluated for gross motility and sperm membrane integrity using the hypoosmotic test (HOST) and staining with propidium iodide and 6-carboxyfluorescein diacetate (PI-CFDA).

**Results** - Data obtained for motility showed marked differences between the two extenders. TEMPOL maintained good motility after 48 h (scores of 2.25 in March; of 3 in January and September; of 3.25 in May, July and November) and after 72 h motility was still present. SKIMMED MILK maintained good motility for up to 48 h of storage but after 72 h motility was totally absent.

HOST revealed that, from 48 h storage onwards, membrane integrity was better preserved in TEMPOL than in SKIMMED MILK ( $p < 0.01$ ), while PI-CFDA staining revealed better semen quality even after 24 h.

**Conclusions** - This study found that ram semen diluted with an extender containing TEMPOL demonstrated increased motility, confirming the previous published data<sup>3</sup>, and an improved protective effect on sperm plasma membrane when stored at 15° C over 48 h. However, *in vivo* trials are necessary in order to evaluate the fertility and lambing rate after cervical insemination of ram semen stored with TEMPOL.

**References** - 1. Foote R.H., Brockett C.C., Kaproth M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 71, 13–23 (2002). 2. Lindemann C.B., Kanous K. The cyclic nitroxide free radical, 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL), is effective in prolonging the motility of bull sperm *in vitro*. *Biol. Reprod.* 44, 117 (1991). 3. Mara L. et al. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and *in vitro* fertility: a preliminary study. *Theriogenology* 63, 2243-53 (2005).



## LESIONI UTERINE AD EZIOLOGIA BRUCELLARE IN OVINI E CAPRINI SICILIANI

Tucci A., Dauccia M., <sup>1</sup>Di Marco V., <sup>1</sup>Reale S., Marino G., Mannarino C., Zanghì A., *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria; Università degli Studi di Messina.*

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Area di Barcellona P.G. (ME)*

**Parole chiave:** pecora, capra, utero, *Brucella*, PCR.

**RIASSUNTO** - La brucellosi degli ovini e dei caprini è una zoonosi, endemica in Sicilia, sostenuta principalmente da *Brucella melitensis*. L'aborto, il sintomo principale della malattia, ha consentito di identificare un nuovo focolaio in un allevamento messinese. Gli apparati genitali di 211 ovini e 599 caprini, positivi al test ufficiale per la brucellosi, sono stati valutati macroscopicamente in sede di macellazione. Sono state rinvenute lesioni in 8 uteri di pecora e in 24 di capra, di cui 8 gravidi. In 2 di questi ultimi si diagnosticava una placentite fibrinoso-necrotico-purulenta e una broncopneumonia fetale. I restanti uteri, tutti in fase di subinvoluzione *post-partum/post-abortionum* presentavano un'endometrite di grado variabile, in qualche caso di tipo purulento o granulomatoso. L'impiego di una PCR per *Brucella* sp. dimostrava nel 33% dei casi la presenza del germe.

**INTRODUZIONE** - La brucellosi degli ovini e dei caprini è una malattia infettiva, contagiosa, endemica in Sicilia, sostenuta principalmente da *Brucella melitensis* (96-98%) e in misura trascurabile da *B. abortus* (2-4%)<sup>1</sup>. È un'importante zoonosi per la Sicilia che nel 2005 ha registrato il 92% dei casi umani segnalati in Italia<sup>2</sup>. Il germe penetra nell'allevamento essenzialmente attraverso animali infetti, si diffonde per via diretta e/o indiretta, causando in animali puberi turbe riproduttive manifeste come aborto, mortalità neonatale, calo della secrezione latte, orchio-epididimiti<sup>3</sup>. L'aborto brucellare, ampiamente descritto nella bovina per *B. abortus*, avviene nella seconda metà della gravidanza ed è conseguenza di una placentite fibrinoso-necrotico-purulenta e di lesioni anche gravi a diversi organi fetali (polmone, abomaso, fegato)<sup>4,5</sup>. Lesioni simili si riscontrano nei piccoli ruminanti a seguito di infezioni sperimentali con *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. ovis*<sup>6,7,8,9</sup>. Al caso di infezioni naturali le lesioni placentari, se pur sovrapponibili, sono state descritte solo su pecore infette da *B. melitensis*<sup>10</sup> e da *B. ovis*<sup>11,12</sup>.

**MATERIALI E METODI** - La ricerca è stata condotta in un allevamento di tipo semibrado della provincia di Messina, "Ufficialmente indenne" per brucellosi, comprendente 834 caprini di razza Derivata dell'Etna e 300 ovini di razza Pinzirita. La riproduzione era gestita con monta naturale, con maschi in parte provenienti da allevamenti limitrofi. Circa 2 mesi prima del periodo dei parti (gennaio-febbraio), venivano riscontrati diversi casi di aborto, che spingevano l'allevatore a richiedere all'ASL competente l'anticipazione del test ufficiale per la brucellosi (Sieroagglutinazione Rapida con Antigene al Rosa Bengala e Fissazione del Complemento miniaturizzata), il quale accertava 599 caprini e 211 ovini positivi. Con la notifica di "Allevamento infetto" veniva applicata la profilassi prevista per legge, incluso lo *stamping out* dei soggetti positivi. Durante la macellazione venivano ispezionati in loco, con le opportune precauzioni, tutti gli apparati genitali femminili. L'attenzione veniva rivolta agli uteri con gravidanza in atto o pregressa, ossia uteri *post-partum* o *post-abortionum*. Gli organi venivano esaminati macroscopicamente, mediante apertura completa dei corni uterini e valutazione delle lesioni a carico di utero, placenta e organi fetali, da cui venivano prelevati frammenti, fissati in formalina tamponata ed

avviati ad indagine istologica di routine. Frammenti uterini, in 24 casi, venivano processati anche per una *nested* PCR per rivelare la presenza di DNA specifico per *Brucella* sp., secondo una metodica precedentemente descritta<sup>14</sup>. L'età gestazionale (x) veniva stabilita tramite misurazione nuca-ano del feto (y), secondo la formula  $x=2.1 (y + 17)$ <sup>13</sup>.

**RISULTATI** - Venivano rinvenute lesioni macroscopiche in 8 uteri di pecora e in 24 di capra, di cui 8 gravidi. Questi ultimi avevano un'età gestazionale compresa tra i 69 e i 90 giorni. Le lesioni macroscopiche più rilevanti si osservavano in 2 casi (82-86 giorni) caratterizzate da iperemia e notevole edema degli invogli fetali che assumevano un aspetto gelatinoso. I placentomi, ricoperti da un essudato fibrinoso-purulento, di colorito rosso-brunastro, presentavano aree emorragiche e necrotiche (placentite fibrinoso-necrotico-purulenta). Nei feti, in entrambi i casi, si riscontrava emoperitoneo ed epatomegalia. Gli uteri (8 pecore e 16 capre), in fase *post-partum/post-abortionum*, presentavano in genere subinvoluzione uterina, in particolare del corno precedentemente gravido. Alla sezione, nel lume uterino, si notava un contenuto liquido da rosso-bruno a rosato, misto a residui tissutali necrotici, che in alcuni casi formavano una poltiglia rosso-brunastro, inodore. La mucosa endometriale appariva da rosso-bruno per l'imponente iperemia a rosata. Le caruncole si presentavano aumentate di volume, con concavità evidente, congeste, emorragiche, in alcune aree con estesi focolai necrotici. In 2 casi con involuzione quasi completa, si rinveniva nel lume un essudato denso, rosato e l'endometrio presentava caruncole piccole e rosate. L'esame istologico rivelava quadri variabili di endometriti con prevalenza di cellule mononucleate che interessavano essenzialmente lo strato superficiale. In pochi casi l'infiltrato, prevalentemente granulocitario, si insinuava tra le ghiandole endometriali e nel lume di queste. In 3 casi si osservavano numerose formazioni granulomatose con centro necrotico che occupavano gran parte dell'endometrio (endometrite granulomatosa). In altri 2 casi la flogosi, anche se sotto forma di piccoli focolai si estendeva al miometrio e in parte alla sierosa (metrite). Le aree placentari mostravano ectasia vasale, segni anche gravi di degenerazione, infiltrazione linfocitaria, necrosi e calcificazione. Nei feti si rinveniva un'imponente polmonite interstiziale, oltre ad infiltrati infiammatori epatici, splenici e renali. La PCR ha dato risultati positivi in 8 uteri (33%), tutti appartenenti alla specie caprina, qui di seguito richiamati.

Tab. 1 - Uteri di capra positivi alla PCR.

n°	Periodo	Lesione
894/C	90°g gravidanza	Lieve edema degli invogli fetali
895/C	86°g gravidanza	Lieve edema degli invogli fetali
896/C	86°g gravidanza	Placentite fibrinoso-necrotico-purulento. Lesioni fetali
902/C	<i>post-partum/post-abortionum</i>	Lieve endometrite
923/C	<i>post-partum/post-abortionum</i>	Endometrite
924/C	<i>post-partum/post-abortionum</i>	Endometrite granulomatosa
927/C	<i>post-partum/post-abortionum</i>	Endometrite granulomatosa
932/C	<i>post-partum/post-abortionum</i>	Endometrite purulenta

**DISCUSSIONE** - La nostra ricerca si proponeva di accertare eventuali lesioni uterine in animali positivi al test ufficiale per la brucellosi. Poiché la sierologia indica soltanto la circolazione dell'agente nell'allevamento, lo studio di infezioni naturali deve avvalersi di tecniche specifiche che dimostrino la presenza del germe in seno alle lesioni. Quest'approccio può essere di tipo batteriologico<sup>11,12</sup>, immunoistochimico<sup>10</sup>, oppure utilizzando, come al caso nostro, una tecnica di biologia molecolare (PCR)<sup>14</sup>

altamente specifica per *Brucella* sp.. Lesioni macroscopiche sono state rinvenute in appena il 4% degli organi esaminati, questo dato conferma che solo l'utero gravido e solo dopo il secondo mese di gestazione diviene bersaglio del batterio<sup>3,4</sup>. Le lesioni uterine, placentari e fetali sono sovrapponibili a quelle riportate in letteratura per *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. ovis*<sup>6,7,8,9</sup>. Particolare attenzione è stata rivolta agli uteri in fase di involuzione, per i quali è emersa una sequenzialità di lesioni; la placentite fibrinoso-necrotico-purulenta esitava, dopo l'espulsione del feto, in un'endometrite le cui caratteristiche (tipo di essudato, aspetto delle caruncole) apparivano variabili in relazione alla gravità del processo, ma che gradualmente e generalmente rientravano senza sequele importanti. L'esame istologico confermava, in linea generale, solo un lieve interessamento dell'endometrio, in quanto la lesione principale rimaneva per lo più confinata alle aree caruncolari. Solo in 3 casi si rinveniva un'endometrite granulomatosa con notevole scompaginamento dell'endometrio. Modesto è stato il risultato della PCR con solo il 33% di positività, che rivela probabilmente un campionamento insufficiente, nonostante l'impiego di una doppia amplificazione (*nested* PCR).

**BIBLIOGRAFIA - 1.** Di Marco, V. et al. A study on the circulation of biovars of brucellae in sheep and goat in Sicily from 1993 to 2002. *Atti Fe.Me.S.P.Rum.*, 14, 128 (2006). **2.** Marianelli, C. et al. Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2923-2928 (2007). **3.** Center for food security & public health. Ovine and caprine brucellosis: *Brucella melitensis*. [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis\\_melitensis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_melitensis.pdf) (2007). **4.** Del Piero, F. Aborti infettivi dei ruminanti. *Large Anim. Rev.* 9, 11-27 (2003). **5.** Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. & Palmer N. *Pathology of domestic animals*. IV edition, Academic Press, San Diego (1993). **6.** Molello, J.A. & Collier J.R. Placental pathology. I. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *Am. J. Vet. Res.* 24, 897-903 (1963). **7.** Molello, J.A. & Jensen, R. Placental pathology. II. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. *Am. J. Vet. Res.* 24, 905-911 (1963). **8.** Molello, J.A. & Flint, J.C. Placental pathology. III. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 24, 915-921 (1963). **9.** Meador, V.P., Hagemoser, W.A. & Deyoe, B.L. Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *Am. J. Vet. Res.* 49, 274-280 (1988). **10.** Yazicioglu, O. & Hazirolu, R. Pathological and immunoperoxidase studies of the placental lesions of ovine brucellosis. *Israel J. Vet. Med.* 55 ([http://www.isrvma.org/article/55\\_3\\_5.htm](http://www.isrvma.org/article/55_3_5.htm)) (2000). **11.** Marco, J. et al. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. *Vet. Rec.* 135, 254-256 (1994). **12.** Libal, M.C. & Kirkbride, C.A. *Brucella ovis*-induced abortion in ewes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183, 553-554 (1983). **13.** Noakes, D.E., Parkinson, T.J. & England G.C.W. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. VIII edition, W.B. Saunders, London (2001). **14.** Reale, S. et al. Controllo della contaminazione da *Brucella* nel latte e nei suoi derivati mediante PCR. *Atti S.I.P.A.O.C.* 13, 494-496 (1999).

## BRUCELLAR UTERINE LESIONS IN SICILIAN EWES AND DOES

Tucci A., Dauccia M., <sup>1</sup>Di Marco V., <sup>1</sup>Reale S., Marino G, Mannarino C., Zanghì A., Department of Veterinary Public Health, University of Messina; <sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Area di Barcellona P.G. (ME); ASL  
Corresponding author: Zanghia@unime.it

**Key words:** ewe, doe, uterus, *Brucella*, PCR.

**INTRODUCTION** - Ovine and caprine brucellosis in Sicily is endemic and mainly caused by *Brucella melitensis*<sup>1</sup>. The main sign of the disease is abortion, widely described in cows for *B. abortus* as a consequence of necrotizing fibrinous purulent placentitis<sup>2</sup>. A similar pathogenesis has been suggested in ewes and does by means of experimental<sup>3</sup> and natural infections<sup>4</sup>.

**MATERIALS AND METHODS** - Following serological checks, a natural brucellar infection was discovered on a farm near Messina, where there were 834 caprines and 300 ovines. 599 caprines and 211 ovines tested positive and were sent to the local abattoir, as required by law. On slaughtering, the genital organs were collected and grossly examined. Samples of uterus in which phlogistic lesions were evident were evaluated histologically and by a nested PCR for *Brucella* sp.

**RESULTS** - Only 8 ovine and 24 caprine uteruses showed gross lesions. Of 8 gravid caprine uteruses (69-90 days), only 2 had severe features of necrotizing purulent-fibrinous placentitis and fetal lesions, mainly represented by hepatomegaly and interstitial pneumonia. The other uteruses presented *post-partum/post-abortum* involutions, but on opening were seen to be filled with reddish-brown to pink exudates mixed with necrotic remnants. Endometrial mucosa was slightly affected, while caruncles were often enlarged, congested, hemorrhagic, with necrotic foci. Histology confirmed varying grades of endometritis with prevalent lymphocytic and only occasionally granulocytic populations. Only 3 cases of granulomatous endometritis were detected with severe damage to the endometrial layer. In 2 cases, the extension of the infiltrates indicated a metritis. PCR was positive in 8 caprine cases (33%).

**DISCUSSION** - The study of pathological changes during natural infection requires demonstration of the agents within the lesions. PCR is a very sensitive technique and was employed to this end. However the PCR results (33% positivity) were not very satisfactory. The low prevalence of the detected gross uterine lesions (4%) confirms that the uterus is probably an elective site for *Brucella* organisms only during the second half of gestation<sup>2</sup>. After expulsion of the fetus, typical brucellar placentitis showed sequels of endometritis of varying grades, though generally not so severe as expected.

**REFERENCES** - 1. Di Marco, V. et al. A study on the circulation of biovars of brucellae in sheep and goat in Sicily from 1993 to 2002. *Atti Fe.Me.S.P.Rum.*,14, 128 (2006). 2. Del Piero, F. Aborti infettivi dei ruminanti. *Large Anim. Rev.* 9, 11-27 (2003). 3. Meador, V.P., Hagemoser, W.A. & Deyoe, B.L. Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *Am. J. Vet. Res.* 49, 274-280 (1988). 4. Yazicioglu, O. & Hazioglu, R. Pathological and immunoperoxidase studies of the placental lesions of ovine brucellosis. *Israel J. Vet. Med.* 55 ([http://www.isrvma.org/article/55\\_3\\_5.htm](http://www.isrvma.org/article/55_3_5.htm)) (2000).

## VARIAZIONI DELLA FUNZIONALITA' TESTICOLARE NEI BECCHI IN SEGUITO A SOMMINISTRAZIONE PROTRATTA DI BUSERELIN

**Binetti F., Aiudi G., Matarrese R., De Sandro Salvati A., Caira M., Lacalandra G.M.,** *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari*

**Parole chiave:** libido, GnRH, testosteronemia.

**RIASSUNTO** - Gli effetti antifertilità degli agonisti del GnRH sono stati documentati nel ratto, nel cane, nella scimmia *reshus*, nell'uomo e in molte altre specie di Mammiferi domestici. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare se nel becco somministrazioni prolungate di un analogo di sintesi del GnRH (Buserelin), avessero avuto un effetto inibente su testosteronemia, dimensioni testicolari e libido, durante la stagione riproduttiva.

**INTRODUZIONE** - La Buserelina è un analogo sintetico del GnRH, neuro-ormone ipotalamico che controlla l'attività riproduttiva nei Mammiferi. In singola dose, la buserelina stimola il rilascio delle gonadotropine, al contrario la somministrazione di dosi multiple causa una desensitizzazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi<sup>1, 2, 3</sup>. Somministrazioni di buserelina per 4 giorni consecutivi producono un incremento del 70% dei recettori per il GnRH in ratti maschi interi e castrati<sup>4</sup>. Questo effetto risulta, comunque, antagonizzabile tramite la somministrazione di siero anti-GnRH di ratto<sup>4</sup>. Durante una terapia con buserelina si è notata la possibilità di sviluppo di anticorpi anti-buserelina, ma senza conseguenze cliniche<sup>5</sup>. Sono state condotte ricerche sulla tossicità della molecola, effettuando somministrazioni sottocutanee di buserelina con dosi a partire da 12 µg/kg in ratti e cani, che hanno rilevato una riduzione del peso dei testicoli nei maschi di entrambe le specie<sup>6</sup>. Il tempo di emivita, è di circa 75 minuti dopo una somministrazione intravenosa di una elevata dose, e di circa 80 minuti dopo una somministrazione intramuscolare di 1000 µg ogni 12 ore per 7 giorni<sup>7</sup>. L'impiego degli agonisti del GnRH rappresenta un significativo passo in avanti nella clinica ginecologica ed andrologica in tutti quei casi in cui si rende necessario il raggiungimento di un blocco reversibile degli ormoni sessuali o una soppressione a lungo termine in oncologia come nel cancro alla prostata. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare se nel becco somministrazioni prolungate di un analogo di sintesi del GnRH potessero avere un effetto inibente sulla testosteronemia e conseguentemente sulla libido, durante la stagione riproduttiva.

**MATERIALI E METODI** - La sperimentazione, è stata effettuata nei mesi di settembre-ottobre 2007, su 6 becchi di razza Jonica x Maltese, di età compresa tra 1 e 5 anni, in buone condizioni di salute, di provata fertilità, allevati con sistema misto pascolo-integrazione in stalla, presso l'Azienda "Ricchioni" dell'Università degli Studi di Bari. Il giorno prima dell'inizio del trattamento in tutti i soggetti sono stati eseguiti rilievi clinici ed ecografici: comportamento, circonferenza testicolare mediante metro lineare, misurazioni ecografiche dei diametri testicolari (Chison 8300 vet, Cina). Ai becchi è stato somministrato Buserelin acetato (Suprefact<sup>®</sup> soluzione iniettabile 1mg/ml; Aventis, Italy), 0,5 mg/capo im ogni 8 ore, per 5 settimane. Dall'inizio della sperimentazione sono stati effettuati prelievi ematici dalla vena giugulare, ed il siero, ottenuto dopo centrifugazione, è stato stoccato (-20°C) per valutare la testosteronemia (Kit testosterone EIA, con sensibilità 0,03% e specificità 100%, RADIM, Pomezia Roma). Le misurazioni testicolari ed i rilievi ecografici sono stati effettuati prima del trattamento, alla terza e alla 5 settimana. Per ogni becco è stata monitorata la libido, valutando l'interesse mostrato per le femmine in estro mediante lambimenti dei genitali,

atteggiamento di Flehmen ed eventuali salti sulle capre. I dati ottenuti dalla testosteronemia e dalle misurazioni lineari ed ecografiche sono stati valutati statisticamente attraverso ANOVA test con significatività per  $P \leq 0,05$ .

**RISULTATI** - I prelievi ematici effettuati per la valutazione della testosteronemia prima dell'inizio dei trattamenti hanno permesso di evidenziare che dei 6 soggetti, 3 avevano valori basali tipici della controstagione, mentre gli altri 3 presentavano valori più alti, indicativi di una ripresa della attività riproduttiva. Tali dati risultavano positivamente correlati agli atteggiamenti comportamentali e alle misurazioni della circonferenza testicolare e questo ha permesso di suddividere i soggetti in due gruppi A e B. Effettuando il trattamento all'inizio della stagione riproduttiva, i soggetti del gruppo A si presentavano ancora in anestro stagionale, mentre quelli del gruppo B mostravano già una ripresa dell'attività testicolare. Durante le prime due settimane di trattamento, in particolare alla fine della seconda settimana, in tutti i soggetti, sono stati osservati sintomi tipici di libido, irrequietezza, tentativi reciproci di monta, frequenti getti di urina ed interesse verso le femmine. In entrambi i gruppi a partire dalla terza settimana, si è osservato un calo della libido con diminuzione marcata delle manifestazioni comportamentali correlabili alle misurazioni della circonferenza testicolare.

Tab. 1 - Testosteronemia (ng/ml) nei becchi dei gruppi A e B

Gruppi	Giorni di trattamento								
	T <sub>0</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>15</sub>	T <sub>20</sub>	T <sub>25</sub>	T <sub>30</sub>	T <sub>35</sub>
A	0,4 (±0,4) <sup>A</sup>	5,7 (±3,5)	8,7 (±4,3)	7,2 (±1,7) <sup>B</sup>	7,0 (±1,6) <sup>B</sup>	5,7 (±1,8) <sup>B</sup>	4,5 (±0,8) <sup>BC</sup>	2,0 (±1,2)	0,9 (±0,2) <sup>AD</sup>
B	10,6 (±1,4) <sup>A</sup>	15,2 (±0,7) <sup>BC</sup>	14,5 (±2,7)	12,6 (±1,8)	9,6 (±0,4) <sup>D</sup>	7,1 (±1,8) <sup>D</sup>	7,0 (±2,9) <sup>D</sup>	5,0 (±3,5) <sup>D</sup>	4,3 (±3,8) <sup>D</sup>

Sulla stessa riga per il Gruppo A: A≠B C≠D E≠F G≠H per  $P \leq 0,01$ ;  
sulla stessa riga per il Gruppo B: A≠B C≠D per  $P \leq 0,01$ .

Tab. 2 - Misurazione (cm; X±D.S.) della circonferenza testicolare; distanza ecografica parete-parete e parete - mediastino testicolare.

RILIEVI	BECCHI	Inizio trattamento	3 <sup>a</sup> settimana	Fine trattamento
Circonferenza scrotale	Gruppo A	34,4 ± 0,7 <sup>A</sup>	34,3 ± 0,6	31,5 ± 1,3 <sup>B</sup>
	Gruppo B	31,8 ± 1,7	32,9 ± 1,6	32,1 ± 1,7
Distanza ecografica parete-parete	Gruppo A	6,27 ± 0,4 <sup>A</sup>	6,09 ± 0,5	5,3 ± 0,1 <sup>B</sup>
	Gruppo B	5,44 ± 0,7	5,58 ± 0,3	5,5 ± 0,3
Distanza ecografica parete-mediastino	Gruppo A	3,71 ± 0,2	3,53 ± 0,1	3,0 ± 0,4
	Gruppo B	3,29 ± 0,4	3,39 ± 0,5	3,3 ± 0,5

Sulla stessa riga: A≠B per  $P \leq 0,01$

La testosteronemia è notevolmente aumentata dopo circa una settimana di trattamento, in tutti i soggetti, anche se più marcatamente nel gruppo A, mentre a partire dalla terza settimana, i valori sono costantemente diminuiti, per i soggetti di entrambi i gruppi (Tab. 1). La circonferenza scrotale ed i parametri dimensionali rilevati ecograficamente sui testicoli sono risultati modificati in tutti i becchi trattati (Tab. 2).

**CONCLUSIONI** - Il trattamento con il Buserelin è risultato privo di effetti collaterali ed in grado, in 6-7 giorni, di stimolare l'attività riproduttiva determinando

verosimilmente, attraverso un incremento dell'LH e dell'FSH, un aumento della libido e della testosteronemia. La somministrazione cronica invece ha avuto come esito una depressione funzionale dell'attività testicolare. Anche nei becchi, quindi, come nel ratto, nel cane, nella scimmia reshus, nell'uomo e in molte altre specie di mammiferi domestici<sup>9</sup>, la prolungata esposizione all'analogo di sintesi del GnRH riduce la secrezione di gonadotropine stimulate dal GnRH attraverso una down-regulation dei recettori del GnRH a livello ipofisario e dei recettori gonadotropi a livello gonadico come anche, verosimilmente, un'alterazione dell'internalizzazione e della trasmissione del segnale ormonale<sup>8</sup>. Gli effetti antifertilità degli agonisti del GnRH sono stati documentati nel ratto, nel cane, nella scimmia reshus, nell'uomo e in molte altre specie di Mammiferi domestici<sup>9</sup>. Comunque si rendono necessari ulteriori studi sulla dinamica endocrina conseguente all'impiego del farmaco utilizzato, sull'interferenza degli equilibri endocrini dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Tuttavia si può fornire una generale indicazione sulla utilizzazione pratica del Buserelin che al dosaggio di 0,5 mg/capo per 3 volte al dì per un massimo di 5-7 giorni può essere utilizzato sia in soggetti già attivi per aumentare le performance, sia in soggetti inattivi per indurre rapidamente una ripresa dell'attività sessuale.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Brogden R.N., Buckley M.T., Ward A.: Buserelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical profile. *Drug*, 39(3): 399-437, (1990). 2. Sandow J.: The regulation of LHRH action at the pituitary and gonadal receptor level: a review. *Psychoneuroendocrinology*, 8: 277-297, (1983). 3. Loumaye E., Catt K.J.: Homologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured pituitary cells. *Science*, 215: 983-985, (1982). 4. Sandow J., König W.: Studies with fragments of a highly active analogue of luteinizing hormone releasing hormone. *Journal of Endocrinology*, 81: 175-182, (1979). 5. Fraser H.M., Sandow J., Krauss B.: Antibody production against an agonist analogue of luteinizing hormone-releasing hormone: evaluation of immunochemical and physiological consequences. *Acta Endocrinologica*, 103: 151-157, (1983). 6. Kramer M., Gunzel P.: The proof of drug effects on endocrine glands or endocrine target organs by means of toxicological investigations. *Pharmacological and Therapeutics*, 5: 287-296, (1979). 7. Kiesel L., Sandow J., Bertgesk, Jerabek-Sandow G., Trabant H. et al.: Serum concentration and urinary excretion of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist buserelin in patients with endometriosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 68: 1167-1173, (1989). 8. Kutzler M., Wood A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66: 514-525, (2006). 9. Kher R. and Kalla N.R.: Antifertility effects of an LHRH agonist in male mice. *Contraception*, 53: 299-306, (1996).

## TESTICULAR FUNCTIONALITY VARIATIONS IN BUCKS SUBSEQUENTLY BUSERELIN EXTENDED SUBMINISTRATION

**Binetti F., Aiudi G., Matarrese R., De Sandro Salvati A., Caira M., Lacalandra G.M.,** *Department of Animal Production, University of Bari. Corresponding author: g.aiudi@veterinaria.uniba.it*

**Key words:** libido, GnRH, testosteronemie

Buserelin is a synthetic GnRH analogue, a hypothalamic neuro-hormone controlling the reproductive activity in Mammals through the stimulation of the synthesis and release of the hypophysial gonadotropines LH and FSH. In single dose, the buserelin stimulates the release of gonadotropines, on the contrary, the multiple dose administration causes a desensitization of the axle hypothalamus-hypophysis-gonads. In the present work it has been valued, as known, that in the beak, time lasting administrations of an synthetic GnRH analogue have an inhibiting effect on testosteronemy and consequently on the beaks libido during the normal reproductive season. The experimentation has been conducted on 6 beaks of Jonica x Maltese breed, on which there have been valued libidos, testicular circumference measured manually and through ultrasound and testosteronemy. The beaks have been treated with Buserelin acetate (Suprefact® injectable solution 1mg/ml; Aventis, Italy) in the quantity of 0,5 mg/individual, intramuscular each 8 hours, every day. The duration of the treatment has been of 5 weeks.

Starting from the third week in all the subjects a decrease of the libido has been observed, with marked diminution of the behavioural signs. The measurements of the testicular circumferences has evidenced the interaction between this parameter and the changes on the libido. The testosterone values constantly decreased beginning from the third week in all the subjects. Scrotal circumference and the dimensional parameters revealed by testicle ultrasound result changed in all beaks. Therefore, in beaks as in the rat, dog, the reshus monkey, in human and in a multitude of other domestic mammals, the long-time/ prolonged exposure to the synthetic GnRH analogue causes a reduction of the gonadotrophine secretion stimulated by GnRH through a receptor down-regulation.



## ASPETTI MORFOLOGICI ED ISTOCHIMICI DELL'EPITELIO DI RIVESTIMENTO DELL'OVIDUTTO DI CAVALLA

Desantis S., Ventriglia G., Zizza S., <sup>1</sup>Rossi R., Di Summa A., Losurdo M., De Metrio G., *Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali; <sup>1</sup>Dipartimento di Anatomia Patologica, Università degli Studi di Bari*

**Parole chiave:** ovidutto, ultrastruttura, glicoproteine, cavalla.

**RIASSUNTO** - Indagini di microscopia elettronica a scansione, a trasmissione, e di istochimica dei glicoconjugati sono state effettuate sull'ovidutto di cavalla. Le cellule non ciliate (secretorie) hanno mostrato corti microvilli, variabilità nella presenza di protrusioni apicali, nella elettrendensità citoplasmatica e nelle caratteristiche dei granuli di secreto nell'ambito delle diverse regioni dell'ovidutto. La superficie luminale dell'intero ovidutto e la regione apicale delle cellule non ciliate dell'ampolla e dell'istmo hanno evidenziato la contemporanea presenza di glicoproteine neutre e di mucosostanze acide soprattutto solfatei, mentre la regione apicale delle cellule non ciliate dell'infundibulo ha espresso solo queste ultime. Questi risultati sono correlabili con la specificità funzionale dell'epitelio di rivestimento dei vari segmenti dell'ovidutto.

**INTRODUZIONE** - L'ovidutto gioca un ruolo essenziale nella riproduzione dei mammiferi perchè non rappresenta un semplice condotto interposto tra l'ovario e l'utero ma è un organo che concorre, insieme ad un trasudato del siero, alla formazione del fluido intraluminale che crea un microambiente necessario per le funzioni di questo dotto. Sulla base delle caratteristiche macroscopiche ed istologiche, l'ovidutto è diviso in preampolla (fimbrie ed infundibulo), ampolla ed istmo. L'epitelio che riveste la superficie interna dell'ovidutto è costituito da due distinti tipi cellulari: cellule ciliate (CC) e cellule non ciliate (CNC). Le CC favoriscono lo spostamento dei gameti, mentre le CNC sintetizzano e rilasciano nel lume glicoproteine oviduttali specie-specifiche che si associano alla zona pellucida dell'ovocita e/o alla superficie degli spermatozoi giocando un ruolo importante nella maturazione degli spermatozoi, nella fecondazione e nelle prime fasi di sviluppo dell'embrione<sup>1</sup>. Sebbene in molti animali domestici siano stati compiuti studi sulle caratteristiche ultrastrutturali dell'ovidutto<sup>2,3</sup>, mancano dati sulle caratteristiche citologiche dell'ovidutto equino. In questa specie le indagini sulla componente glicoproteica sono incomplete perchè mancano dati riguardanti l'infundibulo<sup>4,5,6</sup>. Al fine di mettere in evidenza correlazioni tra struttura e funzioni, nel presente studio sono state esaminate, mediante indagini di microscopia elettronica a scansione (SEM), a trasmissione (TEM) e l'istochimica convenzionale dei glicoconjugati, le caratteristiche ultrastrutturali e la componente carboidratica dell'epitelio di rivestimento delle diverse regioni dell'ovidutto di cavalle in fase estrale.

**MATERIALI E METODI** - Ovidutti di tre cavalle in fase estrale con storia riproduttiva sconosciuta sono stati prelevati e divisi nei tratti infundibulare, ampollare ed istmico. Frammenti di ciascun segmento sono stati quindi: 1) fissati in glutaraldeide 3% tamponata in cacodilato, postfissati in OsO<sub>4</sub> e sottoposti a protocolli di routine per le indagini al SEM o al TEM; 2) fissati in liquido di Bouin ed inclusi in paraffina per l'analisi istochimica dei glicoconjugati mediante le colorazioni PAS (per marcare le glicoproteine neutre), Alcian Blu pH 2,5 (per evidenziare i glicoconjugati acidi solfati e non solfati), Alcian Blu pH 1,0 (per individuare i glicoconjugati solfati).

**RISULTATI** - Le osservazioni al SEM hanno evidenziato la presenza di CC e le CNC in tutte le regioni dell'ovidutto. Le CNC contenevano corti microvilli e/o protrusioni

apicali di aspetto irregolare (Fig. 1A). Le indagini al TEM hanno rivelato caratteristiche differenti tra le CC e tra le CNC nei diversi segmenti considerati. Le CC sono sempre apparse caratterizzate da una abbondante presenza di mitocondri nella regione apicale (Fig. 1B), mentre la loro elettrondensità citoplasmatica variava nelle diverse regioni dell'ovidutto (Figg. 1C,E). Nell'infundibulo le CC erano sia moderatamente elettrondense che elettronlucenti, nell'ampolla erano moderatamente elettrondense, nell'istmo erano elettrondense. Le CNC hanno mostrato la presenza di strutture connesse alla sintesi delle glicoproteine (reticolo endoplasmico rugoso e apparato di Golgi) oltre che differenze riguardanti la elettrondensità citoplasmatica, la presenza di protrusioni apicali e le caratteristiche strutturali dei granuli. Nell'infundibulo sono state trovate CNC prive di granuli di secreto con citoplasma elettronlucente o elettrondenso, queste ultime con nucleo dal contorno irregolare situato in posizione apicale (Fig. 1C), come anche CNC elettrondense più esili con protrusioni apicali (Figg. 1B). Nell'ampolla le CNC hanno mostrato citoplasma moderatamente elettrondenso con protrusioni apicali contenenti granuli di elettrondensità variabile (Fig. 1D). Nell'istmo le CNC sono apparse elettronlucenti e potevano essere senza protrusioni apicali, contenenti granuli differenti per elettrondensità della matrice e per la presenza di un core elettrondenso, o con protrusioni apicali contenenti granuli fortemente elettrondensi (Fig. 1E).

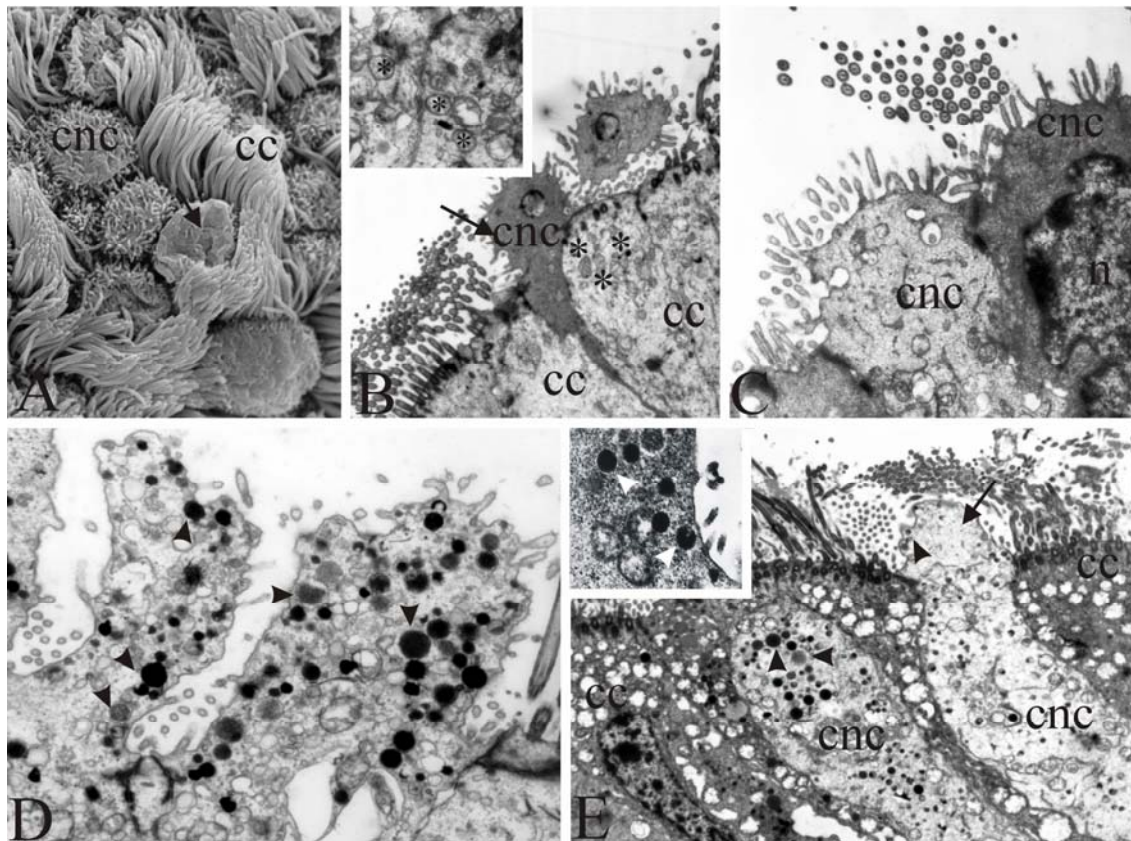


Fig. 1 - A. Micrografia al SEM di istmo dell'ovidutto di cavalla. Figg. B,C. Micrografie al TEM di infundibulo oviduttale di cavalla. L'inserto in B mostra la elevata presenza di mitocondri nella regione apicale di due CC. Fig. D. Caratteristiche ultrastrutturali di due protrusioni apicali delle CNC dell'ampolla di cavalla. Fig. E. Micrografia al TEM dell'istmo dell'ovidutto di cavalla. L'inserto mostra granuli fortemente elettrondensi in una protrusione apicale, cc, cellula ciliata; cnc, cellula non ciliata; n, nucleo; freccia, protrusione apicale, \*, mitocondrio; testa di freccia, granulo di secreto.

L'istochimica dei glicoconjugati (Tabella 1) ha evidenziato che la superficie luminale dell'intero ovidutto e la regione apicale di alcune CNC dell'ampolla e dell'istmo si colorano con la PAS, l'Alcian Blu pH 2,5 e l'Alcian Blu pH 1,0, mentre le CNC dell'infundibulo non reagiscono con la PAS ma le protrusioni apicali presentano affinità per entrambe le colorazioni con Alcian Blu.

Tab. 1 - Risultati dell'istochimica dei glicoconjugati sull'ovidutto di cavalla.

Colorazioni	Infundibulo	Ampolla	Istmo
PAS	sl	sl/ra	sl/ra
Alcian Blu pH 2,5	sl/pa	sl/ra	sl/ra
Alcian Blu pH 1,0	sl/pa	sl/ra	sl/ra

pa: protrusione apicale; ra: regione apicale; sl: superficie luminale.

**DISCUSSIONE** - I risultati ottenuti in questo studio evidenziano per la prima volta che le regioni dell'ovidutto di cavalla sono costituite da diverse sottopopolazioni di CC e di CNC. In particolare le CNC sono distinguibili per la elettrondensità citoplasmatica, per la presenza di protrusioni apicali, per morfologia dei granuli di secrezione. Queste osservazioni sembrano essere in accordo con i risultati ottenuti in studi ultrastrutturali dell'ovidutto di altre specie di mammifero<sup>2,3</sup>. Le reazioni istochimiche indicano che i granuli di secreto osservati al TEM potrebbero contenere glicoproteine neutre o acide diversamente espresse lungo il dotto. Infatti nell'infundibulo i granuli di secreto sembrano contenere solo glicoconjugati acidi, mentre nell'ampolla e nell'istmo sono presenti anche glicoproteine neutre. Il contenuto dei granuli va a costituire la superficie luminale che contiene entrambi i tipi di glicoconjugati. Difficile da spiegare è la presenza di glicoproteine neutre sulla superficie luminale dell'infundibulo con la loro assenza nel citoplasma delle CNC. Comunque, la diversa espressione di glicoproteine a livello delle CNC potrebbe essere correlata con la diversa specificità funzionale dei diversi segmenti dell'ovidutto così come è stato osservato nell'ovidutto di altri mammiferi<sup>1,2</sup>.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Buhi, W.C. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123, 355-62 (2002). **2.** Abe, H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol. Histopathol.* 11, 743-768 (1996). **3.** Abe, H. et al. Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *J. Anat.* 195, 515-521 (1999). **4.** Ball, B.A. et al. Distribution of glycoconjugates in the uterine tube (oviduct) of horses. *Am. J. Vet. Res.* 58, 816-22 (1997). **5.** Desantis, S. et al. Distribution of sialoglycoconjugates in the oviductal isthmus of the horse during anoestrus, oestrus and pregnancy: a lectin histochemistry study. *Eur. J. Histochem.* 48, 403-412 (2004). **6.** Desantis, S. et al. Differential lectin binding patterns in the oviductal ampulla of the horse during oestrus. *J. Histochem.* 49, 139-150 (2005).

## ULTRASTRUCTURAL FEATURES AND HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF GLYCOCONJUGATES IN MARE OVIDUCT

Desantis S., Ventriglia G., Zizza S., <sup>1</sup>Rossi R., Di Summa A., Losurdo M., De Metrio G., *Department of Animal Health and Well-being; <sup>1</sup>Department of Pathologic Anatomy, University of Bari, Italy.*  
Corresponding author: s.desantis@veterinaria.uniba.it

**Key words:** oviduct, ultrastructure, glycoconjugates, horse.

The oviduct plays an essential role in mammalian reproduction by providing suitable conditions for gamete transport, maturation, fertilization, and early embryo development. The oviduct is divided into three segments, which differ in their anatomical and functional features: infundibulum, ampulla and isthmus. Each segment is characterized by the secretion of specific molecules, mainly secretory glycoproteins<sup>1</sup>. The oviductal epithelium is a simple columnar type and consists of ciliated (CCs) and non-ciliated cells (NCs). CCs play a role in the transport of germinal cells, whereas NCs are considered secretory cells. Marked regional variations in the morphological and biochemical characteristics of the oviductal secretory cells have been demonstrated in many species<sup>2,3</sup>, but studies on the ultrastructure of the mare oviductal epithelium are still lacking and histochemical investigations do not include the infundibular segment<sup>4,5,6</sup>. In this study, we investigated the ultrastructural features and the glycoconjugate pattern of the epithelium lining the mare oviduct during oestrus. Thus oviducts from three oestrous mares (with a follicle >35 mm) were processed for scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy, and for carbohydrate histochemistry.

SEM and TEM evidenced that NCs were covered either with short microvilli or apical protrusions. TEM showed numerous mitochondria in the apical region of CCs along the entire oviduct, but the cytoplasm electron-density varied among the segments. It was electron-dense or light in the infundibulum, moderately electron-dense in the ampulla, electron-dense in the isthmus. NCs contained well-developed Golgi complexes and rough endoplasmic reticulum, but the presence of apical protrusions, the cytoplasm electron-density and the granular structure varied among the segments. Infundibular NCs displayed either electron-dense or light cytoplasm. The former were characterized by both apical nuclei and protrusions. Light NCs displayed secretory granules with different electron-dense matrices. Ampullar NCs were moderately electron-dense and displayed apical protrusions containing different type of secretory granules. Isthmic NCs were light, sometimes without apical protrusions, and their secretory granules were very heterogeneous. The histochemistry revealed both neutral and acidic glycans on the luminal surface along the duct and in the apical region of ampullar and isthmic NCs. NCs of the infundibulum expressed acidic glycoconjugates. These results indicate distinctive differences between segments of the mare oviduct.

**REFERENCES** - 1. Buhi, W.C. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 123, 355-62 (2002). 2. Abe, H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol. Histopathol.* 11, 743-768 (1996). 3. Abe, H. et al. Ultrastructural features of goat oviductal secretory cells at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *J. Anat.* 195, 515-521 (1999). 4. Ball, B.A. et al. Distribution of glycoconjugates in the uterine tube (oviduct) of horses. *Am. J. Vet. Res.* 58, 816-22 (1997). 5. Desantis, S. et al. Distribution of sialoglycoconjugates in the oviductal isthmus of the horse during anoestrus, oestrus and pregnancy: a lectin histochemistry study. *Eur. J. Histochem.* 48, 403-412 (2004). 6. Desantis, S. et al. Differential lectin binding patterns in the oviductal ampulla of the horse during oestrus. *Eur. J. Histochem.* 49, 139-150 (2005).

## ATTIVITÀ STEROIDOGENICA E SENSIBILITÀ ALLE PGF<sub>2α</sub> DEL CORPO LUTEO NELLA CAVALLA

Panzani S., <sup>1</sup>Faustini M., <sup>2</sup>Carluccio A., <sup>3</sup>Quartuccio M., <sup>4</sup>Govoni N., Cairoli F.,  
*Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Milano; <sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e  
Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze  
Cliniche Veterinarie, Teramo; <sup>3</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Messina;  
<sup>4</sup>DIMORFIPA, Bologna*

**Parole chiave:** cavalla, corpo luteo, progesterone, PGF<sub>2α</sub>

**RIASSUNTO** - Per verificare l'esistenza di una correlazione tra attività steroidogenica e sensibilità del CL alle PGF<sub>2α</sub>, 170 cavalle, trattate con 75 µg di D-cloprostenolo sul rilievo ecografico di un CL attivo, sono state sottoposte a prelievi ematici prima della somministrazione delle PGF<sub>2α</sub> e 3 giorni dopo per la determinazione della progesteronemia. E' stato riscontrato un errore del 22.4 % nel rilievo ecografico di CL attivo, mentre la luteolisi è stata registrata nel 64,4%. In conclusione l'analisi dei risultati, pur non evidenziando una diretta correlazione tra attività steroidogenica e sensibilità alle PGF del CL nella cavalla, evidenzia come un calo del P4 superiore al 91.6% rispetto al valore pre trattamento 3 giorni dopo la somministrazione di 75 µg di D-cloprostenolo, possa essere considerato come indice di avvenuta luteolisi.

**INTRODUZIONE** - Nella cavalla, già nel corso delle prime ore dopo l'ovulazione, le cellule della granulosa, che rappresentano la popolazione cellulare principalmente coinvolta nello sviluppo del corpo luteo (CL), iniziano ad accrescersi rapidamente, dando inizio, 24 ore dopo, alla fase secernente, come si può intuire dalla fine vacuolizzazione del citoplasma. Queste cellule, classificate come grandi cellule luteiniche, risultano completamente luteinizzate 3 giorni dopo l'ovulazione e raggiungono la massima ipertrofia al 9° giorno, concomitante con la massima produzione di progesterone (P4). Queste caratteristiche vengono conservate fino al 12° giorno, quando ha inizio un progressivo decremento che si estende nei 4 giorni successivi. Nella cavalla non gravida la durata della fase luteinica è controllata dalle prostaglandine F<sub>2α</sub> (PGF) uterine, il cui rilascio, 13-16 giorni dopo l'ovulazione, è in grado di indurre la luteolisi. Douglas e Ginther<sup>1</sup> furono tra i primi a correlare l'incremento delle PGF uterine e la lisi del CL durante il ciclo estrale. Successivamente Neely e collaboratori<sup>2</sup> stabilirono che il rilascio di PGF, che raggiunge il picco massimo 14-17 giorni dopo l'ovulazione, viene seguito dal primo declino di P4 già dopo 3-4 ore. Queste luteolisine, attivando una serie di geni che portano al blocco dell'attività cellulare, determinano una sorta di apoptosi delle cellule luteiniche. La secrezione uterina di PGF, con il supporto delle PGF intraluteali<sup>3</sup>, è in grado di indurre la lisi del corpo luteo nella cavalla<sup>4</sup>. E' universalmente riconosciuto che la completa regressione funzionale e strutturale del CL, in risposta alle PgF esogene naturali o di sintesi, viene raggiunta solo in pieno diestro. Infatti durante la fase centrale del diestro le concentrazioni plasmatiche di P4 sono massime, corrispondenti all'aumentato numero delle grandi cellule luteali e alla loro espressione recettoriale per le PGF<sup>5</sup>. E' però possibile indurre la lisi del CL già 3 giorni dopo l'ovulazione<sup>6,7</sup>. Infatti la somministrazione di PGF al 3° giorno dopo l'ovulazione ha indotto la luteolisi con riduzione del P4 entro 48 ore. Tuttavia è stata registrata una ripresa dell'attività del CL nelle cavalle, che al trattamento avevano una progesteronemia significativamente più bassa, lasciando ipotizzare un diverso grado di funzionalità steroidogenica tra cavalle con completa od incompleta luteolisi<sup>6</sup>. Con questo studio abbiamo inteso verificare

l'esistenza di una correlazione tra attività steroidogenica e sensibilità alle PgF del CL nella cavalla.

**MATERIALI E METODI** - Durante le stagioni riproduttive 2005-2007 sono state selezionate 170 cavalle, di razze diverse, di 3-20 anni, con un CL ritenuto attivo all'esame ecografico (sonda lineare 7,5 MHz), come descritto da Ginther<sup>8</sup>. Ad ogni soggetto sono stati somministrati i.m. 75 µg di D-cloprostenolo, enantiomero destrogiro del cloprostenolo (analogo di sintesi delle PGF). Per controllare l'attività steroidogenica del CL al trattamento e l'avvenuta luteolisi, le cavalle sono state sottoposte a prelievi ematici immediatamente prima della somministrazione delle PGF e 3 giorni dopo per la determinazione della progesteronemia. Il sangue, prelevato dalla vena giugulare con vacutainer eparinizzati, è stato centrifugato (1000 g x 20 min) ed il plasma raccolto è stato conservato a -20°C fino alla determinazione delle concentrazioni di P4 con metodo RIA con un coefficiente di variazione tra- ed inter-saggi di 6.1% e 10.9% rispettivamente ed una sensibilità di 13 pg/ml<sup>9</sup>. Il CL è stato ritenuto attivo quando, alla somministrazione del D-cloprostenolo, era presente una concentrazione plasmatica di P4 ≥1 ng/ml; l'avvenuta luteolisi è stata identificata dall'abbassamento, 3 giorni dopo il trattamento, a valori <1 ng/ml<sup>10</sup>. I dati della progesteronemia sono stati analizzati attraverso la valutazione delle concentrazioni al momento del trattamento (P4) e della differenza tra le concentrazioni al trattamento e 3 giorni dopo, espressa in valore assoluto (P4diff) ed in percentuale (P4perc). La risposta al trattamento (positiva/negativa) è stata considerata come variabile dicotomica tra i gruppi. Allo scopo di valutare la soglia e la relativa sensibilità e specificità del test per il P4 è stata applicata un'analisi ROC (Receiver Operating Characteristic), che pone in relazione la sensibilità e la specificità del test su tutto il range delle soglie dell'analita, costituendo una curva, di cui è stata calcolata l'area sottesa (AUC). L'analisi ROC rappresenta un importante mezzo per valutare le performance del test in termini di sensibilità (Se) e specificità (Sp), intendendo per Se la probabilità condizionale che un soggetto abbia responso positivo al test in una condizione di reale positività e per Sp la probabilità condizionale che un soggetto abbia un responso negativo in una condizione di reale negatività.. Per evidenziare le differenze nell'efficacia del P4, della P4diff e della P4perc sono state valutate le differenze nelle AUC delle curve ROC tramite una statistica z. Infine è stato valutato il valore predittivo positivo (probabilità condizionale di positività dato un responso positivo al test) e negativo (probabilità condizionale di negatività dato un responso negativo al test).

**RISULTATI** - La situazione della progesteronemia delle 170 cavalle trattate con D-cloprostenolo in seguito a rilievo ecografico di CL attivo è riportata in tabella 1.

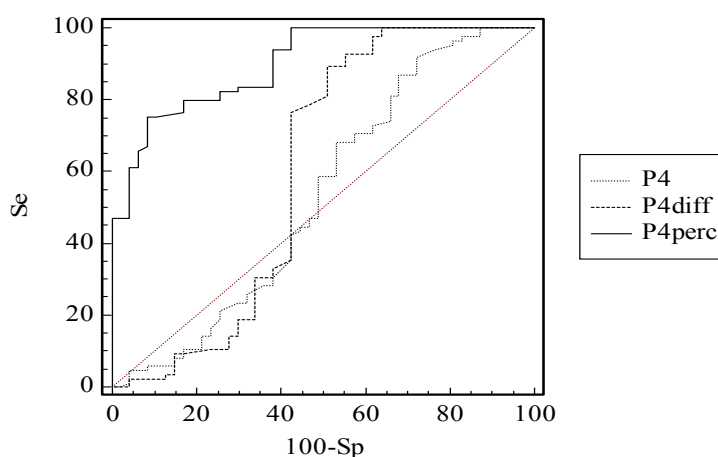
Tab. 1 - Distribuzione delle 170 cavalle in funzione della progesteronemia pre e post trattamento con PgF

<b>P4 ≥1 ng/ml al trattamento</b>		<b>P4 &lt;1 ng/ml dopo 3 giorni</b>	
<b>n.</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
132/170	77,6	85/132	64,4

Gli andamenti del P4, P4diff e P4perc nel tracciato ROC sono riportati nel grafico 1. La performance del test tende a migliorare quanto più la linea spezzata si avvicina all'angolo superiore sinistro del grafico (massima Se e Sp), avvicinando l'AUC al valore di 1. La statistica z conferma quanto rappresentato nel grafico: le aree per il P4, la P4diff e la P4perc, espresse come media±ES, sono rispettivamente 0,53±0,05, 0,60±0,05 e 0,9±0,03, con tutte le AUC differenti con P<0,001. La soglia che meglio discrimina tra cavalle che hanno risposto (<1 ng/ml) e quelle con risposta negativa è uguale al 91,6%. A questo cutoff, la Se è pari a 75,3% e la Sp pari a 91,5%, mentre il

potere predittivo positivo del test è risultato del 94,1% e il potere predittivo negativo del 67,2%.

Grafico 1. Tracciato ROC per le variabili P4, P4diff e P4perc



**DISCUSSIONE** - Un primo rilievo interessante è rappresentato dall'errore, di difficile spiegazione, salvo addebitarlo alla sola errata interpretazione delle immagini ecografiche, nella selezione delle cavalle con CL attivo; nel 22.4 % infatti il P4 non raggiungeva concentrazioni plasmatiche ( $\geq 1$  ng/ml) indicative di attività steroidogenica.. La percentuale di risposta positiva al trattamento luteolitico (64.4%), identificata dall'abbassamento, 3 giorni dopo, a valori  $< 1$  ng/ml, rientra invece nel normale range (45-88%) riscontrabile in bibliografia. La disamina dell'andamento delle curve, riportate nel grafico, mostra come solo la P4perc fornisca le migliori performance, in quanto il P4 e la P4diff presentano tracciati ROC a cavallo della linea diagonale, da intendere come linea di indifferenza (inutilità del test). Il parametro più significativo risulta quindi la P4perc, che esprime il calo di progesterone dopo il trattamento. In conclusione l'analisi dei risultati, pur non evidenziando una diretta correlazione tra attività steroidogenica e sensibilità alle PGF del CL nella cavalla, evidenzia come un calo, 3 giorni dopo la somministrazione di 75  $\mu$ g di D-cloprostenolo, superiore al 91,6% rispetto al valore di P4 pre trattamento, possa essere considerato come indice di avvenuta luteolisi.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Douglas R.H., Ginther O.J. Effects of prostaglandin F2alpha on the oestrous cycle and pregnancy in mares. *J Reprod Fertil Supp* 23: 257-61 (1975). 2. Neely D.P., Kindahl H., Stabenfeldt G.H., Edqvist L.E., Hughes J.P. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. *J Reprod Fertil Suppl* 27:181-189 (1979). 3. Beg M.A. et al. Changes in steady-state concentrations of messenger ribonucleic acids in luteal tissue during prostaglandin F2alpha induced luteolysis in mares. *Anim Reprod Sci* 90: 273-285 (2005). 4. Arosh J.A. et al. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology* 145: 2551-60 (2004). 5. da Costa R.P.R. et al. Progesterone receptors and proliferating cell nuclear antigen expression in equine luteal tissue. *Reprod Fertil Dev* 17: 659-666 (2005). 6. Bergfelt D.R., Pierson R.A., Ginther O.J. Regression and resurgence of the CL following PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  treatment 3 days after ovulation in mares. *Theriogenology* 65: 1605-1619 (2006). 7. Tosi U., Panzani S., Veronesi M.C., Galeati G., Carluccio A. Progesterone and estrogens plasma concentrations around PGF2A treatment 3 days after ovulation in the mare. *Proceedings of Veterinary European Equine Meeting (XIV SIVE/FEEVA Congress)* 381-382 (2008). 8. Ginther O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction. Book 2, Horses. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing (1995). 9. Veronesi M.C. et al. Plasma concentrations of 15-ketodihydro-PGF(2alpha), cortisol and progesterone during manual twin reduction in thoroughbred mares. *J Vet Med A* 52: 411-415 (2005). 10. Gastal E.L., Rodrigues B.L., Gastal M.O., Beg M.A., Ginther O.J. Responsiveness of the early corpus luteum to PGF2 $\alpha$  and resulting progesterone, LH, and FSH interrelationship in mares. *Anim Reprod* 2: 240-249 (2005).



## CORPUS LUTEUM STEROIDOGENIC ACTIVITY AND SENSITIVITY TO PGF<sub>2α</sub> IN THE MARE

Panzani S., <sup>1</sup>Faustini M., <sup>2</sup>Carluccio A., <sup>3</sup>Quartuccio M., <sup>4</sup>Govoni N., Cairoli F.,  
*Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Milano; <sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e  
Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze  
Cliniche Veterinarie, Teramo; <sup>3</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Messina;  
<sup>4</sup>DIMORFIPA, Bologna; Italy. Corresponding author: sara.panzani@unimi.it*

**Key words:** mare, corpus luteum, progesterone, PGF<sub>2α</sub>

**Introduction** - In the mare, in the first few hours after ovulation, luteal cells rapidly growth and proliferate. At the same time, they start to produce progesterone (P4), reaching maximal activity at day 9 after ovulation, when the cells are completely hypertrophic. Afterwards, from day 12 to 16 after ovulation, P4 production gradually decreases. In this phase, the secretion of uterine PGF<sub>2α</sub> is correlated to the lysis of the corpus luteum (CL). The peak of PGF<sub>2α</sub> release, 14-17 days after ovulation, is followed by a decrease in P4 concentrations over 3-4 hours. It is well known that the complete functional and structural regression of the CL can be obtained only in mid-diestrus, when P4 plasma concentrations are maximal, as well as the number of luteal cells and their expression of PGF<sub>2α</sub> receptors. However, the administration of PGF<sub>2α</sub> 3 days after ovulation could induce a P4 decrease within 48 hours, followed by a resurgence in CL activity in mares with lower P4 levels at treatment. The aim of this study was to verify the correlation between steroidogenic activity and corpus luteum PGF<sub>2α</sub> sensitivity in the mare.

**Materials and Methods** -170 mares, with the ecographic diagnosis of functional CL, were enrolled and treated with 75 µg i.m. of R-cloprostenol (a PGF<sub>2α</sub>-analogue). Immediately before treatment and 3 days later, blood samples were collected, centrifuged, and plasma stored at -20°C until analysis by RIA. A P4 concentration ≥1ng/ml was related to a functional CL; luteolysis was defined as a P4 <1 ng/ml 3 days after treatment. Three different parameters were evaluated: progesterone concentration at treatment (P4), the difference between concentrations at treatment and 3 days after as a value (P4diff) and as a percentage (P4perc). Response to treatment was considered as a dichotomic variable between groups (positive/negative). A ROC analysis was used to analyze the cutoff value, the sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the test. Se represents the probability that the test is positive given that luteolysis occurred; Sp is the probability that the test will be negative given that luteolysis has not occurred. The areas under curve (AUC) for each variable were determined, and the differences between AUCs was calculated by z-statistics.

**Results** - At treatment, P4 concentration was ≥1ng/ml in 132/170 mares. 85 out of 132 (64.4%) showed P4<1ng/ml 3 days after treatment. The z test demonstrated that the AUCs for P4, P4diff and P4perc are respectively: 0.53±0.05, 0.60±0.05 e 0.9±0.03, with AUC statistically different for P<0.001. The best cutoff between responding and non-responding mares was 91.6%, with Se of 75.3% and Sp of 91.5%. The positive predictive value was 94.1%, while the negative predictive value was 67.2%.

**Discussion** - The percentage response to luteolytic treatment after 3 days is within the normal range reported in literature. The P4perc value was the best parameter for evaluating the occurrence of luteolysis. In conclusion, even if these results do not prove a direct correlation between steroidogenic activity and PgF<sub>2α</sub> sensitivity of the CL in the mare, they do show that a decrease in the P4 pre-treatment value when higher than 91.6% 3 days after treatment with 75 µg i.m. of R-cloprostenol, can be considered as an index of luteolysis occurrence.



## **PROFILASSI DEL RIASSORBIMENTO EMBRIONALE E DELL'ABORTO DI ORIGINE ORMONALE NELLA CAVALLA TRAMITE SOMMINISTRAZIONE DI UNA ASSOCIAZIONE DI PROGESTERONE (P<sub>4</sub>), hCG E VIT. E**

**Parmigiani E., Bigliardi E., Morini G., Bresciani C., Di Ianni F., Vecchi I., Ferrari L., Di Ciommo F., Magnani E.,** *Dipartimento di Salute Animale, Università degli Studi di Parma.*

**Parole chiave:** Cavalla, Progesterone, Riassorbimento embrionale, Aborto

**RIASSUNTO** - In questo studio gli autori hanno suddiviso 40 fattrici in due gruppi. Il Gruppo A era formato da 30 cavalle trattate con 150 mg di Medrossiprogesterone acetato i.m., 1500 I.U. di hCG i.m. e 150 mg di Vit E i.m. a partire immediatamente dopo la diagnosi di gravidanza effettuata al 15° giorno e per ogni 15 giorni fino al 320° giorno. Il Gruppo B di 10 animali è stato utilizzato come controllo. Tutte le cavalle presentavano anamnesi di mortalità embrionale o aborti tardivi. Le cavalle trattate hanno partorito 28 puledri normali (93,3%), i soggetti di controllo solo un puledro normale (10%). I risultati ottenuti indicano che questo trattamento durante la gestazione è essenziale per il mantenimento della gravidanza e la nascita di un puledro normale.

**INTRODUZIONE** - La perdita di gravidanze nella cavalla in seguito a riassorbimento embrionale e ad aborto, costituisce da sempre un grave motivo di perdita economica per gli allevatori. Secondo quanto riportato in letteratura la percentuale totale di perdite di gravidanze nella cavalla<sup>1</sup> può variare dal 10% al 50%<sup>2</sup>. Lo scopo del nostro lavoro è dimostrare l'efficacia della somministrazione di una associazione di, progesterone (P<sub>4</sub>), (hCG) e Vit E nella profilassi del riassorbimento embrionale e dell'aborto nella fattrice.

**MATERIALI E METODI** - Durante le stagioni di monta 2005-2006-2007 sono state prese in considerazione 40 fattrici di razza trotter di età variabile da 4 a 22 anni (media=14±4,5). Le cavalle sono state suddivise in due gruppi: gruppo A costituito da 30 soggetti denominato di trattamento, il gruppo B con 10 cavalle di controllo. Nell'anamnesi delle stagioni precedenti tutte le cavalle riportavano un trascorso di riassorbimento embrionale o aborto non correlabile a patologie di tipo infettivo. Le fattrici sono state sottoposte a visita ginecologica ed ecografia, tampone cervico-uterino con esame batteriologico e citologico ed in alcuni casi "flushing" endouterino pre e post inseminazione. Le cavalle sono state inseminate con stalloni di provata fertilità, sottoposte a diagnosi manuale ed ecografica di gravidanza a 15 giorni e confermate ecograficamente a circa 30 e ricontrollate ogni due mesi fino al settimo mese di gravidanza. Le cavalle appartenenti al gruppo A sono state trattate con Medrossiprogesterone acetato mg 150 IM (Depoprovera 150<sup>®</sup>, Upjohn Company, USA), hCG 1500 U.I. IM (Corulon<sup>®</sup>, Intervet, Italia S.r.l.), Vit E 150 mg I.M. (Vitalene E<sup>®</sup>, Fatro S.p.a., Italia) dal 15° giorno di gravidanza, ogni 15 giorni fino al 320° giorno. Il risultato è stato considerato positivo nei casi in cui la fattrice ha partorito un puledro vivo e vitale. Negativo quando si è verificato riassorbimento embrionale, aborto tardivo o un parto prematuro con puledro morto o disvitale. I risultati ottenuti sono stati sottoposti a confronto statistico.

**RISULTATI** - La tabella I dimostra che alla prima diagnosi di gravidanza eseguita al 15° giorno per il gruppo A e B le gravidanze erano 29 (96,6%) e 9 (90%). Al 30° giorno per il gruppo A la percentuale di gravidanza era ancora del 96,6% mentre per il controllo le gravidanze erano scese a 4 (40%).

Tab 1 - Efficacia del trattamento a base di una associazione di P4, hCG e Vit E nella profilassi dell'aborto di origine ormonale nella cavalla.

Gruppi	Cavalle N	Cavalle diagnosticate gravide N (%)	Cavalle gravide al 30° giorno N (%)	Cavalle gravide al 5° mese N (%)	Cavalle con puledro vivo e vitale N (%)
A	30	29 (96,6%)	29(96,6%)	28 (93,3%) <sup>A</sup>	28 (93,3%) <sup>A</sup>
B	10	9 (90%)	4 (40%)	2 (20%) <sup>B</sup>	1 ( 10%) <sup>B</sup>

A≠B - Il confronto fra le percentuali è altamente significativo (P<0,01).

Al quinto mese le cavalle gravide del gruppo A erano 28 (93,3%) mentre nel gruppo B si erano ridotte a 2 (20%), il confronto statistico fra le due percentuali è risultato altamente significativo (P<0,01). Il numero di puledri nati vivi e vitali dalle cavalle trattate è stato di 28 (93,3%) mentre nel gruppo di controllo solo un puledro è nato vivo e vitale (10%). Un dato importante da rilevare è che tutte le cavalle appartenenti al gruppo di trattamento hanno trasportato la data del parto oltre il termine fisiologico senza alcuna conseguenza per i puledri. Il confronto statistico fra le percentuali di puledri nati vivi e vitali è risultato altamente significativo P<0,01.

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONI** - Il progesterone costituisce un fattore critico e necessario al fine del mantenimento della gravidanza nella fattrice<sup>3</sup>. Uno studio recentissimo ha evidenziato la presenza di recettori specifici per il P4 sulle membrane fetali dell'embrione equino, ribadendo il ruolo diretto di tale ormone sullo sviluppo embrionale e nel mantenimento della gravidanza<sup>4</sup>. L'utilità di un trattamento a base di progesterone nella profilassi del riassorbimento embrionale o dell'aborto di origine endocrina rimane tuttora un argomento molto dibattuto fra i ricercatori<sup>3,5,6</sup>. Infatti alcuni sostengono che il trattamento non ha alcuna influenza<sup>7,8</sup>, altri invece sostengono l'efficacia della somministrazione ormonale<sup>3</sup>. Inoltre, è riportato in letteratura che la somministrazione di hCG nella fattrice gravida aumenta significativamente la concentrazione sierica di P4<sup>9</sup>. Il nostro lavoro propone la novità del trattamento con una associazione di sostanze ormonali come il progesterone-depo e l'hCG associati ad una vitamina con caratteristiche antiossidanti e anti-abortogene come la vit. E<sup>10</sup>. In base ai risultati ottenuti nel presente lavoro, gli Autori possono affermare che oltre al trattamento con progesterone, l'associazione delle tre sostanze sopraccitate è altamente efficace nel mantenimento della gravidanza durante tutto il periodo.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Sieme H., Hamann H., Distl O.: Factors affecting pregnancy loss of mares in A.I. programs. *Reproduction in domestic animals*. 41, 4: 299 (2006). 2. Stout, T.A.E.: Mechanisms of early pregnancy loss in the mare. *Reproduction in domestic animals*. 41, 4:299 (2006). 3. B. A. Ball: Embryonic death in mares. Cap. 61: 526-527, in McKinnon A. O. and Voss J.L. Equine Reproduction. Ed. Blackwell Publishing 6° edizione (2005). 4. Rambags B. P. B., Van Tol H. T. A., van den Eng M. M., Colenbrander B., Stout T. A. E. Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. *Theriogenology* 69, 3: 366-375 (2008). 5. Allen W.R.: Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 36: 121-131 (2001). 6. Daels P. F.: Progesterone therapy and pregnancy loss. *Proceedings of AAEP Annual Resort Symposium*. Rome, Italy-Jan.19-21, (2006). 7. Irvine C. H. G. et al.: Changes in plasma progesterone concentrations from days 17 to 42 of gestation in mares maintaining or losing pregnancy. *Equine Veterinary Journal*. 22: 104-106 (1990). 8. D. R. Bergfelt, Woods J.A., Ginther O. J.: Role of the embryonic vesicle and progesterone in embryonic loss in mares. *J. Reprod. Fert.* 95: 339-347 (1992). 9. Kelly C. M., Hoyer P. B., Wise M. E. In vitro and in-vivo responsiveness of the corpus luteum of the mare to gonadotrophin stimulation. *J. Reprod. Fert.* 84: 593-600 (1988). 10. Wilkins P. A.: Monitoring the pregnant mare in the ICU. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2, 2: 212-219 (2003).

## EMBRYONIC LOSS AND HORMONAL ABORTION PROPHYLAXIS IN THE MARE BY MEANS OF AN ASSOCIATION OF PROGESTERONE (P4), hCG AND VITAMIN E

Parmigiani E., Bigliardi E., Morini G., Bresciani C., Di Ianni F., Vecchi I., Ferrari L., Di Ciommo F., Magnani E., *Clinical Obstetric and Animal Reproduction Unit, Animal Health Department, Parma University, Italy. Corresponding author: enrico.parmigiani@unipr.it*

**Key Words:** Mare, Progesterone, Embryonic loss, Abortion

The maintenance of pregnancy in the mare is very strongly dependent on progesterone produced by the primary corpus luteum and endometrial cups in the first 200 days of pregnancy than on progesterone produced by the placenta<sup>1</sup>. A lack of progesterone production in any of these phases induces reabsorption of the embryonic vesicle or abortion<sup>2</sup>. The aim of this study was to evaluate the efficacy of an association between Progesterone (P4), hCG and vitamin E to prevent embryo loss and late abortion. A total of 40 mares with a history of several embryo losses or late abortion not due to infectious disease were considered. The animals were divided into two groups, group A formed by 30 mares, and the control group B with the remaining 10 mares. Group A animals were treated with medroxyprogesterone acetate 150 mg i.m. (Depoprovera 150<sup>®</sup>, Upjohn Company, USA), hCG 1500 I.U. i.m. (Corulon<sup>®</sup> - Intervet, Italia S.r.l.), Vit. E 150 mg i.m. (Vitalene E<sup>®</sup> - Fatro S.p.a., Italia) starting from day 15, the time of ultrasound pregnancy diagnosis and every 15 days until day 320. The result was considered positive when the mare delivered a normal foal, negative when the mare underwent embryonic loss or late abortion. Tab. 1 shows that in group A 28 mares (93.3%) delivered a normal foal, while in group B only one mare had a normal foal (10%). The statistical comparison between numbers with subscripts was significant  $P < 0.01$ .

Tab. 1 - Efficacy of an association of Progesterone, hCG and vitamin E for the prophylaxis of embryonic loss and hormonal abortion in the mare.

Group	Mares N	Pregnant mares N(%)	Pregnant mares at 30 <sup>th</sup> day N(%)	Pregnant mares at 5 <sup>th</sup> month N(%)	Pregnant mares with viable and healthy foal N(%)
A	30	29 (96.6%)	29(96.6%)	28 (93.3%) <sup>A</sup>	28 (93.3%) <sup>A</sup>
B	10	9 (90%)	4 (40%)	2 (20%) <sup>B</sup>	1 ( 10%) <sup>B</sup>

A≠B: the statistical difference is highly significant ( $P < 0.01$ )

The efficacy of progesterone treatment for preventing embryonic loss or late abortion is still a controversial topic<sup>3</sup>. Some believe in its usefulness, while others consider the treatment unnecessary<sup>3,4</sup>. In the present paper, we suggest the use of a hormonal and vitamin association, and the results show that the treatment was crucial for the maintenance of pregnancy and for the birth of a normal foal.

**References** - 1. Allen W.R.: Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod. Dom. Anim.* 36: 121-131 (2001). 2. B. A. Ball: Embryonic death in mares. Cap. 61: 526-527, in McKinnon A. O. and Voss J.L. *Equine Reproduction*. Ed. Blackwell Publishing 6<sup>th</sup> edition (2005). 3. Daels P. F.: Progesterone therapy and pregnancy loss. *Proceedings of AAEP Annual Resort Symposium*. Rome, Italy-Jan.19-21, (2006). 4. Irvine C. H. G. et al.: Changes in plasma progesterone concentrations from days 17 to 42 of gestation in mares maintaining or losing pregnancy. *Equine Veterinary Journal*. 22: 104-106 (1990).

## MONITORAGGIO ECOGRAFICO DELLA GRAVIDANZA DELL'ASINA DAL 10° AL 150° GIORNO

Crisci A., Panzani D., Rota A., Camillo F., *Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Pisa*

**Parole chiave:** asina, gravidanza, embrione, feto, ecografia.

**RIASSUNTO** - L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare ecograficamente la gravidanza di 6 asine Amiatine dal 10° al 150° giorno. La vescicola embrionale è comparsa a 11,7±0,8gg (diametro di 7±2mm) e si è fissata nei segmenti caudali delle corna uterine a 19,3±1,6gg (diametro di 29,8±3,8mm) post-ovulazione, mentre la perdita della sfericità è avvenuta al 19° giorno. L'embrione è stato evidenziato a partire dal giorno 22±1,3 quando misurava 4,2±1,6mm; il battito cardiaco a partire dal giorno 24,7±1. La comparsa del sacco allantoideo e la formazione del cordone ombelicale sono avvenute rispettivamente a 27,3±1 gg e 46,5±0,8 gg; il sacco vitellino è scomparso a 48,7±3 gg dall'ovulazione. Orbita, torace, aorta e stomaco fetali sono stati per la prima volta identificati a 85,7±11,8; 64,3±12; 97±7,1; 65,5±4,2 giorni.

**INTRODUZIONE** - Lo sviluppo dell'embrione e del feto equino è stato ampiamente studiato per mezzo dell'ecografia<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>, mentre pochissimi sono i lavori sullo sviluppo embrionale nell'asino<sup>8,9,10,11</sup> e non sono state pubblicate indagini sugli aspetti ecografici della gravidanza in questa specie dopo il 60° giorno. Lo scopo di questo studio è stato quello di descrivere le caratteristiche ecografiche della gravidanza dell'asina dal 10° al 150° giorno.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa su 6 asine di razza Amiata in due anni consecutivi (2006 e 2007). Gli animali, di età compresa tra 5 e 12 anni e con un peso corporeo tra i 300 e i 350 kg, sono stati mantenuti in paddock all'aperto ed alimentati con fieno a volontà e mangime fiocato. All'inizio della ricerca gli animali si presentavano clinicamente sani. Le asine sono state sottoposte ad ecografie transrettali giornaliere durante l'estro e, dalla comparsa di un follicolo ≥35 mm di diametro fino all'ovulazione (= giorno 0), ad inseminazione artificiale (IA) con seme fresco di uno stallone della stessa razza di provata fertilità. La diagnosi di gravidanza è stata effettuata mediante ecografia (Toshiba JustVision200 con sonda semiconvex PNF-78F, frequenza di 5 Mhz) a partire dal 10° giorno dopo l'ovulazione e ripetuta ogni 48 ore fino al 16° giorno quando, in caso di riscontro negativo, le asine sono state trattate con PGF<sub>2α</sub> per essere sottoposte al medesimo protocollo di IA, fino al conseguimento della gravidanza. In caso di riscontro positivo la gestazione è stata monitorata a giorni alterni fino al 40° giorno, successivamente con cadenza settimanale fino al 150° giorno. Il 40° giorno è stato considerato il limite tra la fase embrionale e quella fetale<sup>6</sup>. A carico della vescicola embrionale (VE) sono stati valutati: giorno della comparsa, diametro, giorno e sito della fissazione, perdita della sfericità. Sono stati inoltre considerati il giorno della comparsa dell'embrione e le sue dimensioni, l'evidenziazione del battito cardiaco, la comparsa del sacco allantoideo e del cordone ombelicale e la scomparsa del sacco vitellino. La VE è stata misurata in senso dorso-ventrale fino al mantenimento della sua sfericità; dall'acquisizione di una forma irregolare<sup>9</sup> le misurazioni ricavate erano la media del diametro maggiore e minore. Sul feto sono state effettuate le misurazioni relative a: diametro dell'orbita, ampiezza massima del torace, comparsa della bolla gastrica e diametro dell'aorta. I valori sono stati espressi come media ± deviazione standard (DS).

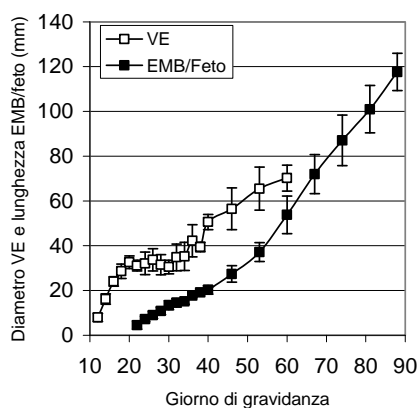
**RISULTATI** - Il primo riscontro positivo della gravidanza è avvenuto in un caso a 10 giorni, e negli altri a 12. La Tabella 1, accanto al giorno della comparsa delle differenti caratteristiche prese in considerazione nel periodo embrionale, riporta le corrispondenti dimensioni della vescicola embrionale e dell'embrione.

Tab. 1 - Giorno della comparsa di vescicola embrionale, fissazione e perdita della sfericità dell'embrione, battito cardiaco ed allantoide in 6 asine. Media±DS e Range.

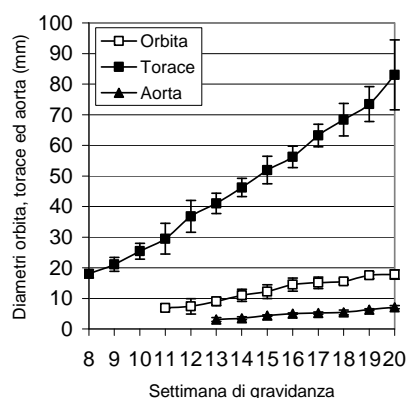
Rilievi	Giorno di gestazione (range)	Diametro vescicola (mm)	Lunghezza embrione (mm)
Vescicola embrionale	11,7±0,8 (10-12)	7±2	-
Fissazione	19,3±1,6 (18-22)	29,8±3,8	-
Perdita sfericità	19±1,7 (18-22)	30,1±3,3	-
Embrione	22±1,3 (20-24)	31,4±2,8	4,2±1,6
Battito cardiaco	24,7±1 (24-26)	33,5±5,5	8,1±1,9
Allantoide	27,3±1 (26-28)	31,1±4	10±1,7

In 4/6 gravidanze la localizzazione della vescicola è avvenuta alla base del corno destro, in 2/6 alla base del sinistro. I tempi di evidenziazione del cordone ombelicale e di scomparsa del sacco vitellino sono stati mediamente di 46,5±0,8 e 48,7±3. Il giorno della prima identificazione e il diametro di orbita, torace e aorta fetali, sono risultati rispettivamente di 85,7±11,8 gg e 7,3±2,2 mm, 64,3±12 gg e 19,8±7,7 mm, 97±7,1 gg e 3,3±0,9 mm. E' stato possibile evidenziare la bolla gastrica a 65,5±4,2gg di gravidanza.

Nella Figura 1 sono riportati i valori medi del diametro della vescicola embrionale e delle dimensioni dell'embrione e del feto dal 10° al 90° giorno di gravidanza. La vescicola embrionale e il feto, date le eccessive dimensioni, non sono stati misurabili dopo il 60° e il 90° giorno rispettivamente. I dati relativi a diametro dell'orbita, ampiezza del torace e diametro dell'aorta nel feto nelle diverse settimane di gravidanza sono invece raffigurati nella Figura 2.



**Figura 1** - Diametro della VE e dimensioni dell'embrione o del feto (EMB/feto) dal 12° all'88° giorno di gravidanza in 6 asine; (Media±DS).



**Figura 2** - Diametro dell'orbita, ampiezza del torace e diametro dell'aorta dall'8^ alla 20^ settimana di gravidanza in 6 asine, (Media±DS).

**DISCUSSIONE** - In questo studio, la comparsa della vescicola embrionale è avvenuta intorno ai 12 giorni dopo l'ovulazione, in accordo con quanto osservato da altri autori in razze differenti di asino<sup>9,10,11</sup>, in un'epoca leggermente più tardiva rispetto a quanto osservato nella cavalla portatrice di un cavallo<sup>7,8</sup> o di un mulo<sup>12</sup>. Come ampiamente riportato sia nella cavalla<sup>2,8</sup>, che nell'asina<sup>8,9,10,11</sup>, questo studio ha evidenziato una fissazione alla base delle corna uterine; questa particolare localizzazione è stata imputata sia ad un maggior impedimento intraluminale, incontrato dalla vescicola in questo punto<sup>1</sup>, sia ad un rallentamento della mobilità della vescicola stessa dovuta all'aumento del suo diametro e del tono uterino<sup>9,10</sup>. In questo studio, inoltre, la fissazione della vescicola embrionale è avvenuta più tardivamente (19,3±1,6gg) rispetto a quanto riportato nella cavalla (16 gg<sup>1</sup>), nell'asina (15,5-17 gg<sup>8,9,10,11</sup>) e nel caso di un conceptus mulino (17,3 gg<sup>12</sup>); in conseguenza di ciò, il diametro della vescicola al momento della fissazione è risultato maggiore rispetto a quanto riportato nei lavori precedentemente citati: 29,8±3,8 mm vs 21,7-26,4 mm<sup>8,9,10,11,12</sup>. Come già osservato nell'asina<sup>9,10,11</sup>, la vescicola embrionale è rimasta sferica in media fino al 19° g dopo l'ovulazione (diametro 30,1±3,3 mm), per assumere una forma dapprima ovale quindi irregolare<sup>9</sup>. La comparsa dell'embrione è avvenuta in 4/6 casi al giorno 22 dopo l'ovulazione, nei restanti 2 al giorno 20 e 24. Questo dato concorda con quanto riportato nell'asina di Martina Franca<sup>11</sup>, mentre da altri autori l'embrione è stato identificato più precocemente (19,9±0,2 gg<sup>9</sup>, 20,7±1,2 gg<sup>10</sup>). Nelle asine Amiatine da noi considerate il battito cardiaco dell'embrionale è comparso prima (24,7±1gg) rispetto a quanto descritto da Carluccio et al.<sup>11</sup> (26° g) e più tardivamente che in altri studi (21,8±0,3 gg<sup>9</sup>, 23,5±1,3 gg<sup>10</sup>). La comparsa dell'allantoide e del cordone ombelicale, nonché la scomparsa del sacco vitellino, sono stati successivi rispetto a quanto riportato in precedenti lavori<sup>9,10,11</sup>. Parte delle discrepanze tra lo studio presente e gli altri che si sono occupati di sviluppo dell'embrione di asino<sup>8,9,10,11</sup>, può essere spiegata sia con la diversa cadenza del monitoraggio, ogni 48 ore in questo studio, quotidiano negli altri<sup>8,9,10,11</sup>, sia con le possibili diverse condizioni sperimentali, in primo luogo la qualità degli ecografi impiegati. Nonostante ciò, i riscontri di questo studio sulle prime fasi di sviluppo della gravidanza nell'asina Amiatina, sono per diversi aspetti sovrapponibili o comunque molto vicini a quanto precedentemente riportato in altre razze di questa specie<sup>8,9,10,11</sup> e nella cavalla<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>. Non è possibile confrontare i risultati da noi ottenuti relativi a comparsa e dimensioni di alcuni organi del feto (orbita, torace, stomaco ed aorta), in quanto, apparentemente, non sono stati pubblicati studi simili sull'asina.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Ginther, O. J. Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mare. *Theriogenology* 21, 633-644 (1984). 2. Leith, G. S. & Ginther, O. J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology* 22, 401-408 (1984). 3. Leith, G. S. & Ginther, O. J. Mobility of the conceptus and uterine contractions in the mare. *Theriogenology* 24, 701-711 (1985). 4. Palmer, E. & Driancourt, M. A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. *Theriogenology* 13, 203-216 (1980). 5. Squires, E. L., Voss, J. L., Villahoz, M. D. & Shideler, R. K. Use of ultrasound in broodmare reproduction. *Proc. Am. Ass. equine Pract.* 29, 27-43 (1983). 6. Ginther, O. J. Embryology and placentation. In: Ginther, O. J. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. Ed. Cross Plains, Wisconsin, Equiservices, 345-418 (1992). 7. McKinnon, A. O., Voss, J. L., Squires, E. L. & Carnevale, E. M. Diagnostic ultrasonography. In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. *Equine reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, 266-302 (1993). 8. Bessent, C. & Ginther, O. J. Comparison of early conceptus mobility between mares and jennies. *Theriogenology* 29, 913-920 (1988). 9. Gastal, E. L., Santos, G. F., Henry, M. & Piedade, H. M. Embryonic and early foetal development in donkeys. *Equine vet. J.* 15, 10-13 (1993). 10. Meira, C., Ferreira, J. C. P., Papa, F. O. & Henry, M. Ultrasonographic evaluation of the conceptus from days 10 to 60 of pregnancy in jennies. *Theriogenology* 49, 1475-1482 (1998). 11. Carluccio, A. et al. Rilievi ecografici della gravidanza precoce nell'asina di Martina Franca. *Ippologia* 16(4), 31-35 (2005). 12. Paolucci, M. et al. Ultrasonic assessment of mule conceptus during early pregnancy in trotter mares. X ESDAR Congress, *Reprod. Dom. Anim.* 41(4), 362 (2006).

## ULTRASONOGRAPHIC EVALUATION OF DONKEY PREGNANCY FROM DAY 10 TO DAY 150

**Crisci A., Panzani D., Rota A., Camillo F.,** *Department of Veterinary Clinic, University of Pisa, Italy. Corresponding author: acrisci@vet.unipi.it*

**Key words:** donkey, pregnancy, embryo, foetus, ultrasonography.

In mares, ultrasonographic evaluation of embryonic and foetal development is well known and widely employed in clinical practice<sup>1,2</sup>. By contrast, there are few such studies in literature on donkeys<sup>3,4,5,6</sup>, a species in which there is no information beyond day 60 of pregnancy. The aim of this study was to describe the ultrasonographic features of donkey pregnancy between days 10 and 150.

Six Amiata donkey jennies underwent transrectal ultrasound every second day between days 10 and 40, and weekly between days 40 and 150 post ovulation. One pregnancy was evaluated for each jenny. First detection of the embryonic vesicle occurred once at day 10, and in five animals at day 12; its diameter at first appraisal was  $7.0 \pm 2.0$  mm. Uterine fixation occurred in the caudal segments of the uterine horns at  $19.3 \pm 1.6$ , when the embryonic vesicle measured  $29.8 \pm 3.8$  mm and had already lost its spherical shape. The first observation of the embryo proper occurred at  $22.0 \pm 1.3$  days of pregnancy, when its crown-rump length was  $4.2 \pm 1.6$  mm. Foetal heartbeat was first detected at  $24.7 \pm 1.0$ , allantoic sac and umbilical cord appeared at days  $27.3 \pm 1.0$  and  $46.5 \pm 0.8$ , respectively, while yolk sac was not detectable beyond day  $48.7 \pm 3.0$ . First identification of foetal orbit, thorax and aorta occurred at days  $85.7 \pm 11.8$ ,  $64.3 \pm 12.0$ , and  $97.0 \pm 7.1$ , respectively, when their diameter was  $7.3 \pm 2.2$ ,  $19.8 \pm 7.7$ , and  $3.3 \pm 0.9$  mm. Stomach could be appreciated from day  $65.5 \pm 4.2$  of pregnancy.

Time of first embryonic vesicle observation, its diameter, and the site of fixation within the uterus are similar to descriptions for this species by other authors<sup>3,4,5,6</sup>. Appreciation of the embryo proper and of the heartbeat occurred at times that although similar to those observed by Carluccio et al<sup>6</sup>, was later than observed by others<sup>4,5</sup>. Also, the time of fixation within the uterus, appearance of amniotic sac and umbilical cord, and disappearance of vitelline sac occurred in our study later than observed in other studies on donkeys<sup>4,5,6</sup>. These, to our knowledge, are the first data in literature concerning the appearance and size of foetal orbit, thorax, stomach and aorta in donkeys. In conclusion, ultrasonographic evaluation of the initial phases of pregnancy in Amiata donkeys showed many similarities with observations in other breeds of donkeys<sup>3,4,5,6</sup> and in the mare<sup>1,2</sup>.

**References** - 1. Ginther, O. J. Intrauterine movement of the early conceptus in barren and postpartum mare. *Theriogenology* 21, 633-644 (1984). 2. Ginther, O. J. Embryology and placentation. In: Ginther, O. J. *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects*. Ed. Cross Plains, Wisconsin, Equiservices, 345-418 (1992). 3. Bessent, C. & Ginther, O. J. Comparison of early conceptus mobility between mares and jennies. *Theriogenology* 29, 913-920 (1988). 4. Gastal, E. L., Santos, G. F., Henry, M. & Piedade, H. M. Embryonic and early foetal development in donkeys. *Equine vet. J.* 15, 10-13 (1993). 5. Meira, C., Ferreira, J. C. P., Papa, F. O. & Henry, M. Ultrasonographic evaluation of the conceptus from days 10 to 60 of pregnancy in jennies. *Theriogenology* 49, 1475-1482 (1998). 6. Carluccio, A. et al. Rilievi ecografici della gravidanza precoce nell'asina di Martina Franca. *Ippologia* 16(4), 31-35

## **L'ENDOMETRITE POST COITALE DELLA CAVALLA: CORRELAZIONE TRA CITOLOGIA UTERINA E RISULTATO INSEMINATIVO**

**Nervo T., Semita C., Gay P.,** *Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino*

**Parole chiave:** cavalla, inseminazione, endometrite, flushing uterino, citologico.

**RIASSUNTO** - Durante la stagione di monta 2007, 29 fattrici di varie razze ed età sono state sottoposte a lavaggi uterini pre e post Inseminazione Artificiale (IA), per migliorarne il tasso riproduttivo. Sono state esaminate le caratteristiche citologiche dei fluidi uterini così raccolti (caratteristiche macroscopiche del fluido, presenza di detriti, granulociti neutrofili, batteri, rapporto tra neutrofili e cellule epiteliali) e sono state correlate con l'esito dell'IA tramite test di Pearson. Non è stato possibile dimostrare tale correlazione, principalmente a causa dell'elevata percentuale di gravidanze a fine stagione ottenute anche in presenza di citologici non sempre ottimali, il che dimostra l'utilità diagnostica e terapeutica del flushing uterino in caso di endometrite post-coitale nella cavalla.

**INTRODUZIONE** - L'infertilità è un deficit riproduttivo temporaneo o permanente. Escludendo problemi legati ad un management di scuderia o dell'IA non ottimali e da scarse caratteristiche del seme, la principale causa di infertilità nella cavalla trova ragione nell'endometrite che è riconosciuta essere la terza più comune tra le patologie equine, dopo quelle del tratto gastrointestinale e respiratorio<sup>1</sup>. Viene definita come una risposta infiammatoria dell'endometrio a stimoli fisici e antigenici, associata a presenza di granulociti neutrofili nel lume ed accompagnata dall'accumulo di fluido all'interno dell'organo. L'endometrite post-coitale (PMIE, Persistent Mating Induced Metritis) è un fenomeno para-fisiologico, autolimitante e di breve durata, la cui funzione è quella di liberare l'utero dall'eccesso di spermatozoi, plasma seminale e contaminanti eventuali in vista del possibile instaurarsi di una gravidanza<sup>2</sup>. Le fattrici sane sono in grado di annullare l'infiammazione e di evacuare l'utero dai contaminanti in 12-48 h dalla monta-inseminazione<sup>3</sup>. La flogosi viene invece definita persistente, e la fattrice suscettibile, nel caso in cui sia riscontrabile un secreto infiammatorio intrauterino oltre la 12<sup>a</sup>h post accoppiamento<sup>4</sup>. La presenza di fluido intrauterino oltre le 72 h è associata a ridotti tassi di fertilità<sup>5</sup>. Questa patologia è spesso associata ad accumulo di fluido intrauterino, valutabile ecograficamente e composto da mediatori dell'infiammazione, neutrofili, immunoglobuline, sistema complemento ed enzimi<sup>6</sup>. L'assetto ormonale estrale aumenta le secrezioni endometriali e provoca edema dell'utero: se il drenaggio linfatico è insufficiente, si verifica un accumulo intrauterino dei fluidi. Il residuo di fluido in utero in diestro provoca riduzione dei tassi di gravidanza e aumento della mortalità embrionale<sup>7</sup>. Numerosi Autori<sup>8</sup> suggerirono che un difetto intrinseco della contrattilità del miometrio potesse provocare un ritardo nella clearance dell'utero. In caso di PMIE, non solo la clearance risulta compromessa, ma anche il trasporto degli spermatozoi verso l'ovidutto, decisamente ridotto nelle fattrici suscettibili<sup>9</sup>.

**MATERIALI E METODI** - Durante la stagione di monta 2007, sono state fecondate 29 fattrici, di età compresa tra i 5 e i 21 anni, di razza Trottatore (11), Sella Italiana (6), Sella Francese (3), Quarter Horse (3), Haflinger (2), Purosangue Inglese (2), Hannover (1) e Belga (1). I soggetti venivano valutati ecograficamente per identificare la presenza di un follicolo pre-ovulatorio, di più di 35mm di diametro. In caso di contemporanea presenza di fluido intrauterino di più di 2cm in altezza all'ecografia, veniva praticato un flushing utilizzando 5 litri di soluzione di Ringer Lattato sterile ed evacuando poi



l'utero per caduta. Dopo l'IA, in una finestra di tempo compresa tra le 6 e le 24h, tutte le fattrici venivano sottoposte a flushing uterino. Le caratteristiche macroscopiche del liquido di lavaggio (limpido, opaco, con flocculi) venivano valutate immediatamente dopo la raccolta. Quindi, da una piccola aliquota del liquido di flushing (400 µl) si allestivano i campioni citologici mediante citocentrifugazione e colorazione con May-Grunwald-Giemsa. I vetrini così preparati venivano valutati al microscopio ottico, considerando diversi parametri: ad ingrandimento 400X, la percentuale di campo ottico occupato da detriti cellulari e muco; ad ingrandimento 1000X, la presenza di neutrofili, di batteri e rapporto tra neutrofili e cellule endometriali, basandosi sui valori soglia considerati in ricerche effettuate da altri Autori<sup>10,11,12,13</sup>, come indicato in Tabella 1.

Tab.1 - Parametri utilizzati per valutare i citologici uterini.

	Categ. 0	Categ. 1	Categ. 2	Categ. 3
Detriti	0-25%	25-50%	50-75%	>75%
Neutrofili	0-5	6-50	>50	-
Batteri	0	1-4 campi/10	5-10 campi/10	-
PMN/Cell. epiteliali	0-2PMN/15 c.e.	3-5PMN/15 c.e.	>5PMNN/15 c.e.	-

12-16 giorni post IA, le fattrici venivano sottoposte a diagnosi di gravidanza ecografica. Sono state poi calcolate le frequenze delle diverse categorie e sono stati messi in correlazione i diversi parametri macroscopici e citologici sopra citati con l'eventuale gravidanza delle fattrici. I dati ottenuti sono stati esaminati con il programma di analisi statistica SPSS 14.0 per Windows (©SPSS Inc, 2005).

**RISULTATI** - Macroscopicamente, il liquido di lavaggio è risultato limpido nel 56,9% dei flushing effettuati, mentre nei restanti 25 (43,1%) veniva classificato come torbido. Ad una valutazione del campione citologico, nel 51,7% dei casi si riscontrava la presenza di detriti cellulari e muco in grado di occupare un'area di campo ottico compresa tra lo 0 e il 25% (categoria 0). Le categorie 1 e 2 si ritrovavano con una frequenza simile, prossima al 20%. Solo il 10,3% dei casi apparteneva alla categoria 3. Il conteggio dei granulociti neutrofili su 10 campi microscopici era compreso tra 0 e 5 unità (categoria 0) nel 51,7% dei casi, mentre le altre due categorie rappresentavano rispettivamente il 20,7 (categoria 1) e il 27,6 (categoria 2) % del campione esaminato. Nel 43,1% dei casi non venivano riscontrati batteri su nessuno dei 10 campi microscopici esaminati; nel 29,3% dei casi su 10 campi ottici veniva evidenziata la presenza di batteri in 1-4 campi; nel 27,6% i batteri erano presenti su 5 o più campi ottici. Nel 46,6% dei casi il rapporto tra PMN e cellule epiteliali apparteneva alla categoria 0. La categoria 1 si presentava con una frequenza del 24,1%, la categoria 2 del 29,3%. I parametri esaminati sono stati correlati all'esito dell'IA tramite test di Pearson, tuttavia non è stato possibile dimostrare statisticamente tale correlazione, sebbene si siano osservate più spesso cavalle non gravide in presenza di citologici negativi. Complessivamente, il tasso di gravidanza a fine stagione è stato del 71,43%.

**DISCUSSIONE** - La PMIE della cavalla risulta essere una delle principali cause di infertilità in tale specie. Il flushing uterino presenta il duplice vantaggio di permettere una diagnosi di tale patologia, non sempre evidenziabile ecograficamente, sulla base delle caratteristiche citologiche e microbiologiche del liquido prelevato prima e dopo la monta/IA e di aiutare la cavalla a liberarsi dal fluido infiammatorio eventualmente presente, soprattutto in caso di clearance ritardata, soggetti anziani o pluripari. Il nostro lavoro è stato effettuato in condizioni di campo; i soggetti esaminati appartenevano ad una popolazione eterogenea, comprendente diverse razze, diverse classi di età e con tipologia di allevamento non costante, il che si discosta dai principali studi effettuati sull'argomento, dove i soggetti esaminati erano quasi sempre Purosangue Inglese

ricoverati in stazione di monta<sup>13,14</sup>. I risultati ottenuti non hanno permesso di evidenziare una correlazione statisticamente significativa tra le caratteristiche macroscopiche e citologiche del liquido di lavaggio uterino ed i risultati della diagnosi di gravidanza; si è tuttavia notata una lieve corrispondenza tra negatività alla valutazione citologica (in particolare modo per i parametri di presenza neutrofila, batterica e di rapporto PMN/epitelio) ed assenza di gestazione. I nuovi protocolli<sup>13</sup> per la diagnosi di PMIE, prevedono l'utilizzo di un lavaggio uterino a basso volume (60ml) che eviti la rarefazione cellulare per valutare più efficacemente lo stato infiammatorio dell'utero. Nel suo studio, esaminando più di 400 campioni citologici, Michelle LeBlanc<sup>13</sup> ha notato una sensibilità del 75% e una specificità del 90% nella diagnosi dell'endometrite eseguita mediante flushing uterino a basso volume, anche in presenza di segni clinici scarsi o nulli. Anche Riddle<sup>14</sup> ha osservato che, nel caso in cui la valutazione citologica di campioni ottenuti da flushing uterini fosse positiva per l'infiammazione, le percentuali di gravidanza riscontrate erano sensibilmente inferiori. Tuttavia, va comunque evidenziato che questa tecnica, per quanto innovativa e vantaggiosa per la diagnosi di endometrite post accoppiamento, non può avere alcuna valenza terapeutica. Dalla nostra esperienza possiamo concludere che lo studio citologico dei liquidi ottenuti da flushing uterini permette di mettere in evidenza alcune caratteristiche predittive di endometrite post coitale nella cavalla, in modo semplice ed economico. Utilizzare un lavaggio a basso volume, come suggerito molto di recente dai Ricercatori più autorevoli in materia, permetterà di essere ancora più accurati nella diagnosi, soprattutto in quelle cavalle che, pur presentando ipofertilità, non mostrano segni clinici evidenti di PMIE. In base ai risultati ottenuti con tali metodiche, sarà cura del clinico trattare i soggetti "a rischio" con terapie in grado di migliorarne le performance riproduttive, favorendo l'eliminazione del fluido infiammatorio prodotto. Il corretto approccio terapeutico a queste fattrici permette infatti di aumentare la probabilità di ottenere una gestazione. Infatti, nel nostro studio, anche fattrici con segni di PMIE rilevabili dall'osservazione del citologico uterino, alla fine della stagione di monta sono risultate gravide, probabilmente in quanto sottoposte a numerosi flushing ed alla somministrazione di agenti ecbolici.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Traub-Dargatz, J.L., Salman, M.D., Voss, J.L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198, 1745–1747 (1991). 2. Alghamdi A., Troedsson, M.H.T. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology* 55, 1019-1028 (2000). 3. Nikolakopoulos, E., Kindahl, H., Watson, E.D. Oxytocin and PGF2 $\alpha$  release in mares resistant and susceptible to persistent mating-induced endometritis. *Journal of Reproduction and Fertility* 56 (Supplement), 363–372 (2000). 4. Troedsson, M.H.T., Ibrahim, N.M., King, V.L., Foster, D.N., Crabo, B.G. Post-breeding endometritis: the role of seminal components. *Pferdeheilkunde* 13, 542 (1997). 5. Pycoc, J.F., Newcombe, J.R. The relationship between intraluminal uterine fluid, endometritis, and pregnancy rate in the mare. *Equine Prat* 18, 19-22 (1996). 6. Katila, T., Lock, T.F., Hoffman, W.E., Smith, A.R. Lysozyme, alkaline phosphatase, and neutrophils in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. *Theriogenology* 33, 723-732 (1990). 7. LeBlanc, M.M., Johnson, R.D., Mays, M.B.C., Valderrama, C. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Biology of Reproduction* Monograph Series 1, 501–506 (1995). 8. Nikolakopoulos, E., Watson, E.D. Uterine motility in mares resistant and susceptible to endometritis. *J Reprod Fer Abstr Ser* 20 (1997). 9. Scott, M.A., Liu, I.K.M. Abnormal sperm function in mares with confirmed susceptibility to chronic endometritis. *Pferdeheilkunde* 12, 542 (1997). 10. Asbury, A.C. Uterine defense mechanisms in the mare: the use of intrauterine plasma in the management of endometritis. *Theriogenology* 21, 387–393 (1984). 11. Brook, D. Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. *Equine Vet Sci* 5, 16-22 (1985). 12. Card, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares *Theriogenology* 64, 580–588 (2005). 13. LeBlanc, M.M., Joshua, M., Arnold, J.S. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 68, 403-412 (2007). 14. Riddle, W.T., LeBlanc, M.M., Pierce, S.W., Stromberg, A.J. Relationships between pregnancy rates, uterine cytology and culture results in a Thoroughbred practice in central Kentucky. *Proceedings of the 50th Annual Convention of AAEP*, 51-54 (2007).

## POST BREEDING ENDOMETRITIS IN THE MARE: CORRELATION BETWEEN UTERINE CYTOLOGY AND FERTILITY RATE

Nervo T., Semita C., Gay P., *Department of Animal Pathology, University of Turin, Italy. Corresponding author: tiziana.nervo@unito.it*

**Key words:** mare, A.I., endometritis, uterine flushing, cytological evaluation.

Persistent mating-induced endometritis (PMIE) is a parapsyiological, self-limiting and short-lasting event, whose function is to evacuate the uterus from an excess of spermatozoa, seminal plasma and contaminants, raising the chances of establishing a pregnancy. Sound mares can disable this inflammation and evacuate the uterus within 12-48 hours after breeding. Inflammation is defined as persistent, and the mare susceptible, if inflammatory uterine secretions are found in the uterine lumen beyond the 12<sup>th</sup> hour after breeding. The presence of uterine inflammatory fluid during diestrus rouses a reduction in pregnancy rates and a rise in embryonic mortality rate. Several Authors suggested an intrinsic defect of myometrial contractility as a possible factor causing a delay in uterine clearance. During the 2007 breeding season, 29 mares, ranging from 5 to 21 y.o. and belonging to Standardbred (11), Sella Italiana (6), Selle Française (3), Quarter Horse (3), Haflinger (2), Thoroughbred (2), Hannover (1) and Belgian (1) breeds, were artificially inseminated. If pre-AI ultrasound examination revealed intrauterine fluid levels above 2 cm, a uterine flushing with 5 l of sterile Ringer solution was performed. 6 to 24 hours after AI, a uterine flushing was performed on all mares. Flushing characteristics were recorded, classifying the fluid as clean, dirty or cloudy (in the presence of mucus). Moreover, cytological specimens were prepared through cytocentrifugation and May-Grunwald-Giemsa coloration. Samples were evaluated under a light microscope, considering various parameters: the percentage of optical field occupied by cellular debris and mucus, the presence of neutrophils, bacteria and the PMN/epithelial cell ratio. 12 to 16 days after breeding, mares were submitted to transrectal ultrasonography in order to confirm pregnancy. A statistical analysis was performed correlating the different macroscopic and cytological parameters with pregnancy detection, using SPSS 14.0 for Windows. Uterine flushing appeared macroscopically clean in 56.9% of specimens, while in 51.7% the presence of mucus and debris occupied the optical field in a percentage between 0-25% (cat. 0). Categories 1 and 2 had a similar frequency, about 20%. 10.3% of samples belonged to category 3. PMN cell count over 10 microscope fields was included between 0 to 5 units (cat. 0) in 57.1% of samples, while the two other classes accounted for 20.7% (cat. 1) and 27.6% (cat. 2). In 43.1% of all the samples, no bacteria were found over ten microscope fields; in 29.3%, bacteria were seen on 1-4 fields and in 27.6% bacteria were present in 5 or more microscope fields. In 46.6%, the PMN/epithelial cell ratio belonged to category 0; cat 1 had a rate of 24.1%, cat. 2 had a rate of 29.3%. All parameters were correlated to the fertility rate through Pearson's test, however a statistically significant correlation was not proven, although positive cytological samples were observed mainly in non-pregnant mares. The end-of-season pregnancy rate was 71.43%. Uterine flushing allows the diagnosis of PMIE, which is sometimes hardly visible by ultrasound examination. Moreover, it facilitates the mare in evacuating inflammatory fluid from her uterus, mainly in cases of delayed uterine clearance in older or pluriparous subjects. Despite being a non-statistically significant correlation between macroscopic and microscopic uterine flushing features and pregnancy diagnosis, a correspondence between cytological negativity and positive pregnancy diagnosis was found. In our study, even mares with cytological signs of PMIE became pregnant probably because they were submitted to many uterine flushings and treatments when necessary.

## CONGELABILITÀ E FERTILITÀ DEL SEME DI STALLONE DI RAZZA MURGESE

Nicassio M., Aiudi G., Matarrese R., Silvestre F., Leoci R., Lacalandra G.M.,  
*Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari*

**Parole chiave:** Cavallo Murgesse, congelamento seme, fertilità

**RIASSUNTO** - Negli ultimi anni l'allevamento del cavallo Murgesse ha avuto un notevole incremento suscitando interesse anche da parte di alcuni Paesi Europei. Scopo del presente lavoro è stato quello di testare la congelabilità del seme di stalloni di razza Murgesse, valutando la fertilità in vivo. Il materiale seminale proveniente da 5 stalloni selezionati di razza Murgesse è stato sottoposto a valutazioni macroscopiche, microscopiche e ad analisi computerizzata di immagine (CASA) prima e dopo congelamento evidenziando valori medi di motilità totale e di motilità progressiva del  $51,1 \pm 4,9$  e del  $35,2 \pm 2,9$ , con una percentuale di spermatozoi iperattivi (RAPID) del  $33,2 \pm 1$ . Nel gruppo delle fattrici utilizzate per valutare la fertilità in vivo del seme congelato mediamente è stato ottenuto un valore di gravidanza dell'88 % con 2,2 cicli per gravidanza.

**INTRODUZIONE** - Il Cavallo delle Murge o Murgesse è una razza equina autoctona dell'Italia meridionale, allevata e selezionata dal 1926 in una circoscritta area della Puglia, nota come zona delle Murge<sup>1</sup>. Dal 1990 il Murgesse rientra in un programma nazionale per la tutela delle razze equine autoctone a ridotta consistenza numerica e limitata diffusione. Negli ultimi dieci anni, su tutto il territorio nazionale, si è registrato un significativo incremento numerico della razza, tale da giustificare la richiesta di istituzione di un Libro Genealogico del Cavallo Murgesse<sup>2</sup>. Inoltre, un crescente interesse per questa razza si è osservato anche da parte di alcuni Paesi Europei, dove, apprezzata per le sue caratteristiche di rusticità, versatilità, buon temperamento ed attitudine all'addestramento, la richiesta di puledri e fattrici è in continuo aumento. Tuttavia, la sua diffusione a livello nazionale ed estero trova ancora un importante limite nel ridotto numero di stalloni di pregio morfologico e genealogico presenti lontano dalla zona di origine della razza. La fecondazione artificiale, ed in particolare quella con seme congelato, potrebbe rappresentare pertanto un'utile pratica per intraprendere un più vasto programma di selezione e diffusione della razza. In questo modo stalloni di elevato valore genetico potrebbero essere utilizzati come miglioratori su un numero più consistente di fattrici presenti sul territorio nazionale ed internazionale. Scopo del presente lavoro è stato quello di testare la congelabilità del seme di stalloni selezionati di razza Murgesse attraverso un analizzatore d'immagini computerizzato (CASA) e valutarne la fertilità in vivo, al fine di dimostrare la possibilità reale di effettuare la fecondazione artificiale con seme congelato anche nella razza Murgesse ed evidenziarne i vantaggi derivabili.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine sperimentale è stata condotta nel Centro di Riproduzione Equina "Pegasus", ubicato presso la sezione di Clinica Ostetrica dell'Ospedale Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bari. In 5 stalloni selezionati di razza Murgesse di età compresa tra i 5 ed i 9 anni e di provata fertilità, sono stati effettuati 5 prelievi di seme a giorni alterni con vagina artificiale modello Missouri (Nasco, USA). Ogni eiaculato è stato preventivamente sottoposto a valutazioni macroscopiche, microscopiche con microscopio ottico (Nikon, Alphaphot-2, Giappone) munito di tavolinetto riscaldato ed esaminato, previa diluizione in rapporto 1:5 con Tyrode medium, con un analizzatore di

immagini computerizzato (CASA) modello IVOS 12 (Hamilton Thorne Biosciences, USA), che consente, in tempo reale, lo studio del movimento di ogni singolo spermatozoo fornendo dati oggettivi e ripetibili<sup>3</sup>. Dopo queste valutazioni, al fine di preservare la vitalità degli spermatozoi, il seme è stato diluito con un primo mestruo diluente contenente gentamicina (Gent for cooled semen, Minitübe, Austria), precedentemente termostato alla temperatura di 37°C, fino ad ottenere una concentrazione 1:1 e centrifugato a 2300 rpm per 15 minuti. Il pellet ottenuto è stato risospeso e diluito con un secondo extender a base di tuorlo d'uovo (Gent for freezing semen, Minitübe, Austria), contenente come crioprotettore il glicerolo (8%) fino ad ottenere una concentrazione di  $250 \times 10^6$  spz/ml, confezionato in paillettes da 0,5 ml e sottoposto alle procedure di congelamento in azoto liquido<sup>4,5</sup>.

Per ogni lotto di congelamento, la valutazione della motilità e delle caratteristiche cinetiche del materiale seminale dopo scongelamento a bagnomaria a 37°C per 30" è stata effettuata mediante CASA. La capacità fertilizzante in vivo è stata valutata su un gruppo di 25 fattrici (5 per stallone) di età compresa tra 7 e 13 anni, ricorrendo alle normali procedure per l'inseminazione artificiale con seme congelato nella specie equina<sup>5</sup> ed utilizzando una dose inseminante contenente  $300 \times 10^6$  spz progressivamente mobili dopo scongelamento (8 paillettes)<sup>6,9</sup>.

**RISULTATI** - Le valutazioni effettuate subito dopo il prelievo hanno evidenziato una concentrazione di  $143 \pm 10,3 \times 10^6$ /ml, una motilità totale del  $86,4 \pm 6,6$  e progressiva del  $73,6 \pm 9,7$  (Tab. 1). Le prove sulla motilità spermatica dopo scongelamento effettuate al CASA hanno evidenziato valori medi di motilità totale e di motilità progressiva del  $51,1 \pm 4,9$  e del  $35,2 \pm 2,9$ , con una percentuale di spermatozoi iperattivi (RAPID) del  $33,2 \pm 1,1$ ; anche i restanti parametri di motilità spermatica sono risultati elevati e positivamente correlati con la buona qualità del seme dopo scongelamento (Tab. 1).

Tab. 1 - Parametri seminali valutati al CASA prima e dopo congelamento

Parametri seminali	Seme	
	Fresco (X±DS)	Congelato (M±DS)
Concentrazione (mil/ml)	143±10,3	247,4±4,2
Motilità totale (%)	86,4±6,6	51,1±4,9
Motilità progressiva (%)	73,6±9,7	35,2±2,9
Velocità sulla traccia media (VAP) (µm/s)	124,3±6,7	93,5±10,3
Velocità media rettilinea (VSL) (µm/s)	92,6±11,1	80,4±3,6
Velocità media curvilinea (VCL) (µm/s)	198,8±15,1	142,7±4,2
Rettilinearità VSL/VAP - (STR) (%)	69,8±1,9	82,6±2,6
Linearità VSL/VCL - (LIN) (%)	46,5±2,3	53,6±2,3
Spermatozoi rapidi (RAPID) (%)	67,8±4,3	33,2±1,1

Delle 25 fattrici utilizzate per valutare la fertilità in vivo del seme congelato, 13 sono risultate gravide al primo ciclo (52%) e 9 nei 3 cicli successivi (36 %), con un valore medio di gravidanza dell'88 %. Per ottenere le 22 gravidanze sono stati necessari in media 1,76 cicli per cavalla con un numero medio di 2,26 cicli per gravidanza (Tab. 2).

Tab. 2 - Parametri riproduttivi nelle cavalle inseminate con seme congelato

Stalloni	Parametri riproduttivi delle fattrici			
	N. cavalle	Gravidanze (%)	N. cicli/cavalla	N. cicli/gravidanze
1	5	100	1,2	1,2
2	5	80	1,8	2,2
3	5	80	2	2,5
4	5	100	1,4	1,4
5	5	80	2,4	4

**CONCLUSIONI** - I dati ottenuti indicano la validità della procedura di congelamento utilizzata, che ha influito in misura minima sulle caratteristiche cinetiche degli spermatozoi mobili dopo scongelamento<sup>7</sup>. Particolarmente significativi sono i dati relativi alla buona percentuale di motilità dopo scongelamento, che è risultata superiore al 35%, valore limite al di sotto del quale il seme di uno stallone è considerato non utilizzabile in IA e quindi non congelabile<sup>8,9</sup>. I risultati ottenuti, pur nell'esiguità del numero di campioni di seme e di fattrici inseminate, rappresentano un dato positivo ed incoraggiante. In particolare, gli indici riproduttivi ottenuti in vivo permettono di dimostrare la reale possibilità di adottare la fecondazione artificiale con seme congelato anche nella razza Murgese. Sicuramente l'Inseminazione Artificiale potrebbe trovare valido campo d'applicazione e diffusione negli allevamenti sparsi nel nord Italia e soprattutto all'estero dove, data l'impossibilità d'impiego del seme refrigerato a causa della distanza, quello congelato rappresenta l'unica possibile alternativa allo spostamento delle fattrici nella zona di origine della razza.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Pastore, L. È nato ieri il vecchio Murgese. *Il mio cavallo* 1, 104-109, (1996). 2. Associazione Nazionale Allevatori del Cavallo delle Murge e dell'Asino di Martina Franca (ANAMF), Istituto Regionale Incremento Ippico di Foggia (IRIIP). Cavallo delle Murge e Asino di Martina Franca - Consistenza produzione selezionata (2006). 3. Varner, D.D., Vaughan, S.D., Johnson, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. *Am. J. Vet. Res.* 52(2), 224-230 (1991). 4. Braun, J., Sakai, M., Hochi, S., Oguri, N. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 41(4), 809-818 (1994). 5. Camper, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science* 68, 219-228 (2001). 6. Metcalf, E.S. The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology* 68, 423-428 (2007). 7. Tischner, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J. Reprod Fert. Suppl.* 27, 53-59 (1979). 8. Vidament, M. et al. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48, 907-917 (1997). 9. Leipold, S.D. et al. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology* 49, 1537-1543 (1998).

## **FREEZEABILITY AND FERTILITY OF MURGESE STALLION SEMEN**

**Nicassio M., Aiudi G., Matarrese R., Silvestre F., Leoci R., Lacalandra M.G.,**  
*Department of Animal Production, Faculty of Veterinary Medicine, University of Bari.*  
*Italy. Corresponding author: e-mail: m.nicassio@veterinaria.uniba.it*

**Key words:** Murgesse horse, cryopreservation, fertility

The Murgesse horse is an autochthon breed of Apulia (South Italy), appreciated all over Europe for its characters: rusticity, versatility, good temper and aptitude for training. Nevertheless, the use of frozen semen is not permitted and only a few stallions with good morphological and genealogical traits are used for breeding out of the native area. The Artificial Insemination with frozen semen may support the breed genetic diffusion. The aim of this study was to examine the effect of freezing on viability of Murgesse semen in terms of sperm quality and pregnancy rate after AI.

Semen was collected from 5 selected Murgesse stallions of proven fertility using a Missouri artificial vagina (Nasco, USA) and macroscopically and microscopically evaluated under a light microscope (Nikon, Alphaphot-2, Japan), equipped with a heating stage (38°C) and by a computer assisted sperm analysis (CASA, Hamilton Thorne Biosciences, Ivos 12, USA).

Five proven ejaculates from each stallion (concentration  $\geq 100 \times 10^6$  spz/ml, progressive motility  $\geq 70\%$ ) were extended with Gent (Minitube, Germany), packaged in 0.5 ml plastic straws ( $250 \times 10^6$  spz /ml each), frozen by liquid nitrogen vapors and stored at -196 °C. Two straws/ejaculate/stallion were thawed (37°C for 30'') and analysed by CASA.

The average percentages (means $\pm$ sd) of total and progressive motile spermatozoa on frozen semen were  $51.1 \pm 4.9$  and  $35.2 \pm 2.9$ , hyperactively motile spermatozoa (RAPID) were  $33.2 \pm 1.1$ . The values of other kinematic characteristics assessed by CASA were elevated and positively correlated with the sperm quality. The frozen semen fertility was evaluated *in vivo* on 25 mares. 13 of 25 mares were pregnant at the first-cycle (52%) and 9 mares at the 3 following cycles (36%), with a mean pregnancy rate of 88%.

The good quality of seminal parameters and high pregnancy rate show the semen freezeability of Murgesse stallions. A semen freezing programme for this breed needs the creation of a semen bank in order to diffuse Murgesse germoplasm in high demand abroad.

## EFFETTO DOSE-RISPOSTA DELLA MICOTOSSINA ZEARALENONE E SUOI DERIVATI SULLA STABILITÀ DELLA STRUTTURA CROMATINICA (SCSA) DI SPERMATOZOI DI CAVALLO

Filannino A., <sup>1</sup>Giannoccaro A., <sup>1</sup>Minervini F., Nicassio M., Dell'Aquila M.E., <sup>1</sup>Visconti A., Lacalandra G.M., *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari; <sup>1</sup>Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA, CNR), Bari*

**Parole chiave:** spermatozoi equini, micotossina zearalenone, SCSA, citofluorimetro.

**RIASSUNTO** - E' stato valutato l'effetto dose-risposta della micotossina zearalenone (ZEA) e suoi derivati  $\alpha$ - e  $\beta$ -zearalenolo ( $\alpha$ - e  $\beta$ -ZOL),  $\alpha$ - e  $\beta$ -zearalanolo ( $\alpha$ - e  $\beta$ -ZAL) e zearalanone (ZAN) sulla vitalità e sulla stabilità della struttura cromatinica (SCSA) di spermatozoi di cavallo mediante citofluorimetria. Sono state utilizzate concentrazioni di micotossine comprese tra 0,025 e 250 nM. Tutte le micotossine hanno indotto, dopo 2 ore di incubazione, un significativo aumento dell'instabilità della struttura cromatinica alle più basse concentrazioni utilizzate, ottenendo la seguente scala di tossicità: ZEA= $\beta$ -ZOL= $\alpha$ -ZOL= $\alpha$ -ZAL>> $\beta$ -ZAL=ZAN. Non è stata osservata riduzione della vitalità spermatica. L'effetto indotto da ZEA e suoi derivati sulla struttura cromatinica degli spermatozoi equini potrebbe essere considerato una delle cause di subfertilità negli stalloni.

**INTRODUZIONE** - Le micotossine, metaboliti secondari di alcuni funghi parassiti, possono ritrovarsi nelle piante infette e nelle derrate alimentari in concentrazioni tali da indurre intossicazione negli animali e nell'uomo in seguito all'ingestione di mangimi e di alimenti contaminati<sup>1</sup>. Lo zearalenone (ZEA) è una micotossina con attività estrogenica sintetizzata da funghi del genere *Fusarium* frequentemente presenti nei cereali. Nei mammiferi, ZEA è metabolizzato in differenti derivati,  $\alpha$ - e  $\beta$ -zearalenolo ( $\alpha$ -ZOL e  $\beta$ -ZOL),  $\alpha$ - e  $\beta$ -zearalanolo ( $\alpha$ -ZAL e  $\beta$ -ZAL) e zearalanone (ZAN), i cui profili metabolici sono diversi a seconda della specie animale. Per l'equino Songsermsakul *et al*<sup>2</sup> hanno riportato elevati livelli urinari di  $\beta$ -ZOL,  $\beta$ -ZAL e ZAN ma mancano studi sul metabolismo in questa specie. A causa della similarità strutturale con il 17  $\beta$ -estradiolo, ZEA e suoi derivati inducono effetti estrogenici sia per competizione con i recettori estrogenici sia per interazione con gli enzimi 3 $\alpha$ ( $\beta$ )-idrossisteroide-deidrogenasi (HSD) coinvolti nella regolazione degli ormoni steroidei<sup>3</sup>. La sindrome estrogenica, osservabile principalmente nella specie suina più sensibile, è caratterizzata da alterazione del tratto riproduttivo femminile e riduzione della fertilità. Nei maschi si osserva ginecomastia, riduzione della grandezza dei testicoli, perdita di libido e ridotta motilità degli spermatozoi<sup>4</sup>. Per la specie equina è stata riportata assenza di sintomatologia in ambedue i sessi<sup>5,6</sup> e dopo somministrazione orale di 7 mg di ZEA<sup>7</sup>. L'obiettivo del presente lavoro è stato di valutare l'effetto dose-risposta della micotossina ZEA e suoi derivati ( $\alpha$ - e  $\beta$ -ZOL,  $\alpha$ - e  $\beta$ -ZAL e ZAN) sulla vitalità e sulla stabilità della struttura cromatinica (SCSA) di spermatozoi di cavallo mediante citofluorimetria.

**MATERIALI E METODI** - Le concentrazioni finali di micotossine, comprese tra 0,025 e 250 nM, sono state ottenute mediante diluizioni seriali 1:10 in metanolo. Queste concentrazioni sono state selezionate sulla base dei livelli naturali di esposizione a ZEA ritrovati in campioni di urine di cavallo<sup>8</sup>. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) è una metodica citofluorimetrica, messa a punto da Evenson *et al*<sup>9</sup>, che quantifica l'integrità della cromatina spermatica dopo denaturazione acida *in situ* sfruttando le proprietà metacromatiche dell'arancio d'acridina (AO), colorante che



emette fluorescenza verde se intercala DNA a doppia elica o rossa se intercala DNA a singola elica. Dopo scongelamento del seme, sono stati aggiunti 50 µl di ciascuna diluizione di micotossina ad aliquote di 1 ml di Tyrode medium<sup>10</sup>, contenenti 2 x 10<sup>6</sup> spermatozoi. I controlli sono stati allestiti aggiungendo 50 µl di metanolo in 1 ml di Tyrode medium. Le provette sono state poste in incubatore a CO<sub>2</sub> per 2 ore a 38,5°C. Dopo centrifugazione a 300 x g per 10 minuti, gli spermatozoi sono stati sottoposti a trattamento acido e, successivamente a colorazione con AO, come descritto da Bochenek *et al*<sup>11</sup>. L'analisi SCSA è stata condotta con il citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson, BD) utilizzando il software Cell Quest (BD). La fluorescenza rossa di AO è stata misurata con filtro passabanda di 650/13 nm (FL3), mentre quella verde con filtro passabanda di 530/30 nm (FL1). La stabilità della cromatina spermatica è stata misurata utilizzando differenti parametri dell'Indice di Frammentazione del DNA (DFI) quali media ( $\bar{X}$ -DFI), percentuale (%-DFI) e deviazione standard (DS-DFI) del DFI. La vitalità spermatica è stata valutata in campioni paralleli mediante l'uso dello ioduro di propidio (PI). Sono stati aggiunti 50 µl di ogni diluizione di micotossina ad aliquote di 1 ml di PBS, contenenti 2 x 10<sup>6</sup> spermatozoi. I controlli sono stati allestiti aggiungendo 50 µl di metanolo in 1 ml di PBS. Le provette sono state incubate per 30 minuti. Gli spermatozoi sono stati incubati per ulteriori 30 minuti in 2 µg/ml di PI e analizzati al citofluorimetro. La fluorescenza del PI è stata valutata con filtro passabanda di 650/13 nm (FL3). Le cellule con membrana integra (PI-negative) hanno mostrato bassa fluorescenza, mentre quelle con membrana danneggiata (PI-positive) alta fluorescenza. La vitalità è stata espressa come percentuale delle cellule PI-negative. Analisi statistica Le differenze tra i campioni trattati con le micotossine e i rispettivi controlli sono state valutate con il test di Wilcoxon. Valori di p<0,05 sono stati considerati significativamente differenti.

**RISULTATI - SCSA** La tabella riporta per ciascuna micotossina le variazioni dei parametri SCSA alla minore concentrazione risultata significativamente attiva. Tutte le micotossine hanno indotto instabilità della struttura cromatinica rispetto ai controlli, modificando i parametri considerati. Zearalenone e β-ZOL, alla concentrazione di 0,025 nM, hanno determinato un significativo incremento (p<0,05) del parametro  $\bar{X}$ -DFI mentre, alle stesse concentrazioni, α-ZOL e α-ZAL hanno indotto un aumento significativo (p<0,05) del parametro %-DFI. Le micotossine β-ZAL e ZAN, a concentrazioni di 0,25 nM, hanno determinato un significativo incremento (p<0,05) del parametro DS-DFI. Vitalità Le micotossine non hanno determinato una significativa riduzione della vitalità spermatica. Una riduzione del 10% si è osservata in seguito ad esposizione con 25 e 250 nM ZAN.

Tab. 1 - Effetti dello zearalenone e derivati sull'SCSA di spermatozoi equini dopo 2 ore di esposizione

Micotossine (concentrazione attiva)	Parametri SCSA	Trattati (media ± ds)	Controlli
Zearalenone (0,025 nM)	$\bar{X}$ -DFI	187 ± 8	169 ± 5
β- Zearalenolo (0,025 nM)		170 ± 4	150 ± 5
α- Zearalenolo (0,025 nM)	% -DFI	20 ± 1	18 ± 2
α- Zearalanolo (0,025 nM)		23 ± 3	20 ± 2
β- Zearalanolo (0,25 nM)	DS-DFI	130 ± 5	116 ± 10
Zearalanone (0,25 nM)		132 ± 5	116 ± 10

**DISCUSSIONE** - La presenza delle micotossine negli alimenti è un problema molto sentito e numerosi studi sono stati condotti per valutare sia la diffusione che la tossicità negli animali e nell'uomo. Pochi studi sono stati effettuati sulla tossicità di ZEA nell'equino che, come il suino, è una specie monogastrica e per tanto potenzialmente sensibile all'azione delle micotossine. Questo è il primo studio che illustra l'effetto dose-risposta di ZEA e suoi derivati su alcuni parametri della qualità dello sperma equino. L'instabilità della cromatina spermatica è già da tempo utilizzata come parametro della qualità del seme umano in quanto correlata ad aumentati tassi d'aborto spontaneo precoce<sup>12</sup>. Per tal motivo l'SCSA dovrebbe essere inclusa nelle analisi routinarie della qualità del seme per la valutazione della fertilità degli stalloni. La micotossina ZEA e suoi derivati hanno determinato, a livelli di nM, un aumento dell'instabilità cromatinica senza una riduzione della vitalità spermatica. Al contrario, Tsakmakidis *et al*<sup>13</sup> hanno ritrovato assenza di effetto di ZEA e  $\alpha$ -ZOL a concentrazioni  $\mu$ M sulla stabilità cromatinica di spermatozoi suini. Tale discordanza con i nostri risultati potrebbe essere dovuta sia alla specie animale considerata sia alla metodologia (microscopia a fluorescenza) utilizzata per l'analisi. L'effetto indotto da ZEA e suoi derivati sulla struttura cromatinica degli spermatozoi equini potrebbe essere una delle cause di subfertilità negli stalloni. Infatti Love e Kenney<sup>14</sup> hanno osservato una correlazione tra aumentata denaturazione del DNA e ridotta fertilità degli stalloni. A causa della diffusa presenza di ZEA nei cereali, il riscontro di questo effetto sulla stabilità cromatinica degli spermatozoi equini dovrebbe incentivare studi relativi all'influenza di ZEA e derivati sulla fertilità equina.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Bottalico A. Funghi tossigeni e micotossine: aspetti generali. *Informatore Fitopatologico*. 12, 10-22 (2002). 2. Songsermsakul P., Sonta G., Cichna-Markl M., Zentek J., Razzari-Fazeli E. Determination of Zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC-API-MS. *J Chromatogr B*. 843, 252-261 (2006). 3. Malekinejad H., Maas-Bakker R., Fink-Gremmels J. Species differences in the biotransformation of zearalenone. *Vet J*. 172, 96-102 (2006). 4. Ruhr L.P., Osweiler G.D., Foley C.W. Effect of the estrogenic mycotoxin zearalenone on reproductive potential in the boar. *Am J Vet Res*. 44, 483-5 (1983). 5. Raymond S.L., Smith T.K., Swamy H.V. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J Anim Sci*. 81, 2123-2130 (2003). 6. Raymond S.L., Smith T.K., Swamy H.V. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on feed intake, metabolism, and indices of athletic performance of exercised horses. *J Anim Sci*. 83, 1267-1273 (2005). 7. Juhász J., Nagy P., Kulcsár M., Szigeti G., Reiczigel J., Huszenicza G. Effect of low-dose zearalenone exposure on luteal function, follicular activity and uterine oedema in cycling mares. *Acta Vet Hung*. 49, 211-22 (2001). 8. Minervini F., et al. Esposizione dei cavalli alla micotossina zearalenone e derivati e loro influenza sulla stabilità della struttura cromatinica (SCSA) degli spermatozoi. Convegno Nazionale Fattori Ambientali e Salute Riproduttiva, Pescara, 8-9 Giugno 2007. 9. Evenson D.P., Darzynkiewicz Z., Melamed M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 240, 1131-3 (1980). 10. Rathi R., Colenbrander B., Bevers M.M., Gadella B.M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*. 65, 462-70 (2001). 11. Bochenek M., Smorag Z., Pilch J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*. 56, 557-567 (2001). 12. Virro M.R., Larson-Cook K.L., Evenson D.P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*. 81, 1289-95 (2004) 13. Tsakmakidis I.A. et al. Evaluation of zearalenone and alpha-zearalenol toxicity on boar sperm DNA integrity. *J Appl Toxicol*. DOI: 10.1002/jat.1322 (2007). 14. Love C.C., Kenney R.M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*. 57, 955-72 (1998).

## DOSE-RESPONSE EFFECT OF MYCOTOXIN ZEARALENONE AND ITS DERIVATIVES ON SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY (SCSA) IN STALLIONS

Filannino A., <sup>1</sup>Giannoccaro A., <sup>1</sup>Minervini F., Nicassio M., Dell'Aquila M.E., <sup>1</sup>Visconti A., Lacalandra G.M., *Department of Animal Production, University of Bari, Italy; <sup>1</sup>Institute of Sciences of Food Production (ISPA), National Research Council (CNR), Bari, Italy. Corresponding author: fiorenza.minervini@ispa.cnr.it*

**Key words:** equine spermatozoa, mycotoxin zearalenone, SCSA, flow cytometry.

**INTRODUCTION** - Zearalenone (ZEA) and its derivatives ( $\alpha$  and  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$  and  $\beta$  zearalanol and zearalanone) are mycotoxins synthesized by fungi of *Fusarium* species, common parasites of cereals. These substances, with a different metabolic pathway to animal species, exert estrogenic activity because of their chemical structure similar to  $17\beta$  estradiol. Several *in vivo* and *in vitro* studies have been carried out on sensitive animal species, such as swine, but few reports on their exposure and toxicity are available in the horse. This study assessed the effect of ZEA and its derivatives on sperm chromatin structure assay (SCSA) and viability in frozen-thawed equine spermatozoa, by flow cytometry.

**MATERIALS AND METHODS** - Five final mycotoxin concentrations, from 0.025 nM to 0.25  $\mu$ M, were obtained after serial dilution 1:10 with methanol. SCSA was performed by using acridine orange (AO) which emits green or red fluorescence, when it links to double-stranded or single-stranded DNA, respectively, after *in situ* acid denaturation. The stability of sperm chromatin was measured, after 2 hours' incubation, by using various DNA Fragmentation Index (DFI) parameters, such as the mean (X-DFI), the percentage (%-DFI) and the standard deviation (SD-DFI) of DFI. Sperm viability was assessed after 30 minutes of incubation by using propidium iodide (PI) and was expressed as the percentage of cells with intact plasma membranes (PI-negative cells).

**RESULTS** - All mycotoxins induced chromatin structure instability, thus modifying the SCSA parameters used. Zearalenone and  $\beta$ -ZOL, at a concentration of 0.025 nM, induced a significant ( $p<0.05$ ) increase in X-DFI, while  $\alpha$ -ZOL and  $\alpha$ -ZAL, at the same concentration, determined a significant ( $p<0.05$ ) rise in %-DFI.  $\beta$ -ZAL and ZAN mycotoxins, at 0.25 nM, led to a significant ( $p<0.05$ ) increase in SD-DFI. Zearalenone and its derivatives did not determine any significant loss of sperm viability. Reduction of only 10% was observed after exposure to 25 nM ZAN.

**CONCLUSIONS** - We conclude that, at nM levels, the mycotoxin ZEA and its derivatives determined an increase in sperm chromatin structure instability without reducing viability. Previous studies reported a correlation between enhanced sperm DNA denaturation and fertility decrease in stallions. Because of the widespread occurrence of these mycotoxins in cereals, the effect induced by ZEA and its derivatives on equine sperm chromatin structure could be a possible reason for stallion subfertility.

## AGGREGAZIONE POLARE DI GRANULI LIPIDICI CITOPLASMATICI IN OVOCITI EQUINI. UN MARCATORE DI COMPETENZA OVOCITARIA?

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

**Parole chiave:** Ovocita equino, granuli lipidici, mitocondri, ICSI, Microscopia laser scanning confocale (CLSM)

**RIASSUNTO** - Nel presente lavoro sono state analizzate le correlazioni tra aggregazione polare dei granuli lipidici e: 1) maturazione nucleare; 2) distribuzione dei mitocondri attivi; 3) fertilizzazione dopo ICSI in ovociti equini maturati in vitro. E' stata osservata correlazione positiva tra aggregazione polare dei granuli lipidici e maturazione nucleare dell'ovocita. La formazione di aggregati dei due tipi di organuli è risultata associata. Ovociti con granuli lipidici diffusi o aggregati, localizzati e non nell'area dei mitocondri, si sono fertilizzati con percentuali paragonabili.

**INTRODUZIONE** - È noto che l'ovocita contiene considerevoli depositi di molecole energetiche da utilizzare durante la maturazione meiotica, la fertilizzazione e lo sviluppo embrionale precoce. Questo è particolarmente evidente in ovociti di mammiferi domestici nei quali sono stati descritti livelli molto alti di lipidi<sup>1</sup> la maggior parte dei quali in forma di trigliceridi<sup>2</sup> assemblati in granuli lipidici (GL) spesso circondati da uno strato di fosfolipidi<sup>3,4</sup>. Il contenuto in lipidi nell'ovocita differisce tra le specie ed ha implicazioni nel potenziale di sviluppo dell'ovocita e nel determinarne la resistenza a procedure di crioconservazione<sup>5</sup>. I trigliceridi sono metabolizzati nella matrice dei mitocondri (mt) durante la  $\beta$ -ossidazione e il ciclo degli acidi tricarbossilici. Pertanto è stato ipotizzato che, nel citoplasma ovocitario, mt e GL debbano risiedere in stretta prossimità. Questo è stato provato in oociti di alcune specie, come pecore, bovini e suini, nelle quali è stato osservato che mt e GL sono strettamente associati e formano 'unità metaboliche' che tendono ad accumularsi al margine dell'oocita<sup>5</sup>. L'organizzazione e il posizionamento dei mt attivi sono indicativi dello stato energetico dell'oocita e dell'abilità a sostenere gli eventi chiave della maturazione e fertilizzazione. Calarco, nel 1995<sup>6</sup>, ha riportato che durante la maturazione meiotica, in ovociti murini, la distribuzione dei mt attivi cambia da omogenea (granuli piccoli, GP) a pericorticale/perinucleare (P/P). In seguito tali distribuzioni sono state confermate in ovociti di numerose specie animali e nell'uomo<sup>7</sup>. Studi sulle correlazioni tra caratteristiche dei GL (struttura, distribuzione, composizione) e funzionalità della cellula uovo sono stati riportati finora limitatamente ad aspetti relativi alla maturazione ed esclusivamente per la specie suina nella quale la presenza di ampie quantità di GL è una caratteristica peculiare degli ovociti. Sturmei e Leese<sup>8</sup> hanno riportato una significativa riduzione nel contenuto intracellulare in trigliceridi durante la maturazione in vitro, rivelata da misurazioni di consumo di ossigeno. In un successivo studio, gli stessi autori hanno applicato la tecnica FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) per esaminare la co-localizzazione mt/GL in oociti vivi, dimostrando che, in ovociti suini, questi due tipi di organuli si trovano a distanza di 6-10 nm, indicativa di associazione su scala molecolare<sup>5</sup>. Ulteriori studi sull'associazione mt/GL e sul ruolo biologico di questa unità metabolica durante la maturazione, fecondazione ed embriogenesi precoce in modelli animali potrebbero ampliare le conoscenze sul metabolismo energetico ovocitario e migliorare la produzione di embrioni in vitro. Nel presente studio sono state analizzate, in ovociti equini, le correlazioni tra aggregazione polare dei GL e: 1) percentuali di maturazione in vitro (IVM); 2) pattern di distribuzione

e localizzazione dei mt; 3) fertilizzazione dopo iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI).

**MATERIALI E METODI** - Complessi cumulo-ovocita prelevati da ovaie di cavalle macellate di non nota storia riproduttiva sono stati coltivati in vitro e quelli con cumulo compatto (Cp) o espanso (Esp) sono stati coltivati separatamente in ragione della differente competenza meiotica<sup>9,10</sup>. Al termine della coltura, gli ovociti sono stati denudati e valutati morfologicamente in relazione a spessore e integrità della zona pellucida, spazio perivitellino, diametro dell'ooplasma e integrità dell'oolemma. In entrambi i gruppi, Cp ed Esp, gli ovociti normali sono stati ulteriormente classificati in base alla aggregazione polare (P) o alla distribuzione uniforme (U) dei GL citoplasmatici. Gli ovociti con globulo polare (PB) estruso dei 4 sottogruppi (Cp P, Cp U, Esp P, Esp U) sono stati sottoposti a: **1)** valutazione delle percentuali di maturazione<sup>9</sup>; **2)** analisi del pattern di distribuzione e della localizzazione dei GL e dei mt<sup>11</sup> **3)** fertilizzazione mediante ICSI<sup>9</sup>.

**RISULTATI - Aggregazione dei GL e maturazione nucleare** - I dati si riferiscono a sette prove sperimentali di IVM. Negli ovociti Cp (17/26, 65% vs 2/21, 9%) e nei totali (Cp + Esp; 40/58, 69% vs 13/41, 32%) percentuali più elevate di ovociti P hanno raggiunto lo stadio di metafase II (MII+PB) rispetto agli ovociti U ( $P < 0,001$ ). Negli ovociti Esp si può osservare un trend (23/32, 72% vs 11/20, 55%) ma l'analisi statistica non ha evidenziato significatività ( $X^2=0,89$ ). **Aggregazione e localizzazione dei GL e mt** - Sono stati analizzati 41 ovociti in MII (13 Cp e 28 Esp) ottenuti in due prove sperimentali di IVM. Di questi, 4 ovociti (10%) hanno mostrato GL di tipo U e 37 (90%) di tipo P. Nel gruppo degli ovociti U (n=4 di cui 2 Cp e 2 Esp) si sono osservati sia ovociti con mt omogenei (n=2, di cui 1 Cp e 1 Esp) che ovociti con mt P/P (n=2, di cui 1 Cp e 1 Esp). Questo dato indica che la distribuzione uniforme dei GL non influisce sulla possibilità che i mt possano organizzarsi a formare patterns eterogenei. Nel gruppo degli ovociti P (n=37 di cui 11 Cp e 26 Esp) sono state osservate percentuali più elevate di ovociti con distribuzione P/P dei mt, sia Cp (8/11, 73%) che Esp (17/26, 65%). I rimanenti ovociti (3/11, 27% Cp e 9/26, 35% Esp) hanno mostrato mt diffusi in GP. Questo dato indica che l'aggregazione polare dei GL è associata a distribuzione P/P dei mt attivi. Inoltre in entrambe le categorie è risultato che il dominio semilunare dei GL, che si può osservare in posizione adiacente (A), opposta (O) o longitudinale (L) rispetto al PB, non sempre si localizza nella stessa area degli aggregati di mt presenti nell'emisfero contenente il fuso meiotico. In particolare negli ovociti Cp P (n=8) sono stati riscontrati 3 ovociti con GL A (38%), 3 O (38%) e 2 L (25%) rispetto alla posizione del PB e dei mt. Negli ovociti Esp P (n= 17) sono stati riscontrati 5 ovociti con GL A (29%), 4 O (24%) e 8 L (47%). In totale su 25 ovociti P, in 8 ovociti (32%) mt e GL sono risultati localizzati nell'area contenente l'apparato meiotico. **Aggregazione dei GL e fertilizzazione** - I dati sono riferiti a nove prove sperimentali di IVM/ICSI. Le percentuali di ovociti fertilizzati non sono variate tra i due gruppi P e U, sia per ovociti Cp (20/33, 61% vs 7/12, 58%) che Esp (23/41, 56% vs 5/10, 50%). Inoltre, negli ovociti P, Cp P ed Esp P, le percentuali di ovociti fertilizzati non sono variate in relazione alla posizione relativa dei GL rispetto al PB sia per ovociti Cp (5/11, 45%; 10/16, 63%; 5/6, 83%) che per ovociti Esp (5/8, 63%; 9/20, 45%; 9/13, 67%) che per i totali (10/19, 53%; 19/36, 53%; 14/19, 74%) A, O e L, rispettivamente.

**DISCUSSIONE** - Questo studio fornisce nuove informazioni sulla possibilità di considerare l'aggregazione polare dei GL nell'ovocita di cavalla come marcatore predittivo della funzionalità ovocitaria. Grøndahl et al.<sup>12,13</sup>, avevano descritto il riarrangiamento di GL da una distribuzione uniforme, in oociti immaturi, ad un dominio

semilunare adiacente al fuso meiotico che conferiva all'ooplasma un'apparenza polarizzata, in ovociti in MII. Carnevale e Maclellan<sup>10</sup>, in una rivisitazione dei più importanti criteri per la selezione di ovociti equini per un uso clinico, hanno confermato che quando la maturazione è completata l'ooplasma può avere differenti gradazioni di grigio, spesso con apparenza polarizzata, causata da una distribuzione non uniforme di GL e di organelli. Questo è il primo studio che riporta una analisi statistica della correlazione tra questo marcatore e la maturazione meiotica in vitro. I dati evidenziano correlazione positiva tra polarizzazione dei GL citoplasmatici e maturazione nucleare dell'ovocita, confermata anche negli esperimenti di ICSI. Al fine di valutare la rilevanza funzionale dell'aggregazione dei GL nel metabolismo energetico dell'ovocita è stato ritenuto interessante osservare la loro localizzazione rispetto ai mt attivi. È stato osservato che, in ovociti equini, le condizioni di aggregazione dei GL e dei mt sono associate ma i due tipi di organuli possono formare aggregati anche non localizzati nella stessa area. L'analisi della distribuzione dei mt in ovociti equini è stata riportata in due precedenti studi. Caillaud et al.<sup>14</sup>, hanno analizzato in ovociti maturati in vivo gli effetti di fattori di regolazione della maturità citoplasmatica in termini di migrazione e remodelling dei mt. Torner et al.,<sup>15</sup> hanno riportato modificazioni della distribuzione dei mt durante la maturazione in vitro in relazione alla morfologia del cumulo ooforo al momento del prelievo. Lo studio di ICSI ha mostrato mancanza di correlazione dell'aggregazione dei GL con la fecondabilità, in quanto ovociti con GL diffusi o aggregati, localizzati e non nell'area dei mt, si sono fertilizzati con percentuali paragonabili. Ulteriori studi potranno chiarire eventuali differenze specie-specifiche nel rapporto mt/substrati energetici nel citoplasma di ovociti nei mammiferi e le implicazioni di questi due parametri energetici sul potenziale di sviluppo di embrioni in vitro.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. McEvoy, T., Coull, G., Broadbent, P., Hutchinson, J. & Speake, B. Fatty acid composition of lipids in immature cattle pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil.* 118, 163-170 (2000). 2. Homa, S., Racow, C. & McGaughey, R. Lipid analysis of immature pig oocytes. *J Reprod Fertil.* 77 425-434 (1986). 3. Murphy, D.J. & Vance, J. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.* 24, 109-115 (1999). 4. Ostermeyer, A.G. et al. Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J Cell Biol.* 152, 1071-8 (2001). 5. Sturme, R.G., O'Toole, P.J. & Leese, H.J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction* 132, 829-37 (2006). 6. Calarco, P.G. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Dev. Genet.* 16, 36-43 (1995). 7. Iorga, A.I. et al. Mitochondrial distribution and activity in canine oocytes is related to reproductive cycle stage but can be compromised during in vitro maturation *Anim. Reprod. Sci.* (2008, in stampa). 8. Sturme, R.G. & Leese, H.J. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 126, 197-204 (2003). 9. Dell'Aquila, M.E., Albrizio, M., Maritato, F., Minoia, P. & Hinrichs, K. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulosa cell apoptosis. *Biol. Reprod.* 68, 2065-72 (2003). 10. Carnevale, E.M. & Maclellan, L.J. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 22, 843-856 (2006). 11. Dell'Aquila, M.E., Ambruosi, B., De Santis, T. & Cho, Y.S. Mitochondrial distribution and activity in human mature oocytes: GnRH agonist vs antagonist for pituitary downregulation. *Fertil. Steril.* (2008, in stampa). 12. Grøndahl, C. et al. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 94-105 (1995). 13. Grøndahl, C. et al., Intracytoplasmic sperm injection of in vitro-matured equine oocytes. *Biol. Reprod.* 57, 1495-1501 (1997). 14. Caillaud, M., Duchamp, G. & Gérard, N. In vivo effect of interleukin-1beta and interleukin-1RA on oocyte cytoplasmic maturation, ovulation, and early embryonic development in the mare. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 22, 3-26 (2005). 15. Torner, H. et al. Effect of initial cumulus morphology on meiotic dynamic and status of mitochondria in horse oocytes during IVM. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 176-183 (2007).

Lavoro eseguito con finanziamenti dell'Università di Bari (Finanziamenti d'Ateneo 2006)

## **POLAR AGGREGATION OF CYTOPLASMIC LIPID DROPLETS IN EQUINE OOCYTES. A MARKER FOR OOCYTE COMPETENCE?**

**Ambrosi B., Iorga A.I., De Santis T., Matarrese R., Dell'Aquila M.E.,** *Department of Animal Production, University of Bari. Corresponding author: e.dellaquila@veterinaria.uniba.it*

**Key words:** Equine oocyte, lipid droplets, mitochondria, Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), Confocal Laser Scanning Microscopy

**INTRODUCTION** - Lipid granules and mitochondria in the ooplasm are essential for energy production required for fertilization and embryo development. We studied the correlations between the polar aggregation of cytoplasmic lipid droplets and: 1) nuclear maturation; 2) pericortical/perinuclear (P/P) mitochondrial (mt) distribution; 3) fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in equine oocytes matured in vitro.

**MATERIALS AND METHODS** - Cumulus-oocyte complexes (COCs) from slaughtered mares, classified as having an intact cumulus investment, were cultured for in vitro maturation (IVM; Dell'Aquila et al., *Biol. Reprod.* 2003; 68, 2065-72). After culture, oocytes classified as morphologically normal, according to zona pellucida thickness and integrity, perivitelline space width, ooplasmic size and oolemmal integrity, were categorized as having polar (P) aggregation or uniform (U) distribution of lipid droplets within the cytoplasm. In both groups, the oocytes in metaphase II (MII), showing the 1<sup>st</sup> polar body (PB) extruded, underwent either nuclear chromatin evaluation (Experiment 1) or mt distribution (Dell'Aquila et al., *Fertil. Steril.* in press) and mt-lipid droplet co-localisation analysis (Experiment 2) or ICSI (Dell'Aquila et al., *Biol. Reprod.* 2003; Experiment 3).

**RESULTS** - In Experiment 1, 99 oocytes, 58 P (59%) and 41 U (41%) were analyzed. The nuclear maturation rate (MII + PB) was significantly higher in P compared with U oocytes (69%, 40/58 vs 32%, 13/41;  $P < 0.001$ ). In Experiment 2, 41 MIIPB oocytes were analyzed. Thirty-seven of them (90%) showed P aggregation of lipid droplets. A higher rate of P oocytes showed peripheral/perinuclear mt distribution in the area corresponding to meiotic apparatus (68%, 25/37). In these oocytes the lipid semilunar domain was not always associated with mt aggregates in the area corresponding to meiotic spindle and was observed in 3 different positions, adjacent (32%, 8/25), opposite (28%, 7/25) and longitudinal (40%, 10/25) as regards PB position. The remaining P oocytes (32%, 12/37) showed homogeneous mt distribution. In the group of U oocytes (n=4), both peripheral/perinuclear (50%, 2/4) and homogeneous (50%, 2/4) mt distribution were observed. In Experiment 3, 127 oocytes, 85 P (67%) and 42 U (33%) were analyzed. The maturation rate was, again, significantly higher in P oocytes compared with U (93%, 79/85 vs 64%, 27/42;  $P < 0.001$ ). However, the rate of normally fertilized oocytes was no different between groups (58%, 43/74 vs 54%, 12/22, for P and U respectively; NS).

**CONCLUSIONS** - We conclude that, in morphologically normal equine oocytes, P distribution of lipid granules is related with nuclear maturation and with P/P mt distribution. However, the semilunar domain of lipid droplets does not always co-localize with mt in the area containing meiotic spindle and cannot be considered as a predictive indicator for normal fertilization. Probably species-specific differences exist in mt/substrates relations in mammalian oocytes.

## ATTIVITÀ DEL NALOXONE SULLA MATURAZIONE IN VITRO DI OVOCITI DI CAGNA: EFFETTO ENHANCER NELLA FASE ANESTRALE

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

**Parole chiave:** cagna, ovocita, maturazione in vitro, mitocondri, naloxone.

**RIASSUNTO** - Sono stati valutati gli effetti del naloxone (Nx), antagonista recettoriale degli oppioidi, sulla maturazione in vitro (IVM) di ovociti di cagna, prelevati da soggetti puberi in diverse fasi del ciclo riproduttivo (anestro, fase follicolare, ovulazione, diestro iniziale, diestro avanzato). Il Nx è stato testato a tre diverse concentrazioni,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-10}$  M. I parametri di maturazione osservati sono stati lo stadio della cromatina nucleare e il pattern di distribuzione mitocondriale. Il Nx, alla concentrazione maggiore, ha indotto un significativo incremento della maturazione nucleare negli ovociti prelevati in fase anestrata. I mitocondri hanno mostrato un pattern di aggregazione a granuli piccoli, indicativo di uno stato di non attivazione energetica, in tutti gli ovociti, indipendentemente dallo stadio del ciclo estrale. I risultati fanno ipotizzare un effetto inibitorio del sistema oppioidergico sull'acquisizione della competenza meiotica in ovociti di cagne in anestro.

**INTRODUZIONE** - I peptidi oppioidi endogeni (EOP) sono importanti modulatori della riproduzione, esercitando primariamente un ruolo inibitorio dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi<sup>1,2</sup>. Studi recenti hanno dimostrato anche un'attività modulatrice diretta degli EOP sulla funzione ovarica, tramite un'azione locale intrafollicolare<sup>3,4,5</sup>. La sintesi e il rilascio degli EOP sono mediati da vari fattori, sia di origine centrale che periferica; tra questi, oltre a diversi neurotrasmettitori, rientrano anche gli ormoni steroidei sessuali<sup>6</sup>. Gli EOP si legano a specifici recettori accoppiati a proteine G, di cui i più noti sono mu, delta e kappa. Il recettore mu per gli oppioidi (MOR) è presente in ovociti bovini<sup>3</sup>, umani<sup>7</sup>, equini<sup>8</sup> e di cagna<sup>9</sup>. Ultimamente, negli animali da compagnia i motivi e le tipologie di intervento specialistico di riproduzione assistita si stanno sempre più omologando a quelli della specie umana, finalizzati alla risoluzione di problemi di ipofertilità del singolo soggetto. La maturazione in vitro (IVM) dell'ovocita è uno step fondamentale delle procedure di embriogenesi in vitro. Nella specie canina, contrariamente a molte specie da reddito, l'IVM consegue risultati insoddisfacenti, con percentuali non superiori al 10-20%<sup>10</sup>. Le cause di ciò sono ad oggi ancora non definite per molti aspetti. La supplementazione con agonisti oppioidi del terreno di maturazione non addizionato con ormoni blocca l'avvio della maturazione di ovociti nel ratto<sup>11</sup>, nel bovino<sup>3</sup> e nell'equino<sup>8</sup>, mentre l'aggiunta di basse concentrazioni di naloxone (Nx), antagonista recettoriale degli oppioidi, ha incrementato i tassi di maturazione ovocitaria in bovini<sup>3</sup> ed equini<sup>8</sup>. Questo studio riporta gli effetti della supplementazione del terreno di maturazione con Nx sulle percentuali di maturazione nucleare e citoplasmatica di ovociti recuperati da cagne puberi in diversi stadi del ciclo ovarico. La maturazione citoplasmatica è stata analizzata in termini di distribuzione mitocondriale.

**MATERIALI E METODI** - Gli ovociti sono stati prelevati da ovaie asportate da 16 cagne puberi sane, di differente razza, con età compresa tra 10 mesi e 5 anni e peso corporeo tra 8-30 kg, portate presso gli ambulatori della Clinica Ostetrica 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 dopo asportazione, secondo i criteri descritti da Otoi et al. (2002)<sup>12</sup>. Le ovaie prelevate entro le prime due settimane



dopo l'ovulazione sono state classificate come diestro iniziale. Il recupero degli ovociti è stato effettuato entro 30 minuti dall'intervento, mediante slicing delle ovaie in soluzione di tampone fosfato (PBS). Sono stati analizzati solo ovociti circondati da alcuni strati di cellule del cumulo ooforo e con diametro maggiore di 110  $\mu\text{m}$ . La coltura di IVM è stata condotta per 72 ore a 38.5°C in 5% di CO<sub>2</sub> come descritto da Otoi et al.<sup>12</sup>. Il Naloxone (Nx) è stato aggiunto al terreno di coltura alle concentrazioni di 1x10<sup>-6</sup>, 1x10<sup>-8</sup>, 1x10<sup>-10</sup> M. Gli ovociti del gruppo di controllo sono stati coltivati in assenza di Nx. Dopo l'IVM, gli ovociti sono stati privati delle cellule 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 CO<sub>2</sub>, in un medium contenente MitoTracker Orange CMTM Ros (Molecular Probes, 280 nM) 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  $\mu\text{g/ml}$  di Hoechst 33258 in soluzione 3:1 (v:v) glicerolo/PBS. Lo stadio della cromatina nucleare degli ovociti è stato classificato come segue: vescicola germinale (GV), prometafase I (PI), metafase I (MI), metafase II (MII), cromatina degenerata o non identificabile (D/NI)<sup>13</sup>. 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. Patterns di distribuzione mitocondriale omogenea ed eterogenea sono stati considerati indicativi di immaturità e maturità citoplasmatica, rispettivamente come riportato in altre specie<sup>14</sup>. I dati sono stati analizzati con test Chi-quadro.

**RISULTATI** - I dati relativi allo stadio meiotico di ovociti di cagna recuperati da ovaie in diverse fasi del ciclo e coltivati in TCM 199 supplementato con differenti concentrazioni di Nx sono riportati in tabella 1. Le percentuali di maturazione nucleare, in assenza di Nx, sono risultate significativamente più elevate negli ovociti prelevati in fase follicolare rispetto a quelli recuperati in fase anestrata (P<0,05).

Tab. 1 - Effetti del naloxone sulla maturazione in vitro di ovociti di cagne in diverse fasi del ciclo

Stadio del ciclo estrale (N° di cagne)	Concentrazione del Naloxone (M)	N° di ovociti esaminati	Stadio della cromatina nucleare N° (%)					Totale (PI+MI+MII)	D/NI
			GV	PI	MI	MII			
Anestro (7)	Controllo	33	28 (85)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	<b>1 (3)<sup>a</sup></b>	4 (12)	
	1x 10 <sup>-6</sup>	40	15 (37,5)	5 (12,5)	2 (5)	5 (12,5)	<b>12 (30)<sup>b</sup></b>	13 (32,5)	
	1x 10 <sup>-8</sup>	34	18 (53)	4 (12)	3 (9)	2 (6)	<b>9 (26)<sup>b</sup></b>	7 (20)	
	1x 10 <sup>-10</sup>	33	19 (58)	4 (12)	3 (9)	1 (3)	<b>8 (24)</b>	6 (18)	
Fase follicolare (2)	Controllo	39	23 (59)	1 (3)	9 (23)	4 (10)	<b>14 (36)<sup>b</sup></b>	2 (5)	
	1x 10 <sup>-6</sup>	36	19 (53)	1 (3)	8 (22)	7 (19)	<b>16 (44)</b>	1 (3)	
	1x 10 <sup>-8</sup>	40	25 (62,5)	6 (15)	3 (7,5)	5 (12,5)	<b>14 (35)</b>	1 (2,5)	
	1x 10 <sup>-10</sup>	42	24 (57)	1 (2)	9 (21)	2 (5)	<b>12 (29)</b>	6 (14)	
Ovulazione (2)	Controllo	18	7 (39)	0 (0)	3 (17)	0 (0)	<b>3 (17)</b>	8 (44)	
	1x 10 <sup>-6</sup>	23	14 (61)	0 (0)	1 (4)	1 (4)	<b>2 (9)</b>	7 (31)	
	1x 10 <sup>-8</sup>	22	12 (55)	0 (0)	0 (0)	4 (18)	<b>4 (18)</b>	6 (27)	
	1x 10 <sup>-10</sup>	25	12 (48)	0 (0)	2 (8)	3 (12)	<b>5 (20)</b>	8 (32)	
Diestro iniziale (2)	Controllo	8	3 (37,5)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	<b>1 (12,5)</b>	4 (50)	
	1x 10 <sup>-6</sup>	5	2 (40)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>0 (0)</b>	3 (60)	
	1x 10 <sup>-8</sup>	11	5 (45)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	<b>0 (0)</b>	6 (54)	
	1x 10 <sup>-10</sup>	12	8 (67)	2 (17)	0 (0)	0 (0)	<b>2 (17)</b>	2 (16)	
Diestro avanzato (3)	Controllo	29	12 (41)	2 (7)	2 (7)	2 (7)	<b>6 (21)</b>	11 (38)	
	1x 10 <sup>-6</sup>	33	15 (44)	3 (9)	2 (6)	4 (12)	<b>9 (27)</b>	9 (27)	
	1x 10 <sup>-8</sup>	31	18 (58)	2 (6)	1 (3)	0 (0)	<b>3 (10)</b>	10 (32)	
	1x 10 <sup>-10</sup>	39	24 (62)	4 (10)	1 (3)	1 (3)	<b>6 (15)</b>	9 (23)	

GV, vescicola germinale; PI, prometafase I; MI, metafase I; MII, metafase II; D/NI, degenerato/ cromatina non identificabile. a≠b: p<0,05

La supplementazione con Nx alle concentrazioni di 1x10<sup>-6</sup> e 1x10<sup>-8</sup> M ha determinato un significativo incremento della ripresa meiotica negli ovociti rispetto al controllo nella

fase di anestro ( $P < 0,05$ ). A livello citoplasmatico, il trattamento con Nx non ha influenzato lo stadio maturativo. Tutti gli ovociti in MII, sia nei controlli che nei trattati, hanno presentato un pattern di distribuzione mitocondriale con granuli piccoli, indicativo di una condizione energetica non attiva.

**DISCUSSIONE** - In base ai nostri riscontri il grado di competenza meiotica dell'ovocita nella cagna risulta influenzato dallo stadio del ciclo estrale, come evidenziato dai migliori livelli di maturazione nucleare ottenuti negli ovociti prelevati in fase follicolare rispetto a quelli in fase anestratale. L'aggiunta nel terreno di maturazione di Nx ha dato, alle maggiori concentrazioni testate, un incremento significativo della ripresa meiotica negli ovociti prelevati nella fase di anestro, mentre non ha prodotto significative modificazioni negli altri stadi del ciclo. Considerando che in diverse specie di mammiferi gli EOP svolgono un'azione inibitoria dell'asse ipotalamo-ipofisi e un'attività modulatrice diretta a livello follicolare, è ipotizzabile che anche nella cagna rientrino tra i fattori di regolazione intraovarica dell'anestro. Uno studio precedente ha evidenziato che nella cavalla, specie ad attività riproduttiva stagionale, il MOR è espresso con maggiore intensità in ovociti prelevati in fase di anestro, a ulteriore conferma di un probabile ruolo degli EOP nella regolazione della competenza meiotica dell'ovocita<sup>8</sup>. Considerando che nella fase anestratale sono stati ottenuti significativi miglioramenti delle percentuali di MII dopo aggiunta di Nx e che questa è la fase in cui più frequentemente le cagne vengono sterilizzate, questi dati forniscono un ulteriore contributo al miglioramento delle tecnologie riproduttive nella specie canina nella quale sono descritte notevoli difficoltà per la standardizzazione delle metodologie della produzione in vitro di embrioni<sup>10</sup>.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Brooks, A.N., Lamming, G.E., Haynes, N.B. Endogenous opioid peptides and the control of gonadotrophin secretion. *Res Vet Sci.* 41(3), 285-99 (1986). 2. Whisnant, S.C., Havern, R.L., Goodman, R.L. Endogenous opioid suppression of luteinizing hormone pulse frequency and amplitude in the ewe: hypothalamic sites of action. *Neuroendocrinology* 54, 587-593 (1991). 3. Dell'Aquila, M.E. et al. Effects of beta-endorphin and Naloxone on in vitro maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 63, 210-22 (2002). 4. Kaminski, T., Siawrys, G., Bogacka, I., Okrasa, S., Przala, J. The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells. *Anim Reprod Sci.* 78, 71-84 (2003). 5. Kaminski, T., Siawrys, C., Bogacka, I., Okrasa, S., Przala, J. The influence of opioid peptides on steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Reprod Domest Anim.* 39, 25-32 (2004). 6. Piva, F. et al. Effects of steroids on the brain opioid system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 53, 343-8 (1995). 7. Dell'Aquila, M.E. et al. Immunofluorescence detection of the mu-opioid receptor in human oocytes. *Hum Reprod Suppl.* 18, 180 (2003). 8. Dell'Aquila, M.E. et al. Expression and localization of the mu-opioid receptor (MOR) in the equine cumulus-oocyte complex and its involvement in the seasonal regulation of oocyte meiotic competence. *Mol Reprod Dev.* (In stampa). 9. Pavone, L., Albrizio, M., Minoia, R. Expression and localization of mu-opioid receptor in canine oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 20, 172 (2008). 10. Luvoni, G.C., Chigioni, S. & Beccaglia, M. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. *Reprod Domest Anim.* 41, 286-90 (2006). 11. O, W.S., The effect of beta-endorphin on rat oocyte maturation in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 68, 181-5 (1990). 12. Otoi, T., Willingham, L., Shin, T., Kraemer, D.C., Westhusin, M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 124, 775-81 (2002). 13. Martins, L.R. Ponchirolli, C.B., Beier, S.L., Landim-Alvarenga, F.C., Lopes, M.D. Analysis of nuclear maturation in *in vitro* matured oocytes from estrous and anestrous bitches. *Anim. Reprod.* 3, 49-54 (2006). 14. Calarco, P.G. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Dev Genet.* 16, 36-43 (1995).

*Lavoro eseguito con finanziamenti dell'Università di Bari (Fondi di Ateneo 2006).*

## ACTIVITY OF NALOXONE ON IN VITRO MATURATION OF CANINE OOCYTES: ENHANCER EFFECT IN THE ANESTROUS PHASE

Iorga A.I., Valentini L., Ambruosi B., De Santis T., Caira M., Dell'Aquila M.E.,  
*Department of Animal Production, University of Bari, Italy. Corresponding author:*  
*e.dellaquila@veterinaria.uniba.it*

**Key words:** bitch, oocyte, in vitro maturation, mitochondria, naloxone.

**INTRODUCTION** - Supplementation of *in vitro* maturation (IVM) medium with opioid agents, whether agonists or antagonists, was shown to affect oocyte maturation in several species such as rat, bovine and equine. The pharmacological effects of these compounds are mediated by G protein-coupled receptors. The mu opioid receptor (MOR) is expressed in oocytes of bovine, humans, equine and canine and, in seasonal breeders, is expressed with higher intensity in anestrus specimens. This study reports the effects of supplementing IVM medium with naloxone (Nx), an opioid antagonist, on nuclear and cytoplasmic maturation rate of oocytes recovered from bitches in different phases of the estrous cycle. Cytoplasmic maturation was examined in terms of mitochondrial (mt) distribution.

**MATERIALS AND METHODS** - Cumulus-oocyte complexes were recovered from the ovaries of 16 bitches: 7 of them were in anestrus, 2 in the follicular phase, 2 in the ovulatory phase, 2 in the early luteal phase and 3 in the medium/late luteal phase. The IVM culture was performed as described by Otoi et al. (*Reproduction* 124, 775-81, 2002). Naloxone was used at concentrations of  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-8}$   $1 \times 10^{-10}$  M. Control oocytes were cultured in the absence of Nx. After IVM, nuclear maturation of oocytes was classified as (GV) germinal vesicle, (PI) prometaphase I, (MI) metaphase I, (MII) metaphase II and (D/NI) degenerated/non identifiable chromatin. The distribution of active mitochondria was revealed by using MitoTracker Orange CMTM Ros and confocal laser scanning microscopy. Heterogeneous mt distribution patterns were considered as indicative of cytoplasmic maturity as reported in other species.

**RESULTS AND DISCUSSION** - In control conditions, the maturation rate was significantly higher in oocytes recovered from bitches in the follicular phase (36%) compared with the anestrus phase (3%,  $P < 0,05$ ). In anestrus bitches, overall maturation rate of oocytes cultured in presence of  $1 \times 10^{-6}$  (30%) and  $1 \times 10^{-8}$  M (26%) Nx was significantly higher than that of the control group (3%;  $P < 0,05$ ). Treatment with Nx did not affect cytoplasmic maturation. All MII stage oocytes, control or Nx-treated, showed homogeneous small granular mt distribution pattern. We conclude that, in oocytes of anestrus bitches, the opioid antagonist Nx significantly improves the nuclear maturation rate. Further studies could be performed to elucidate the expression of opioid receptors, and the possible interactive effects of their antagonists on canine oocyte maturation.

## **IMPORTANZA DELLE AQUAPORINE NELL'EQUILIBRIO IDRICO DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DELLA CAGNA: BILANCIAMENTO DEI FLUIDI OVIDUTTALI E POSSIBILE RUOLO NEL MECCANISMO DI IMBIBIZIONE UTERINA**

**Aralla M., <sup>1</sup>Groppetti D., <sup>1</sup>Cremonesi F., Arrighi S.,** *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare; <sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Milano.*

**Parole chiave:** fluidi oviduttali, imbibizione idrica uterina, Aquaporine, cagna

**RIASSUNTO** - Il movimento di fluidi attraverso le membrane cellulari è rilevante in molti processi alla base della riproduzione. Il trasferimento passivo di acqua è facilitato dalla presenza di Aquaporine, proteine canale di membrana, la cui espressione negli organi riproduttori femminili muta con la fase funzionale. Lo studio immunostochimico di quattro diverse isoforme di AQP nella salpinge di cagna mira a dimostrare il loro coinvolgimento nelle funzioni secretorie e assorbenti atte a mantenere l'appropriato milieu oviduttale, fornendo l'ambiente migliore per la fecondazione e le prime fasi dello sviluppo embrionale. Anche la modulazione dell'imbibizione dei tessuti dell'utero correlata all'andamento degli ormoni steroidei e in rapporto al possibile processo di impianto embrionale, è rapportabile all'espressione di AQP nei diversi tessuti.

**INTRODUZIONE** - Lo studio della composizione, formazione e secrezione del fluido oviduttale è argomento di grande interesse e attualità per le indagini sulla fertilità in ambito ginecologico umano e veterinario. La struttura anatomica delle tube uterine dei mammiferi consente infatti l'espletamento di tre distinte funzioni: il trasporto dell'oocita, espulso dall'ovaio, accolto dall'infundibolo e da qui sospinto verso l'ampolla; il passaggio degli spermatozoi nell'ampolla, luogo dove avviene la fecondazione; ed infine il trasferimento dell'embrione precoce dall'istmo verso l'utero. Le differenti fasi del ciclo estrale influenzano la morfologia dei tessuti oviduttali in modo adeguato alla funzione richiesta. Allo stesso modo gli ormoni steroidei e le loro fluttuazioni incidono sulla quantità e qualità del fluido oviduttale. Il fluido prodotto e secreto dalle cellule epiteliali fornisce il medium adatto all'adempimento della fecondazione e al susseguirsi fisiologico delle prime fasi dello sviluppo embrionale. La secrezione del fluido aumenta da 2 fino a 10 volte durante la fase estrogenica rispetto a quella diestrane, gravidica o meno<sup>1,2</sup>. Anche a livello uterino, si assiste a profondi cambiamenti in risposta alla secrezione di ormoni steroidei ovarici che conducono, nelle diverse fasi del ciclo estrale, a iperemia, aumentata permeabilità capillare, edema stromale e modificazioni del volume di fluido luminale<sup>3</sup>. In parallelo, drastici cambiamenti si osservano anche a livello della cervice uterina, quali la riorganizzazione della trama collagene, l'aumento dell'imbibizione tessutale e modificazioni della composizione di glicosaminoglicani, che sarà massima durante la gestazione e consentirà la dilatazione della cervice al momento del parto<sup>4,5</sup>.

Nel bilanciamento dei fluidi giocano un ruolo fondamentale le Aquaporine (AQP), proteine canale di membrana deputate a facilitare il movimento passivo di acqua o di acqua e altri soluti (Aquagliceroporine). Come già dimostrato per altri organi e tessuti<sup>6</sup>, le AQP risultano implicate nel trasporto transmembrana di acqua anche negli organi riproduttori femminili modulando, nelle diverse fasi del ciclo estrale, le secrezioni tubariche ed i differenti gradi di imbibizione dell'utero e della cervice, in relazione all'andamento degli ormoni steroidei<sup>7</sup>. Questo lavoro si propone pertanto di dimostrare la presenza di differenti isoforme di Aquaporine (AQP1, AQP2, AQP5 e

AQP9) nei tessuti oviduttali ed uterini di cagna e di accertarne il coinvolgimento nel bilanciamento idrico volte al mantenimento di un appropriato milieu in questi organi.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto su salpingi e uteri ottenuti da 20 cagne di età compresa fra i 6 mesi ed i 5 anni, ovarioisterectomizzate con il consenso del proprietario. In parallelo, è stata monitorata la concentrazione ematica del progesterone (metodo ELFA) che, unitamente ad anamnesi, visita clinica, esame colpocitologico e valutazione macroscopica delle ovaie post-ovaristerectomia, ha consentito di definire l'esatta fase del ciclo estrale in cui i soggetti presi in esame si trovavano. Porzioni di tuba uterina, corno e cervice dell'utero sono state fissate in formalina al 10% per 48-72 ore, disidratate e incluse in paraffina. Una prima valutazione dei preparati istologici è stata resa possibile attraverso la colorazione Ematossilina-Eosina. Per le reazioni immunoistochimiche, sezioni seriate sono state raccolte su vetrini polilisinati, sparaffinate e reidratate. Le metodiche adottate sono di comune impiego presso il laboratorio di Anatomia del VSA, ma l'utilizzo di ciascun anticorpo ha richiesto una precisa messa a punto per la scelta dell'opportuna procedura e diluizione ottimale. Le caratteristiche degli antisieri utilizzati e delle metodiche di rivelazione applicate ad ognuno di essi sono le seguenti:

Anticorpo	Casa produttrice e Numero di catalogo	Diluizione	Metodo di rivelazione
Rabbit Anti-rat Aquaporin 1 (AQP1)	Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX; Cat#AQP11-A	1:100	Streptavidin-Biotin Complex /HRP
Rabbit anti-rat Aquaporin 2 (AQP2)	Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX; Cat#AQP21-A	1:100	Streptavidin-Biotin Complex /HRP
Rabbit Anti-rat Aquaporin 5 (AQP5)	Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX; Cat#AQP51-A	1:30	Envision System Labelled polymer-HRP Dakocytomation
Rabbit Anti-rat Aquaporin 9 (AQP9)	Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX; Cat#AQP91-A	1:100	Streptavidin-Biotin Complex /HRP

I siti di immunoreazione sono stati visualizzati tramite 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloridrato (DAB). Le sezioni, contrastate con Emallume di Mayer, sono state osservate mediante fotomicroscopio Olympus BX51 collegato ad una fotocamera digitale e dotato del software per l'analisi dell'immagine "DP-Soft" (Olympus, Italia).

**RISULTATI** - Lo studio immunoistochimico condotto su salpingi ottenute da cagne e gatte ovariettomizzate in differenti fasi del ciclo estrale ha portato a verificare la presenza di AQP1, AQP5 e AQP9 ma non di AQP2 nei tessuti oviduttali. I pattern con cui si è evidenziata l'immunoreattività sono risultati peraltro specifici per ogni isoforma testata; in particolare, in accordo con quanto già dimostrato da studi precedenti condotti su femmine di ratto<sup>8,9</sup>, AQP5 e AQP9 sono presenti nell'epitelio oviduttale, mentre AQP1 nei vasi venosi e arteriosi e nella muscolatura miosalpingea.

Anche nell'utero le differenti isoforme sono localizzate con pattern diversi. AQP1 è presente nei vasi sanguigni e nelle cellule muscolari del miometrio in ogni fase del ciclo estrale. L'espressione delle altre aquaporine testate risente invece dei diversi livelli ormonali ematici: AQP2 è presente negli epitelii endometriali e nel miometrio durante l'estro. AQP5 è stata dimostrata solo in diestro, localizzata nella membrana apicale delle cellule epiteliali endometriali.

**DISCUSSIONE** - I dati forniti dalla letteratura circa la presenza di *aquaporin water channels* nell'apparato riproduttore di alcuni mammiferi, quali il topo, il ratto e la donna, ed il loro ruolo nelle dinamiche riproduttive hanno offerto l'occasione per iniziare un'indagine sulla salpinge e sull'utero della cagna, e forniscono anche qualche chiave interpretativa per i nostri risultati. Le diverse aquaporine indagate sono risultate presenti anche nella cagna, espresse con pattern specifici, in qualche caso strettamente dipendenti dal profilo ormonale del momento riproduttivo. I risultati ottenuti sono apparsi meno specifici per AQP1, presente nella parete dei vasi sanguigni, nella muscolatura circolare e longitudinale degli organi esaminati e nell'epitelio ghiandolare uterino indipendentemente dalla fase del ciclo estrale, più direttamente rapportabili alla situazione ormonale per le altre AQP testate.

La differente imbibizione idrica del tessuto muscolare della miosalpinge potrebbe essere importante nella regolazione del trasporto dell'ocita, alterando il diametro luminale, ed indurre altresì un rigonfiamento della parete, utile al meccanismo di "tube locking"<sup>8</sup>. Nell'utero, d'altra parte, si può supporre che AQP1, presente a livello di muscolatura miometriale e di vasi sanguigni, possa favorire il movimento di fluidi dal miometrio allo stroma endometriale in presenza di elevate concentrazioni di progesterone contribuendo al cosiddetto "edema stromale"<sup>10</sup>. La presenza di AQP1 a livello epiteliale nell'endosalpinge può essere correlata alla produzione del fluido oviduttale, che costituisce il medium fisiologico per la fecondazione e il primo sviluppo dell'embrione<sup>9</sup>. La presenza di AQP1 negli epitelii endometriali in relazione a concentrazioni elevate di progesterone ematico potrebbe invece correlarsi al processo di riassorbimento di fluidi dal lume associato alla ricettività uterina per l'impianto embrionale, in virtù dei gradienti osmotici presenti a livello di "barriera" epiteliale. Appare quindi evidente come ci possa essere una collaborazione funzionale di isoforme diverse di AQP1 nel bilanciamento idrico a livello tubarico e uterino, in relazione ai processi fisiologici correlati alla fecondazione, al trasporto dell'embrione e successivamente all'impianto della blastocisti nella parete uterina.

Dati preliminari ottenuti su sezioni di ovaio e di utero gravido indicano un possibile intervento nella maturazione dell'ocita ed una localizzazione selettiva delle diverse AQP1 negli invogli fetali.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Hunter, R.H.F. The Fallopian tubes. Their role in Fertility and Infertility. *Berlin: Springer-Verlag*, 30-48 (1988). 2. Leese, H.J., Tay, J.I., Reischl, J. & Downing, S.J. Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction* 121, 339-346 (2001). 3. Huang, H.F. et al. Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum Reprod Update* 12, 785-795 (2006). 4. Leppert, P.C. Anatomy and Physiology of cervical ripening. *Clin Obstet Gynecol.* 38, 267-279 (1995). 5. Anderson, J., Brown, N., Mahendroo, M.S. & Reese, J. Utilisation of different aquaporin water channels in the mouse cervix during pregnancy and parturition and in models of preterm and delayed cervical ripening. *Endocrinology* 147, 130-140 (2006). 6. Agre, P. et al. Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol.* 542, 3-16 (2002). 7. Arrighi, S., Aralla, M., Bosi, G., Groppetti, D. & Cremonesi, F. Presence of aquaporins in the bitch uterus: is there a potential role in uterine water movements during different phases of estrous cycle? *Reprod Domestic Anim.* 42, 127 (2007). 8. Gannon, B.J., Warnes, G.M., Carati, C.J. & Verco, C.J. Aquaporin-1 expression in visceral smooth muscle cells of female rat reproductive tract. *J Smooth Muscle Res.* 36, 155-167 (2000). 9. Branes, M.C., Morales, B., Rios, M. & Villalon, M.J. Regulation of the immunoeexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288, C1048-1057 (2005). 10. Richard, C., Gao, J., Brown, N. & Reese, J. Aquaporin water channel genes are differentially expressed and regulated by ovarian steroids during the periimplantation period in the mouse. *Endocrinology* 144, 1533-1541 (2003).

*Lavoro eseguito con finanziamenti dell'Università di Milano (FIRST 2007).*

## IMPORTANCE OF AQUAPORINS IN THE WATER HANDLING OF THE BITCH REPRODUCTIVE APPARATUS: OVIDUCTAL FLUID BALANCE AND POTENTIAL ROLES IN UTERINE IMBIBITION MECHANISMS

Aralla M., <sup>1</sup>Groppetti D., <sup>1</sup>Cremonesi F., Arrighi S., *Department of Veterinary Sciences and Technologies for Food Safety, Via Trentacoste 2;* <sup>1</sup>*Department of Clinical Sciences, Via Celoria 10, University of Milan, Italy.*  
Corresponding author: *silvana.arrighi@unimi.it*

**Key words:** oviductal fluid balance, uterine imbibition, Aquaporins, bitch.

The movement of fluids across cell membranes is a relevant process in every reproductive event. The passive transfer of water finds a straightforward route thanks to small membrane proteins called Aquaporins<sup>1</sup>, whose expression in the female reproductive organs is reported to change according to oestrous phases<sup>2,3</sup>.

An immunohistochemical study of four different isoforms of AQPs in the bitch oviduct was undertaken, aimed at demonstrating the involvement of AQP molecules in the manifold secretory and absorptive functions which are the basis for maintaining a correct oviductal environment. This constitutes the best place for fertilization and early stages of embryo development to take place. Uterine samples were also investigated, as the modulation of tissue imbibition taking place at this level under the influence of ovarian steroids aimed at embryo implantation, is probably related to AQP expression at different uterine layers. Antisera against rat AQP1, AQP2, AQP5 and AQP9 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX) were tested by the routine immunohistochemical techniques on formalin-fixed, paraffin-embedded samples of oviduct and uterine tissues, obtained through ovario-hysterectomy performed on 20 bitches. Serum progesterone levels were monitored as well. Immunohistochemical studies showed distinct expression patterns for AQP1, AQP2, AQP5 and AQP9 in the bitch oviduct and uterus, some of them being evidently related to progesteronemia. In particular, AQP5 and AQP9 were present in the tubal epithelium, whereas AQP1 were shown in the blood vessels and smooth muscle cells. In the uterine layers, too, the different AQP isoforms were localized with different patterns. AQP1 was present in the blood vessels and myometrium in every oestrous phase. The expression pattern of the other AQP isoforms was influenced by hormonal blood levels: AQP2 was seen in the endometrial epithelia and in the myometrium during estrus. AQP5 was demonstrated in diestrus only, localized at the apical membrane of the endometrial epithelial cells. Our results confirm the presence of AQPs in the oviduct and uterus, this being the first report in the bitch. A collaboration of different AQP isoforms in the water balance of the uterine tissues is presumed, to create the physiological conditions of a nearly iso-osmolar gradient in the perimplantation period and to promote blastocyst formation. Studies are also in progress in the pregnant bitch uterus and foetal membranes, and preliminary results indicate that the AQP protein family also plays a role in amniotic fluid exchanges.

**REFERENCES** - 1. Agre, P. et al. Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol.* 542, 3-16 (2002). 2. Huang, H.F. et al. Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum Reprod Update* 12, 785-795 (2006). 3. Branes, M.C., Morales, B., Rios, M. & Villalon, M.J. Regulation of the immunoexpression of aquaporin 9 by ovarian hormones in the rat oviductal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288, C1048-C1057 (2005).

*Grants from University of Milan, Italy (FIRST 2007).*

## VALUTAZIONI FUNZIONALI DELL'EPIDIDIMO DI GATTO CORRELATE ALL'ESPRESSIONE DELLE AQUAPORINE E DI SITI LECTINO-LEGANTI

Ventriglia G., <sup>1</sup>Aralla M., Desantis S., <sup>1</sup>Arrighi S., *Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Università degli Studi di Bari; <sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la sicurezza Alimentare, Laboratorio di Anatomia, Università degli Studi di Milano.*

**Parole chiave:** epididimo, gatto, assorbimento, secrezione, istochimica

**RIASSUNTO** - Il lavoro descrive l'espressione e la localizzazione di aquaporine e di glicoproteine nell'epididimo di gatto. La presenza delle aquaporine AQP2 e AQP9 e di glicani N-linked sulla superficie adluminale delle cellule principali potrebbe essere correlata con il movimento di fluidi e ioni attraverso la membrana come anche con eventi di endocitosi. AQP1, assente nell'epitelio di rivestimento di tutti i tratti dell'epididimo, è però presente negli endoteli vascolari, indicando un possibile coinvolgimento nel riassorbimento di acqua a livello dell'interstizio epididimale. La differente distribuzione dei glicani O-linked, tipici glicani di secrezione, nei diversi tratti dell'epididimo e negli spermatozoi presenti nel lume indicherebbe la produzione e secrezione di glicoproteine regione-specifiche implicate nella maturazione e/o conservazione degli spermatozoi.

**INTRODUZIONE** - Precedenti studi ultrastrutturali effettuati sull'epitelio di rivestimento dell'epididimo di gatto hanno evidenziato la presenza nelle cellule principali di strutture correlate all'attività di riassorbimento e di secrezione, sebbene mancano i classici granuli di secreto<sup>1</sup>. Fra le sostanze secrete da parte dell'epitelio epididimale un ruolo importante spetta alle glicoproteine che una volta rilasciate nel lume modificano la composizione del glicocalice degli spermatozoi, intervenendo nella loro maturazione, capacitazione e nella reazione acrosomiale<sup>2</sup>. La composizione del fluido epididimale muta fortemente lungo l'epididimo anche grazie a processi di riassorbimento. La letteratura recente attribuisce un ruolo cruciale nel bilanciamento dei fluidi ad una famiglia di proteine di membrana, le aquaporine (AQPs)<sup>3,6</sup>, canali selettivi per l'acqua o per l'acqua e altri soluti (aquagliceroporine) che, se presenti, rendono le membrane biologiche da 10 a 100 volte più permeabili all'acqua<sup>7</sup>. Ricerche eseguite con diversi approcci metodologici, pur avendo aggiunto informazioni riguardo a modulazioni prossimo-distali del dotto dell'epididimo, non hanno fornito dati esaustivi sulla correlazione fra morfologia e funzioni. In questo studio abbiamo, pertanto, indagato l'espressione e la localizzazione di quattro isoforme di aquaporine e delle glicoproteine nell'epididimo di gatto, utilizzando, rispettivamente, metodiche immunoistochimiche e glicostochimiche.

**MATERIALI E METODI** - Da epididimi di gatti puberi di diverse età, ottenuti al momento della castrazione presso la Clinica Ostetrica dell'Università di Bari, sono stati prelevati frammenti di testa, corpo e coda. I campioni sono stati fissati in formalina neutra, disidratati e inclusi in paraffina. Sezioni seriate sono state utilizzate per: 1) la dimostrazione immunoistochimica delle aquaporine AQP1, AQP2, AQP5 e dell'aquagliceroporina AQP9 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX), utilizzando il metodo di rivelazione Streptavidin-Biotin Complex /HRP (Dakocytomation) secondo il protocollo in uso nei nostri laboratori<sup>8</sup>; 2) l'analisi dei glicoconjugati mediante l'uso di 12 lectine (Tabella 1) in combinazione con digestione in sialidasi (Tipo V ottenuta dal *Clostridium perfringens*).



**RISULTATI** - Le quattro isoforme di AQP testate hanno reagito diversamente nelle varie regioni dell'epididimo. L'AQP1, notevolmente espressa nelle cellule non ciliate dei condottini efferenti della stessa specie<sup>10</sup>, ha mostrato una reattività elettiva nei vasi sanguigni dell'intero dotto dell'epididimo. La immunoreattività per AQP2 è risultata molto intensa sulla superficie adluminale delle cellule principali nella coda e di rare cellule, probabili cellule apicali, nel corpo dell'epididimo. L'aquagliceroporina AQP9 è apparsa localizzata nella regione apicale delle cellule principali dell'intero epididimo, manifestando maggiore presenza nella regione della coda dove sono state localizzate vescicole sferiche AQP9-immunoreattive nel citoplasma sopranucleare ed apicale. AQP5 non è stata localizzata in alcuna regione del dotto.

I risultati dell'istochimica delle lectine e le singole specificità carboidratiche sono illustrati nella Tabella 1. Le *cellule principali* dell'epididimo hanno mostrato intense e diversificate reattività per le lectine usate. Le stereociglia hanno evidenziato reattività per SNA, SBA, HPA e Con A lungo tutto il dotto ed una maggiore intensità di colorazione nella regione caudale con MAL II, KOH-s-PNA, KOH-sialidasi-DBA, PNA, RCA<sub>120</sub>, e WGA. La regione apicale con SBA e con SNA rispettivamente in tutto il dotto e nella coda dell'epididimo. La regione golgiana ha reagito con UEA I lungo l'intero dotto e con MAL II, s-PNA, DBA, RCA<sub>120</sub>, HPA e WGA nella testa e nel corpo dell'organo. Probabili *cellule apicali* hanno reagito con KOH-sialidasi-PNA e GSA I-B<sub>4</sub> solo nella coda dell'epididimo. Le *cellule basali* non hanno mostrato affinità per alcuna delle lectine utilizzate in nessuna delle regioni epididimarie. Gli spermatozoi hanno evidenziato incremento di siti di legame per MAL II, PNA, KOH-sialidasi-PNA, KOH-sialidasi-DBA, RCA<sub>120</sub>, HPA, SBA e WGA procedendo dalla testa verso la coda dell'epididimo e nessuna modificazione dell'intensità di colorazione con SNA e Con A è stata osservata lungo il dotto.

Tab. 1 - Lectine utilizzate, specificità carboidratica, e reattività lectinica dell'epitelio di rivestimento dell'epididimo di gatto e degli spermatozoi luminali

Lectina	Residuo carboidratico riconosciuto	Epitelio epididimario	Spermatozoi
MAL II	Neu5acα2,3Galβ,1,4GlcNac	+Sc*/G <sup>t,cr</sup>	+*
SNA	Neu5Acα2,6Gal/GalNac	+Sc/+a <sup>cd</sup>	+
PNA	Terminal Galβ1,3GalNac	+Sc*	+*
KOH-s-PNA	Neu5AcGalβ1,3GalNac	+Sc*/CA <sup>cd</sup> /G <sup>t,cr</sup>	+*
DBA	Terminal FP>GalNacα1,3GalNac	-/G <sup>t,cr</sup>	-
KOH-s-DBA	Neu5AcFP	+Sc*	+*
RCA <sub>120</sub>	Terminal Galβ1,4GlcNac	+Sc*/G <sup>t,cr</sup>	+*
SBA	Terminal α/βGalNac	+Sc/a	+*
HPA	Terminal αGalNac	+Sc/G <sup>t,cr</sup>	+*
Con A	Terminal and internal αMan>aGlc	+Sc*	+
WGA	Terminal and internal βGlcNac>NeuNac	+Sc*/G <sup>t,cr</sup>	+*
GSA-I B <sub>4</sub>	Terminal αGal	+CA <sup>cd</sup>	-
GSA-II	Terminal D-GlcNac	-	-
UEA I	Terminal αL-Fuc	+G	-

a, regione apicale; cd, reattività nella coda dell'epididimo; cr, reattività nella regione del corpo; CA, cellule apicali; G, regione golgiana; s, sialidasi; Sc, stereociglia; t, reattività nella testa dell'epididimo; \* maggiore intensità di colorazione nella coda dell'epididimo; -, assenza di reattività; +, presenza di reattività.

**DISCUSSIONE** - Le aquaporine testate indicano il proseguimento delle funzioni di assorbimento di fluidi, iniziate massicciamente nei condottini efferenti<sup>1</sup>, a livello epididimale con modalità diverse a causa del coinvolgimento di differenti canali per l'acqua. Nell'epididimo, infatti, l'acqua potrebbe essere assunta dal lume grazie alla presenza di AQP2 e AQP9, diversamente localizzate sulla superficie apicale delle

cellule principali, e venire quindi rimossa dallo spazio intertubulare grazie all'intervento dell'AQP1 presente a livello dei vasi sanguigni di tutti i tratti. Tale rimozione di acqua dal lume del dotto determinerebbe la concentrazione dello sperma coadiuvandone la maturazione, e, nella regione della coda, favorirebbe la secrezione di immobilina, proteina secreta dalle cellule principali per immobilizzare gli spermatozoi stoccati in questa regione<sup>11</sup>. Questi risultati potrebbero essere correlabili con la presenza di abbondanti caveole e vescicole endocitotiche adluminali, possibili veicoli per le sostanze assorbite, osservate nelle cellule principali in precedenti studi ultrastrutturali<sup>1</sup>. La presenza di fossette e vescicole rivestite, e quindi di processi di endocitosi, potrebbe spiegare anche la reattività da parte delle lectine Con A e WGA a livello della superficie luminale del dotto. Queste lectine, specifiche rispettivamente per glicani aventi residui terminali o interni di  $\alpha$ Man e  $\beta$ GlcNAc, marcano tipiche glicoproteine non secretorie caratterizzate da oligosaccaridi del tipo N-linked. Glicani N-linked si ritiene che siano coinvolti nel movimento di fluidi e ioni attraverso la membrana plasmatica in diversi organi<sup>12</sup>. La presenza di AQP2 nel versante adluminale di sporadiche cellule cilindriche rimanda alla morfologia delle cellule apicali, già descritte nell'epididimo di gatto. Probabili cellule apicali sono state marcate nella regione caudale dell'epididimo con KOH-sialidasi-PNA e GSA I-B<sub>4</sub>, evidenziando residui terminali di acido sialico-Gal $\beta$ 1,3GalNAc e  $\alpha$ Gal. In altri mammiferi le cellule apicali hanno mostrato affinità lectinica specie-specifica. La funzione delle cellule apicali non è molto chiara. Secondo alcuni autori sarebbero deputate a precisi scambi ionici con il contenuto luminale<sup>13</sup>, con un coinvolgimento nella acidificazione del microambiente luminale e nell'assorbimento di parte del fluido testicolare, piuttosto che nella secrezione di glicoproteine<sup>2</sup>.

Il diverso assetto carboidratico osservato nei diversi tratti dell'epididimo a carico sia dell'epitelio di rivestimento che degli spermatozoi potrebbe essere correlato soprattutto alla produzione di glicoproteine regione-specifiche implicate nella maturazione e/o conservazione degli spermatozoi, come è stato ampiamente dimostrato in altri mammiferi<sup>2</sup>.

Conoscenze ulteriori sulla morfofisiologia dell'epididimo di gatto potrebbero condurre al miglioramento dei protocolli di conservazione dello sperma, a progressi nella messa a punto di efficaci metodi contraccettivi, nonché a possibili ricadute applicative riguardo alla possibilità di riproduzione assistita nei felini a rischio di estinzione.

BIBLIOGRAFIA - 1. Arrighi, S., Romanello, M.G. & Domeneghini C. Ultrastructural study on the epithelium lining ductus epididymis in adult cats (*Felis catus*). *Arch.Biol.* 97, 7-24 (1986). 2. Calvo, A. et al. Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *J Reprod Fertil* 120, 325-335 (2000). 3. Da Silva et al. Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis. *Biol Reprod* 74, 427-438 (2006). 4. Huang, H.F. et al. Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum Reprod Update.* 12, 785-795 (2006). 5. Domeniconi, R.F. et al. Aquaporin 9 (AQP9) localization in the adult dog testis excurrent ducts by immunohistochemistry. *Anat Rec.* 290, 1519-1525 (2007). 6. Domeniconi, R.F. et al. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. *Cell Tissue Res.* (2008, Epub ahead of print). 7. Agre, P. et al. Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol.* 542, 3-16 (2002). 8. Arrighi, S., Bosi, G., Cremonesi, F. & Domeneghini, C. Immunohistochemical study of the pre- and postnatal innervation of the dog lower urinary tract: morphological aspects at the basis of the consolidation of micturition reflex. *Vet Res Commun.* 32, 291-304 (2008). 9. Desantis, S. et al. Histochemical analysis of glycoconjugates in the domestic cat testis. *Histol Histopathol.* 21, 11-12 (2006). 10. Arrighi, S. et al. Absorptive activities in the efferent ducts of adult cat studied by aquaporin immunohistochemistry and lectin histochemistry. *16th Int Cong Anim Reprod* (2008). 11. Axner, E. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology* 66, 14-24 (2006). 12. Spicer, S.S. & Schulte, B.A. Diversity of glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *J Histochem Cytochem.* 40, 1-38 (1992) 13. Brown, D. & Montesano, R. Membrane specialization in the rat epididymis. I. Rod-shaped intramembrane particles in the apical (mitochondria-rich) cell. *J Cell Sci.* 45, 187-198 (1980).

Lavoro eseguito con finanziamenti delle università di Bari e di Milano (FIRST 2007).

## FUNCTIONAL EVALUATIONS OF THE CAT EPIDYDIMIS RELATED TO THE EXPRESSION OF AQUAPORINS AND LECTIN-BINDING SITES

Ventriglia G., <sup>1</sup>Aralla M., Desantis S., <sup>1</sup>Arrighi S., *Department of Animal Health and Well-being, University of Bari; <sup>1</sup>Department of Veterinary Sciences and Technologies for Food Safety, University of Milan, Italy.*  
Corresponding author: s.desantis@veterinaria.uniba.it

**Key words:** epididymis, cat, absorption, secretion, histochemistry

Previous ultrastructural studies of the epithelium lining the cat epididymal duct indicated that principal cells could be involved in fluid absorption as well as glycoprotein secretion<sup>1</sup>. It is known that modifications of the surface glycoproteins occur during the maturation, capacitation and acrosome reactions of spermatozoa, these glycoconjugates most probably being of epithelial origin by a secretory process into the lumen<sup>2</sup>.

Therefore, the purpose of the present work was to study the possible absorptive and secretory events taking place in the cat epididymis by 1) the immunohistochemical localization of four different isoforms of Aquaporins (AQP1, 2, 5 and 9), integral membrane water channels that facilitate rapid passive movement of water, and 2) the carbohydrate expression and localization in the epithelial lining, by means of lectin histochemistry, utilizing a panel of 12 lectins in association with sialidase treatment, as previously published<sup>3</sup>. The study was carried out on fragments of adult cat epididymides obtained through orchietomy, fixed in neutral formalin and paraffin-embedded.

AQP1-immunoreactivity, strongly evidenced at the apical surface of the ductuli efferentes in non-ciliated cells, was present in the blood vessels all along the epididymis but not in the lining epithelium. Otherwise, AQP2 was well localized at the adluminal surface of principal cells in the cauda epididymidis and AQP9 shows immunoreactivity at the apical region of the principal cells throughout the duct. AQP5-immunoreactivity was undetectable. Lectin histochemistry revealed the following binding sites. In principal cells: 1) stereocilia showed greater reactivity with MAL II, PNA, s-PNA, s-DBA, RCA<sub>120</sub>, WGA in the cauda and no change in the staining intensity with SNA, HPA, SBA, Con A along the ductus; 2) the apical zone reacted with SBA in the whole ductus and with SNA in the cauda; 3) the Golgi zone bound UEA I along the ductus, whereas MAL II, DBA, RCA<sub>120</sub>, HPA, and WGA were bound in the caput and corpus regions. Probable apical cells reacted with s-PNA and GSA I-B<sub>4</sub> in the cauda epididymis. Spermatozoa displayed a staining increase with MAL II, PNA, s-PNA, s-DBA, RCA<sub>120</sub>, HPA, SBA, WGA moving to cauda epididymis but no change with SNA and Con A. The regional differences in the lectin-binding pattern of the epithelium and spermatozoa of cat epididymis could be related to the production of region-specific glycoproteins implicated in the maturation and/or storage of spermatozoa.

Our data provide evidence for a possible pathway in the bulk reabsorption of water throughout the cat epididymis. The abundant expression of AQP2 and AQP9 water channels represents an important pathway for transmembrane water and solute movement. Region-specific glycoproteins have also been evidenced, probably implicated in the maturation and/or storage of spermatozoa.

**REFERENCES** - 1. Arrighi, S., Romanello, M.G. & Domeneghini, C. Ultrastructural study on the epithelium lining ductus epididymis in adult cats (*Felis catus*). *Arch.biol.* 97, 7 (1986). 2. Calvo, A. et al. Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis. *J Reprod Fertil.* 120, 325 (2000). 3. Desantis, S. et al. Histochemical analysis of glycoconjugates in the domestic cat testis. *Histol Histopathol.* 21, 11-12 (2006).

*Grants from University of Bari and Milan (FIRST 2007), Italy.*

## IMMUNOLOCALIZZAZIONE DELLA LEPTINA (OB) E DEL RECETTORE (OB-R) NELL'OVAIO E NEGLI OVOCITI PRE E POST MATURAZIONE IN VITRO NELLA CAVALLA: EFFETTO DELLA PREPUBERTÀ E DELLA RAZZA

Lange Consiglio A., <sup>1</sup>Arrighi S., <sup>1</sup>Bosi G.P., <sup>1</sup>Aralla M., Cremonesi F., *Unità di Riproduzione, Ospedale Grandi Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria Università degli Studi di Milano, Via dell'Università, 6, 26900 Lodi; <sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Laboratorio di Anatomia, Università degli Studi di Milano, Via Trentacoste, 2, 20134 Milano.*

**Parole chiave:** oociti compatti equini, leptina, recettore, immunoistochimica

**RIASSUNTO** - È ampiamente riconosciuta l'esistenza di un legame tra quantità/distribuzione di tessuto adiposo ed efficienza riproduttiva, ed è stato recentemente ipotizzato che la leptina possa mediare direttamente tale interazione. Poiché nell'equino questa relazione è poco compresa, abbiamo valutato l'immunolocalizzazione della leptina e del suo recettore nell'ovaio di puledre, di cavalle da carne e di cavalle trottatrici e nei rispettivi ovociti con cumulo compatto, pre e post maturazione. Le diverse immunoreattività, così come i diversi tassi di maturazione degli ovociti (maggiori nelle cavalle da carne e minori nelle trottatrici e nelle puledre), potrebbero essere correlati alla massa adiposa, all'intensità di esercizio fisico ed allo stadio riproduttivo dell'animale anche se i meccanismi fisiologici implicati sono ancora scarsamente conosciuti.

**INTRODUZIONE** - La leptina, prodotto del gene *ob*, è un piccolo peptide sintetizzato prevalentemente dagli adipociti, che svolge un ruolo regolatore sul ritmo fame – sazietà, modulando, in funzione dello stato nutrizionale, l'assunzione di cibo e la spesa energetica. È ampiamente riconosciuta l'esistenza di un legame tra livelli ematici di leptina, quantità/distribuzione di tessuto adiposo e sistema riproduttivo: infatti, la leptina potrebbe rappresentare un segnale periferico in grado di notificare l'adeguato stato nutrizionale ai fini dell'inizio della fase puberale o della gravidanza ed è ipotizzabile, quindi, che un'inadeguata alimentazione possa portare ad un ritardo nell'inizio della pubertà<sup>1,2,3</sup>. La relazione tra nutrizione ed efficienza riproduttiva è stata ampiamente studiata nell'uomo e nel topo ma è poco compresa nell'equino e, nonostante molti lavori evidenzino la correlazione tra la concentrazione ematica della leptina e la condizione corporea (body condition score, BCS), sono poche le informazioni relative sia alla relazione tra nutrizione ed efficienza riproduttiva nella cavalla<sup>4,5,6</sup> sia alla presenza della leptina (Ob) e del suo recettore (Ob-R) nell'ovaio e nell'ovocita equino. Dai pochi dati in letteratura emerge che nella cavalla la concentrazione della leptina riflette significativamente il contenuto di grasso corporeo. Inoltre, tutte le femmine con basso BCS hanno bassi livelli di leptina ematica, bassa concentrazione di progesterone, mancano di significativa attività follicolare e sono anovulatorie per 6-7 mesi nell'arco di un anno solare, al contrario, la maggioranza di femmine con alto BCS hanno alti livelli di leptina ematica, rimangono in attività riproduttiva durante l'inverno e quelle con brevi periodi di anovulazione conservano una significativa attività follicolare sulle ovaie<sup>7</sup>. Questi dati non presentano correlazione con l'età degli animali testati<sup>8</sup>.

La concentrazione ematica della leptina è modulata, però, oltre che dall'assunzione del cibo anche dal dispendio energetico: nella specie umana la leptina circolante decresce in risposta alla durata ed all'intensità dell'esercizio fisico e questa riduzione potrebbe essere dovuta ad un'alterazione nell'equilibrio tra assunzione e dispendio di energia<sup>9</sup>.

Alla luce di questi dati, scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'immunolocalizzazione della leptina e dei suoi recettori nell'ovaio e negli ovociti con cumulo compatto, pre e post maturazione in vitro e, al fine di individuare possibili relazioni tra stadio riproduttivo, massa adiposa ed intensità di esercizio fisico, sono stati studiati gli organi di puledre, cavalle da carne caratterizzate da una notevole massa adiposa e cavalle trottatrici provenienti da attività agonistica.

**MATERIALI E METODI** - Per questo studio sono state recuperate 222 ovaie da cavalle da carne, 14 ovaie da cavalle trottatrici e 34 ovaie da puledre con anamnesi riproduttiva sconosciuta sottoposte a macellazione. Opportune porzioni di alcune ovaie sono state fissate in formalina al 10% per 24 ore, disidratate e incluse in paraffina. Sezioni seriate, deparaffinate e reidratate, sono state sottoposte a reazioni immunoistochimiche per la rilevazione della leptina (Ob) e del recettore (Ob-R), utilizzando anticorpi primari di coniglio anti-Ob e anti-Ob-R (1:50 e 1:30, Santa Cruz Biotechnology). Il sistema di rivelazione utilizzato è Envision System Labelled polymer-HRP (Dakocytomation). I siti di immunoreazione sono stati visualizzati tramite 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloridrato (DAB). Le sezioni, contrastate con Emallume di Mayer, sono state osservate mediante fotomicroscopio Olympus BX51 collegato ad una fotocamera digitale e dotato del software per l'analisi dell'immagine "DP-Soft" (Olympus Italia).

Gli ovociti con cumulo compatto recuperati mediante scraping dalle rimanenti ovaie, sono stati analizzati in parte immediatamente dopo la raccolta ed in parte dopo maturazione in vitro. Al termine delle due condizioni sperimentali gli oociti sono stati privati del cumulo ooforo e suddivisi casualmente in due gruppi per la rilevazione immunocitochimica della leptina (Ob) e del recettore (Ob-R) grazie agli stessi anticorpi primari anti-Ob e anti-Ob-R (1:100) utilizzando un anticorpo secondario di capra anti-coniglio coniugato con FITC (fluoresceina isotiocianato) (1:100). Contemporaneamente, gli ovociti sono stati sottoposti alla valutazione della configurazione nucleare con ioduro di propidio (10 µg/ml). Gli oociti sono stati esaminati usando un microscopio confocale a scansione laser (Olympus Fluoview FV300) con una combinazione di filtri d'eccitazione ed emissione a 488/650 nm.

I controlli eseguiti con 1) omissione del siero primario, 2) incubazione con anticorpo primario previo adsorbimento con il relativo antigene sono risultati negativi.

**RISULTATI** - Sia la leptina (Ob) sia il suo recettore (Ob-R) sono stati rilevati negli ovociti immaturi di tutti i tipi di animali analizzati e sono apparsi uniformemente distribuiti attraverso l'ooplasma: l'intensità di reazione è però risultata più bassa negli ovociti di puledre e negli ovociti delle cavalle trottatrici rispetto agli ovociti delle cavalle da carne. Dopo IVM le cavalle da carne hanno espresso una più alta proporzione di ovociti che hanno raggiunto lo stadio di metafase II rispetto agli ovociti delle cavalle trottatrici e delle puledre ( $35,23 \pm 0,006\%$ ,  $19,63 \pm 0,028\%$  e  $15,00 \pm 0,06\%$  rispettivamente;  $p < 0,05$ ). Negli ovociti maturi, Ob ed Ob-R erano localizzati alla regione corticale e concentrati ad un polo della cellula. Questa distribuzione all'interno dell'ovocita è stata indipendente dai gruppi di animali, ma con intensità più bassa negli ovociti di puledra e di trottatrice. L'immunoistochimica ha rivelato la presenza di Ob nel lume dei vasi sanguigni contenuti nelle sezioni di ovaio e nelle cellule del corpo luteo, con reattività granulare diffusa nel citoplasma, indipendentemente dalla razza e dall'età. Nei rarissimi follicoli primari, presenti a gruppetti di 2-3 a livello di fossetta di ovulazione, nessun oocita è risultato immunopositivo, nè per Ob nè per Ob-R. e non è mai stato possibile osservare oociti in follicoli di stadi successivi. Ob-R non è mai stato rilevato in nessun campione.

**DISCUSSIONE** - I risultati di questo studio supportano l'ipotesi che nella cavalla la leptina ed il suo recettore sono differenzialmente localizzati nell'ovocita appena raccolto e dopo IVM mostrando diversa intensità immunoreattiva in relazione al tipo di razza ed allo stadio riproduttivo. Ob è localizzata anche nel citoplasma e distribuita in maniera uniforme negli ovociti immaturi di tutti i tipi di animali analizzati e ciò potrebbe in parte essere spiegato dal probabile uptake di leptina dalle cellule del cumulo<sup>10</sup> mentre il recettore (Ob-R) citoplasmatico potrebbe semplicemente rappresentare il recettore neo-sintetizzato, anche se non si può escludere un'internalizzazione del recettore stesso. Negli ovociti maturi di tutti i tipi di animali studiati il recettore presente nella regione corticale rappresenterebbe la maggior frazione dell' Ob-R totale e potrebbe raffigurare la forma matura del recettore in grado di legare la maggior parte di leptina che è, difatti, anch'essa distribuita perifericamente. Le diverse intensità di immunoreazione, così come i diversi tassi di maturazione degli ovociti, potrebbero essere correlati alla massa adiposa, all'intensità di esercizio fisico ed allo stadio riproduttivo dell'animale anche se i meccanismi fisiologici implicati sono ancora scarsamente conosciuti.

Relativamente ai risultati immunoistochimici, i soli ovociti rilevati nelle sezioni istologiche erano accolti nei follicoli primari mentre in quelli di dimensioni maggiori l'ovocita non è mai rimasto compreso nella sezione istologica. Gli ovociti dei follicoli primari sono risultati negativi sia ad Ob sia ad Ob-R a differenza degli ovociti analizzati dopo scraping. È probabile che questi ultimi provengano da follicoli ad uno stadio maturativo più avanzato e che la rilevazione di Ob ed Ob-R siano dipendenti dallo stadio di sviluppo follicolare e dalla maturazione dell'ovocita. La leptina è stata osservata con alta intensità nel corpo luteo e nel lume dei vasi sanguigni dell'ovaio, suggerendo un possibile coinvolgimento di questa molecola nella maturazione dell'ovocita, nell'angiogenesi, nella rottura del follicolo e conseguente formazione del corpo luteo<sup>10</sup>.

Infine, la distribuzione polarizzata della leptina negli ovociti maturi può indurre ad ipotizzare che la leptina sia coinvolta nella determinazione del polo animale dell'ovocita determinando l'allocazione della massa cellulare interna e del trofoblasto nell'embrione.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Mounzih, K., Lu R.H. & Chehab, F.F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1381, 1190–1193 (1997). 2. Tataranni, P.A. et al. Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 21(9), 818-821 (1997). 3. Chehab, F.F., Lim, M.E. & Lu, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet.* 12, 318–320 (1996). 4. Henneke, D.R., Potter, G.D & Kreider, J.L. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology* 21, 897–909 (1984). 5. Henneke, D.R., Potter, G.D., Krieger, J.L. & Yeates, B.F. Relationship between body condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet. J.* 15, 371–372 (1983). 6. Hines, K.K., Hodge, S.L., Kreider, J.L., Potter, G.D. & Harms P.G. Relationship between body condition and levels of serum luteinizing hormone in postpartum mares. *Theriogenology* 28, 815–825 (1987). 7. Buff, P.R., et al. Leptin in horses: tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *J. Anim. Sci.* 80, 2942–2948 (2002). 8. Gentry, L.R. et al. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *J. Anim. Sci.* 80, 2695–2703 (2002). 9. Hulver, M., & Houmard, J.A. Plasma leptin and exercise: recent findings. *Sports Med.* 33, 437–482 (2003). 10. Craig, J, Zhu, H., Dyce, P.W., Petrik, J. & Li, J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 145, 5355-5363.

*Lavoro eseguito con finanziamenti dell'Università di Milano*

## IMMUNOLocalIZATION OF LEPTIN (OB) AND LEPTIN RECEPTOR (OB-R) IN THE OVARY AND IN PRE- AND POST- IN VITRO-MATURED HORSE OOCYTES: PREPUBERTY AND BREED EFFECT

Lange Consiglio A., <sup>1</sup>Arrighi S., <sup>1</sup>Bosi G.P., <sup>1</sup>Aralla M., Cremonesi F., *Reproduction Unit, Large Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, 6 Via dell'Università 1, 26900 Lodi, Italy;* <sup>1</sup>Department of Veterinary Sciences and Technologies for Food Safety, Laboratory of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Via Trentacoste 1, 20134 Milan, Italy. Corresponding author: fausto.cremonesi@unimi.it

**Key words:** horse compact oocytes, leptin, leptin receptor, immunohistochemistry

Leptin, the hormone product of *ob* gene expression, is an important endocrine indicator of adipose mass and nutritional status, as well as an important regulator of various aspects of feed intake, growth, metabolism and reproduction. The amount of leptin in the blood is proportional to body energy stores and/or body mass, so inadequate nutrition might impair reproductive function leading, for example, to the delayed onset of puberty. Indeed, the onset of puberty in humans and animals is associated with an increase in fat and consequent increase in circulating leptin, suggesting that leptin may be required for normal growth and development of reproductive organs. A similar relationship between nutrition and reproductive efficiency is not understood in the mare where, besides many reports quantifying the correlation of circulating leptin concentration with body condition scores<sup>1,2</sup>, there is little information on the presence of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in the ovary or in the oocyte. Taking this into account, we carried out a study to investigate the immunolocalization of Ob and Ob-R in ovaries and compact cumulus oocytes recovered from fillies and from mares of light or heavy body weight breeds after slaughtering. Both Ob and Ob-R, detected in immature oocytes of all kinds of animals analyzed, were uniformly distributed throughout the ooplasm, but the intensity of reaction was lower in the oocytes of both lightweight mares and fillies, compared to the oocytes of heavyweight mares. After IVM, heavy breed mares had a higher proportion of oocytes that reached metaphase II than light mares and fillies (35.23±0.006%, 19.63±0.028% and 15.00±0.06 respectively; P<0.05). In matured oocytes both Ob and Ob-R were localized to the oocyte cortex and concentrated at one pole of the oocyte. This distribution within the oocytes was independent from animal group and once again with weaker immunopositivities in light mares and in fillies. Moreover, we localised the presence of Ob in blood vessels within the ovary as well as within the corpora lutea in all groups of animals analyzed. The results of the present study support the hypothesis that leptin is differently localized in the horse during oocyte IVM, showing different immunoreaction intensity related either to the horse breed or to the reproductive pubertal development. The presence of leptin in the ovary could suggest a possible involvement in oocyte maturation, angiogenesis, follicle rupture or subsequent corpus luteum formation<sup>3</sup>. Moreover, leptin may be involved in the determination of the animal pole of the oocyte and in the establishment of the inner cell mass and trophoblast in the embryo.

**References - 1.** Buff, P.R., et al. Leptin in horses: tissue localization and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *J. Anim. Sci.* 80, 2942–2948 (2002). **2.** Gentry, L.R. et al. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *J. Anim. Sci.* 80, 2695–2703 (2002). **3.** Craig, J, Zhu, H., Dyce, P.W., Petrik, J. & Li, J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 145,(11), 5355–5363 (2004).

## **EFFETTO DELLA FITOEMAGGLUTININA SULLO SVILUPPO EMBRIONALE IN VITRO DI OOCITI DI OVINI PREPUBERI**

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

**Parole chiave:** agnella, produzione di embrioni in vitro, fitoematoagglutinina.

**RIASSUNTO** - L'obiettivo del lavoro è stato quello di verificare l'effetto della fitoemagglutinina sulla produzione di embrioni in vitro da oociti di agnella di 30-40 giorni di età. Dopo maturazione e fertilizzazione in vitro gli embrioni sono stati coltivati per 8 gg fino allo stadio di blastocisti. Il terreno colturale è stato addizionato con fitoematoagglutinina (PHA, 15ug/ml) per tempi differenti: A) dal 1° all'8° giorno di IVC; B) dal 4° all'8° giorno di IVC; C) dal 4° al 5° giorno di IVC; D) controllo: assenza di PHA nel terreno colturale. L'incubazione degli embrioni del gruppo A e B con la PHA non ha determinato un significativo incremento delle percentuali di blastocisti, mentre il trattamento con PHA tra il 4-5 giorno di sviluppo embrionale ha incrementato significativamente ( $P < 0,05$ ) le percentuali di sviluppo a blastocisti e il loro numero cellulare rispetto al gruppo controllo.

**INTRODUZIONE** - Le strategie per il rapido miglioramento genetico delle specie di maggior interesse zootecnico suggeriscono l'impiego di animali prepuberi come fonte di oociti da destinare a programmi di produzione in vitro di embrioni, al fine di ridurre gli intervalli generazionali e di accelerare i test di progenie.

Tuttavia, numerose ricerche hanno evidenziato che l'oocita proveniente da soggetti prepuberi, mostra una ridotta potenzialità di sviluppo embrionale e, dopo embryo transfer, una minore sopravvivenza rispetto a quanto osservato per gli embrioni sviluppati da oociti di soggetti adulti<sup>1,2,3</sup>. Tale limitazione è relazionabile a differenze strutturali e funzionali dell'oocita degli animali prepuberi<sup>4,5</sup> rispetto a quello di animali adulti.

Il miglioramento dei sistemi di coltura in vitro potrebbe permettere di aumentare l'efficienza della produzione embrionale in vitro degli oociti di animali prepuberi. Recenti esperienze hanno evidenziato come la fitoemagglutinina (N-acetylgalactosamine/galactose sugar specific/lectin; PHA), una lectina isolata dal *Phaseolus vulgaris*<sup>6</sup> con elevate proprietà mitogena e agglutinante, esercita un'influenza positiva sulla coltura degli embrioni suini in vitro, incrementando sia le percentuali di sviluppo a blastocisti che la loro qualità<sup>7,8</sup>. Tale sostanza è largamente impiegata nei protocolli di trasferimento nucleare per aumentare l'agglutinazione e la fusione cellulare incrementando lo sviluppo allo stadio di blastocisti degli embrioni ricostruiti<sup>9</sup>.

Lo scopo della presente sperimentazione è quello di verificare l'effetto della fitoemagglutinina sullo sviluppo embrionale in vitro dopo maturazione e fertilizzazione in vitro di oociti di ovini prepuberi.

**MATERIALI E METODI** - IVM/IVF/IVC - Oociti prelevati da agnelle di 30-40 gg di età e 6-12 kg di peso corporeo regolarmente macellate sono stati maturati in vitro in TCM 199 + 10% di FCS + LH/FSH (0.1 UI/ml), cisteamina (100µM) a 38,5° C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore. Per la fertilizzazione in vitro (IVF) 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 incubato alla concentrazione di 10<sup>6</sup> spz/ml con gli oociti maturati in vitro per 16-20 ore.



Si è proceduto, quindi, alla coltura degli zigoti in SOF + 0,4% BSA + aa essenziali e non essenziali per 8 giorni.

#### Trattamento con PHA

Gruppi di embrioni sono stati coltivati in terreno addizionato con fitoemagglutinina (PHA, 15 ug/ml) per tempi differenti:

A) dal 1° all'8° giorno di IVC

B) dal 4° all'8° giorno di IVC

C) dal 4° al 5° giorno di IVC

D) controllo: assenza di PHA nel terreno colturale.

Al termine della coltura in vitro è stato valutato lo sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti e il numero cellulare delle blastocisti mediante fissazione e colorazione con glicerolo e Hoechst 33342 e osservazione in fluorescenza.

**RISULTATI** - Come si evince dai dati riportati nella Tab. 2 l'incubazione degli embrioni con la PHA durante tutto il periodo di coltura in vitro (A-1°-8° g, 37,8% ) o tra il 4°-8° g (B, 39,5%) non ha determinato un significativo incremento dello sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti rispetto al gruppo controllo (C, 40,2%). Tuttavia, in entrambi i gruppi trattati con la PHA è stata osservata una minore espansione della cavità blastocelica dopo 8 giorni di IVC rispetto agli embrioni non trattati. Dopo conta nucleare il numero cellulare delle blastocisti dei gruppi A (83,1±5,5) e B (85,5±9,9) è risultato sovrapponibile al gruppo controllo (86,0±6,4) anche se è stato riscontrato un aumento della picnosi nucleare nelle blastocisti del gruppo A. Il trattamento con PHA tra il 4°-5° giorno di sviluppo embrionale ha invece permesso di incrementare significativamente le percentuali di blastocisti rispetto al controllo (52,4% vs 40,2%, P<0,05). Anche il numero di cellule delle blastocisti è risultato superiore negli embrioni trattati rispetto al numero di quelli coltivati in assenza di PHA (107,9±7,3 vs 86,0±6,4, P<0,05).

Tab. 1 - Effetto della PHA sulle capacità di sviluppo embrionale di oociti di agnella fertilizzati in vitro (a vs b P<0,05, Chi square test; A vs B, P<0,05, Anova, Media±ES).

Trattamento PHA	n° oociti	n° divisi (%)	n° blastocisti (%)	n° nuclei/blastocisti
1-8 g	180	143 (79,4%)	54 (37,8%) <sup>a</sup>	83,1 ± 5,5 <sup>A</sup>
4-8 g	195	152 (77,9%)	60 (39,5%) <sup>a</sup>	85,5 ± 9,9 <sup>A</sup>
4-5 g	210	168 (80%)	88 (52,4%) <sup>b</sup>	107,9 ± 7,3 <sup>B</sup>
Controllo	199	159 (79,9%)	64 (40,2%) <sup>a</sup>	86,0 ± 6,4 <sup>A</sup>

**DISCUSSIONE** - I risultati del presente lavoro dimostrano che l'aggiunta della fitoemagglutinina nel terreno di coltura permette di migliorare l'efficienza nella produzione in vitro di embrioni da oociti di agnelle prepuberi incrementando le percentuali di sviluppo a blastocisti e il loro numero di cellule. Dall'analisi comparativa dei differenti tempi d'incubazione degli embrioni con la PHA emerge come tale effetto viene esplicito nel sistema di incubazione tra il 4° e 5° giorno di sviluppo embrionale mentre periodi di incubazione più lunghi non hanno determinato alcuna modificazione

dello sviluppo embrionale rispetto al sistema controllo. Studi di altri Autori hanno in precedenza dimostrato l'influenza positiva della PHA sia a livello quantitativo che qualitativo sulla produzione in vitro di embrioni suini evidenziando una diminuzione dell'indice apoptotico associata ad un aumento dell'espressione di importanti geni implicati nella sopravvivenza embrionale<sup>7,8</sup>. Tali esperienze, tuttavia, riferiscono protocolli che prevedono l'aggiunta della fitoematoagglutinina durante tutto il periodo di coltura embrionale alle medesime concentrazioni utilizzate nella nostra sperimentazione. Nel bovino, invece, l'impiego della PHA durante la coltura embrionale non sembra influenzare lo sviluppo a blastocisti<sup>10</sup>. I meccanismi molecolari mediante i quali la PHA agisce sullo sviluppo e qualità degli embrioni non sono conosciuti. L'aumento del numero cellulare delle blastocisti è probabilmente relazionabile all'attività mitogenica di tale sostanza come dimostrato nelle cellule intestinali epiteliali<sup>11</sup> e nelle cellule del sangue<sup>12</sup>. Inoltre possiamo ipotizzare che l'esposizione alla PHA tra il 4° e 5° giorno di sviluppo embrionale potrebbe aver favorito il processo di compattazione della morula e di transizione allo stadio di blastocisti. Sono attualmente in corso ulteriori studi mirati alla comprensione dei meccanismi di azione della PHA e delle concentrazioni e tempi di esposizione ottimali per lo sviluppo embrionale di oociti di soggetti prepuberi.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Ledda, S., Bogliolo, L., Leoni, G., Naitana, S. Follicular size affects the meiotic competence of in vitro matured prepuberal and adult oocyte sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 1-6 (1999). 2. Ledda, S., Bogliolo, L., Leoni, G., Naitana, S. Production and lambing rate of blastocysts derived from in vitro matured oocytes after gonadotrophin treatment of prepuberal ewes. *J. Anim. Sci.* 77, 2234-2239 (1999). 3. Leoni, G., Succu, S., Berlinguer, F., Rosati, I., Bebbere, D., Bogliolo, L., Ledda, S., Naitana, S. Delay on the in vitro kinetic development of prepuberal ovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 92, 373-383 (2006). 4. Ptak, G., Loi, L., Dattena, M., Tischner, M., Cappai, P. Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepuberal oocytes. *Biol. Reprod.* 61, 1568-1574 (2001). 5. Leoni, G.G., Bebbere, D., Succu, S., Berlinguer, F., Mossa, F., Galioto, M., Bogliolo, L., Ledda, S., Naitana, S. Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 74(2), 249-57 (2007 Feb). 6. Bourne, Y., Bolgiano, B., Liao, D.I., Strecker, G., Cantau, P., Herzberg, O. et al. Crosslinking of mammalian lecithin (galectin-1) by complex biantennary saccharides. *Nat. Struct. Biol.* 1, 863-70 (1994). 7. Gupta, M.K., Uhm, S.J., Han, D.W., and Lee, H.L. Embryos quality and production efficiency of porcine parthenotes is improved by phytohemagglutinin. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 435-444 (2007). 8. Gupta, M.K., Uhm, S.J., Han, D.W., and Lee, H.L. Differential but beneficial effect of phytoemagglutinin on efficiency of in vitro porcine embryos production by somatic cell nuclear transfer or in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1557-1567 (2007). 9. Du, F., Shen, P.C., Lee, S.N., Yang, X. The cell agglutination agent, phytohemagglutinin-L, improves the efficiency of somatic nuclear transfer cloning in cattle (*Bos Taurus*). *Theriogenology*. 65, 642-657 (2006). 10. Wang, S., Panter, K.E., Evans, R.C., Bunch, T.D. The effects of pokeweed mitogen (PWM) and phytoemagglutinin (PHA) on bovine oocyte maturation and embryos development in vitro. *Anim. Repr. Sc.* 67, 215-220 (2001). 11. Pusztai, A., Ewen, S.W., Grant, G., Peumans, W.J., Van Damme, E.J., Rubio, L., Bardocz, S. Relationship between survival and binding of plant lecithins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion*. 46, 308-316 (1990) 12. Banks, K.L., McGuire, T.C., Davis, W.C. Regulation by antibody of lecithin-induced lymphocytes proliferation: Antibody inhibition of mitogenesis and release of lecithin from cell surface. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1784-1789 (1979).

## THE EFFECT OF PHYTOEMAGGLUTININ ON IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENT OF OVINE PREPUBERTAL OOCYTES

Bogliolo L., Fois S., Ariu F., Rosati I., Zedda M.T., Pau S., Ledda S., *Department of Pathology and Veterinary Clinic, Institute of Obstetrics, University of Sassari, Italy.*  
Corresponding author: [luiss@uniss.it](mailto:luiss@uniss.it)

**Key words:** lamb, in vitro embryo production, phytohemagglutinin.

**Introduction** - *In vitro* embryo production from oocytes of prepubertal animals is still suboptimal due to poor blastocyst yield and quality resulting in low embryo survival to term after transfer<sup>1</sup>. This limitation could be attributable to structural and functional abnormalities of prepubertal oocytes compared to adult ones. Improvements in culture systems could enhance the efficiency of *in vitro* embryo production from prepubertal oocytes. Phytohemagglutinin (PHA), a sugar-specific lectin with a wide variety of biological activities, including agglutination and mitogenesis, increases the percentage of blastocyst development and their quality in porcine embryos<sup>2,3</sup>. PHA improves the efficiency of somatic nuclear transfer in cattle with no detrimental effect on embryo survival<sup>4</sup>. The objective of this study was to investigate the influence of PHA on the *in vitro* embryo development of prepubertal ovine oocytes after *in vitro* maturation and fertilization.

**Materials and Methods** - Oocytes recovered from prepubertal ovine ovaries (30-40 days old) were *in vitro* matured and fertilized with frozen-thawed ram semen. Presumptive zygotes were, thereafter, cultured in SOF + essential and non-essential amino acids + 0.4% BSA for 8 days. PHA (15µg/ml) was added to the culture system at different interval times: A) from 1<sup>st</sup> to 8<sup>th</sup> day of IVC; B) from 4<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> day of IVC; C) from 4<sup>th</sup> to 5<sup>th</sup> day of IVC ; D) IVC without PHA (control). At the end of culture, development up to blastocyst stage was recorded and the number of nuclei was evaluated by Hoechst 33342 staining.

**Results** - Supplementation of PHA did not significantly improve the percentage of blastocyst rate in systems A (37.8%) and B (39.5%) compared to control (40.2%). Moreover, blastocysts from groups A and B showed a reduced expansion of blastocoel cavity. Treatment with PHA from 4<sup>th</sup> to 5<sup>th</sup> day of culture (C) significantly ( $P<0.05$ ), increased embryo development to blastocyst stage (52.4% vs 40.2%) and total nuclei number ( $107.9\pm 7.3$  vs  $86.0\pm 6.4$ ) compared to the control group

**Conclusions** - Our studies suggest that PHA improves the blastocyst yield and quality when added from 4<sup>th</sup> to 5<sup>th</sup> day of embryo development. Previous study reported the beneficial effect of PHA on efficiency of *in vitro* porcine embryo production<sup>2,3</sup>. Molecular mechanisms by which PHA affect embryo development are not clear at present. Higher blastocyst cell numbers could be ascribed to the mitogenic activity of PHA. Moreover, we hypothesize that PHA could positively affect morula compaction and transition to blastocyst stage.

**References** - 1. Ledda, S., Bogliolo, L., Leoni, G, Naitana, S. Production and lambing rate of blastocysts derived from in vitro matured oocytes after gonadotrophin treatment of prepubertal ewes. *J. Anim. Sci.* 77, 2234-2239 (1999). 2. Gupta, M.K., Uhm., S.J., Han, D.W., and Lee, H.L. Embryos quality and production efficiency of porcine parthenotes is improved by phytohemagglutinin. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 435-444 (2007). 3. Gupta, M.K., Uhm., S.J., Han, D.W., Lee, H.L. Differential but beneficial effect of phytohemagglutinin on efficiency of in vitro porcine embryo production by somatic cell nuclear transfer or in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1557-1567 (2007). 4. Du, F., Shen, P.C., Lee, S.N., Yang, X. The cell agglutination agent, phytohemagglutinin-L, improves the efficiency of somatic nuclear transfer cloning in cattle (*Bos Taurus*). *Theriogenology.* 65, 642-657 (2006).

## VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ NEONATALE CANINA MEDIANTE IMPIEGO DI APGAR SCORE IN ASSOCIAZIONE A CARDIOTOCOMETRIA E MISURAZIONE DEL LATTATO FETALE

**Groppetti D., Pecile A., <sup>1</sup>Copley K., Cremonesi F.,** *DSCV, Sezione di Clinica Ostetrica e Ginecologica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano; <sup>1</sup>Veterinary Perinatal Specialties Inc. 9111 W. 38th Ave Wheat Ridge, Colorado 80033*

**Parole chiave:** Apgar, tocometria, lattato fetale, cane

**RIASSUNTO** - La valutazione della vitalità alla nascita ed il riconoscimento precoce dei segni di stress fetale potrebbero contribuire a ridurre l'elevata mortalità neonatale nella specie canina. L'identificazione dell'acidosi fetale tramite dosaggio del lattato ombelicale, la classificazione con metodo Apgar delle categorie a rischio ed il monitoraggio dell'attività uterina durante il travaglio costituiscono un sistema d'avanguardia nella gestione del paziente neonato canino.

**INTRODUZIONE** - Nella specie canina la mortalità neonatale è piuttosto elevata, con un'incidenza del 17-30% nelle prime settimane di vita<sup>1</sup>. I primi minuti di vita del neonato rappresentano la fase più critica. Nel paziente umano ed equino la valutazione della condizione del feto alla nascita si basa sul metodo di punteggio Apgar e sull'analisi dell'equilibrio acido-base. La concentrazione di lattato ematico costituisce, infatti, un indice di stress fetale ed un valido fattore prognostico sulla sopravvivenza<sup>2</sup>. L'acidosi metabolica che si sviluppa durante il parto è dovuta principalmente all'iperlattermia, indotta dall'ipoperfusione dei tessuti periferici. Quest'ultima può essere provocata dall'aumento dell'attività uterina nella prima e seconda fase del travaglio<sup>3</sup>. In questo studio sono stati analizzati alcuni parametri neonatali (Apgar score, lattato fetale, temperatura e peso) alla nascita e nelle fasi di travaglio (contrazioni uterine, intervallo di espulsione dei cuccioli, presentazione) in relazione alla vitalità dei cuccioli, a scopo predittivo della loro sopravvivenza nelle prime ore di vita.

**MATERIALI E METODI** - L'analisi è stata condotta su 9 cagne, di razza diversa ed età compresa tra 3 e 6 anni, che hanno partorito naturalmente (n°=6) oppure con cesareo programmato (n°=3). Cinque cagne erano nullipare e quattro pluripare. La fase terminale di gravidanza fino al momento del parto, è stata monitorata con rilevamento cardiocografico per l'esame delle contrazioni uterine e della frequenza cardiaca fetale, con sistema Whelpwise®. Al momento della nascita è stato prelevato dalla vena ombelicale, secondo la metodica descritta da Huch<sup>4</sup>, un campione di 25 µl di sangue per la misurazione del lattato fetale. Entro 10 minuti dalla nascita i cuccioli sono stati inoltre sottoposti a valutazione con metodo Apgar, rilevamento della temperatura rettale e del peso. I parametri considerati dagli Autori per la valutazione Apgar, adattati alla specie canina su modello umano ed equino, sono riportati in Tabella 1. Le 7 misurazioni comportano ciascuna un punteggio da 0 a 2, per un range totale compreso tra 0 e 14. Valori da 0 a 4 sono stati considerati indicativi di grave disvitalità, da 5 a 9 di ipovitalità e da 10 a 14 di normale vitalità fetale.

Nel campione in esame sono state analizzate le correlazioni tra presentazione fetale, intervallo di tempo di espulsione tra un cucciolo e l'altro e rispetto all'inizio del travaglio, peso e temperatura alla nascita, frequenza ed intensità delle contrazioni uterine, Apgar score e livelli di lattato ematico fetale.

**RISULTATI** - In totale sono nati 57 cuccioli, 28 maschi e 29 femmine, con una media di  $6,3 \pm 3$  nati per parto. Quarantatre cuccioli sono nati con parto naturale e di questi solo 3 hanno richiesto assistenza ostetrica. I restanti 14 sono nati con cesareo programmato. La presentazione cefalica è stata osservata nel 70,8% dei casi.

Tab. 1 - Parametri e punteggio adottati nella specie canina per la valutazione Apgar

Parametri	Punteggio 0	Punteggio 1	Punteggio 2
Colore mucose	Cianotico, pallido	Rosa chiaro	Rosa intenso
Frequenza cardiaca	< 120 bpm	120-180 bpm	> 180 bpm
Frequenza respiratoria	< 15 atti/min	15-30 atti/min	> 30 atti/min
Reattività	Nessuna risposta	Flebile reazione	Reazione attiva
Movimento	Assente	Ipomotilità	Movimenti attivi
Suzione	Assente	Debole	Energica
Vocalizzazione	Assente	Lieve	Vivace

Si è registrata una natimortalità pari al 1,7% (1/57). Due cuccioli sono stati soppressi poco dopo la nascita per gravi malformazioni. La mortalità neonatale dei restanti animali, a 24 e 48 ore di vita, era nulla ma risultava pari a 10,5% (6/57) se considerata a 7 giorni dalla nascita. La valutazione con metodo Apgar è stata eseguita su un totale di 48 cuccioli, 13 nati con parto cesareo e 35 partoriti naturalmente. Il 46,2% dei cani nati con cesareo mostrava un Apgar score compreso tra 0 e 4, rispetto al 14,3% dei soggetti partoriti naturalmente.

La misurazione del lattato ombelicale è stato effettuata su 38 cuccioli, 11 nati con cesareo e 27 con parto naturale. I valori di lattato fetale registrati erano compresi tra 1,7 e 19,6 mmoli/L. Il 54,3% dei soggetti con Apgar score 10-14 presentava una concentrazione ematica di lattato inferiore a 8 mmoli/L. Il 90% dei cuccioli nati con parto cesareo mostrava un valore di lattato inferiore a 4 mmoli/L. La temperatura rettale alla nascita era superiore a 32°C nell'84,4% dei cuccioli, e non mostrava relazione con i livelli di lattato fetale né con il punteggio Apgar. Il 90% dei neonati con Apgar score 10-14 è stato partorito entro 2 ore dal cucciolo precedente. Per intervalli di tempo di espulsione inferiori a 30 minuti i livelli di lattato fetale erano prevalentemente (8/10) minori di 8 mmoli/L. Il peso alla nascita variava, in relazione alla razza, da 221 a 557 grammi. Il peso alla nascita non mostrava correlazione con il punteggio Apgar, mentre nei cuccioli che presentavano un peso superiore a quello medio della stessa nidiata, i valori di lattato erano minori di 8 mmoli/L. La presentazione podalica era sempre associata ad Apgar 10-14, quella cefalica nel 78,6% dei casi. Non si sono osservate variazioni significative nella distribuzione dei livelli di lattato fetale rispetto alla presentazione alla nascita. I cuccioli in cui si è resa necessaria assistenza al parto con estrazione manuale (3/57) presentavano livelli di lattato ematico superiore a 6,8 mmoli/L ed Apgar 10-14. L'espulsione di quattro cuccioli è stata preceduta da iniezione di ossitocina (1 UI sc o im). In questi animali la concentrazione di lattato era superiore a 6,8 mmoli/L e l'Apgar superiore a 6.

Il monitoraggio della contrattilità uterina è stato associato alla misurazione del lattato e dell'Apgar score in 15 cuccioli, 2 nati da uno dei 3 parti cesarei e 13 nati con parto naturale. Nella fase di travaglio attivo una frequenza inferiore o uguale a 2 contrazioni uterine ogni 20 minuti è stata indicativa di inerzia uterina, che ha reso necessario il ricorso a terapia farmacologica (ossitocina 1 UI sc o im) per il parto di 3 cuccioli. I livelli di lattato erano pari a 8,3 mmoli/L, 11,1 mmoli/L e 6,8 mmoli/L ed il rispettivo Apgar score era di 11, 6, 10. Nell'unica cagna, operata di cesareo, in cui è stato possibile associare la tonometria, l'Apgar score e il dosaggio di lattato, le contrazioni uterine prima dell'intervento erano molto deboli e si presentavano con una frequenza di 4 ogni 30 minuti. I relativi 2 cuccioli, monitorati con dosaggio di lattato e Apgar score, presentavano concentrazioni inferiori a 3 mmoli/L e punteggio minore di 3.

**DISCUSSIONE** - La mortalità neonatale registrata nel nostro campione è risultata inferiore (10,5%) a quella riportata in letteratura (17-30%), ma giustificata dal periodo di osservazione limitato a 7 giorni. Dei 6 cuccioli deceduti nella prima settimana di vita, 4 erano nati con parto cesareo e mostravano un Apgar score inferiore a 3. In accordo con quanto riscontrato in neonatologia umana<sup>2,5</sup>, i livelli di lattato nei cuccioli partoriti naturalmente erano minori di quelli in cui era stata necessaria assistenza ostetrica, e maggiori rispetto ai cuccioli nati con cesareo programmato. In caso di parto cesareo l'Apgar score risultava tendenzialmente più basso. Si sottolinea l'aumento delle concentrazioni di lattato fetale riscontrato nei cuccioli nati dopo trattamento con ossitocina e dovuto al suo effetto ischemico sui vasi placentari.

Le cucciolate numerose presentano un maggiore rischio di sviluppare inerzia uterina a causa dell'eccessiva distensione della parete dell'utero che previene le contrazioni<sup>1</sup>; questo aspetto è stato riscontrato anche nel nostro campione in rapporto a livelli elevati di lattato fetale.

Concentrazioni di lattato fetale inferiori a 4 mmoli/L ed un punteggio Apgar superiore a 10, associati ad intervalli di espulsione dei cuccioli inferiori a 30 minuti e contrazioni uterine intense e con una frequenza di 5 ogni trenta minuti, sembrano rappresentare fattori prognostici positivi nel neonato canino. In conclusione, i dati raccolti anche se in via preliminare e da confermare con una casistica più ampia, appaiono interessanti per la valutazione delle condizioni metaboliche del neonato nella specie canina in funzione delle caratteristiche dello svolgimento del parto.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Indrebo, A., Trangerud, C. & Moe, L. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49, (suppl I):S2 (2007). 2. Armstrong, L., Stenson, B. J. Use of umbilical cord blood gas analysis in the assessment of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92,430-434 (2007). 3. Bakker, P. C. A. M. et al. Elevated uterine activity increases the risk of fetal acidosis at birth. *Am J Obstet Gynecol* 193,313.e1-313.e6 (2007). 4. Huch, A., Huch, R. & Rooth, G. Guidelines for blood sampling and measurement of pH and blood gas values in obstetrics. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 18, 54(3), 165-75 (1994). 5. Borruto, F. et al. Screening of foetal distress by assessment of umbilical cord lactate. *Clin Exp Obst & Gyn* XXXIII,4, 219-222 (2006).

## EVALUATION OF NEWBORN VITALITY IN THE DOG BY MEANS OF APGAR SCORE, UTERINE TOCOMETRY AND FETAL LACTATE LEVELS

**Groppetti D., Pecile A., <sup>1</sup>Copley K., Cremonesi F.,** *DSCV, Sezione di Clinica Ostetrica e Ginecologica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano; <sup>1</sup>Veterinary Perinatal Specialties Inc. 9111 W. 38th Ave Wheat Ridge, Colorado 80033. Corresponding author: debora.groppetti@unimi.it*

**Key words:** Apgar, tocometry, fetal lactate, bitch

The rate of stillbirth and neonatal mortality is known to be relatively high in dogs, around 17-30% within the first weeks of life<sup>1</sup>. In human and foal, the newborn's condition at delivery is evaluated by the Apgar score method and umbilical cord blood gas analysis, that provide important information on the past, present and future state of the neonate<sup>2</sup>. Actually, the lactate level is an indicator of fetal distress and a valid predictor of neonatal survival<sup>2</sup>. Fetal acidosis at birth is mainly due to hyperlactaemia that may be associated with increased uterine activity during the first and second stages of labor<sup>3</sup>. The aim of the present study was to evaluate the relationship between Apgar score, umbilical cord blood lactate at birth and uterine contractions during labor, in view of predicting puppies vitality. We considered natural parturition versus programmed caesarean section, the influence of oxytocin, fetal presentation, temperature and weight at delivery.

The Apgar score, adapted to canine patterns, was determined by evaluating the newborn puppy on seven simple criteria (mucosal colour, heart and respiratory rate, reflex irritability, movement, suckling and cry) on a scale from zero to two and summing up the values thus obtained. The resulting Apgar score ranges from 0 to 14. The test was done within 10 minutes of birth. Scores below 4 were regarded as critically low, 5 to 9 as fairly low, and over 10 normal.

The blood sample from umbilical cord for lactate measurement was collected directly at delivery as described by Huch<sup>4</sup>. In newborn puppies, in agreement with human medicine<sup>5</sup>, lactate concentration was higher in cases of instrumental delivery than spontaneous parturition.

From the last stage of pregnancy until delivery the bitches were monitored by tocometry to assess uterine activity and by ecodoppler to evaluate fetal heart rate, using the Whelpwise® system.

Lactate concentration lower than 4 mmol/L and Apgar score higher than 10, related to delivery time of 30 minutes with 5 strong uterine contractions every 30 minutes, are considered good prognostic factors in canine labour and neonatology.

Although the small number of animals involved requires further investigation, the data obtained are indicative of its usefulness in studying neonatal vitality in dog.

**REFERENCES** - **1.** Indrebo, A., Trangerud, C. & Moe, L. Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Veterinaria Scandinavica* 49, (suppl I):S2 (2007). **2.** Armstrong, L., Stenson, B. J. Use of umbilical cord blood gas analysis in the assessment of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92,430-434 (2007). **3.** Bakker, P. C. A. M. et al. Elevated uterine activity increases the risk of fetal acidosis at birth. *Am J Obstet Gynecol* 193,313.e1-313.e6 (2007). **4.** Huch, A., Huch, R. & Rooth, G. Guidelines for blood sampling and measurement of pH and blood gas values in obstetrics. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 18, 54(3), 165-75 (1994). **5.** Borruto, F. et al. Screening of foetal distress by assessment of umbilical cord lactate. *Clin Exp Obst & Gyn* XXXIII,4, 219-222 (2006).

## **L'UTILIZZO DELL'AGLEPRISTONE NEL CONTROLLO DELLA GLICEMIA NELLA CAGNA DIABETICA IN FASE DIESTRALE**

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

**Parole chiave:** diabete mellito, diestro, insulina, aglepristone

**RIASSUNTO** – Il diabete mellito è una patologia piuttosto comune nel cane e alcune forme sono in relazione ad alcune endocrinopatie di cui la più frequente è rappresentata dall'iperadrenocorticismo. Già dagli anni 80 è noto che il progesterone endogeno ed esogeno può indurre eccessive produzioni di GH con interferenze sulla azione dell'insulina. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia dell'aglepristone nel controllo della glicemia nella cagna diabetica con insulino-resistenza durante la fase diestrale. Tutte le cagne inserite nel campione erano sotto trattamento con insulina (1,2 UI/Kg) e tuttavia mantenevano livelli medi di glicemia elevati (>350mg/dl). La somministrazione di aglepristone (10mg/Kg) al giorno 1,2,10,18 consentiva in 20° giornata di portare la glicemia a valori inferiori a 200mg/dl.

**INTRODUZIONE** - Lo scopo del presente studio è stato quello di verificare l'efficacia dell'Aglepristone nel controllo della glicemia nella cagna diabetica in fase diestrale. Il diabete mellito è una patologia piuttosto comune nella specie canina. L'incremento dei casi di obesità, alcune disendocrinie e il trattamento con ormoni come i progestinici favoriscono l'instaurarsi della patologia. L'azione diabetogena indiretta di tali sostanze risulta di notevole importanza in quanto trovano comune impiego nel controllo dell'estro nella cagna; anche la produzione endogena di progesterone può determinare stati transitori di iperglicemia. In alcune situazioni particolari, come la fase diestrale, si determina una condizione in cui il controllo della glicemia risulta difficile nonostante la somministrazione dell'insulina esogena.

**MATERIALI E METODI** - Nel nostro studio abbiamo considerato 5 cagne diabetiche, non sterilizzate, di età compresa tra i 10 e 15 anni e di varie razze (1 Barboncino, 1 Schnauzer nano, 1 Alaskan Malamute, 1 Fox Terrier, 1 Cocker) che durante la fase diestrale presentavano difficoltà a mantenere la glicemia a livelli fisiologici, nonostante la somministrazione di dosi crescenti di insulina e pertanto classificati come resistenti all'insulina. I soggetti sono stati sottoposti a controlli giornalieri della glicemia per 7 giorni prima di essere reclutati nello studio. Tutti i soggetti si trovavano nella fase diestrale del ciclo, con tassi di progesterone superiori a 2ng/ml. Le cagne sono state sottoposte a controllo ultrasonografico dell'apparato genitale per evidenziare l'eventuale presenza di patologie ovariche e uterine (iperplasia cistica endometriale). Sono state escluse anche la presenza di patologie neoplastiche, processi settici e disendocrinie concomitanti che potevano interferire con l'attività dell'insulina. Ad ogni soggetto è stato somministrato aglepristone al dosaggio di 10mg/kg sc al giorno 1, 2, 10, 18. I controlli della glicemia sono stati effettuati a partire dal giorno 3 fino a quando la glicemia non è risultata sotto controllo. La dose di insulina (zinco-insulina) è stata mantenuta costante per tutta la durata del trattamento (1,2 UI/Kg due volte al dì). A tutti i soggetti è stata rilevata la temperatura corporea prima e dopo ogni somministrazione di aglepristone.

**RISULTATI** - Tutti i soggetti presentavano, al momento dell'inserimento nello studio, livelli di glicemia superiori a 350 mg/dl (media=407,2) che non subivano variazioni di



rilievo nonostante la somministrazione di insulina (Tabella 1). I tassi di progesterone erano superiori a 2 ng/ml in tutti i soggetti con un valore medio di 7,8ng/ml (min=3,2 max=10,5).

Tab. 1 - Variazione della glicemia dopo trattamento con Aglepristone

Soggetto	Glicemia (mg/dl) giorno 0	Insulina UI	Glicemia (mg/dl) giorno 5	Glicemia (mg/dl) giorno 12	Glicemia (mg/dl) giorno 20
Barboncino	350	7+7	320	280	190
Schnauzer	420	6+6	305	200	205
Alaskan M.	370	30+30	330	295	195
Fox Terrier	506	8+8	266	245	185
Cocker	390	10+10	315	264	176
Media	407,2		307,2	256,8	190,2

La glicemia ha iniziato a diminuire a partire dal giorno 5 per arrivare a valori inferiori a 250 mg/dl in tutti i soggetti in ventesima giornata. Il Fox Terrier ha presentato un picco di glicemia (600mg/dl) in 50° giornata in concomitanza con un episodio di gastroenterite. La temperatura corporea ha subito una riduzione nelle 24 ore successive alla somministrazione dell'aglepristone con valori minimi di 37,3°C per tornare gradualmente nei 2-3 giorni successivi ai valori pre-trattamento.

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONI** - Il diabete nel cane si riscontra più frequentemente negli animali adulti e anziani<sup>1</sup>. Nella specie canina si possono riconoscere tre forme principali che presentano aspetti simili, con alcune differenze, alla classificazione proposta per l'uomo. La prima forma diabetica è assimilabile al diabete tipo I dell'uomo in cui una reazione immuno-mediata determina la distruzione delle cellule beta<sup>2</sup>. Il cane in questa condizione può sviluppare chetoacidosi e necessita della somministrazione di insulina per sopravvivere. Nei soggetti diabetici molto giovani (<1 anno), il rilascio dell'insulina in seguito alla presenza di glucosio risulta incostante e probabilmente indicativo di una progressiva distruzione delle cellule beta. Nell'uomo la presenza di anticorpi verso alcune componenti delle cellule beta (glutamic acid decarboxylase, tyrosine phosphatases or insulin) sono indicativi e predittivi del diabete di tipo I. Nel 50% circa dei cani diabetici sono stati trovati anticorpi verso le cellule beta suggerendo l'eziologia autoimmune come si verifica nell'uomo. Tuttavia l'infiltrazione linfocitica pancreatica tipica dell'uomo e della specie bovina a supporto del processo autoimmunitario nel cane è stato rilevato raramente<sup>3</sup>. Secondo alcuni autori è possibile riscontrare una predisposizione di razza per questo tipo di diabete come ad esempio l'Alaskan Malamutes, lo Schnauzer nano, il Barboncino, lo Sprinter Spaniel. Altre razze come il Boxer, il Pastore Tedesco, il Cocker Spaniel, e il Collie sembrano essere meno esposte al rischio di sviluppare forme diabetiche<sup>1,4</sup>. Una seconda forma in parte assimilabile al diabete di tipo II dell'uomo è quella in cui i valori di insulina in un soggetto sano a digiuno possono essere aumentati, diminuiti o invariati. Nella maggior parte dei casi l'insulina prodotta previene l'insorgenza di chetoacidosi. I soggetti affetti da questa seconda forma sono più o meno sensibili all'azione dell'insulina in relazione alla gravità delle resistenze periferiche all'ormone. Non è chiaro se l'obesità possa essere considerato un fattore di rischio per il diabete nel cane. È stato osservato che soggetti con grasso corporeo fino al 40% mantenevano glicemia e secrezione di insulina nella norma, mentre soggetti con grasso corporeo indicativo di obesità di vario grado (oltre il 60-70%) mostravano iperinsulinemia e intolleranza al glucosio<sup>5</sup>: da queste considerazioni risulta evidente che l'obesità influenza la disponibilità del glucosio e la secrezione dell'insulina. Una terza forma di diabete, che potrebbe essere inclusa nel tipo II, è connessa con alcune endocrinopatie come l'iperadrenocorticismo e

l'interferenza esercitata dal progesterone esogeno ed endogeno sulla secrezione del GH da parte della ghiandola mammaria<sup>6,7,8,9</sup>. In queste condizioni il diabete diviene secondario e spesso difficilmente controllabile e la glicemia rientra nella norma quando la patologia primaria viene trattata. Per quanto riguarda il progesterone nel cane sono stati evidenziati quadri diabetici ed acromegalia durante terapie a base di progestinici; inoltre è stato osservato come la somministrazione prolungata di medrossiprogesterone acetato (MPA) determini aumenti dei livelli sierici di ormone somatotropo (GH) ed acromegalia. I progestinici inoltre hanno attività intrinseca glicocorticoide, soprattutto nel gatto, nel quale possono creare condizioni diabetiche<sup>10</sup>. L'azione principale con la quale i progestinici intervengono nell'insulino-resistenza del cane sembra essere l'incremento della secrezione di ormone somatotropo, del quale è nota la potente azione diabetogena, da cui deriva un aumento delle masse corporee, degli spazi interdentali e iperglicemia. Nel cane tale condizione sembra essere spesso progesterone-dipendente. In alcuni casi di acromegalia la somministrazione di dosi di insulina dalle 30 alle 130 UI ha determinato decrementi molto modesti della glicemia. L'utilizzo di medrossiprogesterone acetato (MPA) per il controllo dell'estro può favorire nella cagna la manifestazione di condizioni diabetiche latenti; è stato dimostrato che la somministrazione di MPA in cagne ovarioisterectomizzate, trattate precedentemente con impianti sottocutanei di estrogeni, determinava incrementi di GH. Il ruolo svolto dagli estrogeni è di potenziamento dell'azione del progesterone; infatti i livelli di GH riscontrati in cagne ovarioisterectomizzate trattate solo con MPA erano da tre a cinque volte inferiori rispetto a quelli ritrovati nei soggetti trattati anche con estrogeni<sup>10</sup>. L'aumento dell'ormone somatotropo determina una diminuzione del numero dei recettori per l'insulina a livello delle membrane cellulari e interferisce con il legame ormone-recettore. L'effetto che ne deriva è uno stato di iperglicemia difficilmente controllabile con la somministrazione di insulina esogena<sup>10</sup>. L'eccesso di produzione di GH deriva dalla ghiandola mammaria a differenza di quanto avviene nella specie felina ed umana in cui l'origine prevalente è rappresentata da adenomi della ghiandola pituitaria<sup>11</sup>. In effetti l'ipofisectomia non influenza gli alti livelli plasmatici di GH indotto dai progestinici<sup>8</sup>. L'incremento plasmatico del GH in seguito a stimolazione progestinica, anche endogena legata alla fase diestrane, è reversibile quando la concentrazione di progesterone torna a livelli fisiologici, fenomeno evidentemente in contrasto con l'origine neoplastica della produzione di GH. Questo declino risulta più pronunciato e permanente dopo ovariectomia<sup>12,13</sup>. L'origine mammaria del GH nella cagna è stata dimostrata valutando le concentrazioni plasmatiche nelle vene mammarie in cui si trovano livelli tre volte superiori rispetto alle arterie mammarie. Inoltre la mastectomia determina una caduta immediata della concentrazione del GH. Nell'epitelio duttale della ghiandola mammaria è stato riscontrato un gene identico a quello ipofisario che controlla la produzione di GH<sup>14</sup> che viene attivato dal progesterone<sup>15</sup>. La produzione locale di GH è stata associata alla presenza di IGFs e delle loro proteine IGFbps. Questo sistema locale svolge un ruolo importante nella regolazione dello sviluppo mammario e della preparazione alla lattazione. Tuttavia lo sviluppo di acromegalia e insulino-resistenza indotta dal GH è relativamente raro<sup>8,9</sup>. L'assunzione del GH con il colostro non determina alterazioni metaboliche nel neonato in quanto non si riscontra assorbimento intestinale, ma sembra che influenzi positivamente la maturazione dell'apparato gastro-intestinale. La presenza di recettori per il progesterone nella ghiandola mammaria è stata ampiamente dimostrata e l'attivazione di questi recettori sembra essere il meccanismo di stimolazione del gene per la produzione di GH di origine mammaria. La difficoltà a controllare la glicemia nei soggetti diabetici che si trovano in una condizione clinica in cui è presente progesterone endogeno, come nei casi da noi trattati, implica una serie di complicanze che possono compromettere la vita del paziente. Spesso i tassi plasmatici del glucosio tipici della

patologia diabetica non possono essere controllati con dosi di insulina anche molto elevate (>100 UI) che sconfinano in condizioni di chetoacidosi gravi a volte non reversibili. La terapia farmacologica classica non fornisce pertanto risultati apprezzabili e l'eliminazione della fonte di produzione di progesterone implica l'asportazione delle ovaie, intervento chirurgico rischioso in una condizione metabolica di questo tipo. La somministrazione di aglepristone ha consentito di riportare la glicemia sotto controllo fino all'esaurimento spontaneo della produzione di progesterone di origine ovarica, consentendo in una fase successiva l'intervento di ovarioisterectomia. La riduzione della temperatura corporea, che non ha comunque determinato complicazioni, sembra dovuta all'azione dell'antiprogestinico sui recettori per il progesterone a livello ipotalamico e di altri centri nervosi. Possiamo pertanto ritenere che gli antiprogestinici possano trovare una valida applicazione in casi di questo tipo per consentire al paziente l'approccio chirurgico oppure come terapia di supporto nella fase diestrane nei casi che, per altre patologie croniche, non possono essere sottoposti all'intervento di ovarioisterectomia.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Marmor M., Willeberg P., Glickman L.T., Priester W.A., Cypess R.H. and Hurvitz A.I., Epizootiologic pattern of diabetes mellitus in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 43, 465–470, 1982. 2. Lendrum R., Walker G. and Cudworth A.G., Islet cell antibodies in diabetes mellitus. *Lancet* 2, 1273–1276, 1976. 3. Foulis A.K. and Stewart J.A., The pancreas in recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. *Diabetologia* 26, 456–461, 1984. 4. Kramer J.W., Nottingham S. and Robinette J., Inherited, early onset, insulin-requiring diabetes mellitus of keeshond dogs. *Diabetes* 29, 558–565, 1980. 5. Mattheeuws D., Rottiers R., Baeyens D. and Vermeulen A., Glucose tolerance and insulin response in obese dogs. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.* 20, 287–293, 1982. 6. Peterson M.E., Decreased insulin sensitivity and glucose tolerance in spontaneous canine hyperadrenocorticism. *Res. Vet. Sci.* 36, 177–182, 1984. 7. Eigenmann J.E., Eigenmann R.Y., Rijnberk A., Van der Gaag I., Zapf J. and Froesch E.R., Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes mellitus and acromegaly. *Acta Endocrinol.* 104, 167–176, 1983. 8. Selman P.J., Mol J.A., Rutteman G.R., van Garderen E. and Rijnberk A., Progesterin-induced growth hormone excess in the dogs originates in the mammary gland. *Endocrinology* 134, 287–292, 1994. 9. Kooistra H.S., den Hertog E., Okkens A.C., Mol J.A. and Rijnberk A., Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anoestrus in beagle bitches. *J. Reprod. Fertil.* 119, 217–222, 2000. 10. Bigliardi E., Parmigiani E., Complicanze diabetiche da cause ginecologiche nella cagna. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, XVII, 53-60, 1997. 11. Van Keulen L.J.M., Wesdorp J.L. and Kooistra H.S., Diabetes mellitus in a dog with growth-hormone producing acidophilic adenoma of the adenohypophysis. *Vet. Pathol.* 33, 451–453, 1996. 12. Concannon P., Altszuler N., Hampshire J., Butler W.R. and Hansel W., Growth hormone, prolactin, and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology* 106, 1173–1180, 1980. 13. Rijnberk A., Eigenmann J.E., Belshaw B.E., Hampshire J. and Altszuler N., Acromegaly associated with transient overproduction of growth hormone in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177, 534–537, 1980. 14. Selman P.J., Mol J.A., Rutteman G.R. and Rijnberk A., Progesterins and growth hormone excess in the dog. *Acta Endocrinol.* 125 Suppl., 42–47, 1991. 15. Lantinga-van Leeuwen I.S., Timmermans-Sprang E.A.P. and Mol J.A., Cloning and characterization of the 5' flanking region of the canine growth hormone gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197, 133–14, 2002.

## THE USE OF AGLEPRISTONE TO CONTROL GLYCEMIA IN THE DIABETIC BITCH DURING DIESTRUS

**Bigliardi E., Parmigiani E., Morini G., Ferrari L., Di Ianni F., Bresciani C., Vecchi I., Magani E.,** *Animal Health Department, Faculty of Veterinary Medicine, University of Parma, Italy. Corresponding author: enrico.bigliardi@unip.it*

**Key words:** diabetes mellitus, diestrus, insulin, Aglepristone.

Diabetes mellitus is a common disease in dogs. Different types of diabetes have been identified in pet animals. The classification of diabetic dogs is modelled following the human classification, but some aspects are different. One form of diabetes in dog occurs in connection with endocrinopathies. The most common are hyperadrenocorticism<sup>1,2</sup> and acromegaly<sup>3</sup>. Acromegaly is especially prevalent in areas where bitches are not spayed at early age. Progestins may increase growth hormone released from the mammary gland. In the 1980s, it was discovered that exogenous progestins and endogenous progesterone can induce GH excess in dogs. This GH excess originates from the mammary gland and may induce acromegaly and insulin resistance. This study was designed to determine the efficacy of aglepristone, a progesterone-receptor blocker, in the control of glycemia in diabetic bitch with insulin resistance during diestrus. In this study, we considered five bitches with insulin resistance during diestrus. All the bitches were under treatment with insulin (1.2 IU/kg BID), but hyperglycemia remained (mean > 350 mg/dl). Any other pathologies such as endocrinopathies, neoplasia, or infectious diseases were eliminated. We administered aglepristone at days 1, 2, 10, 18 (10 mg/kg). In all bitches, glycaemia was under control by day 20 (Tab. 1).

Table 1 - Levels of glycaemia after treatment with Aglepristone

Bitch	Glycaemia (mg/dl) day 0	Insulin (UI)	Glycaemia (mg/dl) day 5	Glycaemia (mg/dl) day 12	Glycaemia (mg/dl) day 20
Miniature Poodles	350	7+7	320	280	190
Schnauzer	420	6+6	305	200	205
Alaskan M.	370	30+30	330	295	195
Fox Terrier	506	8+8	266	245	185
Cocker	390	10+10	315	264	176
Mean	407.2		307.2	256.8	190.2

The use of Aglepristone in diabetic bitch with insulin resistance during diestrus proved to have high efficacy without serious side effects (transitory and light decreases in body temperature).

**References.** 1. Peterson M.E., Decreased insulin sensitivity and glucose tolerance in spontaneous canine hyperadrenocorticism. *Res. Vet. Sci.* 36, 177–182, 1984. 2. Hess R.S., Saunders H.M., Van Winkle T.J. and Ward C.R., Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993–1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217, 1166–1173, 2000. 3. Eigenmann J.E., Eigenmann R.Y., Rijnberk A., Van der Gaag I., Zapf J. and Froesch E.R., Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes mellitus and acromegaly. *Acta Endocrinol.* 104, 167–176, 1983.

## VALUTAZIONE DELLA VASCOLARIZZAZIONE OVARICA MEDIANTE ESAME DOPPLER DURANTE LA FASE FOLLICOLARE NELLA CAGNA

Scotti L., Orlandi R., Ercoli L., <sup>1</sup>Brecchia G., <sup>2</sup>Santoro M., Polisca A., *Dipartimento di Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria, Sezione di Ostetricia e Ginecologia;*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia*

<sup>2</sup>*Allevamento e Addestramento Cinofili della Guardia di Finanza di Castiglion del Lago*

**Parole chiave:** cagna, Doppler, fase follicolare, ovulazione, flusso ematico

**RIASSUNTO** - Le modificazioni emodinamiche che interessano ciclicamente l'ovaio sono strettamente correlate con lo sviluppo follicolare, l'ovulazione e la formazione dei corpi lutei. Scopo del presente studio è stato quello di valutare il flusso arterioso intraovarico durante la fase follicolare nella cagna mediante esame eco-color Doppler. A tal fine sei cagne di razza Pastore Tedesco venivano monitorate giornalmente, dall'inizio della fase proestrile fino al primo giorno di diestro citologico, mediante esame doppler delle ovaie per la valutazione dei parametri flussometrici (Vs, Vd, IR ed IP). L'incremento delle velocità del flusso intraovarico ed il decremento dei rispettivi indici osservato in particolare durante il periodo periovulatorio potrebbe rappresentare un ulteriore parametro diagnostico per stabilire il momento dell'ovulazione nella cagna..

**INTRODUZIONE** - Per ottimizzare l'efficienza riproduttiva nella cagna risulta di fondamentale importanza la determinazione del momento dell'ovulazione e quindi dell'accoppiamento o dell'inseminazione. A tal proposito possono essere utilizzate indagini cliniche in associazione ad esami di laboratorio e strumentali. Tra questi ultimi l'ecografia ovarica bidimensionale rappresenta un valido ausilio diagnostico non invasivo<sup>1,2,3,4,5,6</sup>. Inoltre considerando che le gonadi sono sottoposte a cicliche variazioni della perfusione vascolare, direttamente correlate alla funzionalità ovarica<sup>7,8,9</sup>, l'utilizzo combinato dell'ecografia bidimensionale e del Doppler potrebbe fornire ulteriori informazioni per individuare in tempo reale le modificazioni emodinamiche periovulatorie.<sup>10</sup> Il Color Doppler permette di stabilire la presenza, la direzione e la velocità del flusso ematico, mentre il Doppler pulsato di calcolare i parametri flussometrici caratteristici di un determinato distretto vascolare. Gli obiettivi del presente lavoro sono stati quelli di fornire ulteriori informazioni circa l'applicabilità delle metodiche Doppler a codifica di colore e Doppler pulsato quali ulteriori indagini per individuare il momento dell'ovulazione nella cagna.

**MATERIALI E METODI** - Oggetto del presente studio sono state 6 cagne di razza Pastore Tedesco, clinicamente sane, di età compresa tra 2 e 6 anni, del peso di 15-35 kg, la cui anamnesi riproduttiva riferiva regolare attività ciclica. I soggetti venivano monitorati giornalmente, dall'inizio della fase proestrile fino al primo giorno di diestro citologico, mediante esami colpocitologici, valutazione della progesteronemia (RIA kit DLS, Webster, Texas) ed esame ultrasonografico (Sonoace 8800, Sonda Microconvex da 6,5-7,5 MHz, Medison Inc.) delle ovaie. Identificate queste ultime, al disotto del polo caudale rene, si visualizzavano, mediante color Doppler, i relativi flussi ematici e con il Doppler pulsato venivano calcolati i parametri flussometrici [Velocità Sistolica (Vs), Velocità Diastolica (Vd), Indice Resistivo (IR) ed Indice di Pulsatilità (IP)]. In ciascun ovaio le arterie erano campionate, in tre diverse localizzazioni, con un angolo di incidenza  $\leq 60^\circ$  cui veniva applicata la correzione angolare. I dati relativi ai parametri flussometrici di ogni sessione venivano riferiti come  $media \pm DS$ . Un confronto statistico,

mediante test t di Student, era effettuato tra i valori flussometrici delle due ovaie, e nei giorni 5, 11 e 18 sia per la progesteronemia che per i valori di flusso.

**RISULTATI** - La valutazione flussometrica di entrambe le ovaie ha richiesto in media 35 minuti. Nei soggetti in esame il periodo tra inizio del proestro ed il primo giorno di diestro citologico ha avuto una durata media di  $18 \pm 2$  giorni. Il flusso arterioso intraovarico era visualizzabile a partire dal 5° giorno di proestro fino alla fine delle osservazioni. Il confronto dei parametri flussometrici tra le due gonadi non ha rilevato differenze statisticamente significative. Il diagramma di flusso delle arterie intraovariche, per tutta la durata dell'esperimento, presentava le caratteristiche tipiche di un vaso a bassa resistenza con andamento monofasico, caratterizzato da un rapido picco sistolico seguito da un lento decremento diastolico e da una relativamente bassa velocità telediastolica (fig. 1, 2, 3). Le medie  $\pm$ DS dei parametri flussometrici sono riportati in tabella 1. L'analisi statistica dei valori flussometrici ha messo in evidenza un significativo aumento ( $p < 0,01$ ) della velocità sistolica e diastolica, ed una significativa riduzione degli indici di resistività e pulsatilità tra il giorno 5, il giorno 11 ed il giorno 18 ed un significativo incremento ( $p < 0,01$ ) della progesteronemia (Tab. 2).



Fig. 1 - Esame color Doppler di un'arteria intraovarica e relativo diagramma di flusso al 5° giorno di proestro.

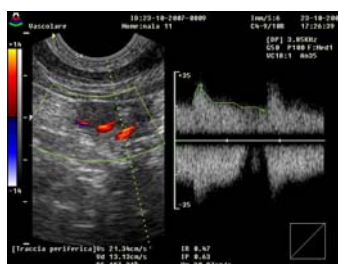


Fig. 2 - Esame color Doppler di un'arteria intraovarica e relativo diagramma di flusso al 11°



Fig. 3 - Esame color Doppler di un'arteria intraovarica e relativo diagramma di flusso al 18°

Tab. 1 - Valori dei parametri flussometrici (media $\pm$ ds) delle arterie intraovariche durante proestro ed estro (n=6) (\*n=5).

Giorno inizio estro manifesto	Vs n cm/s	Vd in cm/s	IR	IP
5°	12,61 $\pm$ 1,04	4,44 $\pm$ 0,84	0,65 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,14
6°	14,17 $\pm$ 1,31	4,74 $\pm$ 0,82	0,67 $\pm$ 0,06	1,16 $\pm$ 0,20
7°	15,23 $\pm$ 1,47	4,92 $\pm$ 1,10	0,66 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,19
8°	15,01 $\pm$ 5,41	6,15 $\pm$ 1,18	0,64 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,12
9°	17,63 $\pm$ 1,57	7,04 $\pm$ 2,14	0,62 $\pm$ 0,09	0,97 $\pm$ 0,22
10°	19,34 $\pm$ 2,02	8,61 $\pm$ 1,95	0,56 $\pm$ 0,06	0,87 $\pm$ 0,12
11°	20,02 $\pm$ 5,19	9,72 $\pm$ 1,77	0,55 $\pm$ 0,06	0,83 $\pm$ 0,13
12°	23,16 $\pm$ 2,13	11,61 $\pm$ 2,15	0,53 $\pm$ 0,05	0,80 $\pm$ 0,10
13°	25,25 $\pm$ 2,31	12,34 $\pm$ 1,45	0,53 $\pm$ 0,07	0,79 $\pm$ 0,16
14°	27,05 $\pm$ 2,09	12,62 $\pm$ 1,29	0,52 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,10
15°	26,24 $\pm$ 2,86	13,00 $\pm$ 1,83	0,50 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,10
16°	27,69 $\pm$ 1,36	14,35 $\pm$ 1,82	0,47 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,12
17°	26,78 $\pm$ 2,18*	13,09 $\pm$ 1,86*	0,47 $\pm$ 0,03*	0,71 $\pm$ 0,07*
18°	25,21 $\pm$ 1,39*	12,44 $\pm$ 2,15*	0,49 $\pm$ 0,04*	0,72 $\pm$ 0,10*

	Giorno 5	Giorno 11	Giorno 18
Vs	12,61 $\pm$ 1,04 a	20,02 $\pm$ 5,19 b	25,21 $\pm$ 1,39 *c
Vd	4,44 $\pm$ 0,84 a	9,72 $\pm$ 1,77 b	12,44 $\pm$ 2,15 *c
IR	0,65 $\pm$ 0,06 a	0,55 $\pm$ 0,06 b	0,49 $\pm$ 0,04 *c
IP	1,11 $\pm$ 0,14 a	0,83 $\pm$ 0,13 b	0,72 $\pm$ 0,10 *b
P4	1,12 $\pm$ 0,6 a	8,51 $\pm$ 1,78 b	34,2 $\pm$ 2,7 *c

Tab. 2 - Confronto statistico nei giorni 5, 11, 18 (\*n=5) a,b,c =p<0,01

**DISCUSSIONE** - Fisiologicamente l'ovaio è sottoposto a cicliche variazioni della vascolarizzazione e rappresenta il tessuto maggiormente irrorato dell'organismo. Tale sviluppo vascolare risulta essenziale per la crescita, la differenziazione delle cellule e per la formazione dei recettori ormonali<sup>11</sup>. Studi sulla perfusione vascolare ovarica nelle diverse specie animali sono stati condotti in passato con metodiche invasive come ad esempio mediante l'impianto di sonde o l'utilizzo di microsferi radioattive<sup>12,13</sup>. Solo recentemente l'ecografia Doppler ha permesso uno studio non invasivo di tale distretto nelle diverse fasi del ciclo estrale<sup>10,14,15</sup>. L'incremento delle velocità del flusso intraovarico (Vs, Vd) ed il decremento dei rispettivi indici (IR, IP) da noi osservato durante la fase follicolare è in accordo con quanto precedentemente riferito nella cagna<sup>10</sup>. Il suddetto incremento potrebbe essere verosimilmente dovuto ad un aumento della perfusione ematica correlata allo sviluppo follicolare e all'evento ovulatorio quest'ultimo confermato dalle modificazioni ultrasonografiche dell'ovaio e dai valori della progesteronemia, come riferito nella cagna<sup>6,10</sup>. Pertanto lo studio flussometrico dell'ovaio può rappresentare un ulteriore ausilio diagnostico per la valutazione della funzionalità ovarica e per determinare l'ovulazione. Sono in corso ulteriori studi effettuati in un maggior numero di animali e che prevedono anche l'impiego della funzione Power Doppler.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Inaba T, Matsui N, Shimizu R, Imori T. Use of echography in bitches for detection of ovulation and pregnancy. *Veterinary Record*; 115:276-277 (1984). **2.** Wilson J, Hayward J. Real-time ultrasound scanning of bitches. *Veterinary Record*; 116:698-699 (1985). **3.** England GCW, Allen WE. Real-time ultrasonic imaging of the ovary and uterus of the dog. *Journal Reproduction and Fertility* 39:91-100(1989). **4.** England G, Yeager AE, Concannon PW. Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch. In *Recent Advances in Small Animal Reproduction* (2003): www.ivis.org. **5.** Marseloo N., et al. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. 5° *International Symposium on Canine and Feline Reproduction*; 75-77 (2004). **6.** Bocci F., Zelli R., Di Salvo P., Polisca Monitoraggio Ecografico Dello Sviluppo Follicolare E Dell'ovulazione Nella Cagna; *Società Italiana di Riproduzione Animale* (2005) **7.** Acosta, T.J., Miyamoto, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sc.* 82-83,127-140 (2004). **8.** Stouffer, R.L., Martinez-Chequer, J.C., Molskness, T.A., Xu, F., Hazzard, T.M. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch. Med. Res.* **32**,567-575 (2001). **9.** Basset, D.L. The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am. J. of Anatomy* 73,251-291(1943). **10.** Koster, K., Poulsen Nautrop, C., Gunzel-Apel, A.R. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reprod.* 122, 453-461 (2001) **11.** Ellinwood, W.E., Nett, T.M., Niswender, G.D. Ovarian vasculature: structure and function. *The Vertebrate Ovary* Ed. RE Jones, 583-614 (1978). **12.** Brown, B.W., Emery, M.J., Mattener, P.E. Ovarian arterial blood velocity measured with Doppler ultrasonic transducers in conscious ewes. *J. Reprod. and Fert.* 58,295-300 (1980). **13.** Ford, S.P., Chenault, J.R. Blood flow in the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. and Fert.* **62**,555-562 (1981). **14.** Bollwein, H., Mayer, R., Weber, F., Stolla, R. Luteal blood flow during estrous cycle in mares. *Theriog.* **57**, 2043-2051(2002). **15.** Acosta TJ. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *J Reprod Dev.* Feb;53(1):39-44; (2007).

Si ringrazia per la collaborazione il Comando Generale della Guardia di Finanza, IV Reparto, Direzione Veterinaria e Cinofili.

## EVALUATION OF OVARIAN BLOOD FLOW BY DOPPLER ULTRASONOGRAPHY DURING FOLLICULAR PHASE IN THE BITCH

Scotti L., Orlandi R., Ercoli L., <sup>1</sup>Brecchia G., <sup>2</sup>Santoro M., Polisca A., *Department of Pathology, Diagnostic and Veterinary Clinic; Section of Obstetrics and Gynecology;*  
<sup>1</sup>*Department of Biopathological Science, Hygiene of Animal and Food Productions, Faculty of Veterinary Medicine, University of Perugia, Italy.*  
<sup>2</sup>*Allevamento e Addestramento Cinofili della Guardia di Finanza di Castiglion del Lago*  
Corresponding author: [angela.polisca@unipg.it](mailto:angela.polisca@unipg.it)

**Key words:** bitch, Doppler, follicular phase, ovulation, blood flow.

Timing the day of ovulation is considered one of the most important factors for determining when to inseminate bitches. Recently, ovarian ultrasound examination in the bitch has been tested by some authors as a tool for diagnosing ovulation in bitches<sup>1</sup>. The ovaries undergo cyclical changes in vascularisation, directly related with ovarian function<sup>2</sup>. The combined use of bidimensional ultrasonography and Color Doppler can provide more information, in particular to determine the periovarian haemodynamic modification. Ovarian blood flow was investigated in six bitches during estrous cycles using color Doppler. The observation was made daily from day 0, the first day of vulvar discharge, to the first day of cytological diestrus and simultaneously, cytological swab and blood samples for RIA determination of progesterone were taken after each examination. The intraovarian arteries of both ovaries were examined with Pulsed Doppler to obtain a waveform of blood flow and to calculate the Systolic velocity (Vs), Diastolic Velocity (Vd), Resistive Index (RI) and Pulsatility Index (PI). Doppler measurements were performed using a Sonoace 8800 ultrasound device, with a 5.5 MHz microconvex probe. The size of the Doppler gate, which determines Doppler information, was processed and the angle was corrected within  $\leq 60^\circ$ . Doppler calculations were performed by using three similar consecutive flow velocity waveforms. The values were similar in both ovaries. Furthermore from day 5, day 11 and day 18 the values of Vs and Vd as well as IR and IP, respectively increase and decrease significantly ( $p < 0.01$ ). These increases may be due to the development of ovarian blood perfusion related to follicular growth and the ovulatory event, confirmed by progesterone values as reported in the bitch<sup>1,3</sup>. The findings of this study show the characteristic changes in blood supply in the ovaries throughout the canine follicular phase and the Doppler could be a good technique for determining ovulation time in the bitch, especially when artificial insemination with frozen or chilled semen has to be performed.

**References** - 1. Bocci F., Zelli R., Di Salvo P., Polisca Monitoraggio ecografico dello sviluppo follicolare e dell'ovulazione nella cagna; *Società Italiana di Riproduzione Animale* 44-46 (2005) 2. Acosta, T.J., Miyamoto, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sc.* 82-83,127-140 (2004). 3. Koster, K., Poulsen Nautrop, C., Gunzel-Apel, A.R. A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reprod.* 122, 453-461 (2001).



## CONTRIBUTO CLINICO SULL'USO DELL'hCG PER IL TRATTAMENTO DELLE CISTI FOLLICOLARI NELLA GATTA.

Valentini L., <sup>1</sup>Paoletti M., Leoci R., *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari;* <sup>1</sup>Libero professionista

**Parole chiave:** cisti follicolari, gatta, hCG

**RIASSUNTO** - Nel lavoro si riportano i riscontri ottenuti con la somministrazione di hCG in gatte affette da iperestrisimo indotto da cisti follicolari. Le cisti follicolari in questa specie sono un reperto di frequente riscontro; se estrogeno-secerenti determinano uno stato di estro persistente. Generalmente la terapia di scelta è l'ovariectomia ma, nell'ottica di mantenere la capacità riproduttiva, si può tentare di indurre farmacologicamente la luteinizzazione delle cisti. Complessivamente sono state trattate 8 gatte con 500 UI di hCG per via i.m. in unica somministrazione. Il trattamento si è rivelato non risolutivo in tutti i casi e in 2 soggetti ha indotto la complicità della piometra, conseguente a parziale luteinizzazione delle cisti. In tutti i casi è stato necessario ricorrere alla terapia chirurgica.

**INTRODUZIONE** - Le cisti follicolari (CF) sono strutture ovariche, singole o multiple, con pareti sottili, fluttuanti, che si sviluppano su una o entrambe le ovaie. Nella gatta sono un reperto di frequente riscontro nella pratica ambulatoriale. Le CF originano da follicoli di Graaf, maturi o atresici, e presentano la stessa organizzazione strutturale, con uno strato di cellule follicolari e uno di cellule tecali, più esterno, anche se assottigliati<sup>1</sup>. Talvolta vanno incontro a luteinizzazione parziale o totale della parete, evolvendo in cisti luteinica. L'eziopatogenesi delle CF nella gatta rimane ancora oscura, ma è noto che la loro frequenza aumenta con l'età. Le CF possono essere asintomatiche oppure, nei casi in cui siano estrogeno-secerenti, determinano un quadro di calore persistente. Il sospetto diagnostico è confermato dai seguenti riscontri: profilo colpocitologico estrale, contraddistinto da almeno il 40% di cellule superficiali e dalla trasparenza del fondo del vetrino<sup>2</sup>; valori dell'estradiolo (E<sub>2</sub>) ematico persistentemente superiori ai 20 pg/ml<sup>2</sup>; rilievo ecografico di follicoli con diametri superiori ai 2,5-3,5 mm<sup>3</sup>. Se il soggetto non è destinato alla riproduzione, la terapia di elezione è l'ovariectomia. Tuttavia, in gatte di particolare pregio, al fine di preservarne la capacità riproduttiva, si può tentare l'ablazione delle singole cisti o una terapia farmacologica, con somministrazione di hCG o GnRH. Nella gatta in fase estrale, la somministrazione i.m. di hCG induce una risposta ovulatoria progressivamente crescente in relazione alla dose somministrata, con risposta massima alla dose di 500 UI<sup>4</sup>. I dosaggi elevati sono giustificati dalla biodisponibilità relativamente ridotta della gonadotropina, pari al 50-60%<sup>5</sup>. Il principale effetto dell'hCG è luteotrofico, tuttavia persistendo a lungo in circolo, stimola l'accrescimento e la maturazione anche di follicoli di piccole dimensioni con il conseguente sviluppo di corpi lutei accessori, dopo circa 2-3 giorni dal trattamento<sup>5</sup>. L'hCG trova applicazione nel trattamento delle CF nella gatta, alla dose di 500 UI i.m. in unica somministrazione, o di 250 UI b.i.d.<sup>6</sup>. In questo lavoro si riportano i riscontri da noi ottenuti con la singola somministrazione di hCG per il trattamento farmacologico delle CF estrogeno-secerenti nella gatta.

**MATERIALI E METODI** - I casi da noi trattati sono stati complessivamente 8. Le gatte erano di razze diverse, di età compresa tra 2 e 10 anni, e con anamnesi di estro persistente da almeno quattro settimane (Tab. 1). Quattro gatte (nn. 3-6) si erano ripetutamente accoppiate senza che ciò avesse determinato la remissione del comportamento estrale. Tutte le gatte al momento della prima visita risultavano in

buone condizioni generali, con parametri vitali ed ematochimici nella norma. La definitiva diagnosi di CF si otteneva attraverso gli esami clinico-comportamentale, colpocitologico, ecografico dell'addome, dosaggio dell'E<sub>2</sub> ematico. In quattro soggetti (nn. 1-4) la CF ovarica era singola e monolaterale; due gatte (nn. 5-6) presentavano CF singole in entrambe le ovaie; altre due (nn. 7-8) avevano rispettivamente una e entrambe le ovaie policistiche. I valori dell'E<sub>2</sub> ematico erano in tutti i casi superiori al livello basale di 20 pg/ml (Tab. 1). Su richiesta dei proprietari, si tentava una terapia conservativa dell'attività riproduttiva somministrando 500 UI di hCG per via i.m. nel tentativo di indurre la luteinizzazione delle CF. A distanza di una settimana veniva effettuato un nuovo controllo clinico, corredato dagli stessi esami attuati nella prima visita, rilevando, quando possibile, la progesteronemia per valutare un'eventuale attività luteale. I dosaggi ormonali sono stati effettuati con analisi EIA (Eia Well, Radim-Italia).

**RISULTATI** - La terapia con hCG non ha determinato alcuna risposta clinica in sei soggetti (nn. 1-5; 8); in due casi (nn. 6-7) ha indotto luteinizzazione dei follicoli cistici, evidenziata dal rientro dell'estradiolo ematico a livelli basali, dall'aumento della progesteronemia (> 1-2 ng/ml)<sup>7</sup> e dalla scomparsa del comportamento estrale. Tuttavia, in entrambi i soggetti si è sviluppata una piometra nell'arco di 3-4 settimane. Una gatta (n. 2), al controllo, ha mostrato una lieve riduzione del tasso ematico di E<sub>2</sub>. Pertanto, in tutti i casi è stato necessario optare per la terapia chirurgica. In sei gatte (nn. 1-2; 5-8) è stata eseguita l'ovarioisterectomia, che ha determinato in breve tempo la risoluzione della sintomatologia da iperestrismo. In due soggetti, di pregio genetico (nn. 3-4), si è optato per l'ovariectomia monolaterale, in quanto solo un ovaio risultava cistico; entrambe hanno successivamente partorito. Il quadro riassuntivo dei riscontri è riportato in tabella 2. Ai rilievi anatomo-istopatologici, in sei casi non è stata osservata né luteinizzazione né regressione delle CF, mentre nei due casi complicati da piometra le CF presentavano luteinizzazione parziale delle parete.

Tab. 1 - Riscontri ecografici delle ovaie e livelli ematici dell'estradiolo rilevati alla prima visita clinica.

Soggetto n.	Razza, età	Ovaio destro	Ovaio sinistro	E <sub>2</sub> ematico (pg/ml)
1	Europeo, 5 a	Singola cisti 1 cm	Normale	26
2	Europeo 4 a	Normale	Singola cisti 1 cm	43,1
3	Sacro di Birmania, 3 a	Normale	Singola cisti 1,5 cm	37
4	Siamese, 2 a	Normale	Singola cisti 1 cm	39
5	Persiano, 8 a	Singola cisti 0.8 cm	Singola cisti 1 cm	24
6	Norvegese d. Foreste, 6 a	Singola cisti 0.9 cm	Singola cisti 0,8 cm	25,6
7	Europeo, 10 a	Policistico	Normale	25
8	Certosino 7 a	Policistico	Policistico	37

Tab. 2 - Riscontri clinici, colpocitologici e ormonali dopo terapia con hCG.

Soggetto n.	Rilievi clinici	Citologia vaginale	P <sub>4</sub> ematico (ng/ml)	E <sub>2</sub> ematico (pg/ml)
1	Persistenza estro	estrale	1,5	nv
2	Attenuazione manifestazioni estrali	estrale	nv	35
3	Persistenza estro	estrale	1,5	nv
4	Persistenza estro	estrale	1,7	nv
5	Persistenza estro	estrale	1,9	nv
6	Scomparsa manifestazioni estrali; insorgenza piometra	diestrane	19	17
7	Scomparsa manifestazioni estrali; insorgenza piometra	diestrane	25	14
8	Persistenza estro	estrale	nv	nv

nv: non valutato

**DISCUSSIONE** - Il trattamento farmacologico con hCG non è stato risolutivo in tutti i casi da noi osservati. Nelle due gatte in cui ha indotto luteinizzazione della parete cistica questa è risultata incompleta, tanto che la condizione non si è risolta e, inoltre, ha determinato la complicità della piometra. All'esame anatomo-istopatologico, molte ovaie presentavano follicoli terziari a diverso stadio di accrescimento. Non siamo in grado di definire se l'hCG abbia indotto nuove ondate di accrescimento follicolare, con relativa produzione di E<sub>2</sub>, o se tali follicoli fossero già in fase di crescita e la gonadotropina esogena possa aver incrementato tale processo. In entrambi i casi ciò potrebbe aver ulteriormente contribuito al perdurare della condizione estrale. È probabile che la degenerazione cistica dei follicoli renda questi non responsivi all'azione luteinizzante dell'hCG, per assenza di recettori o per una loro condizione non funzionale. La somministrazione di gonadotropine esogene nella specie felina può causare diverse alterazioni che riguardano l'attività ciclica riproduttiva, come manifestazioni estrali esacerbate, cisti follicolari, piometra<sup>8,9</sup>. In base alle considerazioni fatte ed ai rilievi clinici ottenuti, si può ipotizzare che la mancata o parziale risposta al protocollo terapeutico adottato in questa sede possa essere stata influenzata da vari fattori, come: responsività dell'ovaio al momento del trattamento; tempi elevati di permanenza in circolo del farmaco, che potrebbero determinare iperstimolazione dell'ovaio; variabilità individuale della risposta al trattamento. Inoltre, contrariamente ad altre specie in cui sono stati definiti i molteplici fattori eziologici all'origine delle cisti follicolari, nella specie felina la patogenesi rimane del tutto ignota. I nostri riscontri negativi indicano la necessità di una maggiore conoscenza in questa specie dell'attività farmacocinetica delle sostanze ad azione LH-simile e la valutazione di protocolli terapeutici diversi, tenendo in debita considerazione anche il fatto che le CF sono la risultante di una compartecipazione di fattori causali non solo di origine ormonale, ma anche di origine ambientale, in cui lo stress gioca un ruolo importante. Pertanto, terapie che mirano a correggere esclusivamente gli squilibri ormonali, possono non dare i risultati sperati.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Logvinov, S. V., Tikhonovskaya, O. A., Petrov, I. A., Petrova, M. S. Morphological Changes in the Ovaries during Modeling of Functional Cysts of Hormonal Genesis. *Bull Exp Biol Med*, 144 (3):362-365, (2007). 2. Shille, V.M., Lundström, K.E., Stabenfeldt, G.H. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biol Reprod*, 21:1217-1223, (1979). 3. Bristol-Gould, S., Woodruff, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 66(1):5-13, (2006). 4. Wildt, D.E., Seager, S.W. Ovarian response in the estrual cat receiving varying dosages of HCG. *Horm Res*, 9(3):144-50, (1978). 5. Swanson, W.F., Wolfe, B.A., Brown, J.L., Martin-Jimenez, T., Riviere, J.E., et al. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administered singly and in combination in the domestic cat. *Biol Reprod*, 57(2):295-302, (1997). 6. Johnston, S.D., Root Kustritz, M.V., Olson, P.N.S. Disorders of the feline ovaries. In *Canine and Feline Theriogenology*, WB Saunders Company, US:453-462, (2001). 7. Feldman, E.C, Nelson, R.W. Riproduzione nel gatto. In *Endocrinologia e riproduzione nel cane e nel gatto*. UTET, Torino:829-861, (1998). 8. Dresser, B.L., Sehlhorst, C.S., Wachs, K.B., Keller, G.L., Gelwicks, E.J., Turner, J.L. Hormonal stimulation and embryo collection in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogen*, 28:915-927, (1987). 9. Silva, T.F.P., Mattos, T.R.F., Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Pereira, B.S., et al., Sexual behaviour and ovarian response after FSHp superovulation treatment in queens (*Felis catus*). *Rev Bras Reprod Anim*:357-377, (2001).

## USE OF hCG FOR FOLLICULAR CYST TREATMENT IN THE CAT. CLINICAL REPORT

Valentini L., <sup>1</sup>Paoletti M., Leoci R., *Department of Animal Production, University of Bari, Italy;* <sup>1</sup>*Veterinary practitioner*

**Key words:** follicular cysts, queen, hCG

**INTRODUCTION** - Ovarian follicular cysts (FC) are common in the cat, and their incidence increases with age. Follicular cysts are single or multiple thin-walled floating structures similar to Graafian follicles, with an inner layer of granulosa cells and thecal tissue at the periphery. They may arise from one or both ovaries; follicular cysts derived from mature or atretic follicles. The aetiology in its spontaneous form is unknown. Affected queens may be asymptomatic or may exhibit prolonged estrus if the cyst secretes estrogens. Ovariectomy is the therapy of choice, although surgical resection of the cyst, or a pharmacological approach using hCG or GnRH, may be proposed in order to preserve reproductive abilities in valuable cats. Intramuscular hCG administration in estrual queens induces a progressive ovulatory response according to the dosage; a single injection of 500 UI has the highest response. The aim of this work is to report the results obtained by a single administration of hCG to treat cat estrogen-secreting FC.

**MATERIALS** - Eight cats of different breeds, ranging from 2 to 10 years of age, affected by FC were treated. Queens showed uninterrupted estrus lasting more than 4 weeks. The diagnosis of FC was performed by behavioral and clinical observations, vaginal cytology (>40% superficial cells and clearing of the background)<sup>2</sup>, plasma estradiol concentration (persistently higher than 20 pg/ml, evaluated twice at weekly intervals), ultrasonographic identification of follicles with a diameter larger than 2.5-3.5 mm<sup>3</sup>. Four queens were affected by a monolateral single FC, in 2 cats a single cyst was present in both ovaries, the remaining 2 subjects showed one and both polycystic ovaries respectively. A single hCG administration of 500 UI i.m. was performed in effort to luteinize the cysts and to stop the estrous behavior. A new clinical observation, including blood progesterone measurements if permitted, was performed one week later with the aim of monitoring luteal activity.

**RESULTS** - In 6 cats, hCG therapy was ineffective in FC treatment as it did not remit the estrual behavior. In 2 cats, the treatment induced partial thecal cell luteinization with an increase in blood progesterone, and a decrease in estradiol to basal values; therefore, these subjects developed pyometra about one month after hCG administration. One cat showed a transitory decrease in plasma estradiol concentration associated with a transitory disappearance of the estrous behavior. Six subjects underwent ovario-hysterectomy, while in 2 cats a monolateral ovariectomy was performed; afterwards each of the latter had a litter. Histopathological examination of ovaries revealed neither luteinization nor regression of FC in 6 cases; in the subjects affected by pyometra, FC showed partial wall luteinization.

**DISCUSSION** - Administration of hCG at the dosage used did not induce FC remission in all cases. The absence or partial response to hCG treatment could be due to ovarian status, to the prolonged hCG half-life, which may result in ovarian hyperstimulation, to the individual response to therapy. The surgical resection of cystic ovaries resulted in the queens going out of estrus. New therapeutic strategies are needed considering that hormonal disorders, together with environmental factors (such as stress) are suspected to be involved in this disease.

## CITOLOGIA TESTICOLARE PER AGOASPIRAZIONE NEL CANE E NEL GATTO

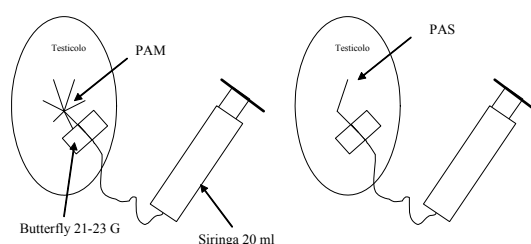
Stelletta C., Mollo A., Milani C., Tramontano A., Baccolini M., <sup>1</sup>Ferro S., Romagnoli S., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova;* <sup>1</sup>*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria*

**RIASSUNTO** - Sono stati considerati maschi adulti di cane (7 soggetti) e di gatto (8 soggetti) per effettuare un agoaspirato testicolare e individuare la migliore tecnica di colorazione e di piano di aspirazione. La colorazione differenziare di May-Grunwald Giemsa sembra essere preferibile utilizzando il piano di aspirazione singola, quando si classificano soggetti normospermici, per non incorrere in errori di identificazione cellulare.

**INTRODUZIONE** - I protocolli diagnostici per l'infertilità canina sono avanzati per quanto riguarda la femmina mentre per i maschi vengono riportati aspetti generali che possono essere riassunti in: esame fisico; valutazione del seme; valutazione dei parametri endocrini; biopsie testicolari; indici epididimali specifici e aspirazione epididimali<sup>1,2</sup>. Nonostante la possibilità della valutazione della motilità spermatica, attraverso l'utilizzo di strumenti d'analisi computerizzati<sup>3</sup>, alcune funzionalità testicolari, come l'andamento spermatogenetico, non possono essere testate se non ricorrendo alla biopsia. Le tecniche biotiche consigliate sono rivolte ad identificare l'integrità dell'epitelio seminifero ed in particolare la tecnica che più si adatta alle esigenze routinarie ambulatoriali è quella che prende in considerazione la citologia testicolare ottenuta per aspirazione con ago sottile (CTAAS) che risulta essere poco dolorosa, semplice e poco invasiva<sup>4,5,6</sup>. La possibilità di standardizzare la metodica potrà dare maggiore impulso alla diagnostica clinica dell'infertilità maschile nei piccoli animali. Oggetto del presente lavoro è stato quello di valutare la variabilità delle percentuali dei tipi cellulari testicolari in dipendenza del piano di aspirazione e della tipologia di colorazione utilizzata.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati considerati maschi adulti di cane (7 soggetti) e di gatto (8 soggetti) portati per l'intervento di orchietomia presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università di Padova. Previa sedazione si è proceduto all'aspirazione testicolare bilaterale utilizzando ago sottile butterfly (23G per i gatti e 21G per i cani) precedentemente raccordato a siringa da 20 ml per la pressione di aspirazione. L'ago è stato infisso in tutti i casi con una manovra rapida in una regione costante corrispondente al confine tra terzo medio e terzo anteriore dell'organo. I testicoli dei soggetti clinicamente sani sono stati inseriti in gruppi differenti di disegno sperimentale; alternativamente sono state effettuate aspirazioni su piani multipli (PAM) o piani singoli (PAS) (Figura 1). I vetrini immediatamente allestiti sono stati strisciati e colorati alternativamente con colorazioni differenziali May Grunwald- Giemsa e con Diff-Quick.

Figura 1 - Schematizzazione della tecnica di prelievo con ago sottile con Piano Multiplo (PAM) e singolo (PAS).



La lettura dei preparati è stata eseguita al microscopio ottico a piccolo ingrandimento (x100), a medio ingrandimento (x400), infine a maggiore ingrandimento (x1000) utilizzando un obiettivo ad immersione. I piccoli ingrandimenti sono stati utilizzati per identificare il grado di inquinamento ematico e/o la distribuzione delle cellule. L'individuazione di ogni tipologia cellulare appartenente alla serie spermatogenetica e delle cellule del Sertoli è stata effettuata in dipendenza delle caratteristiche morfologiche, sia nucleari sia citoplasmatiche, osservate al massimo ingrandimento. Per ogni preparato sono state contate consecutivamente non meno di 200 cellule della serie spermatogenetica che sono state suddivise in spermatogoni, spermatociti primari, spermatociti secondari, spermatidi ab, spermatidi cd e spermatozoi. Per ogni tipo cellulare è stata calcolata la relativa percentuale. La percentuale di spermatozoi rispetto al totale delle cellule spermatogenetiche è stata espressa come Indice Spermatico (SI). Il numero di cellule del Sertoli, contate separatamente, sono state espresse come rapporto con il totale delle cellule spermatogenetiche (Indice Sertoliano - SEI). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza, utilizzando il software statistico SIGMASTAT 2.03, considerando piano di aspirazione (PAM vs PAS) e colorazione degli strisci (May Grunwald-Giemsa vs Diff-Quick) come variabili indipendenti e le percentuali delle tipologie cellulari, SI e SEI come variabili dipendenti.

**RISULTATI** - Dalle aspirazioni sono stati ottenuti 198 vetrini con una media di  $4,88 \pm 2,8$  e  $2,44 \pm 1,23$  vetrini per il PAM ed il PAS rispettivamente. Le % di vetrini non leggibili, indipendentemente dalla colorazione effettuata, che risultavano non idonei alla lettura microscopica sono state del 20 % per entrambi le tipologie di piani di aspirazione. Le % delle singole popolazioni cellulari identificate sono riportate in tabella 1. L'unica differenza significativa riscontrata tra tipologie di piano di aspirazione è stata a carico del SEI che risulta sovrastimato con la colorazione in DQ quando si esegue la tecnica PAS. L'unica differenza di specie evidenziata è stata a carico delle % di spermatociti II variando da  $0,89 \pm 0,88$  a  $3,54 \pm 0,66$  per la specie felina e canina rispettivamente.

Tab. 1 - Percentuali delle cellule spermatogenetiche, indice spermatico (SI) e indice sertoliano (SEI) suddivise per piano di aspirazione.

		PAS	PAM
Spermatogoni	MGG	$1,40 \pm 0,59$	$0,81 \pm 0,28$
	DQ	$2,46 \pm 0,66$	$1,19 \pm 0,29$
Spermatociti I ordine	MGG	$0,86 \pm 0,54$	$0,83 \pm 0,25$
	DQ	$2,53 \pm 0,61$	$0,97 \pm 0,27$
Spermatociti II ordine	MGG	$3,22 \pm 1,81$	$1,88 \pm 0,84$
	DQ	$2,09 \pm 2,02$	$3,24 \pm 0,88$
Spermatidi Sab	MGG	$8,39 \pm 4,18$	$10,86 \pm 1,95$
	DQ	$7,73 \pm 4,67$	$10,93 \pm 2,04$
Spermatidi Scd	MGG	$10,75 \pm 4,55$	$15,93 \pm 2,12$
	DQ	$15,36 \pm 5,08$	$11,62 \pm 2,22$
SI	MGG	$75,38 \pm 7,70$	$69,68 \pm 3,59$
	DQ	$69,83 \pm 8,61$	$72,04 \pm 3,76$
SEI	MGG	$71,61 \pm 22,57$	$45,67 \pm 10,52$
	DQ	$117,27 \pm 25,24^*$	$41 \pm 11,01^*$

All'interno di ogni tipologia di colorazione (righe) la presenza di \* indica una differenza significativa con  $P < 0,05$ .

**DISCUSSIONE** - La tecnica diagnostica che prevede l'agoaspirazione testicolare con ago sottile utilizzata per identificare le cause di azoospermia canina è stata largamente usata con diverse procedure<sup>4,5</sup>. Tali procedure sono poco standardizzate in termini di piani di aspirazione e di colorazione. Nel presente lavoro si sono riscontrate % simili a quelle riportate in bibliografia per tutte le ipotesi testate tranne che per il valore di SEI valutato su vetrini in DQ con PAS. Tale % è riscontrabile in soggetti con problematiche di blocco spermatogenetico finanche sindrome a cellule del Sertoli. È di nostro avviso che la sovrastima del SEI con la tecnica suddetta sia da attribuire ad una errata classificazione di cellule appartenenti alla linea spermatogenetica (spermatociti I) dovuta ad una difficoltà di identificazione delle caratteristiche cellulari con la colorazione in DQ.

**CONCLUSIONI** - L'agoaspirazione testicolare con ago sottile è una tecnica utilizzabile per identificare le differenti classi cellulari spermatogenetiche. La colorazione MGG sembra essere preferibile utilizzando il PAS, quando si classificano soggetti normospermici, per non incorrere in errori di identificazione cellulare.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Olson S.D. Clinical approach for evaluating dogs with azoospermia or aspermia. *Veterinary Clinics of North of America – Small Animal Practice* 21:591-608 (1991). **2.** Larsen, R. E. Evaluation of fertility problems in the male dog. *Veterinary Clinics North of America - Small Animal Practice*. 7:735-745 (1977) **3.** Iguer Ouada, M. & Verstegen, J. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology*. 55:733-749 (2001) **4.** Dahlbom, M., Mäkinen, A., Suominen, J. Testicular fine needle aspiration cytology as a diagnostic tool in dog infertility. *Journal Small Animal Practice*. 38:506-512 (1997). **5.** Souza, F. F., Leme, D. P., Uechi, E., Trinca, A.L., Lopes, D.M. Evaluation testicular fine needle aspiration cytology and serum testosterone levels in dogs. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41:98-105 (2004). **6.** Foresta C. Citologia testicolare per agoaspirazione nella diagnostica dell'infertilità maschile. *Piccin-Nuova Libreria, Padova* (1993).

## TESTICULAR FINE NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY IN CAT AND DOG

Stelletta C., Mollo A., Milani C., Tramontano A., Baccolini M., <sup>1</sup>Ferro S.,  
<sup>1</sup>Romagnoli S., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova;* <sup>1</sup>*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria*  
Corresponding author: [calogero.stelletta@unipd.it](mailto:calogero.stelletta@unipd.it)

**Key word:** Testicular fine needle aspiration, dog, cat, aspiration planes, staining

Testicular biopsy can provide information on testicular function that cannot be obtained by any other method. Among testicular biopsy techniques, fine needle aspiration cytology (TFNAC) has proven to be a less painful, simple and minimally invasive procedure. It allows evaluation of cytological parameters of seminiferous epithelium and its clinical use in dogs has been reported to evaluate seminiferous epithelium. There were no negative effects on sperm quality after testicular biopsy. The possibility to standardize the method might provide a greater impulse to the clinical diagnostics of male dog infertility<sup>1,2</sup>. The aim of this study was to evaluate the percentage variability of testicular cellular types depending on the aspiration planes and on the type of staining. Adult males, 7 dogs and 8 cats, were used. All animals underwent surgery in order to perform orchietomy. After sedation a fine butterfly needle (23-gauge for cat and 21-gauge for dog) connected to a 20 ml-syringe was inserted into a testicle. Multiple plane aspirations (MPS) or single plane aspirations (SPA) were carried out. The withdrawal fluid was smeared, air-dried, stained with My Grunwald-Giemsa and with Diff-Quick and then examined under light microscopy x100, x400 and finally x1000 magnifications. At least 200 consecutive spermatogenic cells and the Sertoli cells between germ cells were counted on each smear and subdivided into spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, ab spermatids, cd spermatids and spermatozoa. The spermatozoa percentage was expressed as Spermatic Index (SI, the number of spermatozoa/ the number of total spermatogenic cells). The number of Sertoli cells, counted apart, was expressed as Sertoli Cell Index (SCI, the number of Sertoli cells/ the number of total spermatogenetic cells). A total of 198 slides were performed with an average of  $4.88 \pm 2.8$  and  $2.44 \pm 1.23$  slides for MPS and SPA respectively. The only significant difference between MPS and SPA was about SCI which is overestimated with Diff-Quick coloration when the SPA technique is performed. The only species difference was in the percentage of secondary spermatocytes ranging from  $0.89 \pm 0.88$  to  $3.54 \pm 0.66$  in cat and in dog respectively. In our study, a percentage comparable to that reported in bibliography was obtained in every hypothesis tested except for SCI values on Diff-Quick slides performed with SPA. This percentage is observable in subjects with spermatogenetic block and also Sertoli Cell Syndrome. The SCI overestimate with the above-mentioned technique might be attributable to a wrong classification of spermatogenetic cells (primary spermatocytes) due to a difficulty in identifying the cell characteristics with Diff-Quick staining. Testicular fine needle aspiration is a technique capable of identifying the different spermatogenetic cell classes. The May-Grunwald Giemsa stain seems to be better when using SPA technique when normospermic subjects are classified with the aim of avoiding cell identification mistakes.

**References** - 1. Dahlbom, M.; Mäkinen, A.; Suominen, J. Testicular fine needle aspiration cytology as a diagnostic tool in dog infertility. *Journal Small Animal Practice*. 38:506-512 (1997). 2. Souza, F. F., Leme, D. P., Uechi, E., Trinca, A.L., Lopes, D.M. Evaluation testicular fine needle aspiration cytology and serum testosterone levels in dogs. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41:98-105 (2004).



## CICLO ESTRALE DELLA CAGNA: RILIEVI VIDEOCOLPOSCOPICI

Minoia G., Rizzo A. Trisolini C., Mutinati M., Spedicato M., Roscino M.T., Sciorsci R.L., *Dipartimento di Produzione Animale, Università di Bari.*

**Parole chiave:** videocolposcopia, ciclo estrale, gravidanza, cagna.

**RIASSUNTO** - L'esame videocolposcopico, in medicina umana, permette di evidenziare patologie vaginali e cervicali. Obiettivo del presente lavoro è quello di valorizzare l'utilizzo del videocolposcopio anche nella clinica ostetrica del cane. Grazie all'utilizzo del videocolposcopio correlato ad opportuni test diagnostici, è stato possibile evidenziare variazioni di aspetto e colorazione della cervice riferibili alle diverse fasi del ciclo estrale e della gravidanza. Lo studio pone le basi per applicazioni successive atte ad individuare patologie cervicali che possano eventualmente compromettere la fertilità della cagna.

**INTRODUZIONE** - La videocolposcopia è un'evoluzione della colposcopia classica, essa prevede l'acquisizione di diversi fotogrammi mediante un sistema di video-acquisizione, durante l'osservazione della vagina e della cervice<sup>1,2</sup>. L'esame computerizzato dei fotogrammi consente una migliore definizione delle aree patologiche e l'eventuale evoluzione nelle visite colposcopiche successive<sup>2,3</sup>. Obiettivo del presente lavoro è constatare la validità dell'utilizzo di un videocolposcopio umano nella clinica ostetrica del cane, poiché sinora gli unici rilievi colposcopici nel cane sono stati eseguiti mediante proctoscopia pediatrica, cistoscopia o endoscopia flessibile<sup>4,5</sup>.

**MATERIALI E METODI** - Oggetto del nostro studio sono state 15 cagne di diverse razze, pervenute alla nostra osservazione con richiesta esplicita da parte del proprietario di sterilizzazione chirurgica. I soggetti avevano un'età compresa tra 1-5 anni ed una taglia fra 20 e 30 Kg.

Escluse eventuali patologie cliniche e subcliniche le cagne sono state sottoposte alla valutazione del ciclo estrale tramite dosaggio del progesterone ematico con test ELISA semiquantitativo (Ovulation Test<sup>®</sup>, Bio Vet Test, Francia; sensibilità 74%, specificità 97%) e valutazione colpocitologica di un tampone vaginale, colorato con Diff-Quick. Si è proceduto, inoltre, all'esame ecografico (ecografo SonoAce PICO Mycolor 2002<sup>®</sup>-Medison Co., Korea con sonda microconvex da 7,5 MHz), per valutare l'eventuale epoca di gestazione in relazione a parametri fetali<sup>6</sup>.

Conclusa la fase preliminare, previo digiuno di 24 ore, le cagne sono state anestetizzate, mediante: *premedicazione* con Acepromazina maleato 0.05 mg/Kg (Prequillan p.a.<sup>®</sup>, FATRO, Italia) associata ad Atropina Solfato 0.03 mg/Kg (Atropina Solfato<sup>®</sup>, ATI, Italia) i.m.; *induzione* con Ketamina cloridrato 5 mg/kg (Ketavet 100<sup>®</sup>, Intervet, Italia) associata a Diazepam (Diazepam 0.5%<sup>®</sup>, Intervet, Italia) alla dose di 0.25 mg/Kg e.v.; *mantenimento* con Isoflurano 1.5% (Isoba<sup>®</sup>, Shering Plough, Milano-Italia) in O<sub>2</sub>. Successivamente si è proceduto, prima dell'intervento chirurgico, all'esame videocolposcopico secondo le seguenti fasi:

- decubito laterale sinistro e introduzione dello speculum cilindrico di materiale plastico, opportunamente lubrificato, di diametro variabile (1; 1,4; 1,8 cm);
- lavaggio dell'esocervice con soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) mediante introduzione di un catetere, per rimuovere il muco cervicale in eccesso ed eventuali impurità;
- visione "a fresco" della cervice, per mezzo di un videocolposcopio (Centrel K 450<sup>®</sup>, Italia), collegato ad un monitor ad alta risoluzione (Trinitron<sup>®</sup> Sony, Giappone) e ad un sistema di videoacquisizione VHS (Sharp VC-GH600SM<sup>®</sup>, Germania). La conformazione anatomica dell'esocervice è stata valutata ai seguenti ingrandimenti: x6; x16; x 25 e x40;

- esecuzione del “*test all’acido acetico*”, con l’applicazione di una soluzione di acido acetico al 3% (Acet Acid<sup>®</sup>, Biochemika, Germania) sull’esocervice tramite catetere. Successivamente, si provvede al drenaggio del liquido in eccesso e dopo circa 40 secondi dall’applicazione si effettua la valutazione videocoloscopica. L’intensità della reazione è direttamente proporzionale al grado di atipia cellulare, che è a sua volta in relazione all’alta densità nucleare ed alla elevata concentrazione dei filamenti di cheratina<sup>2</sup>;
- esecuzione del “*test di Schiller*”, mediante applicazione della soluzione iodata di Lugol (Lugol’s reagent<sup>®</sup>, Carlo Erba, Italia) sull’esocervice. Dopo 1-2 minuti si allontana il liquido in eccesso con un blando lavaggio con soluzione fisiologica (NaCl 0,9%), e quindi si esegue la videocoloscopia. L’intensità della colorazione è proporzionale alla concentrazione di glicogeno negli strati superficiali della mucosa<sup>2</sup>.

Dopo tutte le operazioni si effettua un lavaggio finale con abbondante soluzione fisiologica (NaCl 0,9%). Il video VHS acquisito durante la videocoloscopia è stato digitalizzato e successivamente processato, ricavando i fotogrammi salienti delle diverse fasi, messi poi a confronto.

**RISULTATI e DISCUSSIONE** - L’esame videocoloscopico è stato eseguito con successo in 15 soggetti, con un tempo medio di esecuzione, dall’introduzione dello



Foto 1 - Cervice di cagna in inizio proestro (40x)



Foto 2 - Cervice di cagna in estro (40x)



Foto 3 - Cervice di cagna in fine estro (40x)



Foto 4 - Cervice di cagna in diestro (40x)

speculum alla rimozione dello stesso, di 15±5 minuti. Le cagne esaminate sono state così suddivise: *inizio proestro*: 2 soggetti; *estro*: 2 soggetti; *fine estro*: 2 soggetti; *diestro*: 3 soggetti; *anestro*: 2 soggetti; *40° giorno di gravidanza*: 2 soggetti; *post-partum*: 2 soggetti. Dai fotogrammi, dell’esame “*a fresco*”, appare evidente la differenza essenziale esistente nella conformazione della cervice nelle diverse fasi esaminate. Si osserva un diverso grado di edema ed iperemia della cervice, in relazione alla condizione ormonale del ciclo estrale<sup>7</sup>. Nella foto 1 si rileva una cervice all’inizio del proestro, con iniziale raggrinzimento della superficie, legato all’incremento degli estrogeni<sup>4</sup>. Il test dell’acido acetico non

mette in risalto nulla, mentre col test di Schiller si notano aree periferiche colorate in relazione ad un aumento del glicogeno all’interno delle cellule. In fase estrale (foto 2) si osserva inizialmente l’aumento di spessore delle pliche che appaiono notevolmente edematose in concomitanza della fase di *crenulation* della mucosa vaginale<sup>4</sup>. Alla fine dell’estro (foto 3) in seguito al picco dell’LH si può notare una riduzione di spessore delle pliche per il calo progressivo degli estrogeni. Con il test dell’acido acetico si riscontra una minima colorazione. Il muco cervicale, evidenziabile in questa fase,

assume una caratteristica schiumosità in seguito al contatto con l'acido acetico<sup>7</sup>. Il test di Schiller presenta scarsa attività colorante specie in estro conclamato, ascrivibile al notevole grado di idratazione cellulare che diluisce il glicogeno intracitoplasmatico<sup>7</sup>. Nel primo terzo di diestro (foto 4) si notano a fresco, prima del lavaggio iniziale, tracce



Foto 5 - Cervice di cagna in anaestro (40x).



Foto 6 - Cervice di cagna al 40° giorno di gravidanza (40x).



Foto 7 - Cervice di cagna nel postpartum (40x).

di muco cervicale. Il test dell'acido acetico evidenzia una discreta colorazione correlata all'involuzione cervicale, con riduzione dell'elasticità e deposito di filamenti di cheratina<sup>4,7</sup>. Il test di Schiller ci permette di valutare una blanda colorazione diffusa che si intensifica a livello di confine delle pliche cervicali. A fine anestro (foto 5), si osservano piccole pliche cervicali, con una discreta affinità all'acido acetico, mentre il test di Schiller determina notevole attività colorante alla periferia della cervice. Al 40° giorno di gravidanza (foto 6), si osservano ampie pliche cervicali, che risultano notevolmente edematose, scarsamente reattive all'acido acetico, mentre peculiare è la risposta al test di Schiller, che permette l'osservazione di una colorazione a macchie di leopardo, cioè aree notevolmente colorate con Lugol alternate ad aree che non lo adsorbono. Al 30° giorno dal parto (foto 7), si osserva una cervice dilatata, con grandi pliche cervicali e un medio grado di idratazione; alla reazione dell'acido acetico si denota una buona risposta al colorante, ascrivibile alla notevole atipia cellulare, conseguenza degli importanti rimaneggiamenti cervicali<sup>7</sup>. A conferma di ciò si osserva con il test di Schiller una scarsa attività colorante, confinata ad aree ben precise tra le pliche cervicali.

**CONCLUSIONI** - La valutazione della cervice ci ha permesso di correlare precisi cambiamenti macroscopici della stessa ai profili ormonali delle diverse fasi del ciclo estrale. Lo studio pone le basi per applicazioni successive atte ad approfondire l'utilizzo del videocolposcopio nella clinica ostetrica del cane, così, da poter individuare eventuali patologie cervicali che ne possano compromettere la fertilità.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. van Niekerk W.A. et al. Colposcopy, cervicography, speculscopy and endoscopy. *Acta Cytol.*; 42 (1): 33-49 (1998). 2. Ritter J., Baldauf J.-J. Principi di tecnica colposcopica. In: Prendiville W., Ritter J., Tatti S.A., Twiggs L.B. "Colposcopia Clinica e Terapia", Ed. Elsevier - Masson, Milano. pp. 55- 56 (2004). 3. Ferris D.G., Litaker M. Interobserver agreement for colposcopy quality control using digitized colposcopic images during the ALTS trial. *J. Low. Genit. Tract. Dis.*; 9 (1): 29-35 (2005). 4. Feldman E.C., Nelson R.W. Endocrinologia e riproduzione del cane e del gatto. Ed. UTET, Torino (1998). 5. Wilson M.S. Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*; 31 (2): 291-304 (2001). 6. Nyland T.G., Mattoon J.S. Small animal diagnostic ultrasound. Ed. Elsevier - Saunders, Philadelphia. pp. 37-246 (2002). 7. Milam M.R., Pollock J.W., Nick A.M., Scott T., Jones H.W. The effect of hormonal contraception on the adequacy of colposcopic examination of the cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.*; 192 (5): 1368-1369 (2005).

## OESTROUS CYCLE IN THE BITCH: VIDEO-COLPOSCOPIC PROFILES

**Minoia G., Rizzo A., Trisolini C., Mutinati M., Spedicato M., Roscino M.T., Sciorsci R.L.,** *Department of Animal Production, University of Bari*  
*E-mail address: r.sciorsci@veterinaria.uniba.it*

**Key words:** Video-colposcopy, oestrous cycle, pregnancy, bitch.

Video-colposcopy is a recent diagnostic technique (employed in human medicine) integrating classic colposcopy with a system allowing for the dynamic registration and the collection of vaginal and cervical images<sup>1</sup>. This study aims to test the efficacy of a human video-colposcope in canine obstetrics.

Fifteen healthy bitches, aged 2-5 years and weighing 20-30 Kg, brought to our Department for spaying, were enrolled for this purpose. Dosage of blood progesterone (Ovulation Test<sup>®</sup>, Bio-Veto Test, France; sensibility 74%, specificity 97%), the evaluation of a vaginal smear and ultrasonography helped estimate the phase of the oestrous cycle or the gestational age of each bitch. All subjects were anaesthetized and placed in left decubitus. A cylindrical speculum was introduced into the vagina, the exo-cervix was washed with saline solution (NaCl 0.9%) and a catheter was placed for mucus drainage. The cervix was visualized using a videocolposcope (Centrel K 450<sup>®</sup>, Italy), connected to a monitor at high resolution (Trinitron<sup>®</sup> Sony, Japan) and to a VHS system for image acquisition (Sharp VC-GH600SM<sup>®</sup>, Germany). Soon after, a solution of acetic acid (3%) (Acet Acid<sup>®</sup>, Biochemica, Germany) was applied to the exo-cervix and removed after 40 seconds, before visualizing the cervix (*Acetic Acid test*). Finally, a Lugol solution (Lugol's reagent<sup>®</sup>, Carlo Erba, Italy) was applied to the exo-cervix and washed out with saline solution after 1-2 minutes, before visualizing the cervix again (*Schiller test*). Video-colposcopy was successfully performed on the 15 bitches (2 in proestrus; 2 in oestrus; 2 in late oestrus; 2 in diestrus; 3 in anestrus; 2 on the 40<sup>th</sup> day of pregnancy; 2 in postpartum). Proestral cervixes showed a light wrinkling of the folds, due to the increase in estrogens, whereas the Schiller Test evidenced orange-brownish marginal areas, related to the rise in glycogen. At mid oestrous, the cervical folds thickened, whereas they start to flatten at the end of oestrous. In this phase, the Acetic Acid test induced a foamy aspect of the vaginal lumen, due to the presence of mucus, whereas a scarce coloration occurred with the Schiller test, due to the increasing dilution of glycogen content. Diestral cervixes showed a slight mucous aspect at first, whereas they became quite coloured after both Acetic Acid and Schiller tests (more marginally, in the latter), due to the growing presence of fibrin, following the onset of cervical involution. This staining affinity increases in the marginal areas of anestrus cervixes, with the Schiller test. Pregnant cervixes showed wide edematous folds, with a typical spotted aspect, at Schiller test. Postpartum cervixes showed a high staining affinity at the Acetic Acid test, due to the presence of atypical cells following the strong cellular changes induced by pregnancy and parturition, whereas a low staining affinity was observed with the Schiller test. This study demonstrates the efficacy of using a human video-colposcope in detecting the typical colposcopic aspects of canine cervix, in all the phases of the oestrous cycle and during pregnancy. Our results constitute a starting point for further investigations, in order to better define the colposcopic features of the canine healthy vagina and cervix.

**REFERENCES - 1.** Ritter J., Baldauf J.-J. Principi di tecnica colposcopica. In: Prendiville W., Ritter J., Tatti S.A., Twiggs L.B. "Colposcopia Clinica e Terapia", Ed. Elsevier - Masson, Milano. pp. 55- 56 (2004).

## **UNA MANGANESE SUPEROSSIDO DISMUTASI RICOMBINANTE (RMNSOD), DI ORIGINE UMANA, COME MARKER TUMORALE PER NEOPLASIE MAMMARIE CANINE ESTROGENO-POSITIVE (ER<sup>+</sup>) ; STUDI PRELIMINARI**

**Sica A., Russo M., Cocchia N., Tortora G.,** *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Sezione Clinica Ostetrica e Ginecologica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli "Federico II", Via F. Delpino, 1 – 80137 Napoli; tel. +39 +81 2536017; fax. +39 +81 2536019; e-mail: sandrosica@virgilio.it*

**Parole chiave:** Cagna, neoplasia mammaria, marker tumorale, rMnSod, PET

**RIASSUNTO** - Nel presente lavoro viene studiato l'utilizzo diagnostico di un'isoforma ricombinante di una superossidodismutasi isolata da liposarcoma umano (rMnSod), utilizzabile come marker tumorale per neoplasie mammarie canine sovraesprimenti recettori per estrogeni.

Le capacità citostatiche e selettive Er<sup>+</sup> di tale proteina sono state valutate in esperimenti prima "in vitro" prima su colture cellulari "MCF-7", poi e "in vivo" poi. In questo lavoro vengono descritte le pratiche diagnostiche e l'utilizzo della proteina marcata con Gallio 68 in cinque cagne sottoposte ad indagine PET di cui si è voluto dimostrare la captazione neoplastica della molecola.

**INTRODUZIONE** - Il cane è la specie domestica maggiormente colpita da processi morbosi a carattere neoplastico e tra questi, i tumori della componente epiteliale delle ghiandole mammarie (carcinomi e adenocarcinomi) rappresentano quelli di più frequente riscontro negli individui di sesso femminile. Peraltro, le evidenti similitudini con l'oncologia umana, sia in termini eziopatogenetici (induzione ormono-attiva<sup>1</sup> e neoangiogenesi), che evolutivi (metastasi polmonari<sup>2</sup> e linfoascellari/mediastiniche<sup>3</sup>), permettono studi paralleli uomo/cane di protocolli tanto diagnostici quanto terapeutici, utilizzabili in entrambe le specie.

Attualmente, l'attenzione degli oncologi è rivolta alla ricerca di molecole capaci di interagire in maniera selettiva con le cellule maligne e con strutture specifiche su di esse presenti, in modo da potersi utilizzare come "markers" tumorali prima e come antineoplastici efficaci poi. In tal senso, sia i tumori al seno della donna che i carcinomi mammari della cagna, sono nella stragrande maggioranza dei casi ormono-attivi<sup>4</sup> e l'isolamento di proteine, capaci di interagire coi recettori per estrogeni e progesterone<sup>5</sup> presenti sulla membrana cellulare dei citotipi maligni, può rappresentare di grande ausilio nella diagnosi e nel trattamento di tali lesioni.

Da quanto esposto risulta evidente che nell'approccio alla patologia neoplastica la collaborazione tra medici veterinari e medici chirurghi riveste un ruolo fondamentale. Da un lato infatti si ha un modello eziopatogenetico, clinico e prognostico molto simile a quello umano ma con un'incidenza circa tre volte superiore e una velocità di crescita, rapportata anche alla durata complessiva di vita, molto maggiore e dall'altro la possibilità di usufruire di apparecchiature e strumenti d'avanguardia che permettono uno "staging" ed un inquadramento diagnostico completo.

**MATERIALI E METODI** - Nel presente studio sono state valutate cinque cagne di età compresa tra 6 e 14 anni, peso variabile da 4 a 25 kg, appartenenti alle razze York Shire Terrier (2), Bretone (1), Pastore Tedesco (1), Meticcio (1), tutte presentate alla visita presso l'ambulatorio della sezione ostetrico-ginecologica del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie della Facoltà di Napoli per la presenza di neoformazioni mammarie di dimensioni e localizzazione variabili. Ciascuna di esse è stata sottoposta



ad esame clinico completo con particolare riferimento alle ghiandole mammarie e “screening” ematologico.; Per l’inquadramento diagnostico, ogni soggetto è stato sottoposto ad agoaspirato delle lesioni mammarie, indagine ultrasonografica transaddominale con sonde lineari da 7,5 MHz, valutazioni X-grafiche del torace in tripla proiezione (latero-laterale destra e sinistra, ventro-dorsale). In uno dei pazienti (meticcio), in cui per via ecografia sono state individuate delle lesioni proliferative in sede epatica, è stato effettuato un prelievo biptico ecoguidato dalle summenzionate formazioni.

Per uniformare gli esperimenti, i soggetti sono stati sottoposti ad indagine colpocitologica con prelievo vaginale di tampone non sterile, rotolamento su vetrino, colorazione con Hema-Color e lettura con microscopio ottico a 100x.

Le determinazioni sperimentali riguardanti la rMnSod sono state condotte iniettando 500 $\mu$ Ci di <sup>68</sup>Ga legato 30  $\mu$ g di rMnSod nella vena cefalica di ogni soggetto; tre ore dopo i pazienti sono stati sedati con Medetomidina (10  $\mu$ g/kg im) e posizionati in decubito laterale destro.

Le scansioni sono state acquisite con un Tomografo- P.E.T. Siemens ECAT 2D mode con ricostruzioni delle immagini nei piani ortogonali ed un numero di “bed-step” (spostamenti del lettino) sufficienti a coprire l’intera superficie del corpo.

**RISULTATI** - Tutti i pazienti selezionati si sono dimostrati arruolabili in questo studio.; I profili ematologici non mostravano clamorose variazioni rispetto ai “range” di normalità e la fase anestrata del ciclo riproduttivo veniva dimostrata dall’assenza pressochè completa di cheratinizzazione vaginale al momento della PET.

Tutti i soggetti sottoposti ad indagine PET-tomografica hanno mostrato una spiccata emissione in sede mammaria con una notevole captazione del radiofarmaco marcato a rMnSod rispetto a tutti gli altri tessuti non sovraesprimenti recettori Estrogeno +. Le lesioni nodulari sono state evidenziate in maniera netta e dettagliata con una palese enfattizzazione del tessuto neoplastico rispetto a quello mammario non patologico. In un soggetto meticcio di 14 anni cui per via ultrasonografica erano state descritte lesioni nodulari epatiche (poi biopsate e diagnosticate come lesioni secondarie da carcinoma mammario anaplastico), notevole è risultata la captazione del radiofarmaco a livello d’organo e l’“imaging” conseguente ha mostrato formazioni nodulari multiple. La presenza in sede extramammaria di cellule neoplastiche sovraesprimenti recettori ES+, e la conseguente captazione della molecola evidenziata con lo “stage-imaging”, ha ulteriormente rimarcato il tropismo della proteina per tali condizioni e la sua capacità di concentrarsi nelle sedi dove il processo si manifesta.

**DISCUSSIONE** - I soddisfacenti risultati ottenuti suggeriscono ulteriori investigazioni su una più ampia casistica di soggetti e situazioni da definire, cosa peraltro già in atto presso l’Istituto “Pascale” su animali padronali selezionati presso l’ambulatorio di Ostetricia della Facoltà di Medicina Veterinaria. Stiamo inoltre ipotizzando l’utilizzo della rMnSod in differenti protocolli diagnostici come veicolo di markers o mezzi di contrasto con cui mettere in risalto lesioni neoplastiche<sup>6</sup> “in situ” per diagnosi precoci sia nell’uomo che negli animali domestici; riteniamo in aggiunta che la specificità della proteina per le cellule tumorali estrogeno positive<sup>7</sup> possa essere sfruttata per veicolare fin dentro le cellule stesse sostanze citotossiche (o anche beta-emittenti) al fine di indurre necrosi selettiva in sede cancerosa.

Inoltre, auspichiamo per il futuro un utilizzo della molecola in altri settori di diagnostica per immagini e nello specifico in ecografia, dove potrebbe essere utilizzata come carrier di mezzo di contrasto per diagnosi precoce di tumore mammario in caso lesione “in situ” grazie alla selettività sulle sole cellule neoplastiche ES+.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. J A Mol, E van Garderen, P J Selman, J Wolfswinkel, A Rijnberk, and G R Rutteman (1995) Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. 2. I. Tiemessen (1989) "Thoracic metastases of canine mammary gland tumors" *Veterinary Radiology & Ultrasound* Volume 30 Issue 6 Page 249. 3. T. Pereira, S. C. Rahal, C. de Carvaglio, M. Ribeiro (2003) "Lymphatic Drainage on Healthy and Neoplastic Mammary Glands in Female Dogs" *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C* Volume 32 Issue 5 Page 282. 4. Riganti JC, (2001) "Risk of presenting ovarian alterations in bitches with mammary tumors" *WSAVA*. 5. Elling H, Ungemack FR (2004) "Simultaneous occurrence of receptors for estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone in canine mammary tumors" *Journal of cancer research and clinical oncology*. 6. T. Pereira, S. C. Rahal, C. de Carvaglio, M. Ribeiro (2003) "Lymphatic Drainage on Healthy and Neoplastic Mammary Glands in Female Dogs" *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C* Volume 32 Issue 5 Page 282. 7. A. Nieto, L. Peña, M. D. Pérez-Alenza, M. A. Sánchez, J. M. Flores and M. Castaño (2000) "Immunohistologic Detection of Estrogen Receptor Alpha in Canine Mammary Tumors: Clinical and Pathologic Associations and Prognostic Significance" *Vet Pathol* 37:239-247.

**A RECOMBINANT MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE (RMNSOD) ACTING AS A SPECIFIC AND SELECTIVE TUMOR MARKER FOR IMAGING ANALYSIS IN ER<sup>+</sup> CANINE BREAST CANCER. PRELIMINARY STUDIES.**

**Sica A., Russo M., Cocchia N., Tortora G.,** *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Sezione Clinica Ostetrica e Ginecologica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli "Federico II", Via F. Delpino,1 – 80137 Napoli; tel. +39 +81 2536017; fax. +39 +81 2536019; e-mail: sandrosica@virgilio.it*

**Key words:** Bitch, breast cancer, tumoral marker, rMnSod, PET

An MnSOD with oncotoxic property was isolated from the culture medium of a pleiomorphic liposarcoma cell line (LSA) and obtained in recombinant form (rMnSOD) near Department of Molecular Biology and Biotechnology from National Cancer Institute "G. Pascale" Naples.

The in vitro Pharmacology studies have confirmed that the rMnSOD is oncotoxic only for cancer cells expressing estrogen receptors<sup>1</sup> and its activity was directed to transform free radicals into hydrogen peroxide<sup>2</sup>.

Administering to patients a molecule like rMnSod, that shows a high selectiveness for cancerous cells expressing estrogen receptors and is not oncotoxic for normal mammary tissue cells, we can obtain very important information about both tumoral breast masses and organic secondary lesions; in fact, we can use this protein as carrier for contrast mediums in different diagnostic procedures. Furthermore, if the recombinant Manganese SuperOxide Dismutase is uptaken by only neoplastic cells we can differentiate tumoral from other nature lesions, by labelling protein with a beta-emitting substance<sup>3</sup>.

Aim of this work is to evaluate the selectiveness of labelled protein for neoplastic ES+ cells and its availability to carrier isotope into neoplastic masses as diagnostic and prognostic factor in canine mammary gland tumors. In this study, we evaluated mammary cancer in five intact female dogs by total body PET-TAC imaging using rMnSod labelled with <sup>68</sup>Ga to establish its specificity and selectiveness grade. By radioactive capture and emission, we have established the entity of tumoral uptake. Lesions put in evidence by diagnostic imaging, have been also evaluated with cytological and histological examination to confirm neoplastic nature.

**References** - 1. W. Shao, M. Brown. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* (2004); 6(1): 39–52. 2. Mancini, A. et al., Tumor Suppressive Activity of a Novel Isoform of Mn-Superoxide Dismutase Released by a Human Liposarcoma Cell Line. *Int. J. of Cancer* (2006). 3. Schellingerhout D, Accorsi R, Mahmood U, Idoine J, Lanza RC, Weissleder R. Coded aperture nuclear scintigraphy: a novel small animal imaging technique. *Mol. Imaging* (2002); 1(4):344-53.



## **URETROPLASTICA CON LEMBO DI MUCOSA BUCCALE PER LA CORREZIONE DI UNA STENOSI URETRALE IN UN CANE RIPRODUTTORE**

**Zambelli D., Cunto M., Raccagni R., Regazzini M.,** *Dipartimento Clinico Veterinario, Università degli Studi di Bologna*

**Parole Chiave:** uretroplastica, stenosi uretrale, cane, riproduzione, mucosa buccale

**RIASSUNTO** - Un cane di 3 anni, maschio intero, barbone gigante è stato presentato alla visita per problemi di disuria. Un'urografia ascendente ha permesso di diagnosticare una stenosi uretrale a livello d'uretra peniena, complicanza di un'uretrotomia subita precedentemente. Per conservare le sue potenzialità riproduttive, la stenosi è stata risolta mediante uretroplastica utilizzando un lembo di mucosa buccale. Nel follow-up chirurgico non si sono presentate complicazioni e il problema iniziale di disuria è stato risolto. La valutazione morfologica del materiale seminale, eseguita quattro mesi dopo l'intervento, ha mostrato come la pratica chirurgica non abbia influenzato negativamente i parametri quantitativi e qualitativi dell'ejaculato.

**INTRODUZIONE** - Le cause di stenosi uretrale sono molteplici: infiammatorie, post-traumatiche, difetti congeniti quali l'ipospadia, complicanze d'interventi chirurgici, manovre strumentali sull'uretra, neoplasie. Nell'uomo altre cause sono: lichen sclerosus, malattie veneree e stenosi su base ischemica, presenti nel 22% dei soggetti che hanno subito un intervento cardiocirurgico che richiede la circolazione extracorporea. In presenza di stenosi uretrale nell'uomo si ricorre o all'uretrotomia endoscopica o all'uretroplastica. La tecnica endoscopica è rapida ma presenta una percentuale di successo <20% per l'alto tasso di recidive<sup>1</sup>. L'uretroplastica può essere di due tipi: una plastica uretrale di anastomosi, quando la stenosi non è marcata, o in caso di stenosi di maggiori dimensioni, si ricorre all'utilizzo di un innesto per ristabilire un'adeguata continuità uretrale e la persistenza di un lume di calibro normale. In medicina umana la mucosa buccale è il tessuto utilizzato di routine come innesto libero, ed ha sostituito l'impiego della cute peniena che non sempre viene accettata dal paziente poiché implica la circoncisione<sup>1</sup>. In medicina veterinaria, dove all'aspetto psicologico del soggetto non è dato rilievo quanto in umana, per la correzione di stenosi uretrale si ricorre di routine ad uretrotomia, intervento che ostacola gravemente le potenzialità riproduttive del soggetto, invalidandole permanentemente se associato alla castrazione. Negli ultimi anni alcuni tentativi d'uretroplastica con diverse tipologie d'innesto sono stati eseguiti a scopo sperimentale su cani, al fine di valutare quale potesse risultare il migliore sostituto della mucosa uretrale in questa specie<sup>2</sup>. Nei diversi lavori sperimentali, dopo aver creato una lesione a carico dell'uretra asportandone una parte ed aver eseguito l'uretroplastica, è stato valutato l'esito dell'intervento sull'animale in vivo e dopo eutanasia, al fine di esaminare le caratteristiche anatomoistopatologiche del trapianto. In letteratura non si riporta alcun intervento di plastica uretrale eseguito a scopo curativo per conservare le potenzialità riproduttive del soggetto e la funzionalità dell'organo. Risultati positivi sono stati ottenuti sperimentalmente sul cane, ricorrendo all'uso di trapianti di mucosa del colon, per risolvere stenosi uretrali complesse e di dimensioni notevoli<sup>4</sup>. La fascia lata, utilizzata sempre in via sperimentale come innesto nel cane, si è rivelata istologicamente e funzionalmente simile al tessuto uretrale d'origine ed il suo impiego non ha mostrato complicazioni nel postoperatorio<sup>2</sup>. La comparazione sperimentale di tre tecniche d'uretroplastica utilizzando rispettivamente come trapianto la cute, la mucosa vescicale e la mucosa buccale ha messo in evidenza come con quest'ultima tipologia d'innesto si ottengano i risultati più soddisfacenti<sup>3</sup>. La

mucosa buccale è più facilmente e rapidamente ottenibile rispetto la mucosa vescicale ed i tessuti precedentemente citati. La plastica uretrale con lembo di mucosa buccale è associata alle minori percentuali di stenosi post-operatorie, ad uno scarso grado d'infiammazione e fibrosi, mostrando uno spessore del trapianto persistentemente uniforme ed una buona stabilità nel follow-up chirurgico. Anche il lembo di cute è facilmente ottenibile, ma il suo utilizzo ha comportato notevoli complicanze quali infiammazione, infiltrazione fibroblastica, irregolarità nello spessore dell'innesto accompagnata da aree d'atrofia ed una marcata contrazione dell'innesto nel 30-40% dei casi<sup>3</sup>. Altri tentativi d'intervento, ma senza particolari vantaggi, si sono avvalsi dell'uso di sottomucosa intestinale nel coniglio e di pericardio bovino<sup>5</sup>.

**MATERIALI E METODI** - Un cane maschio, barbone gigante, di 3 anni è stato presentato alla visita con un'anamnesi di disuria, conseguente a un precedente intervento d'uretrotomia per la rimozione di un calcolo uretrale. Tale disuria era stata trattata dal veterinario curante con un cateterismo giornaliero. La visita clinica, ha permesso di riscontrare una diminuzione di diametro dell'uretra peniena, evidenziata dalla difficoltà di passaggio di un catetere urinario da 2,6 mm, e la presenza di una piccola fistola fra l'uretra e la cute nel punto in cui era stata eseguita l'uretrotomia. Dalla fistola fuoriusciva un filo di sutura non riassorbibile. Nella stessa occasione un esame ecografico, che ha escluso la presenza d'anomalie a carico della prostata e dei testicoli. Un'urografia ascendente, eseguita utilizzando una dose complessiva di 15 ml di mezzo di contrasto iodato (iodixanolo- Visipaque 320), ha messo in evidenza una stenosi uretrale di grado moderato con riduzione del diametro dorso-ventrale dell'organo. Poiché il proprietario desiderava conservare le potenzialità riproduttive del cane, è stata proposta un'uretroplastica per la risoluzione della stenosi uretrale. Considerato il grado di disuria presentata dall'animale, è stato applicato un catetere uretrale di Foley permanente fino al momento dell'intervento, onde evitare ritenzione urinaria. Una terapia antibiotica con Marbocyl® è stata iniziata il giorno precedente l'intervento e continuata per 25 giorni. Il profilo preoperatorio completo e l'esame delle urine sono risultati nella norma. La premedicazione è stata eseguita con acepromazina (1,5 mg/kg i.m. - Prequillan®-Fatro) mentre l'anestesia è stata indotta con propofol (2 mg/kg e.v. - Rapinivet®-Merial) e mantenuta in anestesia gassosa con isoflurano (2%). Butorfanolo è stato somministrato prima e alla fine dell'intervento (0,1 mg/kg e.v. - Dolorex®-Intervet). Durante l'intervento il soggetto è stato sottoposto a fluidoterapia. Al paziente, in decubito dorsale, è stato applicato un catetere uretrale 10F per facilitare l'identificazione e la dissezione dell'uretra ed il campo operatorio è stato preparato in maniera asettica. È stata eseguita un'incisione cutanea ellittica di circa 5 cm in corrispondenza della parte d'uretra stenotica. Asportato l'abbondante tessuto fibroso, esito del precedente intervento, si è proceduto con l'isolamento dell'uretra mediante dissezione dai tessuti sovrastanti. È stata effettuata un'incisione sul tratto uretrale stenotico, poi allargata cranialmente e caudalmente per circa 1 cm sull'uretra normale. A livello del labbro superiore sinistro è stato asportato un lembo libero di mucosa buccale di circa 4 x 0,8 cm. Dopo curettage della sottomucosa buccale il lembo è stato suturato con monofilamento riassorbibile 5/0 in corrispondenza dell'incisione uretrale. Una sutura continua è stata utilizzata ai lati della soluzione di continuo mentre all'estremità craniale e caudale della breccia si sono applicati alcuni punti di sutura staccati. È stata eseguita la sutura del sottocute e della cute. Nel postoperatorio è stato applicato un catetere uretrale di Foley per 30 giorni.

**RISULTATI** - Il cane ha risposto bene all'intervento iniziando ad alimentarsi senza dolore fin dal giorno successivo. Due giorni dopo la plastica uretrale la ferita appariva nella norma ed accompagnata da una lieve soffiatura emorragica nei tessuti circostanti.

Nei 10 giorni successivi all'intervento si sono presentate lievi emorragie ripetute in seguito a movimenti particolari (specie durante la minzione), con fuoriuscita di sangue dal meato urinario e dalla cute, proveniente dai corpi spongiosi dell'uretra. Tali emorragie sono risultate autolimitanti. I punti cutanei sono stati rimossi un mese dopo la plastica uretrale. In seguito alla rimozione del catetere, 30 giorni dopo la chirurgia, il cane ha urinato spontaneamente con un getto che si presentava d'entità maggiore rispetto a quello osservato prima dell'intervento d'uretroplastica. L'animale è stato regolarmente monitorato ecograficamente, al fine di rilevare l'aspetto dell'uretra e dei tessuti circostanti e di valutare il volume residuo della vescica urinaria in seguito alla minzione spontanea. Il quadro ecografico è apparso compatibile con un normale decorso postoperatorio fin dal primo esame. Un prelievo di materiale seminale, eseguito quattro mesi dopo l'intervento ha evidenziato come l'eiaculazione e l'eiaculato stesso fossero nella norma.

**DISCUSSIONE** - L'uretroplastica è stata eseguita per assecondare il desiderio del proprietario di conservare le potenzialità riproduttive del suo animale e, visto l'entità della stenosi e l'abbondante presenza di tessuto fibroso, è stata preferita, alla più semplice plastica d'anastomosi, la tecnica con lembo libero di mucosa buccale. Si è scelto di utilizzare la mucosa buccale come tessuto d'innesto poiché in medicina umana è utilizzata di routine in tali interventi, e poiché risulta più facile da ottenere. Gli interventi d'uretroplastica nel cane riportati in letteratura sono stati eseguiti a scopo sperimentale, creando una lesione a carico dell'uretra per asportazione di una parte dell'organo. Le condizioni in cui abbiamo lavorato, essendo stata eseguita l'uretroplastica a scopo terapeutico, sono quindi nettamente diverse e svantaggiose, poiché era presente abbondante tessuto fibroso cicatriziale con ridotta vascolarizzazione. Le normali complicanze correlate a questo tipo di chirurgia, quali stenosi, fistole, rigetto dell'innesto non si sono manifestate nel soggetto trattato. Il cane inoltre non ha mostrato alcuna difficoltà nell'alimentarsi, indice d'assenza di dolore a livello del punto d'asportazione del lembo buccale. Il mantenimento del catetere uretrale di Foley per i 30 giorni successivi all'intervento è risultato utile a guidare l'attecchimento dell'innesto ed il rimodellamento dell'uretra. Particolare attenzione è da porre alla chiusura dell'uretra, da effettuare con punti staccati evitando l'apposizione mucosa-mucosa che impedirebbe un'adeguata cicatrizzazione. Le emorragie autolimitanti presentate sono compatibili con perdite di sangue evidenziabili anche in seguito ad uretrotomia, imputabili alla resezione dei corpi spongiosi dell'organo; non si sono verificati infatti ematomi sottocutanei ma solo una piccola soffiatura. Riteniamo che quest'intervento possa essere utilizzato non solo, come nell'uomo, per la risoluzione di stenosi uretrali in cani da adibire alla riproduzione, ma anche in sostituzione all'uretrotomia scrotale con il vantaggio di poter evitare la castrazione del soggetto e comportare minor rischio d'infezioni urinarie ascendenti.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Palminteri, E. et al. Combined dorsal plus ventral double buccal mucosa graft in bulbar urethral reconstruction *Eur Urol* 53(1):81-9 (2008). **2.** Atalan, G., Cihan, M., Sozmen, M., Ozaydin, I. Repair of urethral defects using fascia lata autografts in dogs. *Vet Surg* 34, 514-518 (2005). **3.** El-Sherbiny, M. T., Abol-Enein, H., Dawaba, M. S., Ghoneim, M. A. Treatment of urethral defects: skin, buccal or bladder mucosa, tube or patch? An experimental study in dogs. *J Urol* 167, 2225-2228 (2002). **4.** Xu, Y. M. et al. One-stage urethral reconstruction using colonic mucosa graft: an experimental and clinical study. *World J Gastroenterol* 9, 381-384 (2003). **5.** Lara, R. C., Lucon, A. M., Arap, S. Urethroplasty using a bovine pericardium graft: an experimental study using normal urethras from dogs. *Braz J Med Biol Res* 37, 327-331 (2004).

## URETHROPLASTY USING BUCCAL MUCOSA GRAFT FOR TREATMENT OF AN URETHRAL STENOSIS IN A REPRODUCTIVE DOG

Zambelli D., Cunto M., Raccagni R., Regazzini M., *Veterinary Clinic Department, University of Bologna, Italy. Corresponding author: daniele.zambelli@unibo.it*

**Key words:** urethroplasty, urethral stenosis, dog, reproduction, buccal mucosa

**Introduction** - There are many causes of urethral stenosis: inflammation, trauma, congenital defects such as hypospadias, complications after surgery or catheterization, neoplasms. In man, urethral stricture is treated with endoscopic urethrotomy or with urethroplasty. Anastomosis urethroplasty is used for small stenoses but a larger stricture needs a urethroplasty, usually performed using a free buccal mucosa graft. In veterinary medicine, urethrostomy is usually performed for treatment urethral stricture, but this technique compromises the animal's reproductive capability, especially if associated with orchietomy. Colon mucosa, fascia lata, skin, bladder mucosa and buccal mucosa grafts have been used in dog, but the best results have been obtained using a free buccal mucosa graft. In literature, experimental urethroplasty attempts using different tissue grafts have been described, but this technique has been always applied after the urethra was experimentally damaged. Therapeutic urethroplasty has never been reported in veterinary medicine.

**Materials and methods** - A 3-year-old poodle dog was referred for dysuria after urethrotomy, performed by another vet, to remove a urethral stone. A penile urethral stenosis was diagnosed after ascending urography. The dog underwent urethroplasty using a buccal mucosa graft, in order to maintain the reproductive capability of the animal. The site of the sampling of the graft was the superior lip. A Foley catheter was positioned for thirty days after surgery.

**Results** - No problem has been observed during follow-up and the dog was able to eat from the day after the surgery. Some haemorrhages were observed during the first ten days after surgery. The dog was regularly monitored by ultrasound. Four months after urethroplasty, a sperm sample was collected and the micro- and macroparameters of the ejaculate were evaluated.

**Discussion** - Urethroplasty was performed with a therapeutic aim. This technique was chosen due to the presence of abundant fibrous tissue at the site of a previous urethrotomy. Buccal mucosa graft was preferred because this tissue is usually used in human medicine and is easy to obtain. This type of surgery avoids the need for both animal neutering and urethrostomy, preserving initial reproductive ability and reducing the risk of ascendant bacterial cystitis.

## OVARIOISTERECTOMIA E VULVOVAGINECTOMIA PER IL TRATTAMENTO DI RECIDIVE DI NEOPLASIE VAGINALI IN UNA CAGNA

Zambelli D., Cunto M., Raccagni R., Regazzini M., *Dipartimento Clinico Veterinario, Università degli Studi di Bologna*

**Parole chiave:** neoplasie vaginali, cane, vaginectomia, vulvovaginectomia

**RIASSUNTO** - Un'ovarioisterectomia associata ad una vulvovaginectomia radicale, per il trattamento di recidive di neoplasie vaginali, è stata eseguita in una Labrador di 14 anni, già sottoposta in tre occasioni ad interventi chirurgici d'asportazione di neoformazioni. L'intervento ha avuto esito positivo e la cagna non ha evidenziato alcun problema nel postoperatorio.

**INTRODUZIONE** - Le neoplasie vaginali e vulvari nella cagna rappresentano rispettivamente il 2,8% ed il 3% di tutti i tumori in questa specie<sup>1</sup>, ed interessano soprattutto i soggetti anziani ed interi<sup>2</sup>. Fra i tumori interessanti l'apparato riproduttore le neoplasie vaginali si osservano nel 41% dei casi mentre le vulvari nel 32,4%. Il 70-72% delle neoplasie vaginali/vulvari risultano benigne mentre il restante 28-30% maligne<sup>1</sup>. Le neoplasie benigne colpiscono in prevalenza soggetti interi, mentre le maligne soggetti castrati<sup>3</sup>. Il leiomioma è la neoplasia vaginale/vulvare benigna osservata nella maggioranza dei casi (29-78%<sup>1</sup>); altre forme tumorali benigne includono fibropapillomi, fibromi, fibroleiomiomi, lipomi, istiocitoma fibroso, melanoma, mixoma, mixofibroma e neoplasia della guaina nervosa. Il tumore di Sticker, leiomiosarcomi, adenocarcinomi, fibrosarcomi, mastocitomi, linfosarcomi, carcinoma delle cellule squamose e metastasi da osteosarcomi o adenocarcinomi mammari sono le tipologie di neoplasie vaginali/vulvari maligne che possono essere individuate; fra di esse la più frequente è il tumore venereo trasmissibile con un'incidenza del 10-11%. Nella donna il carcinoma vaginale rappresenta l'1-2% di tutti i tumori maligni dell'apparato riproduttore; nell'85% dei casi è il carcinoma di tipo squamocellulare ad interessare la vagina e colpisce in prevalenza le donne che hanno superato i 60 anni d'età<sup>4</sup>. I segni clinici riferibili a neoplasia vulvare/vaginale nella cagna sono dati dalla presenza di una massa causante rigonfiamento perineale o protudente dalle labbra vulvari, associata a scolo vaginale mucoso, mucopurelento o sierematico<sup>1,2</sup>. La crescita della/e massa/e può compromettere la funzionalità degli organi vicini comprimendo l'uretra o il retto e coinvolgendo i nervi locali, con conseguente disuria e tenesmo rettale. Altri sintomi che possono manifestarsi includono Pu/Pd, anoressia, perdita di peso e lambimento dei genitali. La diagnosi di neoplasia si può effettuare con la sola ispezione della vagina e della vulva, integrata da un'esplorazione rettale per verificare l'estensione della massa, ed eventualmente da una vaginoscopia. È opportuno mettere in diagnosi differenziale il prolasso vaginale e la neoplasia uretrale. L'approccio terapeutico è di tipo chirurgico e può limitarsi alla sola resezione locale delle neoformazioni previa episiotomia, o comprendere una vulvovaginectomia, associata ad uretrotomia perineale, in caso di masse di dimensioni notevoli e/o maligne. In entrambe le procedure è consigliata l'ovarioisterectomia poiché certe neoplasie benigne quali i leiomiomi presentano uno sviluppo influenzato dall'assetto ormonale. In letteratura si riportano solo pochi casi di vulvovaginectomia praticati sulla cagna, in particolare 3 casi sono riportati da Salomon et al.<sup>2</sup> e 4 da Bilbrey et al.<sup>3</sup>. La tecnica chirurgica utilizzata<sup>2,3</sup> è quella da noi impiegata durante l'intervento riportato, anche se Salomon et al.<sup>2</sup> utilizza altre due possibili tecniche ma più complesse: una vaginectomia con approccio ventrale mediante osteotomia del pube e dell'ischio ed una vaginectomia, in seguito ad episiotomia, associata a uretroplastica per anastomosi. Tra le complicanze

riportate risultano l'incontinenza, disuria temporanea, cistiti batteriche<sup>3</sup>, bruciore durante la minzione e perdite vaginali sieroemorragiche temporanee<sup>2</sup>. Nella donna si preferisce la radioterapia alla terapia chirurgica per il minor impatto fisico e psicologico, ma in letteratura si riportano casi in cui si è intervenuto con un'isterectomia laparoscopica radicale ed una vaginectomia associata alla ricostruzione laparoscopica della vagina utilizzando il colon trasverso<sup>4</sup>.

**MATERIALI E METODI** - Un cane Labrador di 14 anni, di circa 25 kg di peso è stato presentato alla visita per un marcato aumento di volume dell'area perineale, in particolare della zona circostante la vulva. Il cane era già stato sottoposto a tre interventi chirurgici d'asportazione di neoformazioni vaginali nel 2002, nel 2004 e nel 2007 presso il Dipartimento Clinico Veterinario sezione Ostetrica della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bologna. In tali occasioni, il proprietario si è sempre rifiutato di sottoporre l'animale ad ovarioisterectomia. Durante questi interventi sono state asportate da un minimo di 2 fino ad un massimo di 13 neoformazioni, risultate leiomiomi all'esame istologico. Ad un anno di distanza dall'ultimo intervento il cane è stato ripresentato alla visita per recidiva della patologia. Mediante la palpazione e l'ispezione digitale della vulva sono state identificate numerose neoformazioni vaginali, la maggiore delle quali recava un diametro di circa 9 cm. Si è così optato per la rimozione dell'intero tratto genitale con uretrotomia perineale. È stato eseguito uno studio radiografico del torace, per escludere la presenza di metastasi, un ECG ed un profilo ematobiochimico completo accompagnato dall'esame coagulativo. Tutti gli esami sono risultati nei limiti della norma. L'intervento chirurgico è stato effettuato in due fasi: dapprima è stata eseguita l'ovarioisterectomia col soggetto in decubito dorsale, ed in seguito la vulvovaginectomia e l'uretrotomia perineale con il cane in decubito sternale, col posteriore leggermente sollevato rispetto la testa. Il soggetto è stato sottoposto ad ampia tricotomia della regione addominale ventrale e della regione perineale, a partire dalla base della coda fino a metà coscia. La premedicazione è stata eseguita con acepromazina, 1,5 mg/kg i.m. (Prequillan®-Fatro) mentre l'anestesia è stata indotta con propofol, 2 mg/kg e.v. (Rapinivet®-Merial) e mantenuta in anestesia gassosa con isofluorano (2%). Butorfanolo è stato somministrato prima dell'intervento, durante e alla fine di esso, 0,1 mg/kg e.v. (Dolorex®-Intervet). Durante l'intervento il soggetto è stato sottoposto a fluidoterapia. L'ano è stato temporaneamente chiuso con una sutura a borsa di tabacco ed il campo operatorio è stato preparato in maniera asettica. Dapprima è stata eseguita l'ovarioisterectomia con l'asportazione delle ovaie, delle borse ovariche, dell'utero e della cervice. In seguito, dopo aver modificato il decubito dell'animale, è stato posizionato un catetere urinario 14F per facilitare l'identificazione e la dissezione dell'uretra. Un'incisione fusiforme è stata effettuata attorno ai margini vulvari, a circa 2 cm di distanza dalle labbra fino a 2 cm al di sotto dell'ano. La porzione più caudale della vagina è stata separata mediante accurata dissezione dai tessuti circostanti a partire dal vestibolo fino all'inizio della vagina propriamente detta, a livello del meato urinario. Per la dissezione è stato utilizzato un elettrobisturi, mentre l'emostasi dei rami vaginali dorsali è stata ottenuta mediante legatura. L'uretra cateterizzata è stata identificata, liberata mediante dissezione dai muscoli vestibolari e sezionata nel punto in cui raggiunge il pavimento della vagina. I muscoli ischiocavernoso e ischiouretrale sono stati sezionati per prolungare cranialmente la dissezione precedentemente iniziata, fino a livello della cervice. È stato così possibile esteriorizzare la vagina in toto, con la legatura del moncone vaginale dell'ovarioisterectomia. I tessuti profondi sono stati suturati per apposizione con sutura continua riassorbibile in 2/0 intrecciato, per eliminare gli spazi morti. L'uretra è stata trazionata caudalmente ed è stata eseguita un'uretrotomia perineale. L'uretra è stata suturata alla cute circa 4 cm ventralmente all'ano ponendo dei punti di sutura staccati

con monofilamento riassorbibile 4/0. Un collare Elisabetta è stato posizionato fino alla rimozione dei punti.

**RISULTATI** - Il decorso postoperatorio è stato buono e privo di complicazioni. Il risveglio è stato tranquillo e rapido pur essendo la cagna anziana e l'intervento dalla durata notevole. Non si sono verificate emorragie in partenza dal sito della stomia e la cagna ha defecato ed urinato normalmente fin dai primi giorni. L'esame ecografico, eseguito tre giorni dopo l'intervento, ha permesso di rilevare l'assenza d'anomalie a carico degli ureteri e della vescica. I punti cutanei sono stati rimossi circa 15 giorni dopo la chirurgia; l'incisione cutanea si presentava ben cicatrizzata ed il sito della stomia pervio e pulito. Al momento della stesura di questo articolo sono trascorsi tre mesi dall'esecuzione della vulvovaginetomia e la cagna non ha presentato alcun episodio d'incontinenza o di gocciolamento d'urina dalla stomia, né complicazioni quali raccolte sierose od ernie perineali. L'esame istologico eseguito sui noduli asportati ha permesso d'identificare le neoplasie come leiomiomi.

**DISCUSSIONE** - L'intervento di vulvovaginetomia ha permesso la risoluzione della patologia evitando la comparsa di recidive future, come accaduto in seguito ai primi tre interventi eseguiti. Probabilmente se l'ovarioisterectomia fosse stata eseguita fin dal primo intervento, la recidiva si sarebbe verificata in un tempo più lungo e la crescita delle nuove neoformazioni sarebbe risultata rallentata. Nonostante in letteratura siano riportati solo 7 casi in cui è stata eseguita una vulvovaginetomia, è stato ritenuto opportuno praticare quest'intervento vista l'età del cane e l'entità delle neoformazioni, che risultavano molto numerose e di dimensioni variabili, tale da rendere difficile un asportazione totale delle masse. L'intervento richiede particolare attenzione e cautela nel non danneggiare il plesso pelvico con conseguente danno all'innervazione del colon-retto e dell'uretra, quindi presenza di possibile incontinenza. È inoltre necessario prestare particolare cura nella dissezione dei tessuti più profondi onde evitare di ledere o legare accidentalmente gli ureteri e/o vasi e nervi. Per evitare l'insorgenza di possibili complicazioni come raccolte sierose ed ernie perineali, riteniamo sia indispensabile realizzare la miglior chiusura possibile dei tessuti perivaginali, facendo attenzione a non incorporare eventuali strutture nervose nella sutura. La vulvovaginetomia realizzata è risultata priva delle suddette complicazioni ed è stata ben tollerata dall'animale che ha mantenuto le sue abitudini riguardo la minzione e la defecazione, non presentando alcun gocciolamento d'urina in partenza dalla stomia lungo gli arti posteriori. Riteniamo così che questo intervento possa essere impiegato non solo in caso di neoplasie maligne, ma che sia da preferire anche in caso di recidive di tumori benigni particolarmente estesi od in caso di patologie vaginali congenite non trattabili in altro modo.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Johnston, S. D., Root Kustritz, M. V., Olson, P. N. S. Disorders of the canine vagina, vestibule, and vulva. *Canine and feline theriogenology* Saunders, Philadelphia (2001). **2.** Salomon, J. F., Deneuche, A., Viguier, E. Vaginectomy and urethroplasty as a treatment for non-peduncolated vaginal tumours in four bitches. *J Sm Anim Prac* 45, 157-161 (2004). **3.** Bilbrey, S. A. et al. Vulvovaginetomia and perineal urethrostomy for neoplasms of the vulva and vagina. *Vet Surg* 18, 6, 450-453 (1989). **4.** Ling B. et al. Laparoscopic radical hysterectomy with vaginectomy and reconstruction of vagina in patients with stage I of primary vaginal carcinoma. *Gynecol Oncol* In stampa.

## **OVARIOHYSTERECTOMY AND VULVOVAGINECTOMY FOR THE TREATMENT OF VAGINAL NEOPLASMS RELAPSES IN A BITCH**

**Zambelli D., Cunto M., Raccagni R., Regazzini M.,** *Veterinary Clinic Department, University of Bologna, Italy. Corresponding author: daniele.zambelli@unibo.it*

**Key words:** vaginal neoplasia, bitch, vaginectomy, vulvovaginectomy

**Introduction** - Vaginal and vulvar neoplasia constitute respectively 2.8% and 3% of all canine tumours. Among canine reproductive specific tumours, vaginal neoplasia has an incidence of 41% and vulvar tumour has been observed in 32.4% of cases. Incidence of benign tumours is 70-72%, while the remaining 27-30% are malignant tumours. Leiomyoma and transmissible venereal tumour are the most common benign and malignant neoplasia respectively. In women, vaginal carcinoma represents 1-2% of all reproductive malignant tumours. The clinical signs most frequently associated with vaginal and vulvar neoplasms are perineal swelling or masses protruding through the vulvar lips, vulvar discharge, but also dysuria and faecal tenesmus. Surgical treatment is the only practicable therapy for this kind of neoplasia. An episiotomy with local resection of the mass can be performed or, if the tumour is very large, a vulvovaginectomy may be necessary.

**Materials and methods** - A 14-year-old Labrador was referred because of an increase of perineal area volume. The bitch had undergone three surgical removals of vaginal masses in 2002, 2004 and 2007. On these occasions, the owner refused bitch neutering. Only one year after the last surgery, the bitch presented vaginal neoplasm relapses, so an ovariectomy and a vulvovaginectomy, associated with perineal urethrostomy, were performed.

**Results** - Follow up was without complications. No micturition or defecation problems were observed and neither ureter nor bladder abnormalities were detected at ultrasound. The histological diagnosis was leiomyoma. Currently, three months after surgery, the bitch has not presented any incontinence event.

**Discussion** - Vulvovaginectomy resolved the pathology, preventing the onset of relapses, as happened after the three previous surgeries. Ovariectomy associated with the first surgery, would probably have postponed neoplastic relapse. In conclusion, vulvovaginectomy is practicable not only for treatment of malignant neoplasia, but also in the case of large benign tumours or for the resolution of congenital vaginal pathologies, not otherwise correctable.



## STUDIO MORFOLOGICO DELLE GONADI IN CANI GIOVANI CON ALTERATA DISCESA TESTICOLARE MONOLATERALE

Rota A., Riccardi E.,<sup>1</sup>Grieco V., Veronesi M.C., *Dipartimento Scienze Cliniche Veterinarie, Milano;* <sup>1</sup>*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Milano.*

**Parole chiave:** cane, alterata discesa testicolare, morfologia

**RIASSUNTO** - Allo scopo di verificare eventuali alterazioni morfologiche della gonade in sede scrotale in cani giovani affetti da alterata discesa testicolare monolaterale, è stato eseguito uno studio morfologico sia della gonade ectopica sia di quella nello scroto. Lo studio ha evidenziato che, mentre alterazioni morfologiche di varia entità sono presenti nella gonade ritenuta già in età giovanile, il testicolo in sede fisiologica non presenta alcuna alterazione morfologica che ne faccia supporre la necessità di una exeresi precoce, mettendo in dubbio l'utilità dell'orchietomia bilaterale in età giovanile in cani affetti da alterata discesa testicolare monolaterale.

**INTRODUZIONE** - L'alterata discesa testicolare nel cane, come in altre specie animali, presenta ancor oggi diversi aspetti non ancora chiariti. Particolarmente carente è lo studio delle eventuali alterazioni, congenite od acquisite, riscontrabili in età giovanile nel testicolo scrotale in corso di alterata discesa testicolare monolaterale. Nell'uomo il criptorchidismo monolaterale può associarsi a gravi alterazioni della fertilità che presuppongono un'alterazione anche del testicolo scrotale<sup>1,2</sup>. Inoltre nei casi di criptorchidismo monolaterale il 20% dei tumori testicolari colpisce anche il testicolo normalmente disceso<sup>3</sup>, lasciando supporre che la condizione di alterata discesa e lo sviluppo neoplastico siano la manifestazione di un'anomalia genetica testicolare e che la trasformazione neoplastica del testicolo non dipenda dalla semplice posizione anomala<sup>4</sup>. La supposta "disgenesia" del testicolo scrotale è quindi la principale motivazione scientifica per la scelta dell'orchietomia bilaterale nei cani affetti da alterata discesa testicolare monolaterale. Benché esistano ampie dimostrazioni dell'opportunità dell'orchietomia bilaterale per le alterazioni indotte sul testicolo scrotale dalle modificazioni strutturali e funzionali del testicolo ectopico/criptico in età avanzata, non esistono prove evidenti della necessità di ricorrere alla gonadectomia bilaterale in età giovanile in cani con alterata discesa testicolare monolaterale. Lo scopo del presente studio è stato quindi quello di indagare le caratteristiche morfologiche delle gonadi in cani affetti da alterata discesa testicolare monolaterale e sottoposti ad orchietomia bilaterale entro i 2 anni di età, al fine di verificare eventuali alterazioni del testicolo ectopico/criptico, ma soprattutto di quello scrotale.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto su 10 cani affetti da alterata discesa testicolare monolaterale, di età compresa tra 1 e 2 anni. Sono stati definiti criptici i testicoli con localizzazione addominale o inguinale ed ectopici quelli con localizzazioni extra-inguinale<sup>4,5,6</sup>. Nei soggetti, non sottoposti ad alcun trattamento per la correzione della condizione, sono state ricercate eventuali patologie, genitali e non, considerate in letteratura come associate ad alterata discesa testicolare<sup>7,8</sup>. È stata eseguita l'orchietomia bilaterale<sup>8,9,10,11</sup>, con metodologia differenziata a seconda della localizzazione dei testicoli, secondo consuetudine chirurgica. Le gonadi sono state fissate in formalina tamponata al 10% ed incluse in paraffina secondo le tecniche di routine. Dai blocchetti così ottenuti sono state effettuate sezioni seriate alcune delle quali sono state colorate con Ematossilina-Eosina (E.E.) per la valutazione degli aspetti

morfologici ed altre con colorazione immunohistochemica impiegando anticorpi diretti contro citocheratina 18, vimentina, fosfatasi alcalina placentare (PLAP) ed inibina.

**RISULTATI** - Cinque dei 10 soggetti osservati erano criptorchidi, 4 con testicolo localizzato all'anello inguinale interno ed 1 con gonade caudale al rene; in 3/5 casi era interessato il testicolo sinistro. In tutti i 5 casi, il testicolo criptico aveva dimensioni e consistenza diminuite rispetto al controlaterale. Negli altri 5 soggetti il testicolo ectopico era parapenieno in 3 casi, prescrotale in 1 e crurale nel restante. L'ectopia riguardava il testicolo destro in 4/5 casi. Le dimensioni del testicolo ectopico erano sempre diminuite, mentre la consistenza era ridotta in 3/5. Solo in un soggetto è stata riscontrata la sublussazione rotulea ricorrente bilaterale. La valutazione macroscopica delle gonadi, eseguita al momento dell'exeresi chirurgica, non ha mai evidenziato lesioni apparenti né del testicolo criptico/ectopico né di quello scrotale. I risultati degli esami istologico ed immunohistochemico dei testicoli criptici/ectopici sono riassunti in tabella 1.

Tabella 1 - Risultati istologici ed immunohistochemici dei testicoli criptici/ectopici nei 10 soggetti

N°	MESI	TUBULI	INTERSTIZIO	PLAP	VIM	CK 18	INA
1	12	SCO	LCH	-	Sertoli +	Sertoli -	Sertoli -
2	12	SCO	-	n.v.	Sertoli +	Sertoli -	Rare Sertoli +
3	16	SCO	-	-	Sertoli +	Sertoli -	Sertoli -
4	16	SCO Cell. Centr.	-	Cell.cent.+	Sertoli + Cellcentr+	Sertoli -	Rare Sertoli +
5	24	SCO Cell. Centr.	LCH	Gonociti + Cell.cent.+	Sertoli + Cell.cent.+	Sertoli -	Rare Sertoli +
6	16	SCO	LCH Fibrosi focale	n.v.	Sertoli +	Sertoli -	Rare Sertoli +
7	24	SCO Cell.cent.	LCH	Cell.cent.+	Sertoli + Cell.cent.+	Sertoli -	Sertoli -
8	16	Linea seminale incompleta	-	n.v.	Sertoli +	Sertoli -	Sertoli -
9	18	Linea seminale completa	-	-	Sertoli +	Sertoli -	Sertoli -
10	12	Linea seminale incompleta	Fibrosi focale	Gonociti +	Sertoli +	Sertoli -	Rare Sertoli +

Legenda: SCO = tubuli rivestiti dalle sole cellule del Sertoli; LCH = iperplasia delle cellule di Leydig; Cell.cent. = cellule centrali

L'esame istologico dei testicoli in sede scrotale ha sempre evidenziato la presenza di spermatozoi nell'epididimo, una linea seminale completa nei tubuli seminiferi e nulla da segnalare nell'interstizio. L'immunohistochemica ha sempre dimostrato la positività alla vimentina e la negatività alla citocheratina 18 delle cellule di Sertoli. Solo in un caso si è osservata una scarsa positività delle cellule di Sertoli all'alfa-inibina. Fatta eccezione per rari gonociti PLAP-positivi in un testicolo, tutti gli altri sono risultati PLAP-negativi. Non si sono mai evidenziate cellule neoplastiche.

**DISCUSSIONE** - Nonostante il numero relativamente ridotto di soggetti, criptorchidismo ed ectopia hanno mostrato la stessa frequenza, con il testicolo destro più frequentemente interessato da ectopia ed il sinistro da criptorchidismo. E' da notare come i testicoli non eutopici, indipendentemente dalla localizzazione, mostrassero sempre alterazioni nelle dimensioni e spesso nella consistenza. In un solo soggetto è stata riscontrata la sublussazione rotulea ricorrente bilaterale, segnalata come patologia

extra genitale associata al criptorchidismo nel cane<sup>7,8</sup>. Per quanto riguarda i risultati istologici si sono notate importanti differenze tra i testicoli criptici e quelli ectopici. Al contrario di quelli ectopici, infatti, nei testicoli criptici, la linea seminale era sempre assente, fatto che porta ad ipotizzare che la localizzazione intra-addominale non permetta lo sviluppo della linea seminale e/o che essa conduca a rapida atrofia anche le cellule seminali immature eventualmente presenti alla nascita. Per quanto riguarda i risultati immunoistochimici, nei testicoli criptici/ectopici le cellule del Sertoli sono risultate positive alla vimentina, negative alla citocheratina e solo raramente e focalmente positive all'inibina. Questi dati suggeriscono che tali cellule nei testicoli esaminati sono generalmente mature. Quanto ai testicoli collocati in sede scrotale apparivano del tutto normali. Un commento finale va dedicato alla tempistica di esecuzione dell'orchietomia e, soprattutto, alla effettiva necessità dell'orchietomia bilaterale in età giovanile che potrebbe condurre ad un maggior rischio di obesità e cambiamenti del comportamento<sup>12</sup>. A nostro parere, dato che il testicolo non scrotale è soggetto allo sviluppo di neoplasie e nonostante queste sembrino insorgere dopo i 5 anni di età, tale testicolo andrebbe sempre asportato già in età giovanile. Quanto al testicolo controlaterale, collocato in sede scrotale, nella nostra casistica di cani entro i 2 anni di età, è risultato sempre normale e dotato di un grado di maturità rapportabile all'età dei soggetti, a differenza di quanto riscontrato nel bambino<sup>13</sup>. Sembra quindi verosimile ipotizzare che, in caso di diagnosi precoce di alterata discesa testicolare monolaterale, l'asportazione del testicolo scrotale possa non essere necessaria in età giovanile, sebbene da un punto genetico sia eticamente corretta l'esclusione dalla riproduzione dei soggetti affetti da alterata discesa testicolare. La gonade in sede scrotale dovrebbe essere sottoposta ad un monitoraggio clinico-strumentale per l'individuazione di eventuali alterazioni che potrebbero comparire in età più avanzata.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Fallon B., Kennedy T.J. Long-term follow-up of fertility in cryptorchid patients. *Urology* 25: 502-504 (1985). 2. Foresta C. et al. Functional and cytologic features of the controlateral testis in cryptorchidism. *Fertil Steril* 66 (4): 624-629 (1996). 3. Martin D.C. Malignancy in the cryptorchid testis. *Urol Clin North Am* 9: 371-376 (1982). 4. Docimo S.G., Silver R.I., Cromie W. The undescended testicle: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 62 (9): 2037-2044, 2047-2048 (2000). 5. Schindler A.M., Diaz P., Cuendet A., Sizonenko P.C. Cryptorchidism: a morphological study of 670 biopsies. *Helv Paediatr Acta* 42 (2-3): 145-158 (1987). 6. D'Cruz A.J., Das K. Undescended testes. *Indian J Pediatr* 71 (12): 1111-1115 (2004). 7. Pendergrass T.W., Hayes H.M. Cryptorchidism and related defects in dogs: epidemiologic comparison with man. *Teratology* 12: 51-55 (1975). 8. Memon M., Tibary A. Cryptorchidism in dogs and cat. In: *Recent advances in small animal reproduction*, P.W.Concannon, G.England and J.Verstegen (Eds.) Ithaca, New York, USA (2001). 9. Romagnoli S.E. Canine cryptorchidism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21: 533-544 (1991). 10. Yates D., Hayes G., Heffernan M., Beynon R. Incidence of cryptorchidism in dogs and cats. *Vet Rec* 152: 502-504 (2003). 11. Vannozzi I., Aria G. Criptorchidectomia laparoscopica nel cane: tre casi di agenesia testicolare unilaterale (monorchidismo vero). *Atti IV Congresso Nazionale S.I.R.A.* 49-51 (2006). 12. 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). 13. Codesal J., Paniagua R., Queizan A., Santamaria L., Nistal M. Cytophotometric DNA quantification in human spermatogonia of cryptorchid testes. *J Urol* 149: 382-385 (1993).

## MORPHOLOGICAL STUDY OF TESTES IN YOUNG DOGS AFFECTED BY UNILATERAL MALDESCENDED TESTIS

Rota A., Riccardi E., <sup>1</sup>Grieco V., Veronesi M.C., *Dipartimento Scienze Cliniche Veterinarie, Milano;* <sup>1</sup>*Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Milano. Corresponding author: veronesi@unimi.it*

**Key words:** dog, maldescended testis, morphology

**INTRODUCTION** - The supposed dysgenetic condition of the scrotal testis is the reason for performing bilateral orchidectomy in dogs affected by unilateral maldescended testis. However, the evidence of congenital or acquired abnormalities affecting the scrotal testis in young dogs with unilateral testicular maldescent is still lacking. Therefore, the aim of the present study was to perform a morphological study of the testes in dogs affected by unilateral testicular maldescent and submitted to bilateral orchidectomy up to 2 years of age. The final purpose was to identify morphological abnormalities of the cryptic/ectopic, but especially of the scrotal testis.

**MATERIALS AND METHODS** - The study was conducted on 10 dogs, 1 to 2 years old affected by unilateral cryptorchidism (testis within the abdomen or in the inguinal channel) or testicular ectopy (extra-abdominal or extra-inguinal location). Testicular characteristics, as well as genital or extra-genital associated abnormalities were recorded before the surgical removal of both testes. Testes were formalin fixed and routinely processed for histology and checked by immunohistochemistry for immunolabelling for cytokeratin 18 (CK18), vimentin, Placental Alkaline Phosphatase (PLAP) and  $\alpha$ -inhibin.

**RESULTS AND DISCUSSION** - Testicular cryptorchidism and ectopy occurred with similar frequency. The left testis was more often affected in cryptorchids, while the right one was more often ectopic. In most instances, cryptic testes were located near the inner inguinal ring, while extra-abdominal testes were frequently located along the penis. All maldescended testes were reduced in size and softer than scrotal testes. No evident lesions were macroscopically observed either in scrotal or in cryptic/ectopic testes. No other associated genital disorder was seen, but one dog showed bilateral patellar luxation. Histology showed total absence of seminal cells in cryptic testes while in the ectopic ones spermatogonia were often still recognizable, suggesting that abdominal location could lead earlier to atrophy of the seminal cells present at birth. Immunohistochemistry in both cryptic and ectopic testes showed Sertoli cells negative for CK18 and positive for vimentin. In only one case, scattered Sertoli cells expressed inhibin and in another case PLAP recognized occasional gonocytes in seminiferous tubuli. All scrotal testes were all histologically normal and immunohistochemistry showed Sertoli cells positive for vimentin while all the other antibodies gave negative results.

**CONCLUSION** - Data from the present study suggest that, when unilateral testicular maldescent is detected in dogs up to 2 years old, the cryptic/ectopic testis should be surgically removed as soon as possible, while it does not seem to be necessary for the scrotal testis. In fact, while the former showed already abnormalities in young dogs (Sertoli cells positive for inhibin and rare gonocytes), the latter could be otherwise checked regularly throughout the life of the dog, in order to detect the development of potential abnormalities in time and plan surgical removal only if really necessary.

## L'IMPIEGO DELLA PGF<sub>2α</sub> PER L'INTERRUZIONE DELLA GRAVIDANZA INDESIDERATA NELLA CAGNA: NOSTRA ESPERIENZA A TIRANA

**Turmalaj L., Selami F., Lika E., <sup>1</sup>Degl'Innocenti S.,** *Universiteti Buiquesor i Tiranes - Fakulteti i Mjekesise Veterinare, Departamenti i Lendeve Klinike (Republika e Shqipërisë); <sup>1</sup>Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Sezione di Ostetricia e Ginecologia, Università degli Studi di Perugia.*

**Parole chiave:** cagna, corpo luteo, gravidanza, aborto, PGF<sub>2α</sub>

**RIASSUNTO** - Gli autori hanno voluto verificare se la prostaglandina F<sub>2α</sub> (Gabbrostim<sup>®</sup>, Ceva, Vetem, Italia) fosse in grado di indurre l'aborto in cagne con gravidanza indesiderata. Lo studio riguarda 12 cagne gravide di razza ed età diverse pervenute a visita presso strutture veterinarie private di Tirana convenzionate con la nostra Sezione e casualmente diagnosticate gravide. I soggetti sono stati divisi in due gruppi, A (19-30gg) e B (>30gg), in relazione al periodo gestazionale. Entrambi i gruppi sono stati trattati con il medesimo protocollo (PGF<sub>2α</sub> im ogni 12 ore per 4 giorni consecutivi di con dosaggio variabile da 200 mcg/kg del primo giorno fino a 250 mcg/kg del 4° giorno). L'aborto si è verificato nel 50% dei soggetti del gruppo A e del 100% nel gruppo B.

**INTRODUZIONE** - La cagna è una femmina monoestrale stagionale e l'attività riproduttiva è condizionata da numerosi fattori quali, la razza, la posizione geografica, il management, l'alimentazione e quelli climatici. In Albania le cagne in generale hanno 2 momenti riproduttivi: primavera e autunno. La specie canina si caratterizza per un alto indice di prolificità che contrasta con la volontà dei proprietari che, per tale motivo, richiedono al medico veterinario la riduzione delle capacità riproduttive. Allo stato attuale in Albania la pratica maggiormente utilizzata è quella chirurgica (ovarioisterectomia), ma i rischi collegati all'anestesia e soprattutto alle infezioni post operatorie hanno stimolato la ricerca di metodi meno traumatici e più sicuri quali la prevenzione dell'estro e l'interruzione farmacologia della gravidanza. Nel primo caso il trattamento preventivo può indurre effetti collaterali non desiderati quali, ad esempio, la piometra mentre, nel secondo caso, la somministrazione di sostanze ad azione luteolitica, quali le PGF<sub>2α</sub>, sembra non portare ad alcuna problematica.

Il trattamento con sostanze antiluteiniche si fonda sul principio che, anche nella cagna, la gravidanza è sostenuta dal Progesterone prodotto dai corpi lutei e che questi presentano la loro massima attività secernente già a partire dal 15°-20° giorno dall'inizio dell'estro e che la loro funzionalità è mantenuta dalla Prolattina<sup>3,4,6,7,8</sup>.

Scopo del nostro studio è verificare l'efficacia della somministrazione, in diversi periodi gestazionale, di PGF<sub>2α</sub> nella interruzione della gravidanza stessa.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato eseguito presso alcune cliniche private di Tirana nel periodo 2006-2007 ed è riferito a 12 cagne di età e razza diversa diagnosticate gravide sia attraverso l'anamnesi sia l'esame clinico diretto (palpazione addominale) che ecografico (Aloka 500). L'età dei soggetti è stata parzialmente determinata dall'esame della tavola dentaria e, quando possibile, dalla richiesta anamnestica del numero dei parti precedenti. In considerazione del periodo gestazionale i soggetti sono stati divisi in 2 gruppi: A e B. Il gruppo A era costituito da 6 cagne con gravidanza compresa tra 19 e 30 giorni mentre nei 6 soggetti del gruppo B la gravidanza era >30 giorni.

Tutti i soggetti, a prescindere dall'età gestazionale, sono stati trattati con PGF<sub>2α</sub> (Gabbrostim<sup>®</sup> - alfaprostol 2 mg/ml) secondo il protocollo riportato in tabella 1. Al fine

di evitare eventuali effetti collaterali indesiderati è stata somministrata, i.m., Atropina alla dose di 10 mg/Kg.

**RISULTATI** - Le informazioni anamnestiche, accompagnate dall'esame clinico diretto, solo in alcuni casi hanno consentito di stabilire l'effettivo stato gravidico. L'esame ecografico, invece, ha confermato essere la metodica diagnostica maggiormente accurata ed affidabile per determinare lo stato di gravidanza a partire dal 19°-20° giorno. Inoltre, utilizzando il parametro *fetal crown-rump length* (>20 mm) è stato possibile determinare con buona approssimazione le gravidanze superiori a 30 giorni (Tab. 2).

Tab. 1 - Protocollo di trattamento

GIORNO 1	PGF <sub>2α</sub> : 200 mcg/kg ogni 12 h + Atropina 10 mg/Kg
GIORNO 2	PGF <sub>2α</sub> : 225 mcg/kg ogni 12 h + Atropina 10 mg/Kg
GIORNO 3	PGF <sub>2α</sub> : 250 mcg/kg ogni 12 h + Atropina 10 mg/Kg; monitoraggio dell'aborto
GIORNO 4	PGF <sub>2α</sub> : 250 mcg/kg ogni 12 h + Atropina 10 mg/Kg; monitoraggio dell'aborto

Tab. 2 - Risultati della diagnosi di gravidanza

Cagne in Calore	METODO		
	ANAMNESI	PALPAZIONE ADDOM.	ECOGRAFIA
12	3	5	4

L'anamnesi, in associazione l'esame della tavola dentaria, ha consentito, con buona approssimazione, di conoscere il numero dei parti e l'età dei soggetti. Nella tabella 3 si evidenzia che il maggior numero di soggetti aveva un'età compresa tra 1 e 2 anni e non aveva mai partorito, mentre 4 cagne erano pluripare.

Tab. 3 - Numero parti ed età dei soggetti

Cagne trattate	Nullipare			Pluripare		
	N. parti	N. cagne	Età (anni)	N. parti	N. cagne	Età (anni)
12	0	8	1-2	2-4	4	<3

I risultati ottenuti (Tab. 4) evidenziano che la somministrazione di PGF<sub>2α</sub> per l'interruzione della gravidanza ha avuto un effetto positivo nel 50% dei soggetti (3/6) del gruppo A; nel gruppo B l'aborto si è verificato nella totalità dei soggetti trattati (6/6).

Tab. 4 - Risultati del trattamento con PGF<sub>2α</sub>

Gruppo	N. cagne	Positivo (Aborto)	Negativo (no aborto)
A	6	3 (50%)	3 (50%)
B	6	6 (100%)	-

La diversità dei risultati tra i due gruppi riteniamo sia da imputare al periodo di gravidanza in cui è stato effettuato il trattamento. Infatti, durante la prima fase della gravidanza (fino a 30 giorni) nei corpi lutei dominano le piccole cellule luteali rispetto alle grandi; queste cellule producono una maggiore quantità di progesterone e hanno un maggior numero di recettori sia per l'LH che per la prostaglandina<sup>2,4</sup>. Con l'avanzamento dell'età della gravidanza le piccole cellule si differenziano in grandi cellule luteali che presentano una situazione recettoriale diversa: aumento dei recettori per la PGF<sub>2α</sub> e diminuzione di quelli per l'LH.

**CONCLUSIONI** - La nostra esperienza, seppur numericamente limitata per varie ragioni, ha comunque confermato quanto riportato in letteratura sulla possibilità di interrompere la gravidanza nella cagna mediante somministrazione di PGF<sub>2α</sub><sup>3,4,5</sup>. Inoltre, abbiamo avuto la riprova che il migliore risultato si ottiene nei soggetti la cui gravidanza è >30 giorni. Quest'ultimo aspetto impone che il medico veterinario abbia la possibilità di stabilire con precisione il periodo gestazionale, possibilmente mediante ausilio ecografico.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Broers P. (1996), *La riproduzione nel cane* in: *Compendio di Riproduzione Animale*, 129-158; 2. Christiansen J. (1984), in: *Reproduction in the dog and cat*; 3. Concannon P.W., Isaman L., Frank D.A. (1998), Elevated concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F<sub>2α</sub> in maternal plasma during prepartum luteolysis and parturition in dogs. *J. Reprod. Fert.*, 84, 71-77; 4. Jackson P.S., Furr B.J.A., Hutchinson F.G. (1982), A preliminary study of pregnancy termination in the bitch with slow-release formulations of prostaglandin analogues; 5. Okkens A.C., Bevers M.M., Dieleman S.J., Willems A.H. (1990), Evidence for prolactin as the luteotrophic factor in the cyclic dog. *Vet. Quart.*, 12, 193-201; 6. Rijnberk A. (1996), *Clinical Endocrinology of Dogs and Cats*. An illustrated text. 131-156; 7. Sulo X.H. (2006), in: *Igiene e riproduzione nella cagna e nella gatta*, 34-44; 8. Van der Wayden G.C., Taverne M.A.M., Dieleman S.J. (1989), Physiological aspects of pregnancy and parturition in dogs. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 39, 211-224.

## USE OF PGF<sub>2α</sub> FOR INTERRUPTING UNWANTED PREGNANCY IN THE BITCH: OUR EXPERIENCE IN TIRANA

**Turmalaj L., Selami F., Lika E., <sup>1</sup>Degl'Innocenti S.,** *Department of Clinical Subjects-Section of Pathology, Obstetrics and Gynaecology, Agricultural University of Tirana (Republic of Albania); <sup>1</sup> Department of Pathology, Diagnostic and Veterinary clinical-Section of Obstetrics and Gynaecology, Perugia University (Italy). Corresponding author: degli@unipg.it*

**Key words:** bitch, corpora lutea, pregnancy, abortion, PGF<sub>2α</sub>.

The effects of PGF<sub>2α</sub> on the corpora lutea of many species are known. The authors wished to determine whether prostaglandin F<sub>2α</sub> could induce abortion in bitches with undesired pregnancy. The study covers 12 pregnant bitches of different races and ages visited at Private veterinary clinics under agreements with our department of the faculty of veterinary medicine and randomly diagnosed pregnant. Subjects were divided into two groups, A and B, with respect to the pregnant period. Group A (6 bitches) consisted of subjects who had been pregnant for between 19 and 30 days while in group B (6 bitches) the period of pregnancy was greater than 30 days. The period of pregnancy was established through anamnesis, abdominal palpation and ultrasound investigation (Aloka 500 owned by the Faculty of Veterinary Medicine of Tirana). Both groups were treated with the same protocol, which provided for administration every 12 hours for 4 consecutive days of PGF<sub>2α</sub> with dosages varying from 200 mcg/kg on the first day up to 250 mcg/kg on Day 4. Abortion occurred in 50% of subjects in group A and 100% in group B. During treatment side effects were observed such as vomiting, hypothermia, diarrhoea etc., which were partly mitigated by the administration of Atropine (10 mg/kg i.m.).

The results show that the administration of PGF<sub>2α</sub> had a positive effect in 50% of subjects (3/6) in Group A, while in Group B abortion occurred in all subjects (6/6). We believe that the diversity of the results between the two groups is due to the different period of pregnancy.

Our experience, although limited, confirmed reports in the literature on interrupting pregnancy through administration of PGF<sub>2α</sub>. In addition, we obtained indications that the best results are obtained in those pregnant for over 30 days.

**References** - 1. Broers P. (1996), *La riproduzione nel cane* in: Compendio di Riproduzione Animale., 129-158; 2. Concannon P.W., Isaman L., Frank D.A. (1998), Elevated concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F<sub>2α</sub> in maternal plasma during parturition luteolysis and parturition in dogs. *J. Reprod. Fert.*, 84, 71-77; 3. Sulo Xh. (2006), in: *Igiene e riproduzione nella cagna e nella gatta*, 34-44.



## VALUTAZIONE RETROSPETTIVA DELL'APPROCCIO LAPAROSCOPICO NELLA CRIPTORCHIDECTOMIA DEL CANE

**Vannozzi I., Innocenti V.M., Aria G.** *Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Pisa*

**Parole chiave:** criptorchidectomia, laparoscopia, cane

**RIASSUNTO** - Lo scopo del nostro lavoro è la valutazione retrospettiva dell'approccio laparoscopico alla chirurgia del cane criptorchide in particolar modo finalizzato alla valutazione tecnica di diverse metodiche ed all'individuazione delle possibili complicanze e delle difficoltà chirurgiche di più comune riscontro con tale approccio. A questo scopo 33 cani appartenenti a diverse razze e fasce d'età pervenuti presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università degli Studi di Pisa sono stati sottoposti a criptorchidectomia laparoscopica con diverse tecniche.

**INTRODUZIONE** - La chirurgia laparoscopica può essere a buon titolo considerata l'approccio elettivo per l'asportazione chirurgica del testicolo ritenuto a livello addominale nel cane.

Tale tecnica comporta infatti un minore stress chirurgico al soggetto e quindi riduzione della depressione immunitaria, perdite ematiche più contenute, minor dolore postoperatorio, minor rischio di complicanze post-operatorie e quindi una ripresa più rapida.

**MATERIALI E METODI** - In questo studio sono stati inclusi 33 cani di razza, età e peso differenti, pervenuti presso il Dipartimento di Clinica Veterinaria di Pisa perché affetti da criptorchidismo mono o bilaterale.

Il protocollo diagnostico e terapeutico è stato lo stesso per tutti i soggetti. Gli animali sono stati sottoposti a valutazione clinica generale nonché alla localizzazione delle gonadi criptiche mediante ecografia addominale utilizzando sonde convex e microconvex da 3,5 A 8 MHz ed ecografo Toshiba CoreVision Pro. In tutti i casi è stato quantificato il rischio anestesilogico mediante valutazione cardio-respiratoria strumentale, lo stato metabolico con esami ematochimici e quindi proposto al proprietario l'approccio laparoscopico all'asportazione delle gonadi addominali. Tutti i pazienti appartenevano alle classi di rischio ASA I e II.

Gli interventi sono stati eseguiti in anestesia generale inalatoria e gli animali posti in decubito dorsale. Per quanto riguarda il posizionamento delle porte di ingresso in addome è stata utilizzata una triangolazione standard con ottica inserita in prossimità della cicatrice ombelicale e le due operative latero caudalmente a formare un triangolo con la base verso la pelvi. Questa disposizione consente una visione ottimale del cavo addominale caudale e degli osti inguinali.

La strumentazione utilizzata prevedeva sempre una colonna laparoscopica costituita da telecamera Storz, monitor 21" Sony Medical, insufflatore automatico Hi Flow Wolff per l'erogazione della CO<sub>2</sub>, fonte luce fredda Storz allo Xenon 300 W, generatore di energia per la coagulazione e la diresi Erbe 300 W e in due casi Ultracision (Ethicon Endo Surgery). Il set per chirurgia laparoscopica includeva sempre una trousse completa di ferri per laparotomia standard e strumentario laparoscopico costituito da: ottica Storz da 5 e 10 mm Ø, cavo luce da 4 mm, cannule Storz da 5 e 10 mm, forbice Metzbaum curva, grasper atraumatico curvo e a spatola, grasper armato retto, pinza bipolare, spinginodo e aspiratore da 5 mm. Una volta realizzato lo pneumoperitoneo mediante insufflazione di CO<sub>2</sub> ad una pressione compresa tra 8 e 11 mmHg attraverso il primo trocar, inserito con tecnica aperta per maggior sicurezza, è stato esplorato l'addome per

la ricerca delle gonadi addominali. Per visualizzare meglio la parte caudale dell'addome i pazienti sono stati posizionati in Trendelenburg (15°) per il tempo necessario all'individuazione. Tramite le due porte laterali si è proceduto ad afferrare i testicoli e a liberarli dalla connessione con il gubernaculum testis mediante elettrochirurgia bipolare. A questo punto l'emostasi dei vasi testicolari è stata ottenuta con tecniche diverse: elettrocoagulazione del funicolo e sezione con forbici endoscopiche, allacciamento con monofilo assorbibile ad ansa stringente (nodo di Ficherman) e sezione con forbici endoscopiche, coagulazione e diresi con bisturi armonico ad ultrasuoni Ultracision. L'intervento si completava con l'estrazione dei testicoli dalla porta centrale e la sutura con punti semplici della parete muscolare (materiale riassorbibile intrecciato) e della cute (nylon).

Sono stati quindi presi in considerazione i seguenti parametri: durata di intervento, tipo di patologia (mono o bilaterale), razza, età, peso, tecnica chirurgica, complicazioni intraoperatorie (vedi Tabella).

RAZZA	ETÀ (mesi)	PESO (Kg)	CRIPTORCHIDE MONO./BILAT.	TECNICA CHIRURGICA	COMPLICANZE INTRAOPERATORIE	TEMPI CHIRURGIA (minuti)
meticcio	18	14,4	monolaterale sx	conversione	testicolo inguinale	35
schnauzer	36	20	bilaterale	loop	scarsa visibilità	85
boxer	84	26	bilaterale	loop		60
pastore tedesco	36	36	monolaterale dx	loop		35
meticcio	15	17,7	monolaterale dx	loop		30
akita inu	7	34	monolaterale dx	Ultracision		40
terranova	7	64	monolaterale sx	loop		15
springer	14	20	bilaterale	loop		35
boxer	12	28	monolaterale dx	loop		25
spriger	54	23,3	monolaterale dx	Ultracision		25
springer	48	20	monolaterale dx	loop		35
labrador	17	32	monolaterale dx	loop		40
pastore tedesco	72	36	monolaterale dx	loop		35
pastore tedesco	60	35	monolaterale dx	conversione	testicolo inguinale	25
boxer	17	34	bilaterale	loop		50
jack russel	11	6	monolaterale dx	monopolare		20
pastore tedesco	66	40	monolaterale dx	loop		55
beagle	14	17,5	monolaterale sx	loop		45
siberian husky	11	28	bilaterale	loop		60
siberian husky	36	18	monolaterale dx	loop		29
dobermann	18	33,3	monolaterale dx	loop		60
boxer	48	34,5	bilaterale	loop		20
boxer	24	32	bilaterale	loop		50
fox terrier	36	6	monolaterale sx	loop		40
pastore tedesco	90	39	bilaterale	loop		55
boxer	15	28,9	bilaterale	loop		50
pastore tedesco	19	36	monolaterale dx	loop		35
meticcio	12	27	bilaterale	loop		40
boxer	18	31,5	monolaterale dx	loop		25
pastore tedesco	12	34	bilaterale	loop/conversione	1 testicolo inguinale	50
terranova	84	68	bilaterale	loop		45
boxer	19	35	bilaterale	loop		50
golden retriever	30	37	monolaterale dx	loop		45

**RISULTATI** - Da un punto di vista generale le razze maggiormente rappresentate sono state Boxer e Pastore Tedesco che costituivano rispettivamente il 22,85% e il 20%, del nostro campione. L'età era compresa tra i 7 e i 90 mesi (media 30,28) ed il peso compreso tra 6 e 68 Kg (media 28,34). Tredici soggetti presentavano criptorchidismo bilaterale (39,4%) e 20 soggetti monolaterale (60,6 %) dei quali 4 sinistri e 16 destri. Il tempo d'intervento variava tra 15 e 85 minuti (media 40,7±14,7 min.), con 50 ±15 minuti in media per le criptorchidectomie bilaterali e 34,7±11,2 minuti per le monolaterali. In un unico caso si sono verificate complicazioni intraoperatorie riferibili a scarsa visualizzazione dell'addome per insufficiente miorilassamento della parete addominale con conseguente difficoltà nelle manualità chirurgiche (85 minuti di intervento). I tre casi di conversione sono imputabili ad erronea localizzazione delle

gonadi che si trovavano nel canale inguinale (in un caso uno solo dei due testicoli criptici era inguinale).

Per quanto riguarda le tecniche operatorie sono state tre: endoloop, Ultracision ed elettrochirurgia. In nessun caso si sono verificate complicazioni riferibili a fenomeni emorragici né ad alterazioni della funzione cardiopolmonare (possibile complicanza di pneumoperitoneo). Quest'ultimo risultato è probabilmente ascrivibile anche al fatto che la maggior parte dei soggetti della nostra casistica, 24/35 (68,57%), erano animali giovani (meno di 3 anni)

**CONCLUSIONI** - La taglia dei soggetti non sembra influenzare la procedura chirurgica, infatti i tempi di intervento non sono significativamente diversi tra animali più grandi rispetto ai più piccoli né si sono verificate complicanze con frequenza diversa relativamente alla taglia. L'unico caso nel quale la durata della procedura chirurgica è stata decisamente maggiore della media, sia generale (85 min rispetto a 40,7) che riferita al tipo di patologia del caso (criptorchidismo bilaterale, media 50 min), è imputabile a difficoltà di visione endoscopica per insufficiente dilatazione dell'addome. Inoltre risulta interessante notare come la durata media della chirurgia per i criptorchidi bilaterali si riduce se si esclude il caso suddetto (39,34±12,58 min vs 50±15 min).

Inoltre a nostro avviso è interessante sottolineare che, nonostante il bisturi armonico consenta di afferrare, coagulare e tagliare il funicolo con la stessa pinza eliminando le fasi di sostituzione dei diversi strumenti endoscopici, gli interventi eseguiti con tale metodica non sono stati conclusi in tempi più brevi. Questo risultato è probabilmente imputabile alla minore esperienza dell'equipe con tale strumento che a nostro avviso rappresenta il gold standard della strumentazione per questo tipo di intervento. Alla luce della nostra esperienza possiamo affermare che la criptorchidectomia laparoscopica rappresenta una tecnica chirurgica sicura non essendosi in nessun caso verificate complicanze intra e post-operatorie importanti.

Per questo motivo, essendo ormai ampiamente dimostrati (almeno in campo umano) i vantaggi che essa ha per il paziente rispetto alla tecnica laparotomica, la tecnica laparoscopica è a nostro avviso l'eccellenza per l'approccio chirurgico al testicolo ritenuto addominale del cane.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Austin B., Lanz O.I., Hamilton S.M., Broadstone R.V., Martin R.A., Laparoscopic ovariectomy in nine dogs. 2003, *Journal of the American Animal Hospital Association* vol.39. 2. Ballantyne G.H., Leahy P.F., Modlin I.M., *Chirurgia Laparoscopica* 1996, ed. Verduci Editore Roma 3. Van Goethem B.E.B.J., Rosenveltdt K.W., Kirpensteijn J., Monopolar versus bipolar electrocoagulation in canine laparoscopic ovariectomy: a nonrandomized, prospective, clinical trial. 2003; *Veterinary Surgery* 32:464-470. 4. Burpee S.E. et al.; The metabolic and immune response to laparoscopic versus open liver resection. 2002, *Surgical Endoscopy* vol.16 n.6 pag.899-904. 5. Crema E. et al.; Evaluation of the response of cortisol, corticotropin and blood platelets kinetics after laparoscopic and open cholecystectomy. 2005, *Acta Cir. Bras.* Vol.20 n. 5 Sao Paulo Sept. 6. Eugster S.K., Schawalter P., Gaschen F., Boerlin P.; 2A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats *Veterinary Surgery* 1004; 33:542-550. 7. Freeman L.J., *Veterinary endosurgery*. 1999, ed. Mosby, St. Louis 8. Holub Z. et al.; Surgically induced hormonal, metabolic and inflammatory changes in laparoscopic hysterectomy: a comparison with abdominal hysterectomy. 2002, *Gynecological Endoscopy* vol.11(5) pag.299-304. 9. Sciorsci R.L. et al.; Ovariectomy combinata nella cagna: laparoscopica e tradizionale. 2005, 3° Congresso Nazionale SIRA. 10. Vannozzi I. et al., Criptorchidectomia laparoscopica nel cane. Convegno su biodiversità e riproduzione animale, Bari, 2001. 11. Vannozzi I, Benetti C., Rota A., "Laparoscopic criptorchidectomia in a cat". *Journal of Feline Medicine and Surgery* 4, 201-202, 2002. 12. Novitsky Y.W., Litwin D.E.M., Callery M.P., The net immunologic advantage of laparoscopic surgery. 2004, *Surgical Endoscopy* vol.18 n.10 pag.1411-1419. 13. Yuen P.M. et al., Metabolic and inflammatory responses after laparoscopic and abdominal hysterectomy. 1998 *Obstet Gynecol* 179(1):1-5

## RETROSPECTIVE EVALUATION OF LAPAROSCOPIC CRYPTORCHIDECTOMY IN DOG

**Vannozzi I., Innocenti V.M., Aria G.,** *Department of Veterinary Clinic Medicine, University of Pisa, Italy. Corresponding author: ivannozz@vet.unipi.it*

**Key words:** cryptorchidectomy, laparoscopy, dog

**Introduction** - This is a retrospective study about the evaluation of laparoscopic approaches to abdominal cryptorchidectomy in dog. The different aspects considered in the study were surgical techniques, possible complications, length of surgery (incision to closure) and the surgical difficulties connected with this approach.

**Materials and Methods** - Thirty-three owned dogs were included in this study. Different breeds, ages and weights were represented. The classic laparoscopic approach with three different methods for haemostasis (loop, electro-surgery and harmonic-surgery) was performed.

Different aspects were considered: breed, age, weight, length of surgery, surgical techniques, surgical and postoperative complications and mono or bilateral pathology.

**Results** - The mean age was 30.28 months (range 7-90), the mean body weight was 28.34 Kg (range 6-68). 13 dogs had bilateral pathology (39.4%) and 20 monolateral pathology (60.6%) of which 4 were in the right testis and 16 in the left. The mean length of surgery was  $40.7 \pm 14.7$  minutes (range 15 - 85) with  $50 \pm 15$  minutes for bilateral cryptorchidectomy and  $34.7 \pm 11.2$  minutes for monolateral. The problems encountered included three laparotomic conversions due to wrong testis localization (inguinal testes) and one lengthy surgery (85 minutes) due to visualisation difficulties. No hemorrhagic problems or laparotomic conversions resulted from surgical complications. No postoperative complications were registered.

**Conclusions** - There was no relationship between dog size, surgical and postoperative complications and no connections were found between haemostasis method and surgical/postoperative complications. Surgical technique and dog size were not connected to total surgical time. Surgical duration for bilateral cryptorchidectomy ( $50 \pm 15$  minutes) was longer than for monolateral cryptorchidectomy ( $34.7 \pm 11.2$  minutes). This minimally invasive approach for cryptorchidectomy in dog is a safe procedure and is becoming the preferred approach for abdominal cryptorchidectomy, as it causes less pain and quicker postoperative recovery.

## OSSERVAZIONI SULLA PRESENZA DI BATTERI E MICOPLASMI NEL TRATTO VAGINALE E NEL LATTE DELLA CAGNA NEL PERIPARTUM: DATI PRELIMINARI

Milani C., Faccioli G., Mollo A., Tramontano A., <sup>1</sup>Corrò M., <sup>2</sup>Rota A., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova; <sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; <sup>2</sup>Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino.*

**Parole chiave:** mortalità neonatale, batteriologia vaginale, latte materno, micoplasmi, durata parto

**RIASSUNTO** - In questo lavoro si è inteso indagare se l'individuazione di batteri potenzialmente patogeni nel tratto vaginale della fattrice a termine gravidanza e nel latte pre e post-parto, la presenza di *Mycoplasma spp.* e la durata del parto possano influenzare il tasso di mortalità neonatale. Solamente la durata del parto è risultata correlata in modo significativo alla percentuale di sopravvivenza dei cuccioli.

**INTRODUZIONE** - La mortalità neonatale e perinatale riguarda una percentuale di cuccioli compresa tra il 10% e il 34%<sup>1</sup>. L'eziologia risulta essere complessa perché vi concorrono numerosi fattori, legati in parte all'ambiente, alla fattrice ed al cucciolo stesso<sup>2</sup>. Una cattiva gestione dell'allevamento, delle fattrici e dei parti, un eccessivo grado di consanguineità tra soggetti, un'elevata carica microbica ambientale o condizioni patologiche anche sub-cliniche a livello genitale o mammario nella madre, insieme allo scarso peso dei neonati al momento della nascita, rappresentano tutti fattori che incidono negativamente sulle possibilità di sopravvivenza dei cuccioli<sup>3</sup>.

Lo scopo di questo lavoro è stato valutare la presenza di correlazioni tra la percentuale di sopravvivenza dei neonati e l'andamento del parto, la presenza di batteri specifici nel tratto vaginale e nel latte pre- e post-partum della cagna e la presenza di *Mycoplasma spp.* nel tratto genitale della fattrice durante la gestazione.

**MATERIALI E METODI** - La ricerca è stata effettuata su 21 fattrici, 18 delle quali appartenenti a diversi (n. 5) allevatori di professione e 3 allevate da amatori, tutti localizzati in Veneto. Per quanto attiene alla tipologia di allevamento sono stati presi in considerazione i seguenti dati: tipo di ricovero degli animali, dislocazione e tipologia della zona parto, positività sierologica per Herpesvirus, piano vaccinale, trattamenti antielmintici, tipo di alimentazione, trattamenti farmacologici effettuati durante la gravidanza ed il parto. Di ciascun soggetto sono stati registrati in particolare l'anamnesi riproduttiva e l'andamento del parto.

Circa 10 giorni prima della data prevista del parto sono stati eseguiti due tamponi vaginali profondi per indagini batteriologiche e per ricerca di micoplasmi. Un terzo tampone è stato effettuato dal secreto mammario, ove presente, ottenuto dopo disinfezione cutanea dalle mammelle inguinali. Sette-dieci giorni dopo il parto è stato ripetuto il tampone sul latte. Al momento del parto è stato registrato il numero di cuccioli nati vivi e morti e, nelle due settimane successive, sono stati registrati i casi di morte neonatale. Sui cuccioli morti è stato praticato l'esame necroscopico.

Mediante il test statistico U di Mann-Witney è stata analizzata la correlazione tra percentuale di cuccioli morti ed isolamento di batteri potenzialmente patogeni, positività a *Mycoplasma spp.* ed andamento del parto inteso come durata totale della fase espulsiva /n° cuccioli (normale se inferiore all'ora, languido se superiore).

**RISULTATI** - I sopralluoghi effettuati hanno messo in evidenza strutture generalmente idonee, solamente negli allevamenti amatoriali 1 e 2 i box-parto non erano di materiale idoneo, né adeguatamente separati dal resto dell'allevamento.

Dai 21 parti presi in considerazione sono nati in totale 120 cuccioli, dei quali 25 (20,8%) nati morti, 23 (19,2%) deceduti entro pochi giorni dalla nascita. Le necrosopie effettuate non hanno mai rilevato lesioni macroscopiche evidenti e la ricerca di Herpesvirus è sempre risultata negativa.

Precedenti lavori indicano che batteri potenzialmente patogeni presenti nelle vie genitali della fattrice o nel secreto mammario predispongono alla mortalità neonatale<sup>4</sup>. In Tab. 1 si può osservare, per ciascuna delle fattrici in esame, la sede in cui sono stati isolati batteri quali *Escherichia coli*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, che sono notoriamente implicati nella setticemia neonatale<sup>4</sup>. Si è considerato un elemento di rischio anche *Staphylococcus intermedius* che, pur essendo di comune riscontro nella flora batterica oro-nasale e cutanea del cane<sup>5</sup>, è stato individuato in femmine affette da mastite subclinica<sup>6</sup>, per cui le tossine prodotte, ingerite dal cucciolo lattante, possono compromettere le difese dell'organismo. Dai dati riportati in Tab. 1 si può osservare che la percentuale di mortalità perinatale e neonatale è risultata variare da 0 a 100%. L'analisi dei dati non ha rilevato l'esistenza di una correlazione significativa tra tasso di mortalità neonatale e presenza di batteri potenzialmente patogeni nel tratto vaginale o nel secreto mammario. Infatti, anche in caso di morte per setticemia dell'intera cucciolata o di gran parte di essa, non sempre si è riscontrata la presenza di batteri potenzialmente patogeni nella madre: il caso più eclatante è quello della fattrice 1A. Per contro, altre volte, tutti i cuccioli sono sopravvissuti nonostante la presenza di potenziali patogeni nelle vie genitali o nel latte materno (soggetti 4B, 3C, amatore 3), sia nel caso di profilassi antibiotica effettuata alla madre (4B, 3C) sia in sua assenza (amatore 3). In altri casi (soggetti 1D e amatore 2) invece i batteri isolati nella madre sono risultati gli stessi isolati dai cuccioli morti. Spesso, dai cuccioli morti sono stati isolati solamente batteri in bassa o bassissima carica che difficilmente possono essere considerati l'unica causa della morte, che è rimasta ignota.

Un uso mirato degli antibiotici può essere efficace nel ridurre la mortalità neonatale<sup>4</sup>, ma può anche portare alla selezione di ceppi batterici resistenti. Nella nostra indagine, in alcuni casi, i batteri isolati sono infatti risultati resistenti agli antibiotici di più comune impiego. Le percentuali maggiori di resistenza si sono avute negli allevamenti in cui viene effettuata di routine la profilassi antibiotica alle fattrici nel periodo del parto, e in alcuni casi, per ovviare al problema delle resistenze batteriche, si fa ricorso a principi attivi poco usuali in medicina veterinaria, con spettro di azione molto ampio (azitromicina). Nell'allevamento D, dove non si fa uso di antibiotici, si sono riscontrati batteri potenzialmente patogeni, ma privi di particolari resistenze. Può non essere un caso che la mortalità sia risultata pari a zero per 2 dei 3 soggetti testati. Questo suggerirebbe che la capacità di resistenza individuale, e quindi tutti i fattori che la determinano, sia l'elemento chiave per ridurre la mortalità in allevamento.

Relativamente alla presenza di micoplasmi, non è stata riscontrata alcuna correlazione tra l'isolamento di *Mycoplasma spp.* in vagina e la percentuale di mortalità nel *peripartum* dei cuccioli. I micoplasmi sono isolati frequentemente nella flora microbica genitale di cani apparentemente sani<sup>7</sup>, tuttavia *Mycoplasma canis* è stato segnalato come causa di orchite ed epididimite nel cane, se inoculato sperimentalmente nel dotto deferente<sup>8</sup>, e di endometrite purulenta in seguito a inoculazione intrauterina nella cagna<sup>9</sup>. La sola individuazione di *Mycoplasma spp.* nel tratto genitale della cagna non è probabilmente sufficiente a stabilire il ruolo di questi microrganismi sulla fertilità nelle cagne. L'andamento del parto è risultato correlato in modo significativo alla percentuale di sopravvivenza dei neonati e infatti la mortalità risulta essere più elevata nei parti languidi (50±36%) rispetto a parti avvenuti in tempi normali (17±20%, P=0,05). È

possibile che la sofferenza fetale causata dal prolungamento dei tempi di espulsione predisponga alle successive infezioni con conseguenti batteriemie e setticemie nel postpartum.

**CONCLUSIONI** – L'analisi dei dati ottenuti nel corso della nostra indagine non ha evidenziato l'esistenza di una correlazione significativa tra tasso di mortalità neonatale e presenza di germi potenzialmente patogeni nel tratto genitale e nel latte materno. Mentre l'andamento del parto è risultato correlato in modo significativo alla percentuale di sopravvivenza dei neonati. Si conferma che l'uso generalizzato di antibiotici nell'allevamento porta alla selezione di ceppi batterici resistenti.

Tab. 1 - Mortalità neonatale in ciascuno dei soggetti esaminati, suddivisi per allevamento, con l'indicazione dell'antibiotico in uso, e in relazione alla presenza e alla localizzazione di batteri potenzialmente patogeni e di micoplasmi.

Tipo	Trattamento Antibiotico	Sogg	Batteri potenzialmente patogeni			Micoplasmi	Mortalità (%)
			Vagina	Latte pre	Latte		
A	Cefalosporine II	1A				X	100
		2A	X		X		30
		3A					100
B	Azitromicina	1B	X	X	X		17
		2B	X	X	X		20
		3B	X	X	X		33
		4B	X		X	X	0
		5B	X		X		20
C	Cefalosporine III	1C	X			X	100
		2C	X			X	50
		3C	X				0
		4C					33
D		1D	X	X	X		100
		2D				X	0
		3D	X			X	0
E	Amoxicillina-ac.clavulanico	1E	X	X			67
		2E				X	0
		3E	X		X		22
Am 1		1	X			50	
Am 2		1	X	X	X	50	
Am 3		1	X		X	0	

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Poffenbarger, E.M., Chandler, M.L., Ralston, S.L., Olson, P.N. Canine neonatology. Part I. Physiologic differences between puppies and adults. *Comp Cont Ed. Small Anim Pract* 12: 1601-1608 (1990). 2. Blunden, T. Diagnosis and treatment of common disorders of newborn puppies. *In Practice*, 10: 175-184 (1988). 3. Hoskins, J.D. Puppy and kitten losses. *In Hoskins JD: Veterinary Pediatrics. Dogs and Cats from Birth to Six Months*, (W. B. Saunders, Philadelphia 3<sup>rd</sup> Ed) Pp. 57-61 (2001). 4. Sager, M., Remmers, C. Some aspects of perinatal mortality in the dog. A clinical, bacteriological and pathological study [in German], *Tierärztliche Praxis*, 18: 415-419 (1990). 5. Saijonmaa-Koulumies L.E., and Lloyd, D.H. Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Dermatol.* 13: 123-130 (2002). 6. Schäfer-Somi, S., Spergser, J., Breitenfellner, J., Aurich, J.E. Bacteriological status of canine milk and septicaemia in neonatal puppies- A retrospective study. *J. Vet. Med. B* 50: 343-346 (2003). 7. Bruchim, A., Lutsky, I., Rosendal, S. Isolation of Mycoplasmas from the canine genital tract: a survey of 108 healthy dogs. *Res Vet Sci* 25: 248-245 (1978). 8. Laber, G. and Holzmann, A. Experimentally induced mycoplasmal infections in the genital tract of the male dog. II Andrological and microbiological investigations after exposure to Mycoplasma. *Theriogenology* 7: 177-188 (1977). 9. Holzmann, A., Laber, G., Walzl, H. Experimentally induced mycoplasmal infections in the genital tract of the female dogs. *Theriogenology* 12: 355-370 (1979).

## RELEVANCE OF BACTERIA AND MYCOPLASMA ISOLATION IN THE VAGINAL TRACT AND IN THE MILK OF PERIPARTURIENT BITCHES. PRELIMINARY RESULTS

Milani C., Faccioli G., Mollo A., Tramontano A., <sup>1</sup>Corrò M., <sup>2</sup>Rota A., *Department of Veterinary Clinical Sciences, University of Padova; <sup>1</sup>Laboratory of Diagnostic Microbiology, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro, PD); <sup>2</sup>Department of Animal Pathology, University of Torino; Italy. Corresponding author: e-mail: ada.rota@unito.it*

**Key words:** neonatal mortality, vaginal bacteriology, milk, Mycoplasma, length of labour

**Introduction** - The rate of stillbirth and neonatal death in dogs ranges from 10% to 34%<sup>1</sup> and is related to many factors including the management of the bitch, its health, the characteristics of whelping facilities and the length of labour. Bacterial infections have been found to be the most common diseases within the first week of life, often leading to puppy death<sup>2</sup>.

The aim of this work was to evaluate if either the detection of potentially pathogen bacteria in the vaginal tract of the bitch, in the pre-partum mammary secretion and in milk, or the detection of *Mycoplasma spp.* in the vaginal tract, or the length of labour, are correlated with neonatal mortality.

**Materials and methods** - A total of 21 bitches of different breeds were included in the study; vaginal swabs for bacteriological examination and Mycoplasma detection were taken about 10 days before parturition, together with a mammary secretion swab. A milk sample was taken 7 days post-partum. The length of labour was registered, together with the number of stillbirths; all the puppies that died within two weeks of age were subjected to post-mortem exams.

**Results and discussion** - A total of 120 puppies were delivered in the 21 whelpings: 25 were stillbirths (20.8%) and 23 (19.2%) died within few days. No gross lesions were ever discovered at necropsy and Canine Herpesvirus was never detected in the tissues of the dead puppies. Potentially pathogenic bacteria, that are a known cause of neonatal septicemia, such as *Escherichia coli*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, and *Staphylococcus intermedius* were sometimes isolated from the bitches and from dead puppies, but the analysis of data (Mann-Witney U-correlation test) did not reveal any significant correlation between the detection of potentially pathogenic bacteria in either of the investigated sites, and neonatal mortality rate; also the presence of *Mycoplasma spp.* was not correlated to puppy mortality. By contrast, the length of labour significantly affected puppy survival rate, with excessively long labour causing higher puppy mortality (P=0.05).

Resistant bacteria strains were isolated from bitches to which antibiotics are routinely administered around parturition.

**References** - 1. Poffenbarger *et al.* Canine neonatology. Part I. Physiologic differences between puppies and adults. *Comp Cont Ed. Small Anim Pract* 12: 1601-1608 (1990). 2. Sager *et al.* Some aspects of perinatal mortality in the dog. A clinical, bacteriological and pathological study *Tierärztliche Praxis* 18: 415-419 (1990).



## **L'ATTIVITÀ TIROIDEA E RIPRODUTTIVA NEL CANE: CORRELAZIONI ESISTENTI TRA FEMMINE EUTIROIDEE E CLINICAMENTE IPOTIROIDEE IN DIVERSE RAZZE**

**Ponzio P.,<sup>1</sup> Macchi E., Lanza M., Burlina V., Bonet S.,** *Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino;* <sup>1</sup>*Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria, Università degli Studi di Torino.*

**Parole chiave:** cane, ghiandola tiroide, ormoni steroidei sessuali, tiroxina libera

**RIASSUNTO** - Scopo del lavoro è la valutazione delle correlazioni tra le concentrazioni sieriche di tiroxina libera (fT<sub>4</sub>), progesterone (P<sub>4</sub>) e fattori stagionali in 2 gruppi di femmine: eutiroidee e con segni clinici riferibili ad ipotiroidismo per la durata di un anno. I campioni ematici di ciascun cane sono stati raccolti due volte per stagione e analizzati per la valutazione delle concentrazioni sieriche di P<sub>4</sub> con kit RIA, e di fT<sub>4</sub> con kit EIA. I risultati elaborati statisticamente hanno mostrato nel gruppo 1 valori sierici di fT<sub>4</sub> compresi nei range indicati per soggetti eutiroidei. Le concentrazioni sieriche di fT<sub>4</sub> risultano significativamente più basse (ma rientranti nei range fisiologici) nel periodo di estrazione e in gravidanza. Il confronto tra le concentrazioni dei valori medi di fT<sub>4</sub> nelle diverse stagioni ha evidenziato differenze significative in particolare in autunno vs inverno e in inverno vs primavera ed estate. Per il P<sub>4</sub> non sono state rilevate differenze stagionali significative.

**INTRODUZIONE** - Il legame tra attività tiroidea e riproduttiva è diffusamente documentato nel cane, ma i riferimenti bibliografici e gli studi scientifici sono generalmente concentrati su aspetti patologici e di non corretta funzionalità di questa ghiandola. Parte dei dati, infatti, riguardano gli aspetti clinici, prognostici e terapeutici e le conseguenze negative sull'apparato riproduttore nel caso di ipotiroidismo. Questo studio si propone di indagare l'aspetto diagnostico e prognostico, le variazioni dell'attività tiroidea in funzione delle modificazioni degli ormoni della sfera riproduttiva in particolare valutando le correlazioni esistenti tra concentrazioni sieriche di fT<sub>4</sub> e di P<sub>4</sub> e le possibili influenze di fattori stagionali in cani eutiroidei o che presentavano una sintomatologia riferibile ad ipotiroidismo.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio ha riguardato soggetti riproduttori provenienti da allevamenti e suddivisi in 2 gruppi. Gruppo 1: 12 femmine, sane, di età compresa tra i 12 mesi e i 5,5 anni appartenenti alle seguenti razze: Labrador Retriever (4), Golden Retriever (6) e Flat Coated Retriever (2). Si è scelto di utilizzare queste tre razze in modo da avere un gruppo omogeneo di animali, sia da un punto di vista morfologico (taglia, peso corporeo) che genetico. Gruppo 2: 21 femmine con evidenti segni clinici riferibili ad ipotiroidismo o appartenenti a razze predisposte a tale patologia, di età compresa tra i 12 mesi e gli 8 anni appartenenti alle seguenti razze: Golden Retriever (8), Labrador Retriever (2), Flat Coat Retriever (2), Leonberger (2), Bassotto Tedesco (1) e Segugio Italiano (2). La scelta dei soggetti da inserire nello studio è stata effettuata sottoponendo i cani ad un esame obiettivo generale (EOG), seguito da uno particolare (EOP) dell'apparato riproduttore. Particolare importanza è stata data all'assenza (Gruppo 1) e/o presenza (Gruppo 2) di segni clinici riconducibili ad ipotiroidismo: alterazioni dei genitali esterni, ipofertilità, alterazioni cutanee, seborrea, alopecia simmetrica, alterazioni comportamentali, vista l'alta incidenza dei quadri ipotiroidei segnalata in alcune di queste razze<sup>1</sup>. Lo studio ha coperto un arco temporale di un anno suddiviso in quattro periodi stagionali. Per ogni soggetto sono stati eseguiti due prelievi ematici effettuati con modalità standardizzate, all'inizio (nel primo mese) e dopo due

mesi e mezzo circa di ciascun periodo, sempre preceduti da EOG dei soggetti. In ogni sessione di prelievo è stato eseguito un esame con metodica Diff-quick® per la determinazione della fase del ciclo riproduttivo. Sono state determinate le concentrazioni sieriche di fT<sub>4</sub> e P<sub>4</sub>. La concentrazione sierica di fT<sub>4</sub> è stata definita utilizzando un kit immunoenzimatico (DLS-10-40100 ACTIVE® Free-T<sub>4</sub> EIA, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA) mentre per quella del progesterone sierico è stato impiegato un kit radioimmunologico (DSL 3900 ACTIVE® PROGESTERONE RIA, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA), entrambi precedentemente validati sul cane. I valori di fT<sub>4</sub> e P<sub>4</sub> sono stati confrontati, raggruppandoli per fase del ciclo estrale e stagione. I risultati sono stati espressi come valori medi ±SD. Per l'elaborazione statistica dei dati (GraphPad InStat 3 Software) sono stati utilizzati il test di Kolmogorov-Smirnov per valutarne la distribuzione gaussiana. Per il Gruppo 1 la correlazione esistente tra concentrazioni sieriche di fT<sub>4</sub> e la fase del ciclo riproduttivo è stato valutata con il test di Pearson (SPSS Software). Mentre per il Gruppo 2 per confrontare le concentrazioni sieriche di fT<sub>4</sub> nei soggetti nelle diverse stagioni è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis (ANOVA non parametrica) e il test di Mann-Whitney, con significatività pari a p<0,05.

**RISULTATI** - Gruppo 1: I valori medi di fT<sub>4</sub> e P<sub>4</sub> osservati sono stati rispettivamente di 1,61±0,69 ng/dl e 4,52±9,79 ng/ml. Le relazioni esistenti tra il momento del ciclo riproduttivo, la concentrazione sierica di fT<sub>4</sub> e quella di P<sub>4</sub> sono riportate in Fig. 1. È stato osservato che il valore sierico di fT<sub>4</sub> subisce variazioni significative (p<0,05) in particolari momenti del ciclo riproduttivo (diestro e gravidanza) pur rimanendo sempre, come valori medi, nel range basale indicato per i soggetti eutiroidei. Gruppo 2: Le concentrazioni sieriche osservate sono state raggruppate per stagione. I valori medi di fT<sub>4</sub> ±SD (ng/dl) sono risultati essere in autunno 0,79±0,58, in inverno 2,2±1,56, in primavera 0,63±0,35 e in estate 0,61±0,22. Il confronto tra le concentrazioni dei valori medi di fT<sub>4</sub> nelle diverse stagioni ha evidenziato differenze significative in particolare in autunno vs l'inverno ed in inverno vs la primavera ed estate. I valori medi di P<sub>4</sub> ±SD (ng/ml) sono risultati essere in autunno 2,43±5,33, in inverno 7,34±11,97, in primavera 6,27±11,88 e in estate 5,18±11,38, senza però rilevare differenze significative. Le correlazioni fra le concentrazioni sieriche di fT<sub>4</sub> e P<sub>4</sub> nelle diverse stagioni hanno evidenziato, da un lato, che a valori di fT<sub>4</sub> nei range fisiologici la correlazione con il P<sub>4</sub> risulta simile a quella osservata nel Gruppo 1 (Fig. 2) senza però evidenziare differenze significative. Dall'altro, per valori di fT<sub>4</sub> inferiori al valore soglia (0,50 ng/dl), la corrispondenza con il P<sub>4</sub> è risultata molto significativa (p<0,005), in particolare in diestro e gravidanza (P<sub>4</sub> >15 ng/ml), ma con valori di P<sub>4</sub> che risultano significativamente più bassi (Fig. 3).

**DISCUSSIONE** - Le concentrazioni ormonali riscontrate nelle femmine rientrano nei range fisiologici riportati in letteratura<sup>1</sup>. In particolare, i valori di fT<sub>4</sub>, tendono a raggiungere i livelli prossimi alla soglia inferiore del range in corrispondenza del maggior carico di progesterone. Nel periodo di quiescenza ormonale (anaestro) le uniche interferenze sull'attività tiroidea sono problemi riconducibili a fattori gestionali. In letteratura sono riportate correlazioni con l'andamento del progesterone unicamente riferite alla tiroxina totale (total T<sub>4</sub>). Le concentrazioni di tale ormone sono significativamente maggiori con alti livelli di P<sub>4</sub><sup>2</sup>. Infatti, il P<sub>4</sub>, tendendo ad esaltare l'affinità di legame con le proteine plasmatiche preposte a veicolare gli ormoni tiroidei, provoca un incremento della frazione totale di T<sub>4</sub> in circolo<sup>1</sup>. I risultati mostrano quanto, nel Gruppo 2, la concentrazione della fT<sub>4</sub> subisca delle significative alterazioni in relazione alla stagione, a fattori ormonali ed alla presenza di segni clinici riferibili ad ipotiroidismo. In particolare è stato osservato che la concentrazione di fT<sub>4</sub> subisce delle

modificazioni durante tutte le stagioni, mentre questo non avviene per il progesterone. In conclusione si può affermare che in tutti i soggetti esaminati il  $fT_4$  risulta correlato ai livelli di  $P_4$ . In particolare, per i soggetti eutiroidei, con valori di  $fT_4$  al di sopra di 0,50 ng/dl, la correlazione è significativa mentre per i soggetti con segni clinici manca questa significatività; a valori minimi dell'ormone tiroideo corrispondono i massimi valori di  $P_4$ . Nei soggetti patologici, invece, con valori di  $fT_4$  al di sotto del limite soglia si osserva una significativa diminuzione del progesterone. Tale situazione giustifica in alcuni casi quadri relativi ad aborto precoce, riassorbimento fetale, nascita di soggetti morti o con un basso peso alla nascita<sup>3</sup>, feti mummificati, difficoltà nel concepimento ed inerzia uterina<sup>4</sup>. Ai fini del corretto monitoraggio dell'attività tiroidea nella cagna l'indicazione del dosaggio del solo parametro ormonale ( $fT_4$ ) risulta poco utile e di interpretazione non esaustiva. Per questo motivo, i risultati devono essere sempre integrati al contesto complessivo dell'anamnesi, dei riscontri clinici e dei dati di laboratorio relativi agli ormoni sessuali. Inoltre, come emerge da questo studio, si sconsiglia la valutazione della tiroxina libera in periodi con elevata attività ormonale riferibile alla fase luteinica. Soprattutto in alcune categorie di soggetti ritenuti a rischio (soggetti "border line", con "sindrome dell'eutiroideo malato" e razze predisposte) il dato diagnostico può risultare sfalsato ed interpretato in maniera non corretta. Questo parametro dovrebbe essere affiancato ad un monitoraggio completo dell'attività ghiandolare che comprenda dosaggio basale e di stimolazione con TSH ed eventualmente ad una più completa valutazione dell'asse gonado-ipofisiario. Tale screening purtroppo comporta costi elevati per la sua esecuzione e di conseguenza risulta spesso improponibile ai fini clinici sul piano pratico. Aumentando la casistica e il numero di prelievi per soggetto per ciascuna fase del ciclo riproduttivo, potranno essere individuati range specifici di riferimento per emettere diagnosi indirette e confermare quadri patologici non conclamati e subdoli, che rappresentano una tra le principali cause responsabili della compromissione delle performance dei soggetti in carriera.

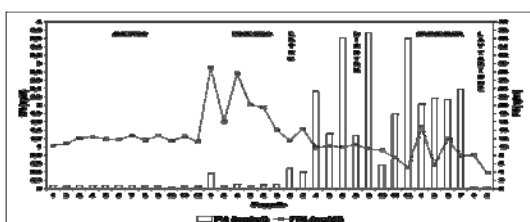


Fig.1- Concentrazioni di  $P_4$  e  $fT_4$  nelle diverse fasi del ciclo per valori superiori al valore soglia

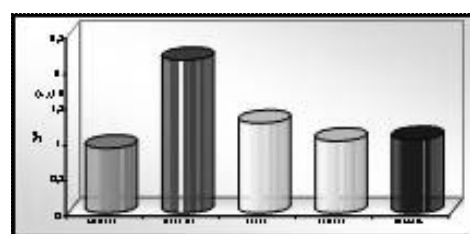
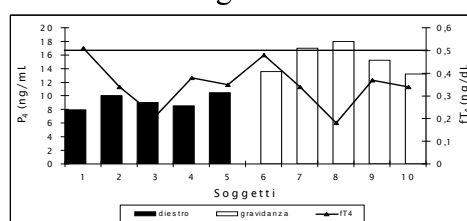


Fig.2 – Concentrazioni di  $fT_4$  nelle diverse fasi del ciclo per valori superiori al valore soglia

Fig.3 - Concentrazioni di  $P_4$  e  $fT_4$  in diestro e gravidanza per valori di  $fT_4$  inferiori al valore soglia (Gruppo 2)



**BIBLIOGRAFIA - 1.** Feldman F.C, Nelson R.W., Canine thyroid tumors and hyperthyroidism. *Feldman E.C Nelson E.C: Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, Philadelphia, W.B Saunders* (1996). **2.** Reimers T.J., Lawler D.F., Sutaria P.M., Correa M.T., Erb H.N. Effects of age, sex, and body size on serum concentrations of thyroid and adrenocortical hormones in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 51(3),454–457(1990). **3.** Panciera D.L., Conditions associated with canine hypothyroidism. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 31(5),935-950 (2001). **4.** Johnson C.A. Thyroid issues in reproduction. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 17, 129-132 (2002).

## THYROID AND REPRODUCTIVE ACTIVITIES IN DOGS: CORRELATIONS BETWEEN EUTHYROIDAL AND CLINICALLY HYPOTHYROIDAL BITCHES IN DIFFERENT BREEDS

Ponzio P., <sup>1</sup>Macchi E., Lanza M., Burlina V., Bonet S., *Department of Animal Pathology, University of Turin, <sup>1</sup>Department of Veterinary Morphophysiology, University of Turin. Italy.*  
Corresponding author: [patrizia.ponzio@unito.it](mailto:patrizia.ponzio@unito.it)

**Key words:** dogs, thyroid gland, sexual steroid hormones, free tiroxine

**INTRODUCTION-**The aim of the study is to evaluate the correlation between thyroid gland and reproductive hormones with the evaluation of fT<sub>4</sub> and P<sub>4</sub> concentrations and any seasonal effects in euthyroid animals or with symptoms related to hypothyroidism.

**MATERIALS AND METHODS-** The study was developed for 12 months divided into 4 seasonal periods, in which 2 samples of blood and 1 vaginal smear were collected in two groups: **I** 12 healthy females (Labrador Retriever (R.) (4), Golden R. (6) and Flat Coated R. (2)) used for reproduction, aged between 12 months and 5,5 years old; **II** 21 females (Labrador R. (2), Golden R. (8), Flat Coated R. (2), Leonberger (2), German Dachshund (1) and Italian Bloodhound (2)) with evident clinical signs of hypothyroidism, aged 12 months-8 years old: fT<sub>4</sub> concentration with EIA and P<sub>4</sub> with RIA were evaluated, comparing the two values grouping them by estrous phase and by season; statistic analyses were then performed.

**RESULTS** - Group I. Mean values of fT<sub>4</sub> and P<sub>4</sub> were respectively  $1.61 \pm 0.69$  ng/dl and  $4.52 \pm 9.79$  ng/ml. Serum concentration of fT<sub>4</sub> changed significantly ( $p < 0.05$ ) during diestrus and pregnancy, but the mean values were always within the reference range for euthyroidism. Group II. Mean fT<sub>4</sub>  $\pm$  SD (ng/dl) values were:  $0.79 \pm 0.58$  in Autumn,  $2.2 \pm 1.56$  in Winter,  $0.63 \pm 0.35$  in Spring and  $0.61 \pm 0.22$  in Summer. Comparison between fT<sub>4</sub> mean values during different seasons showed significant differences in Autumn vs Winter and in Winter vs Spring/Summer. Mean P<sub>4</sub>  $\pm$  SD (ng/ml) values were:  $2.43 \pm 5.33$  in Autumn,  $7.34 \pm 11.97$  in Winter,  $6.27 \pm 11.88$  in Spring and  $5.18 \pm 11.38$  in Summer, without significant differences. Correlations between serum P<sub>4</sub> and fT<sub>4</sub> concentrations during different seasons showed: 1) with physiological fT<sub>4</sub> values they have a correlation with P<sub>4</sub> values which is similar to that observed in Group 1 without significant differences; 2) when fT<sub>4</sub> values are below the reference range (0.50 ng/dl) they have a very significant correlation with P<sub>4</sub> values ( $p < 0.005$ ), especially for diestrus and pregnancy values (P<sub>4</sub> >15 ng/ml). During these stages, P<sub>4</sub> values are significantly lower.

**DISCUSSION** - The fT<sub>4</sub> and P<sub>4</sub> concentrations measured are in agreement with the values reported in literature. In particular, fT<sub>4</sub> values are close to the lower limit of the reference range when P<sub>4</sub> serum concentration is elevated. Previous studies only demonstrated the correlation between P<sub>4</sub> and total T<sub>4</sub>; serum concentrations of this thyroidal hormone are significantly elevated when there are high levels of P<sub>4</sub>. The results show that, in Group 2, fT<sub>4</sub> was influenced by season, hormonal factors and by the presence of clinical signs related to hypothyroidism. It was observed that fT<sub>4</sub> concentration changed during all seasons. From the results, fT<sub>4</sub> is influenced by P<sub>4</sub> values in all the animals studied. In euthyroidal dogs (fT<sub>4</sub> >0.50 ng/dl), this correlation is significant, while in pathologic dogs a significant P<sub>4</sub> decrease was observed that could be the cause of reproductive pathologies. The evaluation of the thyroid gland function in the bitch by measurements of fT<sub>4</sub> is not enough. In particular, it should be avoided in periods when the levels of P<sub>4</sub> are greater high, above all in "borderline" animals, "euthyroid sick syndrome" animals and predisposed breeds.

## PROTOCOLLI ANESTESIOLOGICI PER LA CASTRAZIONE DELL'ALPACA (*Lama pacos*)

Vullo C., Catone G., Scrollavezza P. *Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Camerino*

**Parole chiave:** alpaca, castrazione, analgesia, protocolli anestetici.

**RIASSUNTO** - Il crescente sviluppo in Italia di allevamenti di alpaca, ha dato vita ad una Associazione Nazionale denominata ITALPACA, la quale ha istituito un Registro Anagrafico (RA) volto ad identificare gli alpaca presenti e nati in Italia e a predisporre uno strumento per il miglioramento genetico della popolazione sul nostro territorio. A tal fine, i soggetti maschi che presentano sia caratteristiche morfologiche non conformi sia alterazioni a carico dell'apparato riproduttore, vengono sottoposti a castrazione. Il numero crescente di richieste per questo tipo di intervento ci ha portati ad elaborare protocolli anestetici applicabili per la castrazione in stazione quadrupedale in grado di soddisfare le esigenze operative su campo. Abbiamo utilizzato associazioni anestetiche già sperimentate da altri autori, quali xilazina e butorfanolo per via intramuscolare e lidocaina per via epidurale, e inoltre abbiamo voluto saggiare l'efficacia analgesica di una molecola fino ad ora mai utilizzata in questa specie, il tramadolo.

**INTRODUZIONE** - L'alpaca è una specie animale del genere *Lama*, appartenente al gruppo dei Camelidi originari del Sud America, distinta in due varietà, gli *Huacaya* ed i *Suri*. Anche nel nostro paese il numero di allevamenti di alpaca è in continua crescita, in particolare per le richieste sempre maggiori da parte del mercato di prodotti naturali e di alta qualità, quale la pregiatissima fibra, senza trascurare l'importanza che questo animale sta assumendo come *animale da compagnia (pet)*. Pertanto sono sempre più numerose le richieste da parte degli allevatori di prestazioni professionali che richiedono un miglioramento dei protocolli anestesioologici per poter garantire un perfezionamento delle tecniche diagnostiche e chirurgiche. In particolare abbiamo voluto approfondire alcuni protocolli anestetici applicabili per la castrazione in stazione quadrupedale. Le indicazioni per questa procedura, sicuramente la più comune sia nell'alpaca sia nel lama, sono rappresentate dalla prevenzione di comportamenti aggressivi, frequenti nel maschio di queste specie, dalla prevenzione di accoppiamenti indesiderati con femmine addomesticate e infine la castrazione, così come la vasectomia, rappresentano un mezzo per evitare la trasmissione di caratteristiche genetiche indesiderate<sup>1</sup>. La castrazione nell'alpaca può essere eseguita a qualsiasi età, sebbene alcuni autori suggeriscono di effettuarla non prima dei 18-24 mesi, al fine di garantire una completa maturazione dell'apparato muscoloscheletrico. Infatti, quando la castrazione veniva effettuata a 4-6 mesi di età, sono state evidenziate alcune anomalie di sviluppo, quali ad esempio la lussazione patellare laterale e lo sviluppo precoce di fenomeni degenerativi osteoartritici<sup>2</sup>. La castrazione può essere eseguita con due diverse tecniche: la prima prevede la tecnica pre-scrotale, del tutto simile a quella eseguita nella specie canina, la seconda la tecnica scrotale, analogamente al cavallo e al suino<sup>3</sup>. Quest'ultima può essere realizzata sia con l'animale in decubito oppure in stazione, mentre la castrazione pre-scrotale necessita dell'abbattimento e pertanto dell'anestesia generale<sup>4</sup>. Entrambe le tecniche risultano soddisfacenti, sebbene alcuni proprietari ritengono l'approccio pre-scrotale esteticamente più accettabile e meno esposto alla infestazione da mosche<sup>4</sup>. L'anestesia generale induce frequentemente nei ruminanti rigurgito attivo e passivo, oltre a timpanismo prolungato, effetti che complicano l'evento anestetico soprattutto quando l'animale assume il decubito dorsale<sup>5</sup>. Per questo motivo è raccomandabile far digiunare i camelidi per 18-24 ore prima dell'intervento

anestetico e privarli dell'acqua per lo stesso periodo<sup>6</sup>. Tuttavia, dal momento che i ruminanti accettano bene la contenzione meccanica, è spesso sufficiente una sedazione, associata eventualmente ad un'anestesia epidurale, per portare a termine molte delle usuali procedure<sup>7</sup>. Al fine di limitare gli effetti indesiderati dell'anestesia generale, si sono pertanto voluti saggiare tre diversi protocolli anestetici che potessero soddisfare le esigenze analgesiche ed operative ed agevolare la ripresa dell'attività motoria e sensoriale, tenendo conto delle potenziali difficoltà derivanti dall'operare in ambiente extraospedaliero. Inoltre abbiamo voluto sperimentare l'efficacia di un nuovo analgesico, il tramadolo, largamente utilizzato in Medicina Veterinaria, la cui farmacocinetica è stata recentemente studiata anche nella capra<sup>8</sup>. Tutti i protocolli hanno previsto l'utilizzo della xilazina e della lidocaina, farmaci ampiamente adoperati in questa specie<sup>1,9,10,11</sup>.

**MATERIALI E METODI** - Dodici alpaca maschi, di età  $5,4 \pm 3,4$  anni e di peso  $63,2 \pm 5,0$  Kg, sono stati sottoposti ad esame clinico ed ecografico degli organi scrotali. In cinque animali sono state riscontrate alterazioni a carico del parenchima testicolare (focolai di microlitiasi ed ectasia della *rete testis*), tre animali presentavano spermatocele con evidenti segni di sofferenza parenchimale, mentre i restanti quattro, con caratteristiche morfologiche non conformi allo standard di razza, non mostravano alcuna modificazione evidente. Prima di eseguire la castrazione in campo, abbiamo suddiviso in maniera randomizzata gli animali in tre gruppi. Al primo gruppo (gruppo A) è stata somministrata xilazina (0,3 mg/kg IM) e lidocaina 2% per via epidurale caudale (0,22 mg/kg) con un ago da 18 gauge e 2,5 cm di lunghezza. Al secondo gruppo (gruppo B) è stata somministrata una miscela di xilazina (0,3 mg/kg IM) e tramadolo (2,0 mg/kg IM) associata alla medesima anestesia epidurale. Infine al terzo gruppo (gruppo C) è stata somministrata una miscela di xilazina (0,3 mg/kg IM) e butorfanolo (0,2 mg/kg IM) associata alla stessa anestesia epidurale. Quindici minuti dopo ciascuna inoculazione, gli animali sono stati condotti in un box ed è stata posizionata una palla di paglia sotto la regione addominale per consentire maggiore stabilità durante l'intervento. Tutti gli animali, dopo accurata disinfezione del campo operatorio, sono stati quindi sottoposti a castrazione a testicolo coperto con approccio scrotale mediante un'incisione di 2 cm effettuata su ciascun emisacroto parallela al rafe mediano e successiva doppia legatura (Vicryl® 0/0) del cordone spermatico dopo inoculazione di lidocaina (1,5 ml) nello spessore dello stesso. Durante tutta la fase intraoperatoria è stata valutata da uno stesso operatore la risposta algica degli animali alle manualità chirurgiche con una Scala Analogica Visuale (VAS) a 5 punti: 0= nessuna risposta algica (l'animale non si muove); 1= segni di minimo dolore; 2= segni di leggero dolore; 3= segni di moderato dolore; 4= segni di intenso dolore; 5= massimo dolore (l'animale scalcia ed emette vocalizzazioni). Nelle 2 ore successive all'intervento si sono osservati gli animali per registrare eventuali reazioni avverse o effetti collaterali.

**RISULTATI** - Tutti e tre i protocolli anestetici hanno consentito di portare a termine l'intervento chirurgico senza nessun effetto collaterale, sebbene gli animali del gruppo A hanno necessitato di una maggiore contenzione meccanica, probabilmente per la mancata somministrazione di un agente analgesico in grado di potenziare l'effetto della xilazina. Infatti in questo gruppo il punteggio della VAS è stato in tutti gli animali variabile da 1 a 2. In tutti i casi è stata comunque sufficiente una sola persona per mantenere gli animali nella posizione idonea per eseguire la castrazione. Nel gruppo B e nel gruppo C non si sono osservate differenze nella risposta algica alle manualità operative, a conferma che sia il butorfanolo, già ampiamente utilizzato in questa specie<sup>11,12,13</sup>, che il tramadolo, per la prima volta utilizzato, possono rappresentare degli ottimi agenti antidolorifici. In questi due gruppi infatti il punteggio della VAS è stato

uguale a zero. L'anestesia epidurale caudale, effettuata a livello dello spazio sacrococcigeo, ha garantito, come riportato in letteratura<sup>14</sup>, l'analgesia del perineo e tutti gli animali hanno mantenuto la stazione quadrupedale, agevolati anche dalla presenza della palla di paglia posizionata sotto la regione addominale. L'ulteriore analgesia locale, garantita dall'infiltrazione del cordone spermatico, ha consentito di eseguire la legatura dello stesso senza riscontrare alcuna risposta difensiva degli animali. Questo ha permesso di desensibilizzare le terminazioni nervose dal momento che ciò non è sufficientemente garantito dall'anestesia epidurale<sup>14</sup>. Terminato l'intervento, che ha avuto una durata di 15±3 minuti, gli animali, autonomi dal punto di vista motorio, sono stati ricondotti nel recinto. Non è stata osservata alcuna complicanza post operatoria o anestetica nelle due ore successive all'intervento, pertanto gli animali sono stati lasciati liberi di alimentarsi.

**DISCUSSIONE** - I tre protocolli anestetici eseguiti, sebbene abbiamo permesso l'esecuzione in tutti i casi della castrazione in stazione quadrupedale, ci hanno permesso di concludere che l'utilizzo di un agente analgesico, quale il butorfanolo o il tramadolo, determina una risposta algica nettamente inferiore, ciò probabilmente dovuto al potenziamento dell'agente ipnotico utilizzato nella sedazione. Sebbene la valutazione dell'efficacia del tramadolo si sia basata esclusivamente sulla risposta dolorifica dell'animale alle manualità chirurgiche, possiamo affermare che il dosaggio utilizzato non ha determinato reazioni avverse clinicamente apprezzabili. Ulteriori approfondimenti si rendono pertanto necessari sia per valutare il profilo farmacocinetico di questo farmaco nei camelidi, sia per sperimentarlo negli stessi animali in associazione ad altri agenti sedativi. Inoltre, un monitoraggio più accurato, che si rende possibile solo in anestesia generale, ci potrà eventualmente confermare la tollerabilità di questa molecola.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Padula AM Clinical evaluation of caudal epidural anaesthesia for the neutering of alpacas. *Veterinary Record*, 156:616-617 (2005). **2.** Fowler ME Surgery. In: *Medicine and Surgery of South American Camelids: Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco*. 2nd ed Ames, Iowa State University Press, 136 (1998). **3.** Baird AN, Pugh DG, Wenzel JGW, Lin HC Comparison of two castration techniques for castration of llamas. *J Am Vet Med Assoc*, 208:261-262 (1996). **4.** Pugh DG, Baird AN, Wolfe DF, Wenzel JGW, Lin HC A pre-scrotal castration technique for llamas. *Eq Pract*, 16:26-28 (1994). **5.** Caulkett N Anesthesia of ruminants. *Large An Vet Round*, 3:111-117 (2003). **6.** Tranquilli WJ Techniques of inalation anaesthesia in ruminants and swine. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2:593-619 (1986). **7.** King MR, Hendrickson DA, Southwood LL, Trumble TN, Johnson LW Laparoscopic ovariectomy in two standing llamas. *Am J Vet Res*, 58:153-156 (1997). **8.** De Sousa AB et al. Pharmacokinetics of tramadol and o-desmethyltramadol in goats after intravenous and oral administration. *J Vet Pharmacol Therap*, 31:45-51 (2007). **9.** Dugdale A Anaesthesia of a pregnant alpaca (*Lama pacos*). *Vet Rec*, 7:28 (2001). **10.** Riebold T Anaesthesia in south american camelids. *Proceed of International Camelid Health Conference*, Corvallis, pp 4-7 (2005). **11.** Prado TM, Dubois WR, Ko JC, Mandasager RE, Morgan GL A comparison of two combinations of xylazine-ketamine administered intramuscularly to alpacas and of reversal with tolazoline. *Vet Anaesth Analg*, 18 (2008) in corso di pubblicazione. **12.** Carpenter EM, Hendrickson DA, Anderson DE Laparoscopic ovariectomy and ovariohysterectomy in llamas and alpacas. *Vet Clin North Am: Eq Pract*, 16:363-375 (2000). **13.** Garcia-Pereira FL, Greene SA, Keegan RD, McEwen MM, Tibary A Effects of intravenous butorphanol on cardiopulmonary function in isoflurane-anesthetized alpacas. *Vet Anaesth Analg*, 34:269-74 (2007). **14.** Grubb TL, Riebold TW, Huber MJ Evaluation of lidocaine, xylazine, and a combination of lidocaine and xylazine for epidural analgesia in llamas. *J Am Vet Med Ass*, 203:1441-1444 (1993).

## **ANAESTHETIC PROTOCOLS FOR THE NEUTERING OF ALPACAS (*Lama pacos*)**

**Vullo C., Catone G., Scrollavezza P.,** *Department of Veterinary Science, University of Camerino, Italy. Corresponding author: cecilia.vullo@unicam.it*

**Key words:** alpacas, castration, analgesia, anaesthetic protocols.

**Introduction** – The increasing popularity of alpacas around the world has presented veterinarians with a number of new challenges in veterinary practice, such as the routine neutering of male alpacas. Neutering, probably the most common elective surgical procedure performed on alpacas, is possible from any age, although most veterinarians recommended waiting until two years of age when skeletal height maturity has been reached. The growing development in Italy of alpaca breeding has led to the creation of a National Association, which has set up an Identification Registry (RA) to classify alpacas present and born in Italy. To this end, males who lack standard morphological and genetic characteristics, or who present reproductive system alterations or aggressive behavior are submitted to castration. Basically, any castration method that has been used in other livestock and *pet* animals has been performed successfully in alpacas, but the increasing demand for male field castration led us to develop an anesthetic protocol for performing surgery in a standing position. The aim of this study, in alpacas receiving epidural and local analgesia prior to male castration, was to evaluate a new analgesic drug, tramadol, in combination with xylazine, and to compare it with xylazine alone or in combination with butorphanol.

**Materials and Methods** - Twelve male alpacas submitted to castration were divided into three groups and neutered using three anesthetic protocols. Group A received xylazine 0.3 mg/kg IM, group B received xylazine 0.3 mg/kg in combination with tramadol 2.0 mg/kg IM, and group C received xylazine 0.3 mg/kg in combination with butorphanol 0.2 mg/kg IM. Each group underwent caudal epidural anesthesia and local spermatic cord analgesia with lidocaine 2% to complete anesthesia and to allow castration in a standing position. The pain reaction was recorded during surgery on a five-point Visual Analogue Pain Scale (VAS) from 0 (no pain) to 5 (maximum pain).

**Results** - All the anesthetic protocols enabled us to perform castrations in a standing position without side-effects, but group A required stronger handling. The VAS was 0 in groups receiving butorphanol or tramadol, but was 1 or 2 in group receiving only xylazine. In the 2 hours after surgery no adverse reactions or side-effects were observed in any of the animals.

**Conclusions** - Epidural anesthesia is a commonly-performed veterinary procedure on farm animals, typically for procedures involving obstetric manipulations and surgery of the perineum. The advantages of caudal epidural anesthesia for neutering are that it is fast and simple, the animals remain standing, they resume grazing shortly afterwards, soil contamination of the wound due to recumbency can be reduced, and the risks of general anesthetic are avoided. Supplemental local analgesia directly into the spermatic cord improves the nerve blockade. Butorphanol or tramadol addition to xylazine facilitates animal handling and improves xylazine's antalgic effects. In this study, tramadol provided similar analgesic effects to butorphanol, although further clinical experience is required to evaluate tramadol's pharmacological effects and to confirm tramadol dosage and combinations.



## **INTEGRITÀ MORFOFUNZIONALE DI SPERMATOZOI DI VERRO IN DIFFERENTI DILUITORI: VALUTAZIONE CON TRIPLA COLORAZIONE FLUORESCENTE E SISTEMA “CASA”**

**Maggio V., Lange Consiglio A., <sup>1</sup>Bassini P., <sup>1</sup>Gottardi L., Cremonesi F.,** Unità Operativa di Riproduzione, Ospedale Grandi Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Polo Universitario di Lodi, Località Polledra, 26900 Lodi; <sup>1</sup>Libero professionista

**Parole chiave:** Spermatozoi, vitalità, diluitori, CASA, colorazione multipla fluorescente

**RIASSUNTO** - Scopo di questo lavoro è stato di valutare i parametri di motilità di spermatozoi con il sistema “CASA” e di mettere a punto un semplice metodo per l’analisi simultanea dell’integrità della membrana plasmatica, di quella acrosomale e di quella della guaina mitocondriale di spermatozoi di verro mantenuti in diluenti a breve e lunga conservazione. Da questo studio emerge che entrambe le tecniche forniscono informazioni non solo obiettive ma anche dettagliate sulle caratteristiche del movimento del singolo spermatozoo e sull’integrità delle diverse membrane che lo costituiscono, rispetto alla classica valutazione quali-quantitativa. L’ottima combinazione di pH ed osmolarità dei diluitori è correlata con le più alti percentuali di vitalità degli spermatozoi durante il periodo di conservazione.

**INTRODUZIONE** - Nel settore suinicolo, la rapida diffusione dell’inseminazione artificiale (I.A.) è stata favorita dagli incoraggianti risultati raggiunti, relativamente alle percentuali di gravidanza ed al numero di suinetti nati. L’elevata tecnologia utilizzata per l’applicazione di questa moderna tecnica di riproduzione ha, però, posto in primo piano il problema del controllo di qualità del materiale seminale suino sia fresco sia dopo diluizione. Per questo motivo diventa importante affiancare alle analisi standard di motilità, vitalità e morfologia degli spermatozoi altri strumenti d’analisi di facile applicabilità e di veloce esecuzione, che consentono allo stesso tempo una lettura attendibile ed una ripetibilità dei dati rilevati, in modo da ottenere un dato statistico accettabile. Ciò consentirebbe di migliorare l’operatività biotecnologica che, negli ultimi anni, ha determinato una svolta nell’I.A. suina anche per l’utilizzo di diluitori di nuova formulazione per il materiale refrigerato.

In base a queste premesse, con questo lavoro si è analizzata la sopravvivenza dello sperma di verro, dopo diluizione in differenti mestruai a breve e lunga conservazione, impiegando due tecniche innovative consistenti:

- ✓ nell’analisi della motilità attraverso un sofisticato sistema di valutazione della motilità quale il Computer Assisted Semen Analysis (CASA) che fornisce informazioni dettagliate non solo sulla velocità del singolo spermatozoo ma anche sulle modalità con le quali questa cellula si muove;
- ✓ in una colorazione multipla fluorescente che consente di evidenziare contemporaneamente l’eventuale reazione acrosomale spontanea, la potenzialità delle membrane mitocondriali e la percentuale di spermatozoi vivi/morti durante il periodo di conservazione.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio ha preso in considerazione 3 suini, due dei quali di razza Large White ed uno di razza Landrace di età compresa tra i 2 e i 4 anni.

Ai fini della sperimentazione sono stati scelti 9 diluitori, per comodità siglati con le lettere da A a I, fra quelli comunemente in commercio per la diluizione e la conservazione del seme suino per brevi (6 giorni) o lunghi periodi (12 giorni). I diluitori commerciali utilizzati non hanno una composizione chimica nota, quindi, per poterne discutere la qualità sono stati sottoposti all’analisi del pH e dell’osmolarità.

Il prelievo dello sperma da ogni verro è stato eseguito attraverso un manichino meccanico, l'AutoMate® Boar Dummy (Minitub, Austria), ed è sempre stata raccolta tutta la seconda frazione di eiaculato scartando la prima e la terza frazione. Dopo la raccolta è stata eseguita una rapida analisi del seme in azienda valutando il volume, il colore, l'odore, il pH, la motilità spermatica tramite un microscopio ottico e la concentrazione tramite lo spermio densimetro di Karras. In azienda il seme è stato filtrato attraverso 4 strati di garza sterile e, successivamente, è stato separato in 9 frazioni dello stesso volume e diluito ad una concentrazione di  $50 \times 10^6$  spz/ml con ognuno dei 9 diluitori utilizzati.

Tutti i campioni di seme sono stati trasportati entro 30 minuti a 35°C in laboratorio, dove sono stati aggiunti 300 mg/l di gentamicina solfato per prevenire la crescita microbica durante il periodo di conservazione che si è protratto anche per 12 giorni.

La qualità dello sperma è stata valutata ai giorni 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 di conservazione. Ogni campione è stato valutato attraverso il sistema "CASA" che ha fornito la concentrazione e l'analisi completa della motilità. Contemporaneamente, è stato sottoposto alla colorazione multipla fluorescente mediante l'uso di Ioduro di Propidio, FITC-PNA e JC-1 e, dopo aver eseguito uno striscio su vetrino, è stato osservato con microscopio a fluorescenza.

**RISULTATI** - A 20°C, i valori di pH dei diluitori variavano da 6,44 a 7,44 e quelli di osmolarità da 245 a 335 mOsm. I tre verri utilizzati per la sperimentazione sono da considerarsi ottimi riproduttori sia dai dati della loro fertilità in vivo (la percentuale media dei ritorni dovuta a questi tre verri è del 9,5% e non è significativamente diversa dal valore medio dell'Associazione Provinciale Allevatori del 10,84%), sia da una prima analisi quali-quantitativa dello sperma effettuata secondo le analisi di routine.

La percentuale di spermatozoi mobili, che si attestava al giorno zero attorno al 90%, è decresciuta in maniera statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con il progredire dei giorni di conservazione in tutti i diluenti testati. È, però, emersa una scarsa percentuale di spermatozoi con motilità progressiva fin dal giorno zero di conservazione in tutti i diluitori testati.

Con il progredire del periodo di conservazione si è ridotta significativamente ( $p < 0,05$ ) in tutti i mestruai la percentuale di cellule dotate di motilità ed è aumentata la percentuale di cellule non vitali mostrandoti basso potenziale di membrana mitocondriale e/o spontanea reazione acrosomale. Al termine del periodo di conservazione sono stati significativamente più alti ( $p < 0,05$ ) i valori delle velocità (VCL, VAP e VSL), di LIN e STR nei diluitori E ed I (rispettivamente a breve e lunga conservazione) che sono risultati i migliori tra quelli analizzati. Sono state particolarmente interessanti due categorie di spermatozoi che hanno presentato positività allo ioduro di propidio ma manifestavano alto potenziale di membrana e/o positività alla FITC-PNA. Si è supposto in questi nemaspermi un fenomeno di destabilizzazione delle membrane che vedeva coinvolta più tardivamente quella mitocondriale. È particolare l'andamento di queste due popolazioni durante il periodo di conservazione: nel diluente B per quelli a breve conservazione, ed in tutti e tre i diluenti a lunga conservazione la percentuale di spermatozoi destabilizzati tende a decrescere con l'aumentare dei giorni di conservazione e per il diluente H già a partire dall'8° giorno. Dall'analisi statistica è emerso che la frequenza di spermatozoi vitali con acrosoma intatto ed alta potenzialità di membrana era correlata positivamente con la percentuale di spermatozoi mobili indipendentemente dal diluente utilizzato.

**DISCUSSIONE** - La motilità è un importante parametro per la qualità dello sperma di suino, come per tutte le specie. Per una fecondità ottimale è necessaria una motilità di almeno il 60%<sup>1</sup>. La decrescita della motilità con il progredire della conservazione

potrebbe essere correlata a variazioni nell'uptake di ossigeno e nell'attività metabolica determinate dai diluenti oltre che da uno spontaneo processo d'invecchiamento cellulare.

Per quanto riguarda la bassa motilità progressiva percentuale, si pensa che possa essere dovuta all'effetto della diluizione: è risaputo che lo shock da diluizione riduce la motilità progressiva a favore di quella rotatoria. La percentuale di spermatozoi integri in tutte le loro membrane (spermatozoi con membrana plasmatica intatta, acrosoma intatto ed alto potenziale di membrana mitocondriale), rilevata con il test della colorazione multipla fluorescente, è stata correlata positivamente con la percentuale totale di spermatozoi mobili rilevata con il sistema "CASA" e ciò ha fornito l'attendibilità di questa tecnica. Inoltre, poiché gli spermatozoi con mitocondri intatti sono potenzialmente mobili a dispetto della loro transitoria alterata motilità, ciò ha fatto supporre che la bassa motilità progressiva fosse transitoria. Anche Vyt e coll. (2004)<sup>2</sup> hanno rilevato bassa linearità (35%) in verri utilizzati con pieno successo per l'A.I. e Juonala e coll., (1999)<sup>3</sup> hanno riportato risultati di vitalità e fertilità ottimali per campioni di seme delle razze suine Landrace e Yorkshire con spermatozoi totalmente immobili quando esaminati.

Il test della multipla colorazione fluorescente, da noi messo a punto ed analizzato, può essere ritenuto un potente indicatore della motilità degli spermatozoi poiché esso analizza l'integrità mitocondriale indipendentemente da una temporanea manifestazione di alterata motilità.

Con la colorazione multipla sono state individuate due interessanti categorie cellulari non rilevabili con l'analisi della motilità e che da noi sono state classificate come destabilizzate perché gli spermatozoi pur avendo funzionalità mitocondriale presentavano alterazione o alla membrana plasmatica o al cappuccio acrosomale. Nel corso della conservazione la percentuale di queste cellule è decresciuta a favore della categoria delle cellule morte.

In conclusione, i diluenti con le più alte percentuali di vitalità degli spermatozoi durante il periodo di conservazione erano quelli caratterizzati da un pH inferiore ed un'osmolarità maggiore rispetto agli altri diluenti delle rispettive classi di durata. Inoltre, si ritiene che per una corretta valutazione della vitalità degli spermatozoi di suino siano necessari l'integrazione dei dati ottenibili tra la colorazione multipla fluorescente e l'analisi "CASA" durante la conservazione.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P. & Maxwell, W.M.C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62, 143-172 (2000). 2. Vyt, P. et al. Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods. *Reprod Domest Anim.* 39, 447-453 (2004). 3. Juonala, T., Salonen, E., Nurttala, T. & Andersson, M. Three fluorescence methods for assessing boar sperm viability. *Reprod. Dom Anim.* 34, 83-87 (1999).

## MORPHO-FUNCTIONAL INTEGRITY OF BOAR SPERMATOZOA PRESERVED IN DIFFERENT EXTENDERS: ASSESSMENT BY TRIPLE FLUORESCENT STAINING AND COMPUTER-ASSISTED SEMEN ANALYZER (CASA)

**Maggio V., Lange Consiglio A., <sup>1</sup>Bassini P., <sup>1</sup>Gottardi L., Cremonesi F.,** *Unità Operativa di Riproduzione, Ospedale Grandi Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, Polo Universitario di Lodi, Località Polledra, 26900 Lodi; <sup>1</sup>Practitioner;*  
*Corresponding author: fausto.cremonesi@unimi.it*

**Key words:** spermatozoa; short and long-term extenders; viability; CASA; multiple fluorescent staining.

An important issue in Artificial Insemination is the fertilizing capacity of the semen doses produced: although influenced by semen processing, the fertilizing potential of a semen dose is inherently linked to the quality of the spermatozoa and to the quality of the extender used. In such a context, the aim of this study was to test a simple and consistent method for simultaneously evaluating the integrity of the plasma, the acrosome and the mitochondrial sheath membranes in boar spermatozoa extended with six short-term (A-F) and three long-term (G-I) commercial extenders.

Sperm-rich fractions were collected from three boars of known reproductive history and were evaluated for motility using the Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA), for viability using Propidium Iodide (PI) staining, for acrosome intactness by fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) staining, and for mitochondrial activity by 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) staining. Unfortunately, the quantitative composition of these media is unknown, so in our laboratory we analyzed the pH and osmolarity of each extender. The results obtained from multiple fluorescent staining were compared with sperm motility assessed by CASA.

In our study, the frequency of viable spermatozoa with non-reacted acrosome and intact mitochondria was positively correlated with the rate of motile spermatozoa ( $r^2 > 0.9$ ) regardless of the extender used. In all extenders, the frequency of motile spermatozoa fell significantly over the preservation period ( $p < 0.05$ ) but remained higher in extenders E and I (respectively short- and long-term). The rate of progressively motile spermatozoa was very low in all the extenders, but this motility could have been influenced by dilution. The multiple fluorescent staining test is a potent indicator of sperm motility because it analyses mitochondrial integrity independently of the observable alteration in motility; our results indicate that low progressive motility was only apparent since the mitochondrial sheath of most spermatozoa was intact. E and I are the best extenders, and it is probably the good combination between pH and osmolarity that leads to longer motility preservation of boar semen compared with the other extenders.

In conclusion, because sperm motility alone is not an adequate parameter for predicting boar fertility and extender quality<sup>1,2</sup>, the integration of the data obtainable from the multiple fluorescent staining test and CASA analysis are required for a correct evaluation of boar sperm viability during preservation.

**References** - 1. Quintero-Moreno A., Rigau T. & Rodriguez-Gil J.E., Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61, 673-690 (2004). 2. Vyt P. et al., Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods. *Reprod Domest Anim*, 39, 447-453 (2004).

## L'OSSIDO NITRICO NELLA SPECIE SUINA: DALLA GRAVIDANZA AL POST PARTUM

Minoia R., Pavone L., <sup>1</sup>Massari P., <sup>1</sup>Simone N., Lacalandra G.M., *Dipartimento di Produzione Animale, Università di Bari, Italia;* <sup>1</sup>SU.IT. *Suini Italiani spa, C.da Madama Giulia, 85010 Banzi (PZ), Italia*

**Parole Chiave:** Ossido Nitrico (NO), Scrofa, Gravidanza.

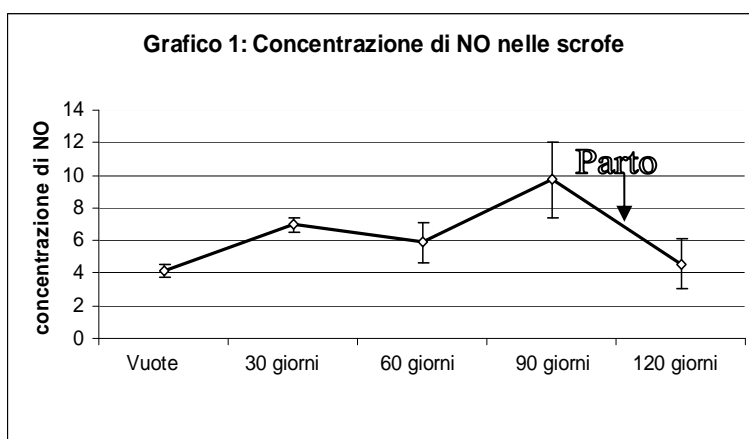
**RIASSUNTO** - L'ossido nitrico (NO) è una forma radicalica e rappresenta uno dei maggiori mediatori biochimici implicato in numerosi processi fisiologici. L'azione più conosciuta dell'NO è quella vasodilatante. Questa forma radicalica è anche coinvolta nel signalling di molti processi riproduttivi come l'ovulazione e l'impianto embrionale. È noto che la somministrazione di NO-donors ha effetti tocolitici sulla muscolatura uterina mentre provoca un'apertura precoce della cervice con conseguente attività abortigena. L'obiettivo principale di questo studio è stato di valutare le concentrazioni di NO in corso di gravidanza nella specie suina. Tali dati potranno essere la base di studio per valutare nuovi approcci clinici alla problematica della mortalità embrionale.

**INTRODUZIONE** - Una delle cause principali di mancata gravidanza, nella specie suina, è l'elevata mortalità embrionale. Lo stabilirsi ed il mantenimento della gravidanza, prevede infatti, l'interazione tra conceptus ed endometrio che controlla la permeabilità vasale, il flusso sanguigno, l'attecchimento embrionale, lo sviluppo placentare e le difese immunitarie. L'endometrio è soggetto ad un forte incremento del flusso sanguigno, fondamentale per sostenere l'embrione. Il maggiore mediatore primario delle modificazioni vascolari, comprese quelle placentari, è l'Ossido Nitrico (NO)<sup>1</sup>. L'NO rappresenta uno dei maggiori mediatori paracrini ed è un importante agente di regolazione in vari processi fisiologici, tra cui quelli riproduttivi, quali: ovulazione, impianto embrionale, mantenimento della gravidanza e parto, inoltre, influenza la contrattilità uterina inibendola durante la gravidanza e promuovendola al termine di essa<sup>2</sup>. Condizioni di aumentato stress ossidativo comportano la conversione dell'NO in perossinitrito, una forma radicalica alla quale è legata la tossicità del mediatore primario<sup>3</sup>. 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<sup>4</sup>.

NO viene sintetizzato a partire dalla L-Arginina grazie all'azione della Ossido Nitrico Sintetasi (NOS) di cui sono state identificate tre isoforme: la NOS neuronale (nNOS), la NOS inducibile (iNOS) e la NOS endoteliale (eNOS). La eNOS e la iNOS sono presenti nell'utero di varie specie, oltre che nella donna, sia in assenza di gravidanza (ratto, topo), sia in corso di gravidanza (ratto, topo, pecora e scrofa)<sup>1</sup>. Nella specie suina è stata dimostrata la presenza di eNOS e iNOS in cellule trofoblastiche al 17° giorno di gravidanza<sup>1</sup>. 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 gravidanza<sup>5</sup>. Vonnahme et al. (2005)<sup>6</sup>, in uno studio condotto sulle pecore, hanno dimostrato che nelle prime fasi della placentazione, i valori di NO sono più elevati rispetto a quelli degli animali non gravidi, successivamente tali valori decrescono sino a raggiungere livelli simili a quelli dei soggetti non gravidi per poi innalzarsi fino al termine della gravidanza. Considerato il ruolo svolto dall'NO in gravidanza e data la presenza dell'enzima sia sull'utero gravido che sulle cellule trofoblastiche suine, abbiamo voluto valutare i livelli di NO nel sangue periferico di scrofe gravide, in modo da studiarne l'andamento e correlare l'azione di NO con le concentrazioni dello stesso.

**MATERIALI E METODI** - *Disegno sperimentale*: Sono state utilizzate 15 scrofe (Large White x Landrace) di cui: 3 vuote, 3 nel post partum, 3 al 30°, 3 al 60°, 3 al 90° giorno di gravidanza. *Campionamento del sangue*: Il sangue è stato prelevato in provette da siero, tramite puntura della vena giugulare. Tutti i campioni sono stati trasportati in contenitori termici fino al laboratorio dove sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti ad una temperatura di 4°C. *Stoccaggio del siero*: Il siero ottenuto è stato stoccato in microprovette da 1,5 ml e conservato ad una temperatura di -20°C fino al momento del dosaggio dell'NO. *Dosaggio di NO*: La concentrazione di NO è stata determinata con metodica colorimetrica dosando i nitrati che vengono trasformati in nitriti dalla Nitrato-reduttasi e leggendo l'assorbanza a 550 nm dopo il trattamento con reattivo di Griess. La lettura è stata effettuata con apparecchio BRIO (Basic Robotic Immunoassay Operator; RADIM, Italia).

**RISULTATI** - I livelli di NO presentano un andamento sovrapponibile a quanto già riscontrato in altre specie<sup>4,6</sup>, seppur con valori notevolmente più bassi. Si evidenziano due picchi in corrispondenza del 30° e del 90° giorno di gestazione. Le concentrazioni più basse si riscontrano nei soggetti non gravidi (4,12 µM/ml) o nel primo post partum (4,81 µM/ml). Il picco più elevato di NO si verifica al 90° giorno di gravidanza (11,32 µM/ml), mentre un incremento più blando è stato osservato al 30° giorno di gestazione (7,15 µM/ml), Grafico 1. I dati sono stati sottoposti al t-student test (PSP-Analysis); i valori sono stati considerati significativi per P<0,05 (Tab. 1).



	Vuote	30° giorno	60° giorno	90° giorno	Post Partum
VUOTE	/	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P=0,51
30° GIORNO	P<0,001	/	P=0,15	P<0,05	P<0,05
60° GIORNO	P<0,05	P=0,15	/	P<0,05	P=0,39
90° GIORNO	P<0,001	P<0,05	P<0,05	/	P<0,001
POSTPARTUM	P=0,51	P<0,05	P=0,39	P<0,001	/

**DISCUSSIONE** - Vonnahme et al. (2005)<sup>6</sup> hanno dimostrato che nelle pecore esiste una correlazione tra le concentrazioni periferiche di NO e lo stadio di gravidanza. Hanno riscontrato, infatti, concentrazioni più elevate di NO nelle prime fasi di formazione placentare (fino al 50° giorno di gravidanza). Durante la gestazione la produzione di NO, a livello di miometrio, è elevata; in prossimità del parto questa si riduce notevolmente favorendo le contrazioni miometriali. A livello cervicale invece le concentrazioni di NO restano basse durante tutta la gestazione<sup>2</sup>. L'azione tocolitica di NO infatti è necessaria a garantire un rilassamento del miometrio, e di contro, le basse concentrazioni a livello cervicale assicurano un'efficace chiusura della stessa<sup>7,8</sup>.

Le basse concentrazioni di NO negli animali vuoti (4,12  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) e nelle scrofe durante il primo post partum (4,81  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) sono in linea con i livelli di NO riscontrati nelle stesse condizioni in altre specie<sup>4,6</sup>. Nella specie suina tra il 10° e 15° giorno di gravidanza il conceptus produce estrogeni che sono necessari per lo stabilirsi della gravidanza<sup>9</sup>. La prima risposta dell'endometrio agli estrogeni, durante l'impianto, prevede l'aumento locale della permeabilità vascolare e lo sviluppo di un edema stromale attraverso una modulazione della produzione di NO<sup>1</sup>. Il picco più elevato di estrogeni si verifica tra il 25° e il 30° giorno di gestazione, in corrispondenza del primo picco di NO (7,15  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) da noi riscontrato<sup>10</sup>. Kim et al. (2008)<sup>11</sup> hanno dimostrato che gli estrogeni attivano rapidamente la eNOS con conseguente incremento della produzione di NO, quindi è ipotizzabile che il picco di NO del 30° giorno sia correlato all'innalzamento di estrogeni, peculiare di questa specie. Successivamente i livelli di NO si riportano attorno a valori basali, ed è questa condizione necessaria per lo sviluppo embrionale, infatti, elevati livelli di NO possono essere tossici per l'epitelio endometriale e per le cellule trofoblastiche perché attiverebbero un processo apoptotico a carico dell'embrione<sup>1</sup>. 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 iNOS con conseguente aumento dei livelli serici di NO quindi abbiamo correlato il picco del 90° giorno (11,32  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) al processo di maturazione cervicale<sup>5,6,12</sup>. Concludendo possiamo mettere in evidenza la relazione esistente tra i livelli di estrogeni e quelli di NO come condizione necessaria all'instaurarsi della gravidanza, e quindi, come anche in questa specie l'NO sia implicato nei processi della gestazione dal riconoscimento materno alla preparazione ed esplicazione del parto. Ulteriori studi saranno sicuramente necessari per comprendere al meglio questo meccanismo di fine regolazione dei processi riproduttivi da parte di NO.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Andronowska A., e Chrusciel M. (2007) Expression and cellular distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthases in the porcine uterus during early pregnancy. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 45 No. 4: 375-380. 2. Maul H., Longo M., Saade G.R., Garfield R.E. (2003) Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des*. 9(5):359-80. 3. Channon K.M., Qian H.S., George S.E. (2000) Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury. Insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20: 1873-1881. 4. Minoia R., Pavone L., Bozzo F., Aiudi G. (2007) Livelli di ossido nitrico in gravidanza. Studio preliminare sulla bovina da latte. *Atti V Congresso Nazionale S.I.R.A.* 17-19. 5. Aalberts M., van Dissel-Emiliani F.M., van Tol H.T., Taverne M.A., Breeveld-Dwarkasing V.N. (2007) High iNOS and protein levels during early third trimester suggest a role for NO in prelabor cervical ripening in the bovine. *Mol Reprod Dev*, 74(3): 378-85. 6. Vonnahme K.A. et al., (2005) Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. *J Physiol*; 15; 565(Pt 1): 101-109 7. Yallampalli C., Garfield R.E. and Byam-Smith M. (1993) Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology by The Endocrine Society* 133, No. 4. 8. Goodrum L.A., Saade G.R., Belfort M.A., Moise K.J. Jr, Jahoor F. (2003) Arginine flux and nitric oxide production during human pregnancy and postpartum. *J Soc Gynecol Investig*, 10(7):400-5. 9. Biswas S., Kabir S.N., Pal A.K. (1998) The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J Reprod Fertil*. 114: 157-161. 10. Bazer F.W., Ott T.L. and Spencer T.E. (1998) Maternal recognition of pregnancy: comparative aspects. *Trophoblast Research* 12:375-386. 11. Kim K.H., Moriarty K., Bender J.R. (2008) Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors; Available online 18 January 2008 [www.elsevier.com/locate/steroids](http://www.elsevier.com/locate/steroids). 12. Facchinetti F., Venturini P., Blasi I., Giannella L. (2005) Changes in the cervical competence in preterm labour. *BJOG* 112 Suppl 1:23-7.

## NITRIC OXIDE IN SWINE: FROM PREGNANCY TO *POST PARTUM*

**Minoia R., Pavone L.,<sup>1</sup> Massari P.,<sup>1</sup> Simone N., Lacalandra G.M.,** *Department of Animal Production, University of Bari, Italy;* <sup>1</sup>*SU. IT. Suini Italiani spa, C.da Madama Giulia, 85010 Banzi (PZ); Italy. Corresponding author: r.minoia@veterinaria.uniba.it*

**Key words:** Nitric Oxide (NO), sow, pregnancy

Nitric oxide (NO) is a major mediator of numerous biological processes, including vascular functions, neurotransmission, hormone secretion and inflammation and an important regulatory agent in various female reproductive processes<sup>1</sup>. NO is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthesis (NOS). Porcine trophoblast cells, observed by Andronowska and Chruściel (2007)<sup>2</sup> displayed clear endothelial NOS and slight inducible NOS immunoactivity on day 17 of pregnancy. The establishment and maintenance of pregnancy involve conceptus-endometrial interactions to control vascular permeability, blood flow, placental attachment and immunological protection<sup>2</sup>. In the sow, the maternal recognition of pregnancy occurs by conceptus estradiol production and this production rises to a peak at 25-30 days of gestation<sup>3</sup>. Estrogen has favorable effects on vascular cells by NO-dependent mechanism and represents a key component of both basal and stimulated NO release<sup>4</sup>. The aim of this study is to evaluate the systemic levels of NO metabolite throughout swine gestation and to determine a possible correlation between NO levels and crucial period of gestation. Blood samples for NO tests were obtained by jugular bleeding from 15 sows: 3 for each month of gestation. Blood sample from 3 non-pregnant sows and 3 sows in the first post partum period were also analyzed. The samples were centrifuged to remove the whole blood elements and then stored at -20°C until NO analysis. NO metabolites were assayed colorimetrically by the Griess reaction. Nitrates in serum were reduced to nitrites by incubation with nitrate reductase at room temperature for 3 h. After 3 h, the nitrite concentration in the sample was measured by adding Griess reagents. The optical density at 550nm (OD<sub>550</sub>) was measured using a BRIO Microplate reader. Nitrate concentrations were calculated by comparison with the OD<sub>550</sub> of a standard curve. Data were analyzed by t-student test, PSP analysis. Significance was defined at P<0.05. Data are reported as the mean ±SEM. Here we report, for the first time, the general trend of systemic NO levels during porcine gestation in non-pathological conditions. NO levels in maternal blood showed a biphasic pattern, being higher than the non-pregnant values on day 30 (7.15 µM/ml) of gestation, decreasing slightly until day 60 and rising again on day 90 (11.32 µM/ml). After the last peak (day 90) NO levels decrease until labour. Our data are in agreement with the data records in other species<sup>5,6,7</sup>. The data give a new concept of NO as a marker for controlling vascular disorder within pregnancy. Finally, circulating NO may be useful as an indicator of foetal health. Ideally an indication of foetal wellbeing found by monitoring circulating maternal factor would aid in early treatment of potential health risks to the fetus and/or the mother.

**References** - 1. Maul H., Longo M., Saade G.R., Garfield R.E. (2003) Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des.* 9(5):359-80. 2. Andronowska A., & Chruściel M. (2007) Expression and cellular distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthases in the porcine uterus during early pregnancy. *Folia Histo. et Cytobiol.* Vol.45 N4:375-380. 3. Bazer F.W., Ott T.L. and Spencer T.E. (1998) Maternal recognition of pregnancy: comparative aspects. *Troph. Res.* 12:375-386. 4. Kim K.H., Moriarty K., Bender J.R. (2008) Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors; online [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com). 5. Facchinetti F., Venturini P., Blasi I., Giannella L. (2005) Changes in the cervical competence in preterm labour. *BJOG.* Mar;112 Suppl 1:23-7. 6. Vonnahme K.A. et al., (2005) Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. *J Physiol;* May 15; 565(Pt 1): 101-109. 7. Minoia R., Pavone L., Bozzo F., Aiudi G. (2007) Livelli di ossido nitrico in gravidanza. Studio preliminare sulla bovina da latte. *Atti V Congresso Nazionale S.I.R.A.*, pagg. 17-19.



## **DETERMINAZIONE CON METODO IN CHEMILUMINESCENZA DEI LIVELLI EMATICI DI PROGESTERONE E TESTOSTERONE IN ALPACA (*Lama pacos*) ALLEVATI IN ITALIA.**

**Stelletta C., <sup>1</sup>D'Alterio G., <sup>2</sup>Stefani A., <sup>2</sup>Moro L., Bevilacqua F., Romagnoli S.,**  
*Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Università degli Studi di Padova; <sup>1</sup>Libero professionista (VT); <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*

**RIASSUNTO** – Si è effettuata la determinazione con metodo in chemiluminescenza dei livelli di progesteronemia e testosteronemia, di femmine e maschi rispettivamente, di Alpaca allevati in Italia. I valori rientrano negli intervalli di normalità riportati per la specie (e mostrano le classiche variazioni evidenziati con altri metodi di determinazione. La progesteronemia è variata da un minimo di 3 ng/ml ad un massimo 12,8 ng/ml nelle femmine gravide e da <0,2 ng/ml a 1,4 ng/ml nelle non gravide. I valori di testosteronemia sono stati variabili da un minimo di <20 ng/dL ad un massimo di 660 ng/dL. I valori riscontrati distribuiti in dipendenza dell'età vengono riportati nei grafici 1 e 2 per la progesteronemia e la testosteronemia rispettivamente.

**INTRODUZIONE** - L'allevamento dei camelidi sudamericani risulta essere una realtà zootecnica nelle aree d'origine ma anche in altre nazioni come l'Australia e gli USA. Da alcuni anni si è evidenziato un sostanziale interesse anche in Europa compresa l'Italia. Gli alpaca sono i camelidi sudamericani più allevati per la produzione di fibra pregiata fuori dai paesi d'origine. Le caratteristiche tipiche rendono questi animali particolarmente interessanti per l'applicazione di metodiche standard di gestione della riproduzione. A differenza di molte specie domestiche le femmine di camelidi non sono poliestruali propriamente dette, esse infatti evidenziano regolari e distinti periodi di calore o di recettività sessuale dopo dei quali l'ovulazione avviene se è indotta dal coito. Se l'ovulazione avviene senza il successivo concepimento il corpo luteo funzionale produce progesterone in quantità misurabile fino a 4 giorni postovulazione. La regressione del corpo luteo nelle femmine non gravide avviene al 8°-10° giorno in concomitanza al rilascio pulsatile di prostaglandina. Le concentrazioni di progesterone diminuiscono rapidamente e raggiungono i livelli basali al 14°-15° postovulazione<sup>1,2,3</sup>. Le metodiche dirette ed indirette di diagnosi di gravidanza si basano sul rifiuto del maschio da parte di una femmina precedentemente accoppiata; la palpazione rettale; l'ecografia transrettale, transvaginale e transaddominale; la concentrazione plasmatica di progesterone. L'ultima durante i primi 30 giorni può essere un buon metodo di diagnosi<sup>3,4</sup>. Nonostante si sia stabilito che un livello di 2 ng/ml indica la presenza di un corpo luteo alcuni studi tendono ad includere fattori di variabilità influenzanti le concentrazioni plasmatiche di progesterone come il peso dell'animale, la condizione corporea, l'ematocrito, l'alimentazione ed il trattamento del campione di sangue<sup>3,4</sup>.

La testosteronemia negli alpaca risulta molto più elevata rispetto ai lama ed è fortemente correlata con il raggiungimento della pubertà, le dimensioni testicolari, la posizione gerarchica. La determinazione ed il monitoraggio della progesteronemia nelle femmine e della testosteronemia nei maschi può risultare uno strumento utile per la gestione ottimale della riproduzione<sup>5</sup>. I dati bibliografici riguardanti tali ormoni si riferiscono alla determinazione con metodo radioimmunologico. Scopo del presente lavoro è stato considerare il metodo di determinazione in chemiluminescenza per i livelli di progesteronemia e testosteronemia in alpaca allevati in Italia.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati effettuati prelievi ematici, per l'ottenimento di campioni di siero, in un periodo ristretto mattutino (10:00-12:00) da 22 femmine e 25 maschi di differente età (tabella 1). Alle femmine adulte (età >2 anni: 16 soggetti) è

stata effettuata diagnosi di gravidanza ecografica trans-addominale utilizzando una sonda lineare curva da 5-7,5 MHz ad un'età gestazionale superiore ai 2 mesi. Le positività sono state confrontate con i risultati della precedente prova di rifiuto del maschio dopo l'avvenuto accoppiamento. Le femmine con diagnosi positiva sono state 11 sul totale delle adulte. I maschi sono stati classificati in dipendenza dell'età e della destinazione produttiva dei singoli soggetti. La determinazione del progesterone e del testosterone è stata effettuata utilizzando kit commerciali (rispettivamente LKTW1 e LKPG1, MEDICAL SYSTEM, Genova, Italia) tramite il sistema automatizzato di immunodosaggio chemiluminescente DPC-Cirrus Immulite (Medical System). Il principio analitico di entrambe le metodiche si basa su un dosaggio immuno-enzimatico chemiluminescente competitivo in fase solida. L'analisi del progesterone è avvenuta in due successivi passaggi ed ha previsto l'utilizzo di biglie sensibilizzate con anticorpo policlonale di coniglio anti-progesterone, di un reagente contenente progesterone coniugato con un ligando e di un secondo reagente contenente un anticorpo anti-ligando coniugato con fosfatasi alcalina. Per quanto riguarda le caratteristiche analitiche del metodo anche in questo caso si è fatto riferimento a quanto riportato nelle specifiche tecniche del kit. Il range di calibrazione della metodica è compreso tra 0,2 e 20 ng/mL, con una sensibilità analitica di 0,2 ng/ml. Le prove di precisione nella serie e tra le serie, eseguite con quattro diversi intervalli di concentrazione dell'analita per un totale di 80 replicati per intervallo, mostrano un CV medio di 9,6 % e 9,9 % rispettivamente. La linearità del metodo, effettuata con prove di diluizioni seriali fino a 1:64, ha evidenziato un valore medio osservato su atteso del 97%. Le prove di recupero sono state eseguite con soluzioni di progesterone di 22,80 e 172 ng/mL: il recupero medio è stato del 96%.

Il metodo del testosterone prevede l'utilizzo di biglie sensibilizzate con anticorpo policlonale di coniglio anti-testosterone e di un reagente contenente testosterone coniugato con fosfatasi alcalina. Il range di calibrazione della metodica è stato compreso tra 20 e 1600 ng/dL, con una sensibilità analitica di 15 ng/dL. Le prove di precisione nella serie e tra le serie, eseguite con sei diversi intervalli di concentrazione dell'analita per un totale di 80 replicati per intervallo, hanno mostrato un CV medio di 8,7% e 10,5% rispettivamente. La linearità del metodo, effettuata con prove di diluizioni seriali fino a 1:8, ha evidenziato un valore medio osservato su atteso del 104%. Le prove di recupero sono state eseguite con soluzioni di testosterone di 2000, 6000 e 12000 ng/dL: il recupero medio è stato del 102%.

**RISULTATI** - I valori riscontrati dei due ormoni rientrano negli intervalli di riferimento per la specie.

Grafico 1 - Valori di progesteronemia distribuiti per età e riscontrati nelle femmine gravide e non gravide

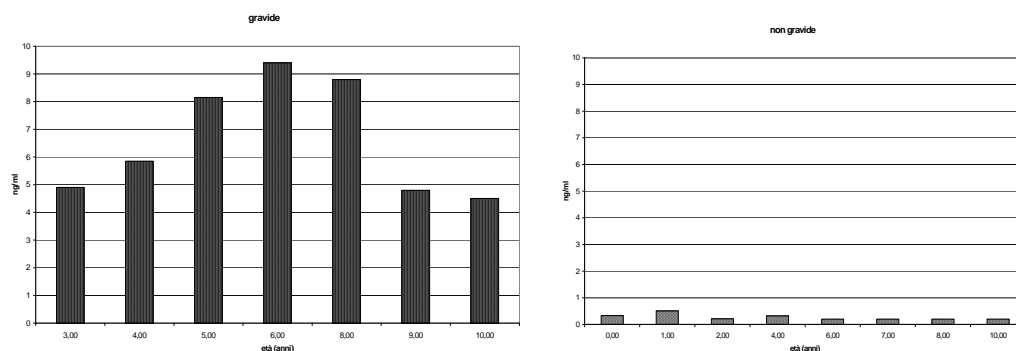
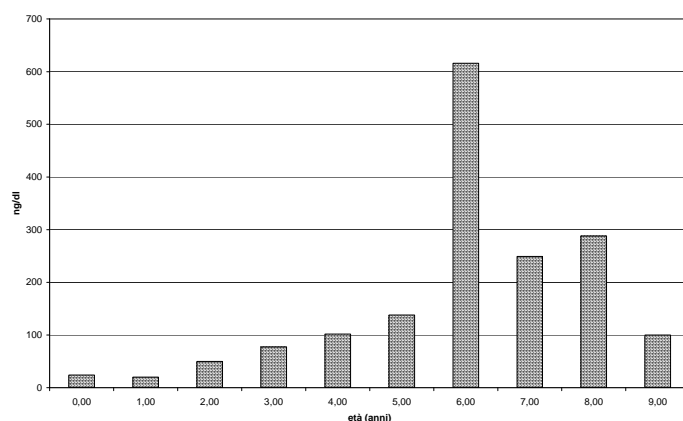


Grafico 2 - Valori di testosteronemia distribuiti per età dei maschi



La progesteronemia è variata da un minimo di 3 ng/ml ad un massimo 12,8 ng/ml nelle femmine gravide e da <0,2 ng/ml a 1,4 ng/ml nelle non gravide. I valori di testosterone sono stati variabili da un minimo di <20 ng/dL ad un massimo di 660 ng/dL. I valori riscontrati distribuiti in dipendenza dell'età vengono riportati nei grafici 1 e 2 per la progesteronemia e la testosteronemia rispettivamente.

**DISCUSSIONE** - Viene riportato in diversi lavori scientifici la elevata mortalità embrionale precoce da attribuire ad una insufficienza luteinica che può raggiungere anche valori pari al 50%<sup>1,2,3,4,6</sup>. Tale ipotesi è stata confortata dal mantenimento della gravidanza con la trattamenti di progesterone esogeno quando i valori ematici sono sotto la soglia dei 2 ng/ml ma  $\geq 1,5$  ng/ml. Dai valori riscontrati si può evidenziare una distribuzione a campana della concentrazione ematica dell'ormone, in dipendenza dell'età, anche se, in tutti i casi, superiore ai livelli soglia. Tale distribuzione potrebbe suggerire una maggiore funzionalità luteinica nei soggetti con un'età compresa tra i 5 e gli 8 anni. La numerosità ridotta dei soggetti considerati non può essere di supporto a tale ipotesi. La testosteronemia variabile con l'età giustifica l'utilizzo dei maschi per la riproduzione non prima dei 3 anni, quando i livelli adeguati di tale ormone stimolano la spermatogenesi e le capacità riproduttive dei soggetti. I valori più elevati sono stati riscontrati nei soggetti adulti che sono destinati normalmente alla monta e/o in soggetti leader del gruppo di appartenenza.

**CONCLUSIONI** - Il dosaggio con metodica in chemiluminescenza risulta utilizzabile per la determinazione dei livelli ematici di progesterone e testosterone negli alpaca. Ulteriori analisi per individuare eventuali fenomeni di insufficienza luteale e di maschi con problemi riproduttivi dovranno essere effettuati per incrementare la numerosità e rendere utilizzabile tale metodica nella gestione della riproduzione di tale specie.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Raggi, L.A., Ferrando, G., Parraguez, V.H., MacNiven, V., Urquieta B. Plasma progesterone in alpaca *Lama pacos* during pregnancy, parturition and early postpartum *Animal Reprod. Sci.* 54:245–249 (1999). **2.** Vaughan, J.L. & Tibary A.. Reproduction in female South American camelids: A review and clinical observations. *Small Rum Research* 61:259-281 (2006). **3** Vaughan J.L. Reproduction in female alpacas. *Proceeding of International Camelid Health Conference*. March 3-6, Oregon State University, Corvallis (2005). **4.** Youngquist, R.S. & Threlfall W.R. *Lama Theriogenology* 843-918 in *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders Elsevier St. Luis Missouri (2007). **5.** Tibary, A., & Vaughan J.L. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Rum Research* 61:283–298. (2006). **6.** Aba, M.A., Bravo, P.W., Forsberg, M., Kindahl, H. Endocrine changes during early pregnancy in the alpaca. *Animal Reprod. Sci.* 47:273-279 (1997).

## CHEMILUMINESCENT METHOD FOR DETERMINING PROGESTERONE AND TESTOSTERONE BLOOD LEVELS IN ALPACA (*LAMA PACOS*) REARED IN ITALY

Stelletta C., <sup>1</sup>D'Alterio G., <sup>2</sup>Stefani A., <sup>2</sup>Moro L., Bevilacqua F., Romagnoli S.,  
*Department of Veterinary Clinical Sciences- University of Padua; <sup>1</sup>Practitioner, <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.*  
*Corresponding author: calogero.stelletta@unipd.it*

**Key words:** Alpaca, Chemiluminescent method, progesterone, testosterone

Commercial rearing of South American camelids has been increasing in Australia, in the USA and also in Europe, including Italy, for the production of high quality fibre. Alpacas have unique reproductive characteristics which are of great interest for good reproductive management. Female camelids are not polyestrous, and ovulation occurs when induced by coitus. The monitoring of plasma progesterone concentration for the first 30 days post mating is a useful method for detecting pregnancy. Ideally, pregnancy should be confirmed by two methods and should be reconfirmed after the first trimester. Testosteronemia levels are higher in alpaca than in llama and depend on puberty, testicular dimensions, hierarchical position. Hormonal determinations could be used to optimize reproductive performance. However, these hormonal determinations are usually carried out through the use of RIA. The aim of this work was to validate the chemiluminescent method for the determination of both these hormones in alpacas raised in Italy. To this purpose, blood samples were collected from 22 females and 25 males. Pregnancy diagnosis was performed ultrasonographically on 16 adult females. The pregnancy rate was 68.75 % (11/16). The males were classified according to age. The progesterone and testosterone determinations were performed using commercial kits (LKTW1 and LKPG1 respectively, MEDICAL SYSTEM, Genoa, Italy) by means of the DPC-Cirrus Immulite (Medical system) automated chemiluminescent immunoassay system. The calibration range is between 0.2 and 20 ng/ml, with an analytical sensitivity of 0.2 ng/ml. Progesterone intra- and inter-assay precision tests showed an average CV of 9.6% and 9.9%, respectively. Recovery tests were performed with progesterone solutions of 22, 80 and 172 ng/mL: the average recovery was 96%. Testosterone intra- and inter-assay precision tests showed an average CV of 8.7% and 10.5%, respectively. Recovery tests were performed with testosterone solutions of 2000, 6000 and 12000 ng/dL: the average recovery was 102%. Progesterone and testosterone values were within the reference range for the species. The progesterone blood values were from 3 ng/ml to 12.8 ng/ml in pregnant females and from <0.2 ng/ml to 1.4 ng/ml in non-pregnant ones. Testosterone blood values were from <20 ng/dl to 660 ng/dl. Progesteronemia had a bell-shaped distribution depending on age. This distribution might suggest a better luteal function in subjects between 5-8 years of age, but the small sample is unable to prove this hypothesis. Testosteronemia was age-dependent and justifies the practice of managing male breeding after 3 years of age. The highest values were found in adult males normally designed for breeding and/or in leader subjects. This study has shown that the chemiluminescent method is usable for progesterone and testosterone blood level determination in alpacas. Further analysis might be carried out with the aim of increasing the sample size and making the chemiluminescent method usable in alpaca reproduction management.

**References** - Youngquist, R.S. & Threlfall W.R. Lama theriogenology 843-918 in *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders Elsevier. St. Luis Missouri (2007). Tibary, A., & Vaughan J.L. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Rum Research* 61:283-298 (2006).

## DETERMINAZIONE DEL SESSO DA MEMBRANA TESTACEA MEDIANTE PCR-RFLP NELLA QUAGLIA GIAPPONESE (*Coturnix japonica*)

Costantini V., Guaricci A.C., Bucci F.A., <sup>1</sup>Inglese G., <sup>2</sup>Rausa F., Lacalandra G.M.,  
Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari; <sup>1</sup>Osservatorio  
Faunistico Regionale, Regione Puglia; <sup>2</sup>Zoosafari di Fasano (BR).

**Parole chiave:** Quaglia giapponese, Sessaggio genetico, PCR-RFLP, Membrana testacea

**RIASSUNTO** - Per i programmi di conservazione integrata (*in situ* ed *ex situ*) delle specie minacciate dell'avifauna protetta, la definizione del sesso a qualsiasi età è determinante. Le metodiche genetiche non invasive, da DNA estratto da piuma, per il sessaggio degli uccelli monomorfici e dimorfici immaturi, risultano efficaci e trovano impiego nella pratica clinica corrente. L'estrazione del DNA da piuma può tuttavia trovare un limite di applicazione nei programmi di determinazione neonatale del sesso in specie a prole con piumaggio assente o particolarmente esiguo nelle prime fasi di vita. In questo studio preliminare la determinazione del sesso è stata realizzata in individui neonati di Quaglia giapponese (*Coturnix japonica*), da DNA estratto dalle membrane testacee dell'uovo, mediante PCR in associazione alla tecnica Restriction Fragment Length Polymorphism.

**INTRODUZIONE** - I progetti di conservazione integrata per le specie 'prioritarie' dell'avifauna selvatica protetta prevedono, nell'ambito di specifici Piani di Azione (PdA) nazionali e internazionali, misure per una migliore tutela degli habitat (conservazione *in situ*) e, per alcune delle specie 'minacciate di estinzione' (*Critically Endangered, Endangered, Vulnerable and Extinct in the Wild*) della Lista Rossa dell'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN), programmi di riproduzione in cattività (*captive breeding*), con rilascio in natura di giovani individui (*captive-born*), per l'incremento delle popolazioni naturali residue (*restocking*) e per la reintroduzione negli areali storici<sup>1,2</sup>. Per la conservazione delle specie minacciate, la definizione del sesso è determinante per lo studio della *sex ratio* delle popolazioni naturali e per la scelta precoce dei riproduttori nell'ambito dei programmi di riproduzione assistita in ambiente controllato<sup>3</sup>. Recentemente sono state messe a punto diverse metodiche non invasive da DNA estratto da piuma, per il sessaggio genetico degli uccelli monomorfici e dimorfici immaturi, in alternativa alla determinazione del sesso basata sulla valutazione, non sempre attendibile, di elementi morfologici e comportamentali, 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 taglia<sup>4</sup>. La metodica di base, che prevede l'estrazione e l'amplificazione del DNA dal calamo di 2-3 piume (regione pettorale), mediante l'impiego di una PCR (Polymerase Chain Reaction) con primers universali per il gene CHD<sup>5</sup> (Chromobox Helicase DNA binding domain), si è dimostrata efficace in numerose specie e trova ormai impiego nella pratica clinica corrente<sup>6,7</sup>. Per le 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 dell'analisi del polimorfismo in lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) con gli enzimi *HaeIII* e *Asp700*<sup>8,9,10</sup>. L'estrazione del DNA da piuma, di largo impiego nelle metodiche non invasive di sessaggio genetico dell'avifauna indigena ed esotica, può tuttavia trovare un limite d'applicazione nei programmi di determinazione neonatale del sesso in specie a prole con piumaggio assente o particolarmente esiguo nelle prime fasi di vita<sup>11</sup>.

Nell'ambito di un programma preliminare di ricerca sulla biologia della riproduzione della Quaglia giapponese (*Coturnix japonica*), individuata come specie modello rispetto a specie minacciate dell'avifauna selvatica protetta, è stata valutata la possibilità di determinare il sesso in individui neonati, a partire da DNA embrionale estratto dalle membrane testacee dell'uovo, mediante la tecnologia PCR associata ad un'analisi del polimorfismo in lunghezza dei frammenti di restrizione con l'enzima *HaeIII*. Per la validazione della metodica, negli stessi soggetti, alla schiusa delle uova, ed in individui adulti dimorfici di Quaglia giapponese, la determinazione genetica del sesso è stata realizzata mediante PCR-RFLP da campioni di piuma.

**MATERIALI E METODI** - Il DNA è stato estratto da cellule ematiche della rete vascolare embrionale di frammenti di membrana testacea (0,5-1 cm<sup>2</sup>) prelevati, dopo schiusa individuale di uova e nascita di pulli vivi e vitali (Gruppo I, n=30) di Quaglia giapponese (*Coturnix japonica*), presso l'Osservatorio Faunistico Regionale di Bitetto (Ba) della Regione Puglia. Contemporaneamente la determinazione genetica del sesso è stata realizzata da cellule del calamo di 3-4 piume (regione pettorale), prelevate negli stessi individui (Gruppo I), entro 24 ore dalla nascita e, per la validazione, in individui adulti dimorfici di Quaglia giapponese (Gruppo Controllo, n=30). La conservazione dei campioni (gusci d'uovo con membrane testacee, piume) è stata effettuata per oltre 1 mese a temperatura ambiente. L'estrazione del DNA è stata eseguita mediante digestione enzimatica *over night* a 54°C in provette Eppendorf con Proteinase K e medium di lisi tissutale presenti nel kit GenElute, Mammalian Genomic Dna Extraction (Sigma, Milano, Italia). Dopo lisi cellulare con apposito buffer, il DNA è stato purificato, eluito dalla colonna e sottoposto a dosaggio spettrofotometrico per determinare la concentrazione. Sono stati usati circa 100 ng di DNA per la reazione di PCR assieme a 1 U. di Taq HotMaster (Eppendorf, Milano, Italia), 10 mM di deossinucleotidi e 50 µM di ciascuno dei primers (P2 e P8) (Sigma) specifici per una regione intronica ipervariabile del gene CHD<sup>12</sup>. Il profilo di amplificazione, dopo denaturazione a 94°C per 2 min, ha previsto 35 cicli a 94°C per 45 secondi (denaturazione), a 48°C per 45 secondi (annealing) ed a 72°C per 45 secondi (allungamento), utilizzando il termociclatore Mastercycler Personal (Eppendorf). Dopo controllo dell'avvenuta amplificazione su di un gel preparativo al 2% di agarosio, è stata effettuata l'analisi RFLP con l'enzima di restrizione *HaeIII* (Sigma), mediante digestione dei campioni a 37°C per 3 ore in un volume finale di 20 µl con 5 U. di enzima ed il buffer corrispondente. Tutto il digerito è stato caricato su di un gel di agarosio al 2% e colorato con Etidio Bromuro per la visualizzazione in luce UV.

**RISULTATI** - Dopo la reazione di PCR, in tutti i campioni si è avuto un prodotto di amplificazione che si risolveva come singola banda di circa 400 paia di basi (bp). Per poter discriminare il sesso è stata effettuata una digestione con l'enzima *HaeIII* che riconosce un suo sito bersaglio solo sul prodotto di amplificazione derivante dal cromosoma Z permettendo di distinguere in maniera inequivocabile i soggetti maschili da quelli femminili. La diagnosi di sesso è risultata agevole in quanto, nei soggetti di sesso femminile, dopo la separazione dei digeriti su gel di agarosio, sono state ottenute tre bande con dimensioni di 400, 340 e 60 bp, nei soggetti di sesso maschile, invece, sono state ottenute due bande di 340 e 60 bp. Per tutti gli individui neonati (Gruppo I, n=30) di Quaglia giapponese c'è stata concordanza tra i risultati relativi al sesso determinato mediante amplificazione del DNA estratto dai campioni di membrana testacea dell'uovo appena schiuso e del DNA estratto dai campioni di piuma. Parimenti per tutti gli individui adulti (Gruppo Controllo, n=30) 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 neonatale del sesso nella Quaglia giapponese (*Coturnix japonica*) realizzata con PCR ed RFLP, da DNA estratto da membrana testacea, di uova da poco schiuse, è risultata metodica rapida ed affidabile. L'innovativa metodica incruenta per il sessaggio genetico dei pulli è stata definita nella Quaglia giapponese, dopo conservazione dei campioni (gusci d'uovo), a temperatura ambiente, anche oltre 1 mese. La metodica è di agevole applicazione in campo in quanto il prelievo e l'invio dei campioni ai laboratori specializzati, con mezzi ordinari, possono essere effettuati direttamente da personale dei Centri di Recupero Animali Selvatici (CRAS) o Centri di Ricerca che intendono sviluppare programmi di conservazione integrata in base a mirati Piani di Azione. I risultati positivi ottenuti per il sessaggio genetico da membrana testacea nella Quaglia giapponese, individuata come specie modello per un programma di ricerca sulla riproduzione assistita e conservazione *ex situ* dell'avifauna selvatica protetta, meritano conferma mediante studi specie-specifici. Tuttavia la metodica descritta può prefigurarsi come un nuovo ed efficace strumento operativo per la determinazione neonatale del sesso in specie 'prioritarie' a prole con piumaggio assente o particolarmente ridotto nelle prime fasi di vita, nell'ambito di programmi di riproduzione assistita e conservazione integrata.

**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. IUCN. Guidelines for Re-introductions. Prepared by the IUCN/SSC Re-introduction Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK (1998). 4. 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). 5. Griffiths, R., Daan, S., Dijkstra, C.. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc R Soc Lond Ser B* 263, 1251-1256 (1996). 6. Guaricci, A.C., Minoia, R., Lacalandra, G.M., Costantini, V. Sessaggio dei volatili monomorfici mediante PCR. SIRA (2005). 7. Costantini, V., Guaricci, A.C., Chammem, M., Seddik, M.M., Lacalandra, G. M., Hammadi, M., Khorchani, T. Sexage de l'Outarde Houbara par PCR sur plume. Séminaire international : *Elevage et faune sauvage dans les régions aride set désertiques: Enjeux et techniques d'amélioration*, Djerba (Tunisie), 33 (2006). 8. Costantini, V., Guaricci, A.C., Conzo, G., Lacalandra, G.M., Minoia P. Sessaggio di Rapaci Diurni e Notturmi mediante Pcr e Polimorfismo di Restrizione (RFLP). SIRA (2006). 9. Costantini V., Guaricci A.C., Inglese G., La Gioia G., D'Onghia T., Lacalandra G.M. Sessaggio del Grillaio (*Falco naumanni*) mediante PCR-RFLP da piuma. Atti V Congresso Nazionale S.I.R.A., Alghero, 124-126, (2007). 10. Costantini V., Guaricci A.C., Laricchiuta P., Rausa F., Lacalandra G.M. DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples. *Animal Reproduction Science*, 106, 162-167 (2008). 11. Starck J.M., Ricklefs R.E. Patterns of development: the altricial-precocial spectrum. In: *Avian Growth and Development. Evolution within the altricial-precocial spectrum*. Starck J. M. and Ricklefs R. E. (eds). Oxford University Press, New York, USA, (1998). 12. Griffiths, R., Daan, S., Dijkstra, C.. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc R Soc Lond Ser B* 263, 1251-1256 (1996).

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

## SEX DETERMINATION OF JAPANESE QUAIL (*Coturnix japonica*) BY PCR-RFLP FROM EGG SHELL MEMBRANE SAMPLES

Costantini V., Guaricci A.C., Bucci F.A., <sup>1</sup>Inglese G., <sup>2</sup>Rausa F., Lacalandra G.M.,  
Department of Animal Production, University of Bari; <sup>1</sup>Osservatorio Faunistico  
Regionale, Regione Puglia; <sup>2</sup>Zoosafari Fasano (BR), Italy.  
Corresponding author: v.costantini@veterinaria.uniba.it

**Key words:** Japanese quail, Molecular sexing, PCR-RFLP, Eggshell membrane

**Introduction** - In conservation programs (*in situ* and *ex situ*) of endangered bird species, sex determination at any age is essential. DNA-based molecular sexing methods on the amplification of the chromo-helicase-DNA-binding 1 (CHD1) gene in sex chromosomes from feather samples have been successfully established for many avian species. However, in some birds these tests are not widely applicable to chicks because they hatch without externally visible feathers or with a very sparse neonatal down (altricial and semialtricial chicks). In this study we assessed the effectiveness of a molecular approach for sexing 1-day-old chicks of a model species, the Japanese Quail (*Coturnix japonica*), by PCR-RFLP analysis from eggshell membrane material collected non-invasively. Additionally, to confirm the results, we evaluated the individual patterns obtained with the feather DNA samples from the corresponding 1-day-old chicks and from the adult dimorphic subjects.

**Materials and Methods** - DNA was extracted after hatching from shell-membrane (0.5-1 cm<sup>2</sup>) blood vessels in Japanese quail eggs (Group I, n=30) (Osservatorio Faunistico Regionale di Bitetto, Apulia, Italy). Genetic sex determination was also carried out from 3-4 feathers collected from corresponding 1-day-old chicks and from adult dimorphic subjects (Group control, n=30). DNA was extracted using the Gene Elute Mammalian Genomic DNA Extraction Kit (Sigma, Milan, Italy). One hundred nanograms of DNA were amplified with 50 µM of each primer, 10 mM dNTPs and 1U Taq HotMaster Polymerase (Eppendorf, Milan, Italy). Amplification profiles was as follows: one 94°C cycle for 2 minutes, 35 cycles at 94°C for 45 s, at 48°C for 45 s, and at 72°C for 45 s. After checking for amplification, samples underwent RFLP analysis with *HaeIII* enzyme for 3 hours at 37°C. The digested samples obtained were run on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

**Results** - After PCR amplification conducted with P2 and P8 primers (Griffiths et al., 1996), a single band of about 400 bp was evidenced in all samples. Sex determination was possible only after RFLP analysis, due to the presence of a restriction site for *HaeIII* enzyme on the Z chromosome; indeed, females showed three bands of about 400-340-60 bp and males only two bands of about 340-60 bp. There was accordance in sex determination in all eggshell membrane samples and corresponding feather samples from 1-day-old chicks, as well as in adult dimorphic subjects in feather samples and morphological characteristics, thus confirming the effectiveness of the molecular technique.

**Conclusions** - Genetic sex determination in 1-day-old chicks of Japanese quail, by PCR and RFLP, from DNA eggshell membrane samples is a quick and reliable technique. The newly hatched egg samples can be stored as long as one month before collecting eggshell membrane for genetic sexing. Shipment of samples is very easy and could be carried out by the staff of wildlife rehabilitation centres or research centres for captive breeding. The positive results obtained using Japanese quail as a model species for assisted reproduction and *ex situ* conservation program of endangered birds require further species-specific investigations. Therefore our data suggested new opportunities for neonatal sexing of bird species whose chicks hatch partially or completely naked.



## IMPOSEX (PSEUDOERMAFRODITISMO FEMMINILE) IN MURICI SICILIANI

Pino C., <sup>1</sup>Macrì D., <sup>2</sup>Basile F., <sup>2</sup>Marino G., *Libero professionista*; <sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia; <sup>2</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria - Università degli Studi di Messina.

**Parole chiave:** murici, *imposex*, Sicilia, RPSI.

**RIASSUNTO** - L'*imposex* è una condizione di pseudoermafroditismo femminile descritta nei gasteropodi e correlata alla polluzione da tributilstagno in ambienti acquatici. Attraverso il campionamento di murici in due siti siciliani, rispettivamente a media e bassa densità navale, si rinvenivano femmine *imposex* appartenenti alle specie *Haustellum brandaris* (23%) e *Phyllanotus trunculus* (75-86%). L'anomalia era caratterizzata dallo sviluppo di un piccolo pene con o senza abbozzo del deferente. I valori di prevalenza, *sex ratio* e dell'indice relativo di lunghezza del pene, indicavano una bassa contaminazione dei siti in esame. Delle due specie, la seconda sembra essere un bioindicatore molto sensibile e utile per monitorare le popolazioni acquatiche a breve e lungo termine.

**INTRODUZIONE** - L'*imposex* è una condizione di pseudoermafroditismo femminile descritta nei gasteropodi che si realizza con la sovrapposizione di caratteri sessuali maschili, come lo sviluppo di pene e vasi deferenti, in individui di sesso femminile<sup>1</sup>. Nel Mediterraneo è stato studiato in diverse specie di muricidi come *Haustellum brandaris*, *Phyllanotus trunculus*, *Thais haemastoma*, *Purpura erinacea*<sup>2,3,4</sup>. In particolare in Italia, il fenomeno è stato osservato in diversi siti costieri, Sicilia compresa<sup>5,6,7</sup>. La patologia è stata correlata all'inquinamento da vernici *antifouling*, in particolare a base di tributilstagno (TBT). I gasteropodi sono animali sentinella o bioindicatori in grado di rivelare anche concentrazioni molto basse di TBT<sup>8</sup>. Questa sostanza, che ha effetti diretti sul sistema endocrino, causa un aumento del testosterone, ormone che le femmine non sono in grado di metabolizzare e che pertanto espleta in breve tempo i suoi effetti mascolinizanti sui genitali esterni<sup>8,9</sup>. In altri organismi acquatici il TBT causa, oltre ai disturbi endocrini, anomalie comportamentali, ritardo della crescita, disfunzioni immunitarie, disturbi nervosi<sup>10</sup>. Non sono noti gli effetti sull'uomo. Alla luce di questi dati, l'Organizzazione Marittima Internazionale e la Comunità Europea hanno legiferato in materia stabilendo il divieto dell'uso del TBT (1/1/2003) e persino la sua rimozione dagli scafi delle navi (1/1/2008)<sup>11</sup>. Lo studio dell'*imposex* ha quindi il duplice scopo di segnalare gli effetti sui molluschi acquatici dovuti alla presenza del TBT e, a lungo termine, di valutare la possibilità di ripresa delle popolazioni in seguito alle recenti restrizioni legislative.

**MATERIALI E METODI** - Per la nostra ricerca sono stati campionati, tra febbraio e giugno 2007, mediante autorespiratore subacqueo, tramagli e nasse da cefalopodi, un totale di 126 murici di specie differenti in due siti siciliani. Nel porticciolo di Rometta Marea (Messina), considerato a basso traffico navale, sono stati raccolti 56 esemplari di *H. brandaris*, 12 di *P. trunculus* e 7 di *T. haemastoma*. Nel porto di Siracusa, considerato a medio traffico navale, sono stati raccolti 51 esemplari di *P. trunculus*. Le conchiglie venivano quindi misurate e gli esemplari estratti da queste, mediante frantumazione. Per comodità, gli esemplari di *H. brandaris* venivano misurati senza il canale sifonale, in questa specie molto lungo e spesso rinvenuto rotto. Il sessaggio veniva fatto sulla base della presenza del pene, posto dorsalmente al tentacolo oculare destro, delle ghiandole accessorie, come prostata e ghiandola del guscio, dell'aspetto e

del colore della gonade, organo che sovrasta l'appendice conica. La scelta del periodo di raccolta coincidente con quello riproduttivo ha permesso il rinvenimento di gonadi sempre ben sviluppate. In tutti i soggetti veniva misurata con un calibro la lunghezza del pene, attribuendo il valore "0" alle femmine non *imposex*. Veniva infine calcolata la prevalenza dell' *imposex* per specie, la *sex ratio* (numero di femmine su numero di maschi), l'indice relativo di lunghezza del pene (RPSI), calcolato come il rapporto della media della lunghezza del pene delle femmine, sulla media della lunghezza del pene nei maschi, moltiplicato 100.

**RISULTATI** – I risultati sono riassunti nelle seguenti tabelle.

Tab. 1 - Esemplari campionati nel porticciolo di Rometta Marea (ME)

Specie	Lunghezza conchiglia (cm)	Sex ratio	Pene maschi (cm)	Pene femmine (cm)	RPSI	% <i>imposex</i>
<i>T. haemastoma</i>	3,6±0,5	0,8	1,7±0,3	0	0	0
<i>H. brandaris</i>	3,7±0,7	1,4	1,1±0,1	0,1±0,1	5,7	23
<i>P. trunculus</i>	5,4±0,6	1	1,0±0,2	0,1±0,1	13,3	75

Tab. 2 - Esemplari campionati nel porto di Siracusa

Specie	Lunghezza conchiglia (cm)	Sex ratio	Pene maschi (cm)	Pene femmine (cm)	RPSI	% <i>imposex</i>
<i>P. trunculus</i>	6,4±0,7	1,3	1,5±0,4	0,3±0,3	19,5	86

Non si rinveniva nessuna femmina *imposex* in *T. haemastoma*, dove il sessaggio veniva fatto essenzialmente sulla base della presenza del pene e della prostata o della ghiandola del guscio, ma non era agevole data l'imaturità dei soggetti campionati. Negli esemplari di *H. brandaris* il sessaggio era facilmente effettuabile grazie alla colorazione della gonade, bianco-arancio nel maschio, rosa e di aspetto granulare nella femmina. Si rinvenivano soggetti *imposex* caratterizzati macroscopicamente solamente da un piccolo abbozzo di pene con forma conica. Anche negli esemplari di *P. trunculus* il sessaggio era basato sulla colorazione della gonade, arancio nel maschio, giallo limone e di aspetto granulare nelle femmine. I soggetti *imposex* mostravano un pene conico o laminare, sempre accompagnato da un abbozzo del deferente.

**DISCUSSIONE** – I dati presentati in questo studio mostrano che il fenomeno dell'*imposex* è presente nei siti in esame, quanto meno nelle popolazioni di *H. brandaris* e *P. trunculus*. La prima specie è nota essere dose dipendente<sup>4</sup>; la bassa prevalenza osservata (23%) indicherebbe un basso grado di contaminazione del primo sito di raccolta (porticciolo di Rometta Marea). La seconda specie è invece molto sensibile al TBT, come dimostrano le alte percentuali di prevalenza riscontrate (75 e 86%), anche se la risposta non sembra essere dose dipendente<sup>12</sup>. La maggiore prevalenza nel secondo sito di raccolta (porto di Siracusa) è verosimilmente da correlare al maggiore traffico navale. Un precedente studio nel porto di Palermo, considerato ad alto traffico, rinveniva in questa specie una prevalenza del 100%, mentre nella riserva di Ustica, in cui è vietato il traffico navale, il valore si abbassava anche al 10%<sup>6</sup>. I valori di RPSI e *sex ratio* non sono preoccupanti ed indicano stadi precoci del fenomeno (sviluppo di un piccolo pene con o senza deferente). Stadi avanzati ostacolerebbero la funzione riproduttiva e la stessa sopravvivenza delle femmine,

causando ripercussioni sulla numerosità delle popolazioni con sbilanciamento verso i maschi della *sex ratio*<sup>8,13</sup>. Il monitoraggio di queste popolazioni di molluschi può permettere in futuro una valutazione degli effetti a breve e lungo termine derivanti dalle recenti restrizioni legislative. Il consumo degli organismi acquatici (murici compresi) pescati o allevati in aree contaminate da TBT dovrebbe, in via precauzionale, essere maggiormente attenzionato dal legislatore.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Smith, B.S. Sexuality in the American mud-snail, *Nassarius obsoletus* Say. *Proc. Malacol. Soc. Lond.* 39, 377-379 (1971). **2.** Hawkins, L. & Hutchinson, S. Physiological and morphogenetic effect of monophenyltin trichloride on *Ocenebra erinacea* (L.). *Funct. Ecol.* 4, 449-454 (1990). **3.** Rilov, G., Gasith, A. Evans, S.M. & Benayahu, Y. Unregulated use of TBT-based antifouling paints in Israel (Eastern Mediterranean): high contamination and imposex levels in the two species of marine gastropods. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 192, 229-238 (2000). **4.** Ramon, M. & Amor, M.J. Increasing imposex in population of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterranean. *Mar. Environ. Res.* 52, 463-475 (2000). **5.** Terlizzi, A., Geraci, S. & Minganti, V. Tributyltin (TBT) pollution in the coastal waters of Italy as indicated by imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae). *Mar. Pollut. Bull.* 36, 749-752 (1998). **6.** Chiavarini, S., Massanisso, P., Nicolai, P., Nobili, C. & Morabito R. Butyltins concentration levels and imposex occurrence in snails from the Sicilian coasts (Italy). *Chemosphere* 50, 311-319 (2003). **7.** Garaventa, F., Faimali, M. & Terlizzi, A. Imposex in pre-pollution times. Is TBT to blame? *Mar. Pollut. Bull.* 52, 696-718 (2006). **8.** Matthiesen, P. & Gibbs, P.E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin mediated endocrine disruption in molluscs. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 37-43 (1998). **9.** Bettin, C., Ohelmann, J. & Stroben, E. TBT-induced imposex in marine Neogasteropods is mediated by an increasing yachting activities at Phuket Island, Thailand. *Environ. Pollut.* 117, 421-429 (1996). **10.** Fent, K. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 1-117 (1996). **11.** Regolamento CE n. 782 del Parlamento Europeo e del Consiglio. *Divieto dei composti organostannici sulle navi*. 14 aprile 2003. **12.** Garaventa, F. et al. Imposex and accumulation of organotin compounds in populations of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) from the Lagoon of Venice (Italy) and Istrian coast (Croatia). *Mar. Pollut. Bull.* 54, 602-625 (2007). **13.** Shi, H.H., Huang, C.J. Yu, X.J. & Zhu, S.X. An updated scheme of imposex for *Cantharus cecillei* (Gastropoda Buccinidae) and a new mechanism leading to the sterilization of imposex-affected females. *Mar. Biol.* 146, 717-723 (2005).

**RINGRAZIAMENTI** - Si ringrazia per la collaborazione il Centro di Ittiopatologia Sperimentale della Sicilia (CISS) dell'Università degli Studi di Messina.

## IMPOSEX (FEMALE PSEUDOHERMAPHRODITISM) IN SICILIAN MURICIDS

Pino C., <sup>1</sup>Macrì D., <sup>2</sup>Basile F., <sup>2</sup>Marino G., *Practitioner*; <sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale "A. Mirri" della Sicilia; <sup>2</sup>Department of Veterinary Public Health - University of Messina. Corresponding author: Marino G.

**Key words:** muricids, *imposex*, Sicilia, RPSI.

**INTRODUCTION** - *Imposex* is the development of additional male sex organs, in females of marine gastropods, such as muricids<sup>1</sup>. The phenomenon is known to be caused by tributyltin (TBT), a component of antifouling paints, and has been widely used as a biomonitoring tool in environmental surveys for TBT pollution assessment<sup>1</sup>. TBT is an endocrine disruptor, but has many toxic effects on different organs<sup>3</sup>. Since 1993, the use of TBT has been greatly restricted in European countries, but the substance and its effects are still present on the coasts of Italy.

**MATERIALS AND METHODS** - This study aimed to evaluate the presence and degree of *imposex* in 3 species of muricids (*Haustellum brandaris*, *Phyllanotus trunculus*, *Thais haemastoma*) collected from two Sicilian harbours (Siracusa and Rometta Marea) with different levels of maritime traffic (medium vs low). 126 muricids were measured, crushed, sexed and the genital organs were grossly examined. The penis size, measured by a calliper, allowed to calculate the Relative Penis Size Index (RPSI).

**RESULTS** - 56 muricids belonging to the species *H. brandaris* and collected in Rometta Marea showed a sex ratio of 1.4 female/male with 23% of *imposex*. The male penis was 1.1±0.1 cm, while the female penis was 0.1±0.1 cm, the RPSI was 5.7. Twelve *P. trunculus* muricids from the same site showed a sex ratio of 1 with 75% of *imposex*. The male penis was 1.0±0.2 cm, while the female penis was 0.1±0.1 cm, the RPSI was 13.3. 51 muricids of the same species collected in Siracusa showed a sex ratio of 1.3 with 86% of *imposex*. The male penis size was 1.5±0.4 cm, while the female was 0.3±0.3 cm, the RPSI was 19.5. No *imposex* was evident in *T. haemastoma* in this study.

**DISCUSSIONS** - The phenomenon of *imposex* is still present in Sicilian harbours, but the degree of contamination seems low. *H. brandaris* has a dose-dependent response<sup>4</sup>, while *P. trunculus* is very sensitive but not dose-dependent<sup>5</sup>. Despite the high prevalence of *imposex* recorded, the values of RPSI and sex ratio indicate a low severity of the disease, characterized only by the development of a small penis and deferent duct, without obstruction and damage to the female apparatus.

**REFERENCES** - 1. Smith, B.S. Sexuality in the American mud-snail, *Nassarius obsoletus* Say. *Proc. Malacol. Soc. Lond.* 39, 377-379 (1971). 2. Matthiesen, P. & Gibbs, P.E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin mediated endocrine disruption in molluscs. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 37-43 (1998). 3. Fent, K. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 1-117 (1996). 4. Ramon, M. & Amor, M.J. Increasing *imposex* in population of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterranean. *Mar. Environ. Res.* 52, 463-475 (2000). 5. Garaventa, F. et al. *Imposex* and accumulation of organotin compounds in populations of *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) from the Lagoon of Venice (Italy) and Istrian coast (Croatia). *Mar. Pollut. Bull.* 54, 602-625 (2007).

## CRIOCONSERVAZIONE DI SPERMATOZOI EPIDIDIMALI FELINI

Cocchia N., Russo M., <sup>1</sup>Tortora G., Lorizio R., *Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie; <sup>1</sup>Scuola di Specializzazione in Fisiopatologia della Riproduzione degli Animali Domestici, Università di Napoli Federico II, Napoli.*

**Parole chiave:** Crioconservazione, spermatozoi, epididimo, felini, riproduzione assistita.

**RIASSUNTO** - Nel gatto domestico particolare attenzione è stata rivolta alla raccolta degli spermatozoi dalla coda dell'epididimo e dal dotto deferente. I gameti felini hanno delle caratteristiche fisiche peculiari che rendono particolarmente difficile lo sviluppo di metodi di crioconservazione validi. Obiettivi del presente studio sono stati: 1) esaminare la motilità, la vitalità e la morfologia di spermatozoi epididimali di gatto domestico (*Felis catus*) pre e post congelamento; 2) valutare l'efficienza dello stesso metodo di crioconservazione su spermatozoi epididimali recuperati post-mortem da tre felini selvatici (1 *Panthera tigris*; 1 *Panthera pardus*, melanic variety ed 1 *Panthera pardus*). I risultati ottenuti, dimostrando l'efficienza della metodica impiegata, offrono spunti per il perfezionamento delle metodiche di crioconservazione dei gameti felini.

**INTRODUZIONE** - La crioconservazione dei gameti è fondamentale per lo sviluppo dei programmi di riproduzione assistita (ART - Assisted Reproduction Techniques)<sup>5,8</sup>. La suscettibilità degli spermatozoi al Cold shock è direttamente correlata alla composizione della membrana plasmatica che è fortemente variabile non solo tra le varie specie ma, nell'ambito di una stessa specie, tra gli individui<sup>9</sup>. I gameti felini hanno delle caratteristiche fisiche peculiari e non ancora ben conosciute, che rendono particolarmente difficile lo sviluppo di metodi di crioconservazione validi. Molteplici sono state le procedure sperimentate ma la tecnica ottimale non è stata ancora realizzata<sup>5</sup>. Il recupero di spermatozoi epididimali rappresenta una procedura alternativa efficiente ed economica per il recupero di materiale genetico pregiato. Recentemente, nel gatto domestico particolare attenzione è stata rivolta alla raccolta degli spermatozoi dalla coda dell'epididimo e dal dotto deferente<sup>1,2,10</sup>. Obiettivi del presente studio sono stati: 1) esaminare la motilità, la vitalità e la morfologia di spermatozoi epididimali di gatto domestico (*Felis catus*) pre e post congelamento; 2) valutare l'efficienza dello stesso metodo di crioconservazione su spermatozoi epididimali recuperati post-mortem da tre felini selvatici (1 *Panthera tigris*; 1 *Panthera pardus*, melanic variety ed 1 *Panthera pardus*).

**MATERIALI E METODI** - Gli epididimi sono stati raccolti da 20 gatti domestici (*Felis catus*), di razza europea, di età compresa tra i 12 ed i 48 mesi durante le routinarie procedure di castrazione presso l'Ambulatorio Ostetrico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli. Allo scopo di selezionare esclusivamente gatti clinicamente sani e di fertilità comprovata ogni soggetto è stato sottoposto ad esame clinico, a valutazione della storia riproduttiva, ad analisi comportamentale e ad esame ultrasonografico dei genitali esterni. I soggetti sono stati sottoposti ad anestesia generale mediante premedicazione con atropina solfato (0,025 mg/kg, IM), induzione con propofol (6 mg/kg, EV) e mantenimento con Isoflurano (1,9%) dopo intubazione endotracheale<sup>4</sup>. L'esame ecografico, effettuato per ottenere una chiara visualizzazione delle dimensioni testicolari e delle caratteristiche del parenchima, è stato condotto in tutti i soggetti con una sonda lineare ad alta frequenza (10MhZ) e le immagini sono state acquisite sia in visione longitudinale che trasversale. L'orchietomia è stata effettuata mediante procedura standard<sup>3</sup> in tutti i gatti. Testicoli ed epididimi sono stati

raccolti anche da 3 felini selvatici dello Zoo di Napoli (1 *Panthera tigris*; 1 *Panthera pardus*, melanic variety ed 1 *Panthera pardus*) durante le autopsie effettuate, entro 6h dal decesso, presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli, tra ottobre 2005 e luglio 2006. I Felini avevano un'età compresa tra i 25 ed i 29 anni. Ogni complesso epididimo-testicolare fu immediatamente immerso in DPBS (Dulbecco's PBS) a 20-24°C e trasportato in laboratorio entro 30' dalla rimozione. Gli epididimi sono stati separati dai testicoli, sottoposti a lavaggi seriali in PBS per l'allontanamento dei residui ematici, i vasi visibili sono stati allontanati e la coda dell'epididimo con la porzione prossimale del dotto deferente sono state separate ed immerse in 2ml di Tris extender (3.025% Tris hydroxymethyl aminomethane, 1.7% citric acid, 1.25% fructose, 0.06% Sodium Benzyl penicillin, 0.1% streptomycin sulphate)<sup>2</sup>. Le code degli epididimi sono state trasferite in una piastra petri (35x10 mm; Falcon) sezionate in due porzioni lungo l'asse longitudinale, delicatamente sezionate, immerse in 1 ml di Tris extender ed incubati a 38°C per 10' per il rilascio degli spermatozoi. Il tessuto epididimale è stato quindi rimosso, il medium raccolto e centrifugato a 700 x g per 6', il surnatante rimosso ed il pellets risospeso in 200 µl Tris EY (Tris extender contenente il 20% (v/v) di egg yolk). 20 µl di tale soluzione sono stati raccolti per valutarne la concentrazione (n° spermatozoi/ml), la motilità, la vitalità e la morfologia spermatica. Un'ulteriore aliquota di Tris EY è stata addizionata al pellet così da ottenere una concentrazione finale di spermatozoi pari a 40 x 10<sup>6</sup> spermatozoi/ml. Il seme è stato, dunque, trasferito in frigorifero a 4°C per 60'. Successivamente il seme è stato diluito con una eguale parte di Tris EY addizionato con l'8% di glicerolo così da ottenere una concentrazione finale di spermatozoi pari a 20 x 10<sup>6</sup> spermatozoi/ml e di glicerolo pari al 4%. Il materiale così diluito è stato caricato in paillettes da 0,25 ml ed esposto ai vapori d'azoto ad una distanza di 6cm dalla superficie dell'azoto liquido per 20' per essere poi immerso in azoto liquido. Dopo 4 settimane ogni campione è stato riscaldato in bagnomaria a 42°C per 15' il seme fu ridiluito in 1 ml di Tris EY per essere rivalutato. Gli spermatozoi sono sottoposti a valutazione (Fertility test) al momento della raccolta, immediatamente dopo scongelamento (T0) ed ad intervalli di 1 h fino a 3 h di incubazione a 38°C dopo lo scongelamento (T1; T2; T3). Sono stati valutati i seguenti parametri: concentrazione, motilità, vitalità e morfologia. La conta degli spermatozoi è stata effettuata mediante osservazione di una aliquota di seme fissato in soluzione salina con microscopio ottico a luce diretta a 100 ingrandimenti impiegando una camera di Bürker. La motilità è stata valutata ponendo un'aliquota del campione in una camera di Makler su tavolino termostato a 37°C ed osservandola a 100 ingrandimenti con microscopio ottico a luce diretta. La vitalità è stata valutata mediante colorazione con eosina (Viability stain, Europath) ed osservazione a 400 x con microscopio a luce diretta. La valutazione delle anomalie morfologiche, infine, è stata effettuata mediante l'osservazione di almeno 200 spermatozoi fissati per campione a 400 X con microscopio a contrasto di fase.

**RISULTATI** - I testicoli dei 20 gatti domestici impiegati per questo studio mostravano una ecostruttura nei limiti fisiologici, una lunghezza media di 1,8 cm ed una larghezza media di 1,2 cm. I testicoli raccolti dai tre felini selvatici mostravano una ecostruttura nei limiti del fisiologico, una lunghezza media di 4,5 cm ed una larghezza media di 3,1 cm. Il numero di spermatozoi raccolto dagli epididimi di gatto domestico è risultato in media di 58,15 x 10<sup>6</sup> spermatozoi ±18,3. Il numero di spermatozoi raccolto dagli epididimi dei felini selvatici è risultato in media di 52,30 x 10<sup>6</sup> spermatozoi ±17,6. I risultati ottenuti per i parametri motilità e vitalità degli spermatozoi epididimali di gatto, esposti in Tabella 1, mostrano una drastica riduzione della qualità del seme post scongelamento e soprattutto entro la prima ora dallo scongelamento. Lo stesso fenomeno è stato rilevato negli spermatozoi epididimali dei felini selvatici (Tab. 2). Alla

valutazione morfologica risulta evidente un significativo incremento nella percentuale di forme anomale post scongelamento (Tab. 3).

Tab. 1 - Caratteristiche degli spermatozoi epididimali di gatto domestico pre- e post-congelamento (0h) e ad intervalli di 1 ora durante 3 ore di incubazione a 38°C. Media±DS (Gatti n = 20)

Parametri	Freschi	Congelati/riscaldati	1h	2h	3h
Conc. (n x 10 <sup>6</sup> )	58,15±18,3				
Motilità (%)	54,7±11,3	32±13,1	31,4±9,2	29,9±11,4	27,6±8,7
Vitalità (%)	74,3±8,6	45,2±9,4	45,1±9,7	42,7±8,4	37,2±8,7

Tab. 2 - Caratteristiche degli spermatozoi epididimali di felini selvatici pre- e post-congelamento (0h) e ad intervalli di 1-h durante 3 h di incubazione a 38°C. Media±DS. (EP; felini n = 3)

Parametri	Freschi	Congelati/riscaldati	1h	2h	3h
Conc. (n x 10 <sup>6</sup> )	52,30±17,6				
Motilità (%)	38,3±18,7	21,5±16,8	20,3±14,3	19,4±9,8	16,8±13
Vitalità (%)	42,4±14,5	33,5±12,9	32,7±10,5	32,2±11,4	26,6±11

Tab. 3 - Percentuale delle anomalie morfologiche spermatiche rilevate in spermatozoi epididimali di felini domestici e non pre- e post-congelamento (Media±DS).

Felini	Spermatozoi anomali (%)	
	Freschi	Congelati/riscaldati
Domestici	43,2±28,6	52,8±31,5
Selvatici	46,8±19,7	57,4±25,9

**DISCUSSIONE** - La crioconservazione di spermatozoi epididimali può rappresentare una potenziale procedura per il recupero e lo stoccaggio del materiale genetico di soggetti pregiati e/o a rischio d'estinzione<sup>7</sup>. Precedenti studi hanno dimostrato che gli spermatozoi di gatto domestico non sono suscettibili al cold shock se refrigerati con i comuni intervalli di discesa termica sia per lo stoccaggio a breve termine che per la preparazione al congelamento. Ulteriori studi hanno dimostrato l'effetto benefico del tuorlo d'uovo (20% di Egg Yolk) sulla membrana plasmatica di tali spermatozoi sia durante la refrigerazione che durante il congelamento<sup>6,9</sup>. Il congelamento in mini paillettes con Tris EY addizionato con il 4% di glicerolo dà ottimi risultati in termini di riduzione percentuale della motilità, vitalità ed integrità morfologica degli spermatozoi epididimali di felini domestici e non. I risultati da noi ottenuti offrono ulteriori spunti per il perfezionamento delle metodiche di crioconservazione dei gameti felini.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Axner E, Ström B, Linde-Forsberg C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 1998; 50: 973–9. 2. Hermansson U, Axner E. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. *Theriogenology*. 2007; 67: 1239–1248. 3. Howe L. Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 2006; 66(3): 500-509; 4. Ishikawa Y, Uechi M, Ishikawa R, Wakao Y, Higuchi S. Effect of isoflurane anesthesia on hemodynamics following the administration of an angiotensin-converting enzyme inhibitor in cats. *J Vet Med Sci* Aug. 2007; 69(8): 869-71. 5. Luvoni GC. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 2006; 66: 101–111; 6. Pukazhenti 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* 1999; 61:135–41. 7. Tsutsui T, Wada M, Anzai M and Hori T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 397–9. 8. Villaverde AISB, Mello Martins MI, Basto Castro V, Lopes MD. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology* 2006; 66: 1641–1644. 9. White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*. 1993; 5: 639–58. 10. Zambelli D, Cunto M. Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology* 2006; 66: 159–165.

## CRYOPRESERVATION OF FELINE EPIDIDYMAL SPERMATOZOA

**Cocchia N., Russo M., <sup>1</sup>Tortora G., Lorizio R.,** *Department of Veterinary Clinic Sciences, <sup>1</sup>Scuola di Specializzazione in Fisiopatologia della Riproduzione degli Animali Domestici, University of Naples Federico II, Via F. Delpino, 1, 80137 Naples, Italy. Corresponding author: ncocchia@unina.it*

**Key words:** Cryopreservation, Spermatozoa, epididymis, feline species, assisted reproduction.

Cryopreservation of gametes is an important tool in assisted reproduction programs; long-term storage of oocytes or spermatozoa is necessary when in vitro fertilization (IVF) or artificial insemination must be carried out at a future date. Almost all feline species are considered either critically endangered, endangered or vulnerable. Genetic material from animals of economic interest or from wildlife can be lost at any time by unexpected death of the animal. In this case, efforts can be made to prevent the total loss of that genetic material, by using assisted reproductive techniques. In domestic cats, special attention has been given to semen retrieval from the cauda epididymidis and deferent duct. Cryopreservation of epididymal spermatozoa offers a potential tool for rescuing genetic material from males of endangered populations. The susceptibility of spermatozoa to cold shock is related to the composition of the plasma membrane and differs not only among species but also among and within individuals. The composition of feline sperm membranes is not well known. Domestic cat spermatozoa and oocytes have peculiar physical characteristics that increase the difficulty of developing successful cryopreservation methods as compared to gametes of some other species. For this reason, even though a variety of procedures have been investigated, optimal cryopreservation techniques, either for spermatozoa or oocytes, have yet to be realized. The objectives of this work were to: 1) examine sperm motility, viability, abnormality and acrosome integrity in frozen/thawed domestic cat epididymal spermatozoa; 2) evaluate the same cryopreservation method on wild feline spermatozoa, in order to preserve their genetic resources. The epididymis was collected from 20 domestic cats during routine neutering procedure and from three wild felines at the time of autopsy. The sperm samples, diluted with 4% glycerol Tris Egg Yolk, were loaded into 0.25 mL mini-straws, exposed to nitrogen vapor and stored in liquid nitrogen. After four weeks, samples were thawed and reevaluated. The quality of each fresh and frozen/thawed sperm sample was tested, determining the motility ( $54.7 \pm 11.3\%$  and  $32 \pm 13.1\%$  respectively for cat spermatozoa;  $38.3 \pm 18.7\%$  and  $21.5 \pm 16.8\%$  respectively for wild felid spermatozoa), viability ( $74.3 \pm 8.6\%$  and  $45.2 \pm 9.4\%$  respectively for cat spermatozoa;  $42.4 \pm 14.5\%$  and  $33.5 \pm 12.9\%$  respectively for wild felid spermatozoa), and morphology. The most frequent sperm abnormalities found in the fresh tomcat semen were proximal droplets ( $10.9 \pm 9.3\%$ ), bent tails ( $19.8 \pm 8.2\%$ ), midpiece abnormalities ( $14.3 \pm 3.4\%$ ), coiled tails ( $9.9 \pm 3.8\%$ ), distal droplets ( $31.8 \pm 7.9\%$ ), bent tails with a droplet ( $6.6 \pm 4.2\%$ ) and head abnormalities ( $6.7 \pm 1.4\%$ ). Morphology showed a significant increase in the percentage of abnormal cells between fresh and frozen/thawed spermatozoa. The present study showed that feline epididymal spermatozoa can be frozen in egg-yolk extender with 4.0 % glycerol in 0.25 ml straws. The procedure used in the present study for epididymal cat sperm cryopreservation may be applicable for banking the genetic resources of wild felid species.



## VALUTAZIONE MORFOMETRICA COMPUTERIZZATA DELLA TESTA DI SPERMATOZOI DI TIGRE (*Panthera tigris*): NOTA PRELIMINARE

Acierno C., <sup>1</sup>De Vico G., <sup>1</sup>Carella F., Tortora G., Lorizio R., Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Sezione Clinica Ostetrica; <sup>1</sup>Dipartimento delle Scienze Biologiche, Facoltà di Scienze MM.FF.NN., Università degli Studi, Napoli Federico II

**Parole chiave:** Tigre, analisi morfometrica, testa spermatozoi

**RIASSUNTO** - La valutazione mediante analisi computerizzata della morfometria della testa di spermatozoi è una metodica standardizzata in diverse specie domestiche, per la valutazione delle caratteristiche morfologiche del seme correlate alla fertilità. Scopo di questo lavoro è stato quello di creare i primi parametri di riferimento morfometrici in spermatozoi epididimali di tigre (*Panthera tigris*).

**INTRODUZIONE** - Attualmente nella lista dell'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura (IUCN) sono presenti 16.119 Specie di animali e piante minacciate di estinzione<sup>1</sup>. Numerose cause risultano responsabili di questa situazione, fra esse la distruzione degli habitat provocata dall'espansione urbana<sup>1</sup>, la riduzione della biodiversità causata dal limitato scambio genetico fra gruppi differenti per l'isolamento geografico<sup>2</sup>, l'intossicazione da sostanze inquinanti<sup>1</sup>, il riscaldamento globale e la diminuzione delle risorse<sup>1</sup>.

Oltre che con la protezione degli habitat, la salvaguardia ed il mantenimento di un'adeguata biodiversità, possono essere realizzate attraverso la conservazione di gameti ed embrioni, importante risorsa genetica per impedire l'estinzione delle specie<sup>1,3</sup>.

Gli spermatozoi epididimali presentano caratteristiche simili a quelli dell'ejacolato, ed in diverse specie animali, sia domestiche che selvatiche<sup>4,5,6,7</sup>, sono utilizzati sia nell'inseminazione artificiale che per ampliare le conoscenze sulle tecniche di fecondazione in vitro (IVF)<sup>3,6,8</sup>. Essi rappresentano dunque un'importante fonte di materiale genetico, recuperabile anche da soggetti morti, soprattutto per le specie selvatiche in cui è difficile ottenere ejacolati, da cui l'attenzione rivolta ad ampliare le conoscenze e le tecniche necessarie alla loro caratterizzazione e conservazione<sup>4,5,6,7</sup>.

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare i parametri morfometrici della testa di spermatozoi epididimali di tigre (*Panthera tigris*) attraverso l'analisi computerizzata al fine di stabilirne le caratteristiche.

**MATERIALI E METODI** - Gli spermatozoi sono stati prelevati da un esemplare di Tigre del Bengala (*Panthera tigris*) deceduto nel gennaio 2008 presso il Giardino Zoologico di Napoli. Il soggetto non presentava lesioni macroscopicamente evidenti all'apparato genitale. Dai testicoli, asportati post-mortem entro sei ore dal decesso, è stata effettuata la dissezione in toto dell'epididimo.

Gli epididimi, sono stati sezionati lungo la linea sagittale mediana ed aperti a libro per esporre la mucosa e procedere al flushing. Il materiale seminale raccolto è stato sottoposto alle routinarie prove di vitalità, motilità e concentrazione. Dal materiale recuperato sono stati allestiti 6 vetrini, essiccati all'aria per 20 minuti e colorati con ematossilina e sono stati valutati morfometricamente 700 spermatozoi.

Le immagini degli spermatozoi sono state acquisite con una videocamera Nikon DS-Fi1 collegata ad un microscopio ottico Nikon Eclips E200, con obiettivo 100x in campo chiaro, memorizzate nel computer e riportate sullo schermo. La testa di ogni spermatozoo è stata delimitata manualmente con il mouse utilizzando come interfaccia il software ImageJ 1.39u (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>), quindi misurata automaticamente con la plug-in "particle 8 plus" version 2.0 (by G. Landini

10/2007). I valori ottenuti, sono stati espressi in pixel, previa calibrazione del software: 800 pixel = 50 µm corrispondenti a 16 pixel/µm.

I parametri morfometrici presi in considerazione per ciascun spermatozoo sono stati: area, perimetro, diametro massimo, diametro minimo, roundness.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Per ciascun parametro morfometrico considerato sono stati calcolati: media, moda, mediana, errore standard, deviazione standard. I dati ottenuti, riportati in tabella 1, erano distribuiti in modo gaussiano.

Tab. 1 - Parametri morfometrici della testa degli spermatozoi espressi in pixel

	Perimetro	Area	Diam. Min	Diam. Max	Roundness
<b>Media</b>	191,524	2046,105	20,024	31,966	0,671
<b>Errore standard</b>	0,487	8,122	0,051	0,087	0,002
<b>Mediana</b>	190,953	2038	20,058	31,876	0,672
<b>Moda</b>	185,196	1937	19,430	29,510	0,700
<b>Deviazione standard</b>	12,919	215,641	1,344	2,307	0,057
<b>Minimo</b>	161,095	1504,5	15,980	25,485	0,482
<b>Massimo</b>	242,995	2631,5	23,786	39,736	0,830
<b>Livello di confidenza (95,0%)</b>	0,955	15,945	0,099	0,170	0,004

Tutte le specie appartenenti alla famiglia dei felidi, ad esclusione del gatto, sono considerate minacciate od esposte al rischio di estinzione<sup>3</sup>. In particolare delle 8 sottospecie di tigre individuate dallo IUCN, tre (*Panthera tigris vigata*, *Panthera tigris sondaica*, *Panthera tigris balica*) risultano già estinte<sup>8</sup>, le restanti sub-specie sono state tutte inserite nella *Red List of Threatened Species* dell'IUCN<sup>9</sup>. Presso il Leibniz Institute Zoo and Wildlife Research (IZW) vengono immagazzinati spermatozoi ottenuti da eiaculati o di origine epididimale di oltre 40 specie di mammiferi selvatici, fra cui i grossi felini, al fine di studiarne le caratteristiche e valutarne la variabilità<sup>1</sup>. Tuttavia, non esistono in letteratura riferimenti in merito alle caratteristiche morfometriche del seme di tigre (*Panthera tigris*).

La classificazione morfologica degli spermatozoi è un importante indicatore di fertilità sia nell'uomo che negli animali, può essere utilizzata inoltre come indicatore di stress biologico, fornendo indicazioni sull'utilizzabilità del seme per il congelamento, e sugli effetti che quest'ultimo può determinare sulla capacità fecondante<sup>10</sup>.

Questo studio rappresenta un punto di partenza da cui ampliare la nostra casistica, utilizzando possibilmente anche sperma prelevato in vivo, al fine di standardizzare la metodica per la valutazione morfometrica della testa di spermatozoi di tigre (*Panthera tigris*), creando parametri di riferimento correlabili alla fertilità anche in questa specie.

**BIBLIOGRAFIA** - 1. Fickel, J., Wagener, A., Ludwig, A., Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J of Wildl Res*, 53, 81-89 (2007). 2. Silva, A.R., Morato, R.G., Silva, L.D., The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim Reprod Sci.*, 81(1-2):159-75, Review (2004). 3. Kashiwazaki N. et al., Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *J Reprod Dev*, 51(6):735-9, Epub 2005 Oct 7, (2005) 4. Zambelli D.,

Cunto M. Semen collection in cats: techniques and analysis, *Theriogenology*, 66(2):159-65, (2006). **5.** Soler C., et al., Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology*, 15;64(5):1236-43 (2005). **6.** Estes, M.C. et al., Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J Androl.*, 27(5):662-70 (2006). **7.** Wani, NA., In vitro embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from in vitro matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4 degrees C. *Anim Reprod Sci.* [Epub ahead of print] Feb 13, (2008). **8.** Donoghue A.M., et al., In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol. Reprod.*, 43(5):733-44 (1990). **9.** 2007 IUCN Red List of Threatened Species. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Downloaded on 1 April 2008. **10.** García-Herreros M. et al., Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int J Androl.*, 29(5):553-63 (2006).

## COMPUTERIZED MORPHOMETRIC EVALUATION OF *PANTHERA TIGRIS* HEAD SPERMATOZOA: PRELIMINARY STUDY

Acierno C., <sup>1</sup>De Vico G., <sup>1</sup>Carella F., Tortora G., Lorizio R., *Veterinary Clinical Department, Obstetric-Gynecological Section; <sup>1</sup>Biological Sciences Department, Faculty of Sciences; University of Naples Federico II, Naples, Italy. Corresponding author:*

**KEY WORDS:** *Panthera tigris*, morphometric analysis, epididymal head spermatozoa,

Currently, 16,119 species of animals of plants are listed by the World Conservation Union as being threatened with extinction (IUCN, 2006), often as a direct consequence of anthropogenic influences<sup>1</sup>. Besides habitat protection, one of the measures to halt this process is genetic resource banking: the preservation of gametes, embryos, or seeds to maintain sufficient genetic diversity<sup>1,2</sup>.

The epididymal spermatozoa from several species of domestic animals have been preserved or used successfully for artificial insemination<sup>3,4</sup>. Epididymal spermatozoa can be harvested from deceased animals and offer a potential tool for rescuing genetic material that can be used in assisted reproductive technologies or preservation<sup>3,4</sup>. The objectives of this work were to determine the morphometric characterizations of the epididymal spermatozoa head from *Panthera tigris* by computer analysis.

Epididymal sperm samples were obtained from one Bengal Tiger (*Panthera tigris*) which died at Naples Zoo. The animal showed no macroscopic lesions of the genital system. The sperm cells were processed for the fertility test (vitality, motility, concentration). Six microscope slides were prepared from the sperm sample. All slides were air-dried and stained with hematoxylin. A total of 700 spermatozoa were examined. The sperm images were obtained using a Nikon DS-Fil video camera interfaced with a Nikon Eclips E200 optical microscope with a 100x bright field objective. Morphometric analyses were obtained using the ImageJ 1.39u software. The calibration was 50µm= 800 pixels, corresponding 16 pixels/µm. The mean morphometric measurements evaluated in our samples were: area= 2046,105 pixels; length= 31,966 pixels; width= 20,024 pixels; perimeter= 191,524 pixels and roundness= 0,671 pixels. This work should be a starting point for developing standardized methods for morphometric evaluations of tiger spermatozoa heads, providing referential parameters for fertility in this species.

**References** - 1. Fickel, J., Wagener, A., Ludwig, A., Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J of Wildl Res.*, 53, 81-89 (2007). 2. Kashiwazaki N. et al., Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat, *J Reprod Dev.*, 51(6):735-9. Epub 2005 Oct 7. (2005) 3. Estes, M.C. et al. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J Androl.* 27(5):662-70. Epub May 25. (2006) 4. Wani, NA. In vitro embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from in vitro matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4 degrees C. *Anim Reprod Sci.*, [Epub ahead of print] Feb 13 (2008).

# ATTI DELLA GIORNATA DI EDUCAZIONE CONTINUA IN MEDICINA

## “DAL GENITAL CONDITION SCORE ALLE TECNOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE: MANTENERE UNA ELEVATA EFFICIENZA RIPRODUTTIVA NELL'ALLEVAMENTO BOVINO”

14 giugno 2008 - Lodi  
Ospedale Veterinario Grandi Animali - Facoltà di Medicina Veterinaria



*Chairman: Prof. Fausto Cremonesi*

08:00 - 08:30 Registrazione partecipanti

08:30 - 09:00 Saluti:

**Preside della Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano** *Prof. E. Scanzani*  
**Presidente della S.I.R.A** *Prof. G.M. Lacalandra*

09:00 - 09:45 **Applicazione del Genital Condition Score**  
*Prof. E. Parmigiani - Università di Parma*

09:45 - 10:30 **Tecnologie della riproduzione e sessaggio del seme**  
*Prof. F. Cremonesi - Università di Milano*

10:30 - 11:15 **Relazione tra fattori metabolici e disfunzioni ovariche post partum  
nella bovina da latte**  
*Prof. M.C. Veronesi - Università di Milano*

11:15 - 11:30 *Pausa caffè*

11:30 - 12:15 **Gli Interferenti endocrini**  
*Prof. R.L. Sciorsci – Università di Bari*

12:15 - 13:00 **Diarrea neonatale nel vitello - diagnosi, terapia e profilassi**  
*Dr. N. Morandi - Università di Milano*

13:00 - 13:30 **Discussione**

13:00 - 15:00 *Pausa pranzo*

15:00 - 18:00 **Sessione pratica per gruppi in allevamenti per applicare il genital  
condition score ed in laboratorio di riproduzione assistita a Lodi**  
*Prof. F. Cremonesi - Università di Milano*  
*Prof. E. Parmigiani - Università di Parma*

18:00 - 19:00 **Discussione, conclusione e ritiro questionario apprendimento**

## GYNECOLOGICAL SYSTEM SCORE (GSS) NELLA VALUTAZIONE DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DELLA BOVINA DA LATTE

**Enrico Parmigiani**, *Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Clinica Ostetrica e Riproduzione Animale, Università degli studi di Parma*

**INTRODUZIONE** - La lunghissima esperienza maturata dagli allevatori di bovine a produzione intensive di latte ha ampiamente dimostrato che la gestione minuziosa ed organizzata di ogni settore comporta l'ottenimento di risultati sempre migliori essenziali oggi per l'ottenimento di un reddito e la conseguente sopravvivenza dell'azienda. Anche in campo riproduttivo l'opera del veterinario ha assunto una importanza tale da rendere necessaria la creazione di specialisti che svolgono una attività periodica e di vitale importanza per la programmazione della produzione e delle altre attività essenziali per il buon funzionamento dell'azienda [1,3,5,6,8,10,11,12]. Nell'ambito dei controlli che il ginecologo esegue periodicamente nell'azienda, l'idea degli Autori è stata quella di proporre una valutazione morfologico-funzionale dell'apparato riproduttore della bovina da latte, eseguita attraverso una visita ginecologica ed ecografica che attribuisca un punteggio ad ogni singolo organo componente l'apparato genitale con un conseguente punteggio medio finale. Il nome proposto per la valutazione è stato quello di *Gynecological System Score* ( GSS) e potrebbe rappresentare un valido elemento di valutazione così come già avviene per il BCS che rappresenta un validissimo elemento di valutazione dello stato nutrizionale del singolo animale e dell'intera mandria al fine di ottimizzare l'equilibrio fra produzione latte, capacità di ingestione e condizione corporea [2,3,4,7,9].

Gli scopi del seguente studio sono quindi stati i seguenti:

- verificare se può esistere una correlazione fra il punteggio ottenuto con il GSS e l'efficienza riproduttiva delle bovine a produzione intensiva di latte;
- valutare se esiste una correlazione fra il GSS ed il BCS;
- vedere se il GSS può essere utile per la programmazione delle attività legate alla riproduzione.

**MATERIALI E METODI** - Nel presente studio sono state prese in considerazione 3359 bovine non gravide di età variabile dai 2,5 ai 12 anni (media=5,5) appartenenti a due grandi aziende della Lombardia uniformi sia per l'alimentazione di tipo "unifed", per la destinazione del prodotto, latte ad uso alimentare o per la produzione di formaggi teneri, che per tecniche di allevamento e gestione dati elaborati attraverso il sistema informatico. Tutti i soggetti sono stati presi a caso fra i vari gruppi in cui erano stati inseriti per esigenze riproduttive produttive ed alimentari. Gli animali sono stati divisi in due gruppi: gruppo A costituito da 2141 soggetti, quello B da 1218. Per entrambi i gruppi sono stati considerati i giorni dal parto, il BCS [2], il numero medio di FA per gravidanza, la percentuale di gravidanze e soprattutto il GSS (Tab. 3). Per la valutazione del "Gynecological System Score" (GSS) è stata eseguita una visita ginecologica ed ecografica per via transrettale dando un punteggio da 0 a 5 ad ognuna delle seguenti strutture: ovaio, corna uterine, corpo dell'utero, cervice, vulva-vagina; per la valutazione dell'angolo della vulva rispetto al terreno è stato dato un '+' o un '-'.

Al fine di ottenere una valutazione uniforme fra tutti i colleghi noi proponiamo i seguenti valori:

Ovaie:                   3,5 cm lunghezza  
                              2,5 cm larghezza

2,0 cm spessore (Fig. 1).

Corna Uterine: 25-30 cm lunghezza con convessità craniale  
3,5-5 cm diametro trasversale (Fig. 2).

Corpo dell'utero: 7-9 cm lunghezza con convessità craniale  
3,5-5 cm diametro trasversale (Fig. 3).

Cervice: 6-8 cm lunghezza  
4-5 cm diametro trasversale con riguardo anche alla mobilità

Vulva - Vagina: 8-11 cm lunghezza con l'aggiunta di un '+' o un '-' in considerazione dell'inclinazione della vulva rispetto al terreno, la presenza di lacerazioni perineali di primo, secondo o terzo grado.

Le tabelle 1a ed 1b mostrano un esempio delle valutazioni eseguite con i relativi valori medi, le tabelle 2a e 2b mostrano come può essere positivamente modificato il foglio di lavoro del veterinario del sistema computerizzato denominato "Cincinnati" proposto dalla maggior parte delle APA Italiane. Le valutazioni sono state eseguite settimanalmente ed i risultati ottenuti sono stati sottoposti a confronto statistico.

#### GYNECOLOGICAL SYSTEM SCORE (G.S.S.)

Tab. 1a - Proposta di valutazione Morfologico-Funzionale dell'apparato genitale delle vacche da latte

			0-5	0-5	0-5	0-5	0-5		+/-	
N. az. vacca	Note	Gg dal parto	OVAlE	CORNA UTERINE	CORPO UTERO	CERVICE	VULVA - VAGINA	TOTALE	INCLINAZIONE	N. punteggio medio
2453	Visita P.P. C.L. O.Dx	45	2,5	5	3	3	2,5	16	+	<b>3,2</b>
3015	Visita P.P. C. F. O.Dx	32	1,5	3	3	3	2,5	13	+	<b>2,6</b>
303	Visita P.P. C.L. O.Sx	45	3	3,5	3,5	3	2,5	15,5	+	<b>3,1</b>
2179	Estro	93	3	2,5	2,5	2,5	2,5	13	+	<b>2,6</b>
651	Visita P.P. C.F. O.Dx	47	1	2,5	2,5	2,5	1,5	10	+	<b>2,0</b>
1577	C.L. O.Dx	330	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	12,5	+	<b>2,5</b>
1521	Visita P.P. Piometra corno uterino Dx	24	1,5	1,5	2,5	2,5	1,5	9,5	-	<b>1,9</b>
84	C.L. O.Dx C.F. O.Sx	93	1,5	2,5	2,5	2,5	2,5	11,5	+	<b>2,3</b>
2025	Visita P.P. FO. Sx C.L. O.Dx	26	3	3,5	3,5	3,5	2,5	16	+	<b>3,2</b>

### GYNAECOLOGICAL SYSTEM SCORE (G.S.S.)

Tab. 1b - Proposta di valutazione Morfologico-Funzionale dell'apparato genitale delle vacche da latte

			0-5	0-5	0-5	0-5	0-5		+/-	
N. az. vacca	Note	gg dal parto	OVAIE	CORNA UTERINE	CORPO UTERO	CERVICCE	VULVA-VAGINA	TOTALE	INCLINAZIONE	N. punteggio medio
2513	Visita P.P. C.L. O.Dx	34	3	3,5	3,5	3	2,5	15,5	+	<b>3,1</b>
2882	Visita P.P. piometra corno Sx	24	1,5	1,5	2,5	1	2,5	9	+	<b>1,8</b>
2675	FO. Sx e Dx	67	1,5	2,5	2,5	2,5	2,5	11,5	+	<b>2,3</b>
2329	Ipofunzionalità ovarica bilaterale	2	1	2,5	2,5	2,5	1,5	10	+	<b>2,0</b>
2596	Visita P.P. C.L. O.Dx	30	3	4	3,5	3	2,5	16	+	<b>3,2</b>
2605	Visita P.P. C.L. O.Sx	40	3	4	3	3,5	3	16	+	<b>3,2</b>
33	C.F. O.Sx e Dx	55	0,5	2,5	2,5	2,5	2,5	10,5	+	<b>2,1</b>
899	Visita P.P. C.L. O.Dx	42	2	2	2	2	2	10	+	<b>2</b>
893	D.G. (-) C.F. O.Sx	106	1	2,5	2,5	2,5	1,5	10	+	<b>2,0</b>
2785	Visita P.P. C.L. O.Sx	52	3	4	3,5	3	2,5	16	+	<b>3,2</b>
2157	Visita P.P. C.L. O.Dx	83	3	2,5	2,5	2,5	2,5	13	+	<b>2,6</b>
2843	Visita P.P. C.F. O.Dx	48	1,5	2,5	2,5	2,5	2,5	11,5	+	<b>2,3</b>



Tab. 2a - Foglio di lavoro del veterinario dal *software* di gestione CINCINNATO modificato con l'aggiunta del GSS

Nome Azienda – Affirm v 2.05ET2 - Foglio di lavoro del veterinario - Data visita \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

n° vacca	Data Visita	Motivo visita veterinaria	Latt. n°	GIM	Diagnosi	Tratt./ Farmaco	Insemin N°	Data Fec.	Giorni dopo fec.	Pro duz	BCS	GS S
2453	06/02/06	II° post parto	3	45	CL Dx	PGF2α e FA	--	--	--	38,3	2,8	<b>3,2</b>
	30/01/06	II° post parto										
	23/01/06	I° post parto			O.K.							
724	06/02/06	II° post parto	5	48	CL	PGF2α e FA					2,75	<b>2,5</b>
	30/01/06	II° post parto										
	23/01/06	I° post parto										
	16/01/06				Piom.		--	--	--	14,3		
455	06/02/06	II° post parto	5	39	CF Sn				--	29,5	2,2	<b>2,3</b>
	30/01/06	I° post parto										
	23/01/06	I° post parto										
2605	06/02/06	II° post parto	2	40	CL Sn	PGF2α e FA	--	--	--	34,8	2,9	<b>3,2</b>
	30/01/06	I° post parto										
	23/01/06	I° post parto										
33	06/02/06	II° post parto	4	55	CF Sn		--	--	--	39,6	2,9	<b>2,1</b>
	30/01/06	II° post parto										
	23/01/06	II° post parto										
	09/01/06	I° post parto			O.K.							
2546	06/02/06	Diagnosi vacche	2	96	DG (-)		1	16/12/05	51	322	23	<b>24</b>
	30/01/06	Diagnosi vacche										
	23/01/06	Diagnosi vacche										
	12/12/05											
3361	06/02/06	Diagnosi vacche	1	97	DG (-)	In estro FA	1	29/12/05	38	163	22	<b>24</b>
	12/12/05	II° post parto			O.K.							
	05/12/05	I° post parto			O.K.							
3177	06/02/06	Diagnosi vacche	1	130	DG (+)		2	23/12/05	44	33,5	30	/
	30/01/06	Diagnosi vacche					1	29/11/05				
	21/11/05	II° post parto			O.K.							
3339	06/02/06	Diagnosi vacche	1	109	DG (+)		2	27/12/05			29	/
	05/12/05	II° post parto			O.K.		1	26/12/05	40	34,3		
	21/11/05	I° post parto			O.K.							
1989	06/02/05	Diagnosi vacche	5	142	DG (-)		1	27/12/05	40	30,1	2,1	<b>1,7</b>
	21/11/05	II° post parto			O.K.							
	18/10/05	I° post parto			O.K.							
1347	06/02/06	Diagnosi vacche	7	152	DG (-) Pio		1	15/12/05	52	40,7	1,9	<b>0,9</b>
	30/01/06	Diagnosi vacche										
	23/01/06	Diagnosi vacche										
905	06/02/06	Anaestro 60 GIM	4	113	CL	PGF2α e FA	--	--	--	32,3	2,8	<b>2,5</b>
	30/01/06	Anaestro 60 GIM										
	23/01/06	Anaestro 60 GIM										
	21/11/05	I° post parto			O.K.							
3027	06/02/06	Diagnosi vacche	1	141	DG (+)		2	26/12/05	41	27,1	3,0	/
	30/01/06	Diagnosi vacche					1	11/11/05				
	23/12/05				DG (-)							

Tab. 2b - Foglio di lavoro del veterinario dal *software* di gestione CINCINNATO modificato con l'aggiunta del GSS

Nome Azienda – Afifarm v 2.05ET2 - Foglio di lavoro del veterinario Data visita / /

n° vacca	Data Visita	Motivo visita veterinaria	Latt. n°	GIM	Diagnosi	Tratt./ Farmaco	Insemin N°	Data Fec.	Giorni dopo fec.	Produz	BCS	GSS
1577	06/02/2006	Diagnosi vacche	5	330	DG (-)/ CL Dx	PGF2α e FA	6	11/12/2005	56	21,0	2,75	<b>2,5</b>
	30/01/2006						5	18/11/2005				
	23/01/2006						4	21/10/2005				
	16/01/2006	Diagnosi vacche			DG (-)		3	18/08/2005				
2157	06/02/2006	Anaestro 60 GIM	3	83		PGF2α e FA	--	--	--	38,8	2,85	<b>2,6</b>
	30/01/2006	Anaestro 60 GIM										
	23/01/2006	Anaestro 60 GIM			IPO	Dodicile						
	09/01/2006	II° post parto			O.K.							
2113	06/02/2006	II° post parto	3	45	CL Sn	PGF2α e FA	--	--	--	45,6	2	<b>2</b>
	30/01/2006	II° post parto										
	23/01/2006	I° post parto			O.K.							
2095	06/02/2006	II° post parto	2	46	CL Dx	PGF2α e FA	--	--	--	39,1	2,7	<b>2,4</b>
	30/01/2006	II° post parto										
	23/01/2006	I° post parto			O.K.							
2282	06/02/2006	I° post parto	2	24	Pio. Cor. Sn	PGF2α	--	--	--	28,5	2,2	<b>2,1</b>
2815	06/02/2006	Diagnosi vacche	2	96	DG (+)		1	29/12/2005	38	20,0	3,0	/
905	06/02/2006	Anaestro 60 GIM	4	113	CL Dx	PGF2α e FA	--	--	--	32,3	2,8	<b>2,5</b>
	30/01/2006	Anaestro 60 GIM			IPO	Dalmavital + Dodicile						
	23/01/2006	Anaestro 60 GIM										
	21/11/2005	I° post parto			O.K.							
658	06/02/2006	Diagnosi vacche	5	129	DG (+)		2	29/12/2005	38	30,4	3,0	/
	14/11/2005	II° post parto			O.K.		1	22/11/2005				
	31/10/2005	I° post parto			O.K.							
1813	06/02/2006	Anaestro 60 GIM	5	130	IPO	Dodicile	--	--	--	36,3	1,75	<b>0,7</b>
	30/01/2006	Anaestro 60 GIM										
	23/01/2006	Anaestro 60 GIM										
1296	06/02/2006	Diagnosi vacche	5	133	DG (-)		3	21/12/2005	46	44,9	2,3	<b>2,5</b>
	30/01/2006	Diagnosi vacche					2	01/12/2005				
2765	06/02/2006	Anaestro 60 GIM	2	63	CL Dx	PGF2α e FA	--	--	--	42,2	2,45	<b>2,6</b>
	30/01/2006	II° post parto										
	23/01/2006	II° post parto										
	16/01/2006	I° post parto			PIO	PGF2α						
3132	06/02/2006	Anaestro 60 GIM	1	82	CL Dx	PGF2α e FA	--	--	--	34,3	2,85	<b>2,7</b>
	30/01/2006	Anaestro 60 GIM										
	23/01/2006	Anaestro 60 GIM										
	12/12/2005	I° post parto										
2260	06/02/2006	Anaestro 60 GIM	3	77	CF Dx		--	--	--	19,9	2,0	<b>1,9</b>
	30/01/2006	Anaestro 60 GIM										
	23/01/2006	Anaestro 60 GIM										

**RISULTATI** - La tabella 3 mostra chiaramente che per il gruppo A in cui le bovine hanno ottenuto un GSS medio di 2,9 il numero di interventi fecondativi e la percentuale di gravidanze sono stati rispettivamente 2,2 e 84,7%, mentre nel gruppo B, dove il GSS medio è risultato 2,1 il numero medio di FA per gravidanza è stato di 3,2 e le gravidanze il 70,44%. In entrambi i casi il confronto statistico fra le medie e le percentuali è risultato significativo per  $P < 0,05$ . La tabella mostra altrettanto chiaramente che esiste una correlazione anche fra il BCS ed il GSS è infatti comprensibile che bovine in condizioni fisiche scadenti possano presentare gravi problemi di funzionalità ovarica. Lo stesso discorso può valere per animali che abbiano avuto problemi al parto con conseguente rallentamento nel recupero fisico nel post-parto possono presentare stati patologici all'utero dovuti a processi infiammatori conseguenti ad un parto distocico con manualità ostetriche traumatizzanti.

Tab. 3 - Correlazione fra *Gynecological System Score* (GSS) ed efficienza riproduttiva nella vacca ad alta produzione.

n° Vacche valutate	Giorni dal parto X ± s.d.	B.C.S. X ± s.d.	G.S.S. X ± s.d.	n° F.A. X ± s.d.	Gravidanze n°(%)
2141	85,5 ± 15	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,2*	1814 (84,7)°
1218	102 ± 17,5	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,2	3,2*	858 (70,44)°

\* Il confronto fra le medie è significativo (*Student's t Test*  $P < 0,05$ )

° Il confronto fra le percentuali è significativo ( $\chi^2$  per  $P < 0,05$ )

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONI** - I risultati riportati nel presente lavoro dimostrano che il GSS può essere un dato utilissimo sia per il veterinario che per l'allevatore. Infatti le conseguenze di questa valutazione possono essere molteplici:

- valutazione del complesso dell'apparato riproduttore;
- valutazione immediata di un problema in una parte dell'apparato riproduttivo con conseguente messa in atto degli opportuni rimedi terapeutici;
- valutazione della frequenza con cui appare un problema a carico di una determinata struttura appartenente all'apparato riproduttore in modo da poter essere facilitati nell'individuare la causa e quindi stabilire più rapidamente una terapia mirata;
- previsione della fertilità della bovina e quindi programmazione del valore economico del toro da impiegare oppure se impiegare la fecondazione naturale, in caso di FA, stabilire il numero di dosi da utilizzare oppure se impiegare una guaina sanitaria;
- valutazione precoce e quindi programmazione degli animali da sottoporre a riforma;
- valutazione dell'apparato riproduttore in caso di compra-vendita.

A nostro avviso anche i futuri sviluppi che questa metodica potrebbe avere sono di importante rilevanza:

- evidenziare la possibilità che hanno certe linee di sangue di trasmettere alterazioni patologiche dell'apparato riproduttore;
- valutare la precocità di sviluppo dell'apparato riproduttore di vacche figlie del medesimo toro;
- verificare, così come abbiamo fatto nel presente lavoro, la correlazione fra BCS e GSS;
- valutare la permanenza di un determinato stato patologico con il susseguirsi delle valutazioni del GSS;
- valutare l'eventuale correlazione fra la conduzione aziendale ed il GSS;
- valutare la correlazione fra il GSS medio e la razione alimentare;
- valutare le eventuali variazioni del costo vacca gravidanza fra animali sottoposti a valutazione del GSS e non;

- valutare le eventuali differenze fra parametri riproduttivi come parto-primario intervento fecondativo parto-concepimento, numero medio di FA per gravidanza.
- Un ulteriore aspetto che appartiene ad un futuro forse molto prossimo potrebbe essere quello di mettere a confronto il GSS di figli di tori in attività con i loro cloni.
- In conclusione dopo aver valutato i risultati ottenuti nel presente studio possiamo affermare quanto segue:
- Esiste una correlazione fra il valore medio ottenuto dal GSS e l'efficienza riproduttiva di bovine da latte ad alta produzione
  - Esiste una chiara correlazione fra GSS e BCS
  - Il GSS può essere un validissimo mezzo per programmare tutte le attività aziendali legate alla riproduzione e gli Autori ne consigliano l'inserimento nei programmi computerizzati per la gestione della riproduzione.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) D. P. BERRY, F. BUCKLEY, P. DILLON, R. D. EVANS, M. RATH, AND R. F. VEERKAMP. (2003) Genetic Relationships among Body Condition Score, Body Weight, Milk Yield, and Fertility in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86:2193–2204
- 2) EDMONSON A.J., LEAN I.J., WEAVER L.D., FARVER T., WEBSTER G. (1989) A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68-78.
- 3) G. BANOS, S. BROTHERSTONE, AND M. P. COFFEY COFFEY. (2004) Evaluation of Body Condition Score Measured Throughout Lactation as an Indicator of Fertility in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 87:2669–2676
- 4) J. G. GONG, W. J. LEE, P. C. GARNSWORTHY AND R. WEBB. (2002) Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123: 419-427.
- 5) PARMIGIANI E. (2004). Gestione Aziendale e ipofertilità nella bovina da latte: aspetti manageriali. XXXVI Congresso Nazionale SIB 36: 113-127
- 6) PARMIGIANI E., BIGLIARDI E., MARTELLI P., BONATI L., MORINI G., DI IANNI F., BRESCIANI C., FERRARI L. (2004). Efficacia della somministrazione di glicole propilenico nel miglioramento della produzione, degli stati patologici del post-parto e della fertilità nella bovina da latte ad alta produzione. Congresso Nazionale SIB. 36: 95-102.
- 7) PARMIGIANI E., DI IANNI F., BIGLIARDI E., MORINI G., AMBROSI V., PERSONA P. (2003). Correlazione fra fertilità e somministrazione di vitamina E, carotene e cobalamide nella bovina da latte. Congresso Nazionale SIB. 35: 347-353.
- 8) PARMIGIANI E., BIGLIARDI E., MORINI G. (2002). Parto, momento di inseminazione ed efficienza riproduttiva in bovine a produzione intensiva di latte. Congresso Nazionale SISVET. 56: 115-116.
- 9) PARMIGIANI E., BIGLIARDI E., MORINI G., AMBROSI V. (2001). Ipofertilità e cause di eliminazione di bovine in alcune grandi aziende della Lombardia. Congresso Nazionale SIB. 33:61-66.
- 10) PARMIGIANI E., BIGLIARDI E., MORINI G., AMBROSI V., MUNARI E. (2001). Esiste una correlazione fra produzione e fertilità nelle bovine da latte in Italia?. Convegno su Biodiversità e Riproduzione Animale. 1:61-65.
- 11) J. E. PRYCE, M. P. COFFEY, and G. SIMM. (2001) The Relationship Between Body Condition Score and Reproductive Performance. *J. Dairy Sci.* 84:1508–1515.
- 12) RODENBURG J. “*Body condition scoring of dairy cattle*” Ministry of Agriculture and Food, Ontario, 1992.

## TECNOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE E SESSAGGIO DEL SEME

### Fausto Cremonesi

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie Sezione di Clinica Ostetrica Veterinaria  
Unità di Riproduzione  
Ospedale Grandi Animali  
Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Milano – Via  
dell'Università, 6 – 26900 LODI

Le recenti conoscenze nel settore della biologia della riproduzione e della biologia molecolare hanno contribuito negli ultimi anni a determinare l'avvento di nuove e sempre più sofisticate tecnologie applicate alla riproduzione animale con l'intento, nella specie bovina, di ottenere un miglioramento genetico determinato da un'intensa e accurata selezione delle popolazioni.

Lo sviluppo di nuove tecniche, che passa dalle considerazioni teoriche e dai test di laboratorio fino all'utilizzo in campo, è sempre stato un processo lento e graduale.

Attualmente sono utilizzate tecniche di riproduzione consolidate e tecniche in fase di perfezionamento. Tra le prime, quella maggiormente diffusa, è la fecondazione artificiale (FA) con seme congelato che ha avuto un'importante influenza sull'allevamento dei bovini da latte fin dagli anni '60. Successivamente l'embryo transfer si è affermato enormemente, tanto da costituire oggi un sistema riproduttivo che, insieme alla fecondazione artificiale, viene impiegato ampiamente negli allevamenti bovini. Esso garantisce l'incremento della produttività grazie al maggior numero di embrioni prodotti dalle bovine donatrici per effetto della superovulazione, ma soprattutto costituisce un valido mezzo per attuare il miglioramento del patrimonio genetico.

Nel corso degli anni l'impiego dell'ET ha gradualmente perso di vista la sua finalità scientifica, trasformando quella che era in origine una valida tecnica di ricerca in una vera e propria metodica zootecnica, la cui applicazione commerciale è oggi diffusa su larga scala.

L'indiscusso vantaggio che la tecnologia della superovulazione multipla associata all'Embryo Transfer (MOET) apporta alla ricerca nel settore della riproduzione animale è costituito dalla possibilità di produrre un numero di embrioni superiore a quello ottenuto da un ciclo riproduttivo fisiologico. Infatti, da questa tecnica si può ottenere, previo trattamento delle manze o delle vacche, un elevato numero di embrioni, che possono poi essere trasferiti in molte altre riceventi.

Altre tecniche sono nella attesa di essere trasferite dai laboratori all'utilizzo in campo. Molte di queste stanno gradualmente migliorando grazie anche all'esperienza pratica, alle nuove tecnologie e al progresso della biologia, tra queste:

- la produzione di embrioni in laboratorio: consiste nel prelievo in vivo con tecniche di aspirazione di ovociti da follicoli ovarici sotto controllo ecografico o da ovaie di bovine macellate. Gli oociti immaturi sono posti su particolari substrati e una volta raggiunta la maturazione sono fecondati in vitro per ottenere gli embrioni;
- la manipolazione degli embrioni: sui quali sono eseguite diagnosi prenatali di sesso, di malattie geneticamente trasmissibili e di fattori (k-caseina, alfa-lattoglobulina) essenziali per alcuni processi produttivi quali la caseificazione. Gli embrioni a seguito delle diagnosi possono essere impiantati in utero oppure congelati in attesa di impianto.
- il sessaggio del seme: consiste nella separazione dei cromosomi sessuali X e Y attraverso la citofluorimetria a flusso (Johnson, 2000). Questo strumento permette di

ottenere un significativo arricchimento, fino al 90%, di spermatozoi contenenti il cromosoma X o Y, separando il seme in base alla differenza di contenuto di DNA. Inizialmente la tecnica di separazione era alquanto lenta producendo circa 300.000 spermatozoi separati l'ora. Era possibile quindi ottenere una dose fecondante congelata con una concentrazione adeguata di spermatozoi, da 2 a 4 milioni, in una giornata di procedimento di separazione. Negli ultimi anni la tecnica è stata ottimizzata modificando aspetti di fluidodinamica e questo ha permesso una maggiore resa di spermatozoi correttamente orientati dal 25 al 70% ed un numero di spermatozoi raccolti molto elevato arrivando a 6 milioni/ora ed un livello di purezza del 90%.

Tale tecnica, rispetto alle altre precedentemente citate, risulta essere ad uno stadio più avanzato di utilizzo pratico.

La ragione principale che giustifica l'utilizzo di questa tecnologia consiste nella possibilità di migliorare l'efficienza della mandria scegliendo il miglior 30% dei soggetti per la rimonta interna e destinando la rimanente quota di vacche per la produzione di vitelli da carne. Questo fatto offre anche notevoli prospettive di selezione genetica sulla linea femminile per la possibilità di aumentare il numero di femmine presenti in azienda.

Tutto ciò rappresenta indubbiamente un vantaggio economico per l'allevatore, anche se l'impiego di questo particolare tipo di sperma necessita di personale molto specializzato ed adeguatamente istruito.

Tuttora però esistono alcune limitazioni:

- 1- la metodica di separazione degli spermatozoi implica una minor disponibilità di materiale seminale e di conseguenza un costo/dose maggiore.
- 2- La concentrazione di spermatozoi per paillette è inferiore alle paillette di sperma non sessato
- 3- Il costo elevato delle dosi (circa tre volte il seme non sessato).
- 4- Il presunto ristretto periodo di utilizzo che deve essere a poche ore dall'inizio dell'ovulazione, a differenza del seme convenzionale che permette un maggiore agio temporale di impiego.

Dopo quanto precedentemente esposto, tre sono le possibilità di approccio alla metodica: 1- attendere che le tecnologie raggiungano un livello tale da rendere perfettamente sostituibile la fecondazione con seme normale rispetto a quella con seme sessato, 2- ignorare queste limitazioni ed utilizzare il seme sessato nello stesso modo di quello non sessato, in altre parole utilizzare questo materiale costoso senza cura o particolare attenzione ai programmi di accoppiamento (questo determinerebbe l'insuccesso e la conclusione che questa tecnologia non funziona), 3- riconoscere le limitazioni e sviluppare nuovi protocolli di fecondazione formulati appositamente per il seme sessato.

In altre parole formulare programmi che utilizzano materiale seminale sessato in maniera efficiente ed economicamente valida.

Nel presente lavoro sono definite alcune delle caratteristiche delle dosi di sperma sessato reperibile in commercio per valutarne la fertilità al fine di mettere a punto metodologie per migliorare la sopravvivenza degli spermatozoi. Inoltre è suggerita un'analisi dei costi e benefici derivanti dall'introduzione di tale tecnica nella realtà produttiva. A questo scopo sono valutati la capacità fecondante in vitro e in vivo, l'integrità di strutture chiave nella fecondazione a livello di membrane, processi metabolici, frammentazione del DNA nella cellula nemaspermatocita ed infine le percentuali di gravidanza nelle bovine sottoposte a fecondazione artificiale con sperma sessato secondo le differenti metodologie oggetto della sperimentazione.

Nell'ambito della metodica di separazione degli spermatozoi, a causa di fattori inerenti il processo di sessaggio e di crioconservazione, il numero dei nemaspermi presenti in

una dose fecondante è notevolmente ridotto rispetto a quello mediamente presente in una dose di sperma non sessato. Questo fatto da solo potrebbe essere già in grado di condizionare la fertilità di tale sperma, senza considerare eventuali alterazioni qualitative a livello delle strutture deputate alla regolazione dei delicati meccanismi che regolano la capacità fecondante dello spermatozoo, quali la reazione acrosomale, il metabolismo mitocondriale, l'integrità del materiale genetico nucleare e la motilità che potrebbero venire alterati dal processo di sessaggio e congelamento. Questi fattori che influenzano negativamente la fertilità dello sperma sessato in condizioni di campo, possono, però essere meno limitanti nel momento in cui, attraverso nuove modalità di impiego di tale sperma, si è in grado di creare condizioni ottimali nel favorire l'incontro tra spermatozoi ed ovulo, impiegando una strategia di deposizione il più vicino al sito di fecondazione (salpingi) e il più prossimo in termini di tempo (ovulazione) nelle vie genitali femminili.

In questa esposizione sono riportate delle utili informazioni per la valutazione della capacità fecondante degli spermatozoi sessati e congelati attualmente a disposizione degli allevatori.

Nella tabella 1 sono riassunti i risultati ottenuti:

- in laboratorio: percentuale di motilità totale, numero di spermatozoi per paillette, percentuale di danni del DNA ( % frammentazione), integrità di membrana acrosomale (acrosomi reagiti), capacità fecondante (% fecondazioni in vitro) validità di separazione spermatozoi maschi e femmine durante il sessaggio (% embrioni ♀)
- in campo (% grav stalla)

Tabella 1

TORO	Motilità %	Concentrazione (milioni di spermatozoi)	Framm. DNA %	Acrosomi reagiti %	Fecondazioni in vitro %	Embrioni ♀ %	Gravidanze in stalla %
1	55	2	23,7	47,6	33	93	17,3
2	50	1,8	31,2	73,1	23,2	90	9,6

Da questa tabella si possono evidenziare alcune caratteristiche:

1. La percentuale di acrosomi reagiti è elevata;
2. Le percentuali di fecondazione in vitro sono relativamente basse;
3. La % di femmine è superiore o uguale al 90% quindi l'attendibilità della metodica di separazione è ottima;
4. Le % di gravidanza in campo sono inferiori al seme convenzionale.

Allo stato attuale della ricerca alcune di queste limitazioni sono insuperabili, essendo connesse con il procedimento di sessaggio, mentre su altre si può intervenire sviluppando nuove strategie di riproduzione adattate specificamente per lo sperma sessato. In altre parole possiamo formulare programmi di impiego dello sperma sessato che sono efficienti sotto il profilo tecnico ed economico anche se il prodotto è costoso e le percentuali di gravidanza sono inferiori allo sperma non sessato. Nella nostra esperienza tali programmi dovranno essere basati su alcune norme procedurali che possiamo sintetizzare come segue:

1. Utilizzare esclusivamente le manze, in ottime condizioni igienico-sanitarie; basarsi su rilievi il più oggettivi possibile per la determinazione dello stato di estro ricorrendo anche alla determinazione del progesterone plasmatico nel momento della inseminazione;
2. Non è determinante compiere un'inseminazione profonda;

3. Attenersi alla regola di fecondare 12 ore dopo la rilevazione dello stato di estro. Lo stato di estro è il periodo in cui l'animale in calore accetta il cavalcamento. L'anticipo come ovvio, ma anche il ritardo dell'intervento portano a drastiche riduzioni della fertilità.

Nel momento in cui è massima la concentrazione di spermatozoi nelle salpingi, in relazione al numero di ore trascorse dopo la fecondazione (FA ore 0), si osserva che gli spermatozoi maschi hanno una massima concentrazione fra le ore 10 e 16 (intervallo di 6 ore) dopo la fecondazione e gli spermatozoi femmina fra le ore 13 e 19 (medesimo intervallo di 6 ore), mentre per gli spermatozoi sessati è riportato come questo intervallo sia ristretto fra le 14 e 16 ore (intervallo di 2 ore). Questa differenza è esclusivamente attribuibile al ridotto numero degli spermatozoi contenuto nelle dosi di seme sessato. Impiegando seme a concentrazione normale già dopo 10 ore (per gli Y) e 12 (per gli X) dalla fecondazione si raggiunge un numero di circa quattro milioni di spermatozoi a livello della salpinge, ritenuto sufficiente a garantire tassi normali di concepimento, numero che non scende sotto questo valore per le successive sei ore. Questo consente una maggiore elasticità temporale nella esecuzione della FA rispetto al momento ottimale dell'intervento. Nel caso degli spermatozoi sessati, il numero ridotto comporta una loro presenza utile a livello salpingeo in tempi più ristretti, obbligando a scegliere il momento ottimale per la FA in modo molto rigoroso. Inoltre il numero di spermatozoi a livello della salpinge non raggiunge mai valori elevati con conseguente difficoltà ad ottenere ottimi tassi di concepimento.

L'allevatore che utilizza il seme sessato feconda in maniera mirata per ottenere due risultati diversi:

1- un numero di femmine variabile e superiore al convenzionale in cui il suo margine netto è dato dalla differenza tra il valore delle femmine nate ed il maggior costo del seme sessato utilizzato nel programma

2- un numero di vitelle femmine fisse che gli servono per la rimonta utilizzando, però un numero di animali della sua mandria inferiore quindi può decidere di fecondare le rimanenti vacche con sperma o embrioni da carne per la produzione di vitelli da carne con valore superiore a quello dei maschi da latte. Il margine netto è dato dalla differenza tra il valore dei vitelli da carne ottenuti, il maggior costo del seme sessato utilizzato nel programma di FA ed il costo dello sperma o embrioni da carne.

Al momento attuale il costo del seme sessato è circa tre volte quello del seme non sessato. E' importante perciò analizzare tutti i fattori implicati nel determinare il ritorno economico di un investimento tecnologico quale può essere considerato quello dell'impiego di sperma sessato a livello aziendale. Numerosi studi sono stati effettuati sul ritorno economico dell'impiego del seme sessato sia nell'allevamento da latte che da carne (Hohenboken, 1999). Un limite in molti di questi studi è però rappresentato dal fatto che spesso non sono stati presi in considerazione numerosi parametri in grado di incidere sul risultato economico dell'investimento per introdurre lo sperma sessato nella conduzione aziendale. Infatti, alcune variabili come la precisione nella separazione degli spermatozoi, la diminuzione dei parti distocici associata con la nascita di sole femmine, la riduzione della fertilità del seme sessato, il miglioramento genetico ottenibile dai tori sessati e la possibilità di avere un maggior numero vitelli incroci da carne, possono risultare difficili da quantificare.

E' qui riportata un'analisi dei costi benefici per opera di Seidel et al, 2003, considerando un ipotetico allevamento in cui veniva già applicata su larga scala la fecondazione artificiale.

La simulazione vuole stabilire il costo extra per l'acquisto delle dosi sessate oltre il quale il loro impiego diviene antieconomico, calcolato per tre livelli di valore di



mercato delle vitelle alla nascita di 180, 280 e 380 euro, posto che si vogliono ingravidare tutte le 100 manze dell'allevamento con seme sessato

Sono state prese in considerazione due ipotesi di gestione, un'ottimale, caratterizzata da un 60% di gravidanze, un'altra con conduzione media, caratterizzata da un 40% di gravidanze, confermate a 60 giorni post inseminazione. I dati economici presi in considerazione erano: il numero di fecondazioni per ottenere la gravidanza, i costi aggiuntivi per l'utilizzo del seme sessato, i costi aggiuntivi per il mantenimento dovuti ad un maggior numero di ritorni, l'incremento del numero di femmine, il numero di maschi, il costo per il maggior numero di dosi seme utilizzate, e il costo del capitale investito.

Il dato finale sulla convenienza economica è rappresentato dal costo massimo aggiuntivo rispetto alla dose convenzionale oltre il quale la dose di seme sessato non garantisce un ritorno economico, calcolato come sopra detto, per tre livelli di valore di mercato delle vitelle alla nascita di 180, 280 e 380 euro. Il valore dei vitelli maschi è assunto in euro 80. I calcoli si basano su una precisione nel sessaggio del 90% e sulla naturale ripartizione dei sessi alla nascita del 51% di maschi e 49% di femmine. La simulazione è basata su una fertilità del seme sessato al 90% rispetto a quella del seme convenzionale.

Nella realtà americana si è riscontrato che l'allevatore con buoni tassi di gravidanza (60%) può permettersi, per ingravidare le manze, di spendere da 7 (nel caso di valore delle vitelle alla nascita di 180euro) fino a 43 euro (nel caso di valore delle vitelle alla nascita di 380euro) in più per acquistare le dosi sessate, invece l'allevatore con bassi indici di fertilità (40%) può sfruttare questa innovazione tecnologica solo se i costi aggiuntivi per introdurla sono compresi tra 1 e 25 euro, sempre in relazione al valore di mercato delle vitelle.

In conclusione, le prove di laboratorio sia di base, sia quelle più specifiche morfo-funzionali (stato acrosomale, fecondazione in vitro e frammentazione del DNA) nel loro complesso, indicano che lo sperma sottoposto al procedimento di separazione X/Y è da ritenersi comunque fertile.

E' plausibile quindi che il processo di sessaggio non induca sostanziali alterazioni sulla capacità fecondante degli spermatozoi durante il processo di separazione delle popolazioni nemaspermatiche in base ai cromosomi sessuali. Le difficoltà relative alle percentuali di gravidanza riscontrate nella prova in stalla riteniamo siano da imputare all'unica sostanziale differenza tra le dosi di sperma sessato e quelle non sessato, riconducibile al numero di spermatozoi presente per paillette. Allo stato attuale della tecnologia, tale importante differenza numerica non sembra essere facilmente superabile in un prossimo futuro. Infatti, per evidenti ragioni economiche, il numero degli spermatozoi sessati ottenibili con l'attuale tecnologia deve essere suddiviso nel maggior numero possibile di dosi le quali comunque, devono contenere quello che è ritenuto il numero minimo accettabile di nemaspermi che non penalizza eccessivamente le percentuali di gravidanza. Tale numero è stato individuato (Weigel, 2003) in due milioni di spermatozoi sessati o non sessati fecondando manze nelle quali si sono ottenute rispettivamente il 46% ed il 49% di gravidanze. Nella attesa di miglioramenti nella metodologia che consentiranno, a parità di costi, l'impiego di una maggiore concentrazione di nemaspermi per dose, questa promettente tecnologia della riproduzione può essere proposta ed utilizzata solo conoscendone in dettaglio le caratteristiche e suggerendo strategie pratico-applicative utili a circoscriverne gli eventuali limiti.

## BIBLIOGRAFIA

Amman RP. Issues affecting commercialization of sexed sperm. *Theriogenology*, 52, 1441-57, 1999

Cheng FP, Fazeli AR, Voorhout WF, Mrks A, Bevers MM, Colenbrander B. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Andrology* 17 674-682 1996

Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli AR, Bevers MM, Colenbrander B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod* 59,733-742 1998b

Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 15, 213-226 1986

Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 12, 98-103 1991

Hohenboken WD. Application of sexed semen on commercial beef production system. *Theriogenology*, 52, 1421-33, 1999

Huges PE, Pig A.I. in Australia- Opportunities and limitations. Proceedings of the Eighth Biennial Conference of the Australasian Pig Science Association (APSA), 155-156 2001

Pallante BA, Stacchezzini S, Grando P, Cremonesi F. Assesment of spontaneous and heparin-dependent acrosome reactions to evaluate fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa. 9° meeting, studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico 75-79 1997.

Saxena N, Peterson RN, Sharif S, Saxena NK, Russel LD. Changes in the organization of surface antigens during in-vitro capacitation of boar spermatozoa as detected by monoclonal antibodies. *J Reprod Fert* 78, 601-614 1986

Stacchezzini S., Cremonesi F. *Manuale di Teriogenologia Bovina*. Editore G. Sali, Ed agricole, Bologna. 1996

Talbot P, Franklin LE. Surface modification of guinea pig sperm during in vitro capacitation: An assesment using lectin-induced agglutination of libing sperm. *J Exp Zool* 203 1-14 1978

Weigel K.A. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems *J. Dairy Sci.*, 87: E120-E130, 2003

## RELAZIONE TRA FATTORI METABOLICI E DISFUNZIONI OVARICHE POST PARTUM NELLA BOVINA DA LATTE

**Maria Cristina Veronesi**

*Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Milano*

Un'elevata efficienza riproduttiva è condizione necessaria per una corretta produzione lattea che garantisca un adeguato profitto all'allevatore<sup>1</sup>. L'attuale calo di fertilità, osservato nelle bovine Frisone, riconosce una causa multifattoriale che coinvolge il miglioramento genetico, disordini alimentari, l'inadeguata gestione riproduttiva, l'aumento di patologie ed il calo di benessere animale<sup>2</sup>. L'esatto impatto delle singole voci sull'efficienza riproduttiva è di difficile valutazione; è tuttavia largamente riconosciuto l'effetto della corretta alimentazione, in particolare nel periodo peripartum, sulle performances riproduttive<sup>3,4</sup>. Da un punto di vista riproduttivo, lo scopo è quello di ridurre al minimo l'intervallo parto-concepimento ed il numero di inseminazioni necessarie ad ottenere una gravidanza<sup>5</sup>. Questo sottintende un rapido ripristino della funzionalità dell'apparato genitale post partum, con completa involuzione dell'utero e ripristino della ciclicità ovarica. Le alterazioni del normale processo involutivo dell'utero possono essere fattori predisponenti o concomitanti l'insorgenza di disfunzioni ovariche, tra le quali frequentemente si osservano lo sviluppo di follicoli cistici, condizioni di prolungato anestro e fasi luteiniche prolungate<sup>6-8</sup>. Nelle bovine da latte il post partum rappresenta un periodo estremamente critico, a causa degli imponenti cambiamenti dell'assetto ormonale connessi con l'evento del parto, ma anche dovuto agli adattamenti metabolici indotti dall'inizio della lattazione. Nelle bovine ad alta produzione lattea, l'improvvisa ed imponente lattazione coincide con una notevole richiesta metabolica, molto spesso non associata ad una corretta assunzione di cibo, in particolare di fonti energetiche. A questa richiesta energetica l'organismo risponde con una lipolisi GH-indotta ed una soppressione della responsività tissutale all'insulina. Gli elevati livelli di GH inducono uno stato catabolico, che esita in una riduzione più o meno marcata del peso corporeo<sup>9</sup>. A livello epatico, il calo di recettori per il GH si traduce in una riduzione dei livelli di IGF-I, che rappresenta, nell'immediato post partum, un importante indicatore dello stato nutrizionale nei confronti dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio<sup>2,10-12</sup>. Quando la disponibilità energetica è insufficiente, si instaura una condizione di bilancio energetico negativo (BEN), caratterizzato da una modificazione dei livelli circolanti di glucosio, insulina, IGF-I, leptina, NEFA, triacilglicerolo e  $\beta$ -idrossibutirrato (BOHB). L'associazione tra prolungato e/o pronunciato BEN e ripercussioni riproduttive è ormai nota<sup>13</sup>, con un'interferenza che si riflette principalmente sulla ripresa della ciclicità ovarica. Nelle bovine da latte una delle più comuni cause di inefficienza riproduttiva post partum è rappresentata dalle cisti ovariche, la cui incidenza è stimata in un range del 5.6-18.8%<sup>14-16</sup>, e che sembra riguardare in maggior misura le bovine ad alta produzione<sup>2,17</sup>. Nonostante l'ampia letteratura inerente le cisti ovariche nella bovina, l'esatto meccanismo eziopatogenetico che conduce allo sviluppo ed al mantenimento della condizione cistica ovarica non è ancora del tutto chiarito, anche se si suppone che la condizione possa essere il risultato di un'eziologia multifattoriale<sup>18</sup>. È stato ampiamente riconosciuto che le cisti ovariche sono la conseguenza di uno squilibrio endocrino dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, associato ad un'anomala produzione (e rilascio) di LH<sup>19</sup>. Anche se la letteratura riporta risultati spesso contrastanti sulla relazione tra BEN e cisti ovariche, un rapporto tra i due eventi sembra alquanto plausibile, con possibili effetti a livello sia ipotalamo-ipofisario che ovarico-follicolare<sup>18</sup>. Le cisti ovariche, definite come strutture similfollicolari di diametro superiore a 20 mm e persistenti per almeno 7-10 giorni, sono caratterizzate da mancata ovulazione e ritardata atresia del follicolo dominante. Per questa ragione alcuni

studi hanno focalizzato l'attenzione sull'associazione tra condizione cistica ovarica e fattori di crescita. Dal momento che il follicolo è considerato una sede di produzione ed azione per le IGF-I, i livelli intrafollicolari di IGF-I sia in follicoli normali che cistici sono stati indagati nella bovina, come in diverse altre specie animali, allo scopo di valutarne il ruolo nella normale funzionalità ovarica ed anche nell'eventuale coinvolgimento nella genesi delle cisti follicolari. Il sistema IGF svolge un ruolo nella crescita follicolare con un meccanismo sia diretto sia indiretto, in associazione all'insulina, nella stimolazione dello sviluppo follicolare mediato dall'up-regulation dei recettori per l'LH sulle cellule della granulosa<sup>20-21</sup>. Zulu et al<sup>11</sup> hanno dimostrato che bassi livelli circolanti di IGF-I nell'immediato post partum possono contribuire alla mancata ovulazione e conseguente sviluppo di follicoli cistici. Ortega et al<sup>22</sup> hanno osservato una più bassa produzione e concentrazione intrafollicolare, ma non circolante, di IGF-I nelle cisti rispetto ai normali follicoli preovulatori, suggerendo quindi un ruolo di questi fattori sia nella follicologenesi che nella patogenesi delle cisti ovariche. Le IGF-I potrebbero influenzare il destino del follicolo attraverso una complessa attività autocrina e paracrina. Infatti, dimostrata la presenza di recettori per le IGF-I a livello di cellule tecali<sup>23</sup>, questi fattori stimolano la produzione di estrogeni nelle cellule della granulosa<sup>24</sup>, incrementano l'induzione di recettori per l'LH, potenziano l'attività aromatasica FSH-mediata, inducono il differenziamento delle cellule della granulosa e agiscono, in sinergia con l'FSH, nell'acquisizione della capacità di sintesi del progesterone e dei proteoglicani dalle cellule della granulosa in coltura<sup>25-26</sup>. Un'altra disfunzione ovarica post partum è l'anestro prolungato, causato con tutta probabilità da una bassa pulsatilità di LH e conseguente ridotti livelli di estrogeni che impedirebbero il raggiungimento di concentrazioni preovulatorie di LH e quindi l'ovulazione stessa. In questo contesto, il diametro del follicolo dominante, così come i livelli circolanti di IGF-I sarebbero altrettanto importanti. Le bovine a maggior rischio di anestro prolungato sono caratterizzate da condizioni corporee non ottimali (BCS <2.5) e da una conseguente mobilizzazione lipidica e proteica, con riduzione dei livelli circolanti di glucosio, insulina, IGF-I e leptina, ed aumento delle concentrazioni di NEFA, triacilglicerolo e  $\beta$ -idrossibutirrato<sup>27</sup>. Queste variazioni dell'assetto metabolico esiterebbero in patologie metaboliche più o meno conclamate, che incrementano il rischio di disordini riproduttivi, tra i quali è annoverata anche la condizione di anestro prolungato<sup>5</sup>. Thatcher et al<sup>28</sup> hanno dimostrato che le bovine con prolungato anestro post partum hanno livelli circolanti di IGF-I più bassi rispetto a quelle con pronta ripresa della ciclicità ovarica dopo il parto. Anche l'insulina costituisce un potente stimolo alla proliferazione cellulare ed alla steroidogenesi follicolare, sia in vivo<sup>29</sup> che in vitro<sup>30</sup>. Ridotti livelli circolanti di insulina nell'immediato post partum possono generare disfunzioni ovariche e sviluppo di follicoli cistici<sup>31</sup>. Nei ratti<sup>32</sup> è stato dimostrato che, in risposta al test di tolleranza al glucosio, le cellule beta delle isole pancreatiche, dopo un'esposizione di 48 ore ad elevati livelli di NEFA, diminuiscono la secrezione di insulina. I NEFA, rilasciati dalle riserve lipidiche, possono essere utilizzati per la produzione di latte e come fonte alternativa di energia. I livelli plasmatici di NEFA costituiscono quindi un indice di lipomobilizzazione ed il loro incremento sistemico suggestivo di deficit energetico<sup>33,34</sup>. Leroy et al<sup>35</sup> hanno osservato elevate concentrazioni intrafollicolari di NEFA in bovine in fase di BEN, con effetti tossici nei confronti dell'oocita, suggerendone pertanto un ruolo nell'ipofertilità post partum. I NEFA possiedono inoltre effetti citotossici su numerosi tipi cellulari, comprese le cellule della granulosa e della teca bovine<sup>31</sup>. L'esposizione a prolungati ed elevati livelli di NEFA durante la fase di BEN potrebbe quindi alterare i normali meccanismi di crescita e sviluppo sia del follicolo che dell'oocita, interferendo con le complesse interazioni endocrine e promuovendo la formazione delle cisti. Infatti, secondo Zulu et al<sup>11</sup> e Huszenicza et al<sup>36</sup>, le bovine che sviluppano cisti ovariche

avrebbero, nel corso delle prime settimane post partum, concentrazioni sieriche di NEFA più elevate rispetto a bovine con normale ovulazione. Durante il BEN, agli elevati livelli di NEFA, si associano concentrazioni sieriche alte di BOHB e basse di glucosio<sup>37,38</sup>. I corpi chetonici rappresentano una tappa del metabolismo intermedio nei ruminanti in grado di divenire un'importante forma di energia per i tessuti periferici in corso di BEN, quando la disponibilità di glucosio è limitata<sup>39</sup>. E' stato dimostrato che le modificazioni dei livelli sierici di glucosio e BOHB si riflettono sulle loro stesse concentrazioni a livello intrafollicolare del follicolo dominante<sup>40</sup>; di conseguenza, in corso di chetosi clinica o subclinica, l'oocita sarebbe esposto a livelli alti di BOHB e bassi di glucosio. Leroy et al<sup>41</sup> hanno osservato che il processo maturativo in vitro degli oociti risentirebbe maggiormente delle basse concentrazioni di glucosio piuttosto che degli elevati livelli di BOHB, che svolgerebbero solo un ruolo aggravante, suggerendo quindi un'ipotetica influenza negativa della chetosi sia clinica che subclinica sulla competenza dell'oocita. Elevate concentrazioni sieriche di chetoni sono state associate ad aumentato rischio di ritardata ripresa della ciclicità ovarica post partum<sup>36,42,43</sup> e di sviluppo di cisti ovariche<sup>44,45</sup>. I chetoni sembrano rappresentare un buon indicatore del grado di BEN, ma, non esercitando effetti negativi sui follicoli bovini, non costituiscono un altrettanto buon indicatore dell'effetto del BEN a livello ovarico. La leptina, ormone prodotto dagli adipociti che agisce sull'ipotalamo, come organo bersaglio principale, e che regola i processi strettamente dipendenti dalle disponibilità energetiche, è riconosciuto come l'end-point di mediazione tra lo stato metabolico e la riproduzione<sup>46</sup>. I livelli plasmatici di leptina si riducono rapidamente durante i periodi di nutrizione inadeguata<sup>47</sup> suggerendo un suo coinvolgimento nella regolazione neuroendocrina della ripartizione energetica. Nonostante manchi una chiara dimostrazione di una relazione tra prima ovulazione post partum e livelli ematici di leptina<sup>48,49</sup>, un tasso minimo "permissivo" di leptina sembra necessario per l'induzione del primo picco preovulatorio di LH dopo il parto<sup>49,50</sup>. Questo aspetto sottintenderebbe quindi un ruolo anche della leptina nella patogenesi delle cisti ovariche<sup>18</sup>. In conclusione, dai dati ottenuti dagli studi più recenti, appare evidente l'inevitabile relazione tra stato metabolico e riproduzione nelle bovine da latte. La sempre più marcata spinta produttiva rende indispensabile la comprensione delle precise interazioni tra fattori metabolici e molteplici aspetti riproduttivi al fine di poter prevenire/evitare le disfunzioni riproduttive post partum, causa di improduttività economica.

**BIBLIOGRAFIA** — 1. Pryce J.E., Royal M.D., Garnsorthy P.C., Mao I.L. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Prod Sci* 86: 125-135 (2004). 2. Lucy M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 84: 1277-1293 (2001). 3. Boland M.P., Lonergan P., O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 1(55): 1323-1340 (2001). 4. Overton T.R., Waldron M.R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J Dairy Sci* 87: E105-E119 (2004). 5. Roche J.F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproduction efficiency. *Anim Reprod Sci* 96, 282-296 (2006). 6. Beam S.W., Butler W.R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod* 56: 133-142 (1997). 7. Opsomer G., Coryn M., Deluyker H., deKruif A. An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reprod Domest Anim* 33: 193-204 (1998). 8. Lopez H., Satter L.D., Wiltbank M.C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 81: 209-223 (2004). 9. Lucy M.C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction Suppl* 61: 415-427 (2003). 10. Vandehaar M.J., Sharma B.K., Fogwell R.L. Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor-1 in liver and corpus luteum of heifers. *J Dairy Sci* 78: 832-841 (1995). 11. Zulu V.C., Sawamukai Y., Nakada K., Kida K., Moriyoshi M. Relationship among insulin like growth factor-1, blood metabolites and postpartum ovarian functions in dairy cows. *J Vet Med Sci* 64: 879-885 (2002). 12.

Konigsson K., Savoini G., Covoni N., Invernizzi G., Prandi A., Kindahl H., Veronesi M.C. Energy balance, leptin NEFA and IGF-1 plasma concentrations and resumption of postpartum ovarian activity in swedish red and white bred cows. *Acta Vet Scand* doi: 10.1186/1751-0147-50-3 (2008). **13.** Jorritsma R., Wensing T, Kruip T.A.M., Vos P.L.A.M., Noordhuizen P.T.M. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet Res* 34: 11-26 (2003). **14.** Garverick H.A. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 80: 995-1004 (1997). **15.** Peter A. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Domest Anim* 39: 1-7 (2004). **16.** Silvia W.J., McGinnis A.S., Hatler T.B. A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. *Reprod Biol* 5: 19-29 (2005). **17.** Heuer C., Schukken Y.H., Dobbelaar P. Postpartum body condition score and results from the first test day milk yield as predictors of disease fertility yield and culling in commercial dairy herds. *J Dairy Sci* 82: 295-304 (1999). **18.** Vanholder T., Opsomer G., deKruif A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Develop* 46: 105-119 (2006). **19.** Hamilton S.A., Garverich H.A., Keisler D.H., Xu Z.Z., Loos K., Young Quist R.S., Salfen B.E. Characterisation of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod* 53: 890-898 (1995). **20.** Davoren J.B., Kasson B.G., Li C.H., Hsueh A.J.W. Specific insulin-like growth factor (IGF) I- and II-binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology* 119: 2155-2162 (1986). **21.** Spicer L.J., Echternkamp S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Dom Anim Endocrinol* 12: 223-245 (1995). **22.** Ortega H.H., Palomar M.M., Acosta J.C., Salvetti N.R., Dallard B.E., Lorente J.A., Barbeito C.G., Gimeno E.J. Insulin-like growth factor I in sera, ovarian follicles and follicular fluid of cows with spontaneous or induced cystic ovarian disease. *Res Vet Sci* 84: 419-427 (2008). **23.** Armstrong D.G., Gutierrez C.G., Baxter G., Glazyrin A.L., Mann G.E., Woad K.J., Hogg C.O., Webb R. Expression of mRNA encoding IGF-1, IGF-2 and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 165: 101-113 (2000). **24.** Erickson G.F., Garzo V.G., Magoffin D.A. Insulin-like growth factor-1 regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 716-724 (1989). **25.** Adashi E.Y., Resnick C.E., D'Ercole A.J., Svoboda M.E., Van Wik J.J. (1985). Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocrine Reviews* 6: 400-420 (1985). **26.** Giudice L. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development *Endocrine Reviews* 13: 641-669 (1992). **27.** Grummer R.R., Mashek D.G., Hayiril A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin Food Anim* 20: 447-470 (2004). **28.** Thatcher W.W., de la Sota R.L., Schmitt E.J., Diaz T.C., Badinga L., Simmen F.A., Staples C.R., Drost M. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. *Reprod Fert Dev* 8: 203-217 (1996). **29.** Armstrong D.G., Gong J.G., Gardner J.O., Baxter G., Hogg C.O., Webb R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of the short-term changes in dietary intake. *Reproduction* 123: 371-378 (2002). **30.** Price C.A., Silva J.M. Intracellular regulation of P450 aromatase by FSH and insulin in bovine granulosa cells. *J Reprod Fert* 23: 5 (1999). **31.** Vanholder T., Leroy J.L.M.R., Van Soom A., Maes D., Coryn M., Fiers T., deKruif A., Opsomer G. Effect of non-esterified fatty acids on bovine theca cells steroidogenesis and proliferation in vitro. *Anim Reprod Sci* (2005). **32.** Mason T.M., Goh T., Tchishopvili V., Sandhu H., Gupta N., Lewis G.F., Giacca A. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo rats. *Diabetes* 48: 524-530 (1999). **33.** Drackley J.K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J Dairy Sci*: 82: 2259-2273 (1999). **34.** Drackley J.K., Overton T.R., Douglas G.N. Adaptations of glucose and long chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period *J Dairy Sci Suppl* 84: E100 (2001). **35.** Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., deKruif A., Genicot G., Van Soom A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130: 485-495 (2005). **36.** Huszenicza G., Haraszti J., Molnar L., Solti L., Fekete S., Ekes K., Yaro A.C. Some metabolic characteristics of dairy cows with different post partum ovarian function. *J Vet Med A* 35: 506-515 (1988). **37.** Chilliard Y., Bocquier F., Doreau M. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev* 38(2): 131-52 (1998). **38.** Herdt T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 16(2): 215-230 (2000). **39.** Duffield T. Subclinical ketosis in lactating dairy

cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 16(2): 231-253 (2000). **40.** Leroy J.L.M.R., Vanholder T., Delanghe J.R., Opsomer G, Van Soom A., Bols P.E.J., De Wulf J., de Kruif A. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology* 62: 1131-1143 (2004). **41.** Leroy J.L., Vanholder T., Opsomer G., Van Soom A., de Kruif A. The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and beta-hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 41(2):119-23 (2006). **42.** Opsomer G., Grohn Y.T., Hertl J., Coryn M., Deluyker H., deKruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 53: 841-857 (2000). **43.** Reist M., Koller A., Busato A., Kupfer U., Blum J.W. First ovulation and ketone body status in the early postpartum period of dairy cows. *Theriogenology* 54: 685-701 (2000). **44.** Andersson L, Gustafsson A.H., Emanuelson U. Effects of hyperketonemia and feeding in dairy cows. *Theriogenology* 36: 521-535 (1991). **45.** Dohoo I.R., Martin S.W. Subclinical Ketosis: prevalence and association with production and disease. *Can J Comp Med* 48: 1-5 (1984). **46.** Barash I.A., Cheung C.C., Weigle D.S., Ren H., Kabigting E.B., Kuijper J.L., Clifton D.K., Steiner R.A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137: 3144-3147 (1996). **47.** Delavaud C., Ferlay A., Faulconnier Y., Bocquier F., Kann G., Chilliard Y. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J Anim Sci* 80(5):1317-28 (2002). **48.** Kadokawa H., Blache D., Yamada Y., Martin G.B. Relationships between changes in plasma concentrations of leptin before and after parturition and the timing of first postpartum ovulation in high-producing Holstein dairy cows. *Reprod Fertil Dev* 12: 405-411 (2000). **49.** Liefers S.C., Veerkamp R.F., Te Pas M.F.W., Delavaud C., Chilliard Y., Van der Lende T. Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield intake live weight, and estrus in dairy cows. *J Dairy Sci* 86: 799-807 (2003). **50.** Huszenica G., Kulcsar M., Nikolic J.A., Schmidt J., Korodi P., Katai L., Dieleman S., Ribiczei-Szabo P., Rudas P. Plasma leptin concentration and its interrelation with some blood metabolites, metabolic hormones and the resumption of cyclic ovarian function in post partum dairy cows supplemented with monensin or inert fat in feed. In: Diskin M.J. Ed Fertility in the high-producing dairy cow. *British Society of Animal Sciences*, Edinburgh, UK, 2: 405-409 (2001).

## GLI INTERFERENTI ENDOCRINI

**Raffaele Luigi Sciorsci**, *Dipartimento di Produzione Animale, Università degli Studi di Bari*

**SUMMARY** - The growing industrialization and mechanization characterizing the last 50 years led to the release of an amount of toxic compounds in the environment, the Endocrine Disrupters. These substances pollute the environment since they are persistent and ubiquitous and may have a long half life. Their effects vary from disruption of reproductive function, to carcinogenesis. Polluted pastures expose farm animals to high concentrations of endocrine disrupting chemicals which accumulate in the fat and are slowly released in blood; this means they can reach the embryo and the neonate, irreversibly affecting its organogenesis. Endocrine disrupters tend to accumulate in meat and milk, giving rise to bio-concentration, thus amplifying their effect in humans, consuming animal products. Besides monitoring programs and researches, information is of paramount importance, in order to limit the overwhelming diffusion of the endocrine disrupting threat.

**RELAZIONE** - Il crescente tasso di industrializzazione e, più in generale, di meccanizzazione che ha caratterizzato gli ultimi 50 anni ha comportato, come inevitabile contropartita, il rilascio nell'ambiente di un'ampia varietà di composti chimici, prodotti dell'industria agricola, manifatturiera, sanitaria, cosmetica, nonché sottoprodotti di innumerevoli processi di lavorazione dei materiali, tutti rientranti nella vastissima categoria dei cosiddetti Interferenti Endocrini <sup>1</sup>.

L'Agenzia per la Protezione Ambientale degli Stati Uniti ha definito nel 1997 il termine di Interferente Endocrino, descrivendolo come "un agente esogeno in grado di interferire con la sintesi, la secrezione, il trasporto, il legame, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali responsabili del mantenimento dell'omeostasi, della riproduzione, dello sviluppo e/o del comportamento" <sup>2</sup>. Gli Interferenti Endocrini appartengono ad una ampia e complessa classe di sostanze con differenti strutture chimiche, differenti caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche, e, di conseguenza, differenti effetti biologici. La capacità di esercitare un effetto biologico è imprescindibilmente legata ad una serie di proprietà intrinseche della molecola, quali l'ubiquitarietà, la persistenza ambientale, l'idrofobia e la lipofilia, la biodisponibilità, la tendenza alla bioconcentrazione, nonché a fattori indipendenti dalle sue caratteristiche strutturali e funzionali, quali l'esposizione contemporanea a più interferenti endocrini e la fase fisiologica di sviluppo dell'organismo esposto e gli effetti transgenerazionali <sup>3</sup>.

La persistenza ambientale è legata all'emivita del composto, che varia da pochi giorni a molti anni, in base al tipo di interferente endocrino preso in considerazione. Chiaramente, più breve è l'emivita di un composto, minore è la capacità dello stesso di generare fenomeni di bioconcentrazione, evento caratterizzato da una progressiva concentrazione della sostanza man mano che si procede verso i vertici della catena alimentare, con conseguente amplificazione dei danni a carico dell'uomo.

L'idrofobia comporta una estesa e tenace diffusione degli interferenti endocrini sul suolo e, di conseguenza, favorisce la loro ingestione da parte degli animali domestici.

La lipofilia di alcuni interferenti endocrini, fa sì che essi diffondano e si accumulino nei grassi di deposito nei soggetti che li assumono, il che espone il feto e/o il neonato ad una maggiore concentrazione di tali sostanze durante la gravidanza e la lattazione, momenti fisiologici caratterizzati da un ingente bisogno energetico da parte della madre e, quindi, da un'abnorme mobilizzazione dei suoi grassi di deposito <sup>4,3</sup>.

Generalmente, gli interferenti endocrini sono dotati di un'elevata biodisponibilità, essendo caratterizzati da una scarsa affinità di legame per le proteine plasmatiche, molto



inferiore a quella degli steroidi sessuali (circa 95%), proprietà che compensa la loro blanda affinità per i recettori steroidei. Per altro, la scarsa attitudine del fegato a sintetizzare proteine plasmatiche nel feto e nel neonato, fa sì che in questi stadi della vita evolutiva vi sia una maggiore esposizione agli interferenti endocrini <sup>5,3</sup>.

La diffusa compresenza di più tipi di “endocrine disruptors” nello stesso ambiente, induce la contemporanea assunzione di svariate sostanze chimiche il che dà frequentemente adito ad un effetto additivo, se non ad un sinergismo di potenziamento, tra di esse.

Da quanto esposto, risulta evidente che l’embrione ed il feto rappresentano gli stadi evolutivi più suscettibili alle interferenze ormonali, data l’incompleta organogenesi, o l’incapacità, da parte dell’organo neoformato, di difendersi (tramite attivazione di sistemi enzimatici adeguati o per mezzo della sintesi di un efficiente pool di proteine plasmatiche), dall’azione dei contaminanti endocrini. L’irreversibilità delle alterazioni esercitate durante l’organogenesi, inoltre, fa sì che gli effetti indotti da tali sostanze, siano in grado di trasmettersi di generazione in generazione (*effetto transgenerazionale*), permanendo per un lasso di tempo superiore alla durata della loro emivita plasmatica <sup>6</sup>.

Uno dei criteri classificativi degli interferenti endocrini è incentrato sulla distinzione tra **sostanze chimiche**, ovvero pesticidi, erbicidi, fungicidi, prodotti antiruggine, detersivi, cosmetici, contraccettivi, anabolizzanti e **sostanze naturali**, tra cui i fitoestrogeni, i micoestrogeni, alcuni metalli pesanti come cadmio, piombo, mercurio <sup>7</sup>.

Un altro criterio classificativo, invece, si basa sul differente meccanismo d’azione ed, in tal senso, distinguiamo sostanze che agiscono da **agonisti degli steroidi sessuali**, altre che agiscono da **antagonisti**, altre che **interferiscono con la sintesi e con il metabolismo degli ormoni endogeni** ed, infine, altre ancora che **modificano la stereoisomeria dei rispettivi recettori** <sup>2</sup>. Tra gli agonisti degli steroidi sessuali, ed in particolare degli Estrogeni, notevole importanza rivestono gli **Xenoestrogeni**, di cui ad oggi si riconoscono circa 60 composti tossici (bisfenolo A, diossina, policloro- e policromo-bifenili, insetticidi quali il DDT, ecc.), in grado di determinare alterazioni comportamentali e del tratto riproduttivo sia maschile che femminile. Studi sperimentali condotti sui ratti hanno dimostrato che l’esposizione in vita fetale ad elevate concentrazioni di **bisfenolo A** determina una pubertà precoce, presenza di follicoli poliovulatori, una riduzione del peso dell’utero, una tendenza verso la trasformazione neoplastica dell’organo, nonché alterazioni proliferative e cancerose a carico del parenchima mammario nelle femmine e ad anomalie di sviluppo, quali ipertrofia prostatica, ipoplasia dell’epididimo, riduzione della conta spermatica, a carico del tratto riproduttore maschile. L’uomo è la specie target del bisfenolo A, a causa della estrema diffusione di tale sostanza in cibo e bevande in lattina, materiale dentario <sup>2</sup>.

I **policlorobifenili (PCB)** tra cui l’Aroclor, il Chlophen, il Fenoclor, sono degli idrocarburi aromatici particolarmente presenti in fluidi dielettrici per condensatori e trasformatori, acque di scarico di origine industriale agricola e domestica, spesso diffusi come fertilizzanti, sono facilmente assunti col pascolo dagli animali domestici. Tali sostanze, caratterizzate da basso peso molecolare ed alta lipofilia, si accumulano negli animali e nell’uomo e la loro presenza non è stata rinvenuta solo a carico del tessuto adiposo, ma, come Trapp dimostrò già ne 1984 <sup>8</sup>, anche nei fluidi del tratto genitale femminile, nel liquido follicolare, nel parenchima ovarico, negli embrioni e nei feti umani.

I PCB impattano negativamente sul potenziale riproduttivo, inducendo una riduzione delle cellule germinali, una diminuzione del peso degli organi riproduttivi, una riduzione dei siti d’impianto, embriotossicità, alterazione del ciclo mestruale (uomo e primati), aumento d’incidenza dei fenomeni abortivi e di riassorbimento embrionale <sup>6,1</sup>.

Di grande attualità, per i risvolti negativi sulla salute pubblica e sulla già compromessa economia nazionale, sono le **diossine**, composti variamente clorurati, di cui il più noto è la tetraclorodibenzo-p-diossina (**TCDD**). Tali sostanze a forte potenziale carcinogeno, derivano da processi di combustione di materiale plastico e gommoso, contaminano terreni con le piogge, vengono assunte dagli animali domestici al pascolo, e, per l'elevata lipofilia e per l'emivita di 7-8 anni, si accumulano nel grasso e nel latte, esponendo gli animali domestici e, per via del consumo dei prodotti lattiero-caseari, soprattutto l'uomo (vertice della catena alimentare), ad alterazioni del tratto riproduttivo maschile e femminile<sup>9</sup>.

Tali effetti sono legati ad un'azione antiandrogena mediata dall'Arylhydrocarbon Receptor (AhR), esitante in una forte riduzione della risposta alle gonadotropine e della steroidogenesi. Un'esposizione in utero alla TCDD porta a ipotrofia ovarica, ridotta fecondità, una mascolinizzazione del tratto riproduttore femminile, alterazioni di sviluppo della ghiandola mammaria, tendenza all'endometriosi, e, nell'uomo, ritardo della pubertà, calo delle concentrazioni plasmatiche di testosterone, della spermatogenesi, ipotrofia e cancro testicolare, nonché tendenza al cancro polmonare, al fegato, mielomi multipli, sarcomi<sup>7</sup>.

Anche gli **ftalati**, usati ampiamente come plastificanti, nella cosmesi (smalto per unghie, latte per il corpo, deodoranti, shampoo), in imballaggi per alimenti, esercitano prevalente effetti antiandrogeni, anche se il meccanismo d'azione è ad oggi poco chiaro. Un'esposizione in vita fetale e/o durante l'allattamento a tali sostanze favorisce l'insorgenza di patologie quali riduzione della distanza ano-genitale, criptorchidismo, ridotta spermatogenesi, ipotrofia prostatica<sup>7</sup>.

Tra le sostanze naturali ad attività estrogenica, sono da annoverare i **micoestrogeni**, tra cui lo **zearalenone**, associato a sindromi estrogenizzanti in pollame e bovini alimentati con cereali ammuffiti<sup>10</sup> derivati degni di nota, per il recente ampio impiego della soia nelle formulazioni mangimistiche degli animali da reddito, nonché nelle diete vegetariane destinate al consumo umano, sono gli isoflavoni ed, in particolare, la **genisteina**. Tali fitoestrogeni hanno spiccata affinità per i recettori degli estrogeni ER  $\beta$  e per le Sex Hormone Binding Proteins (SHBG), caratteristiche che inducono, da parte di tali sostanze, un forte condizionamento dell'attività riproduttiva negli animali da reddito, quali cicli estrali irregolari, calo della fertilità ed alterazioni isto-funzionali a carico dell'apparato riproduttore<sup>11</sup>.

Studi sperimentali volti a valutare gli effetti della esposizione di topi neonati ad elevate concentrazioni di genisteina, hanno mostrato un incremento di follicoli poliovulatori ed un'up-regulation di recettori ER $\alpha$  a livello ovarico<sup>12</sup>.

I composti succitati rappresentano solo alcuni degli innumerevoli interferenti endocrini che oramai contaminano persistentemente l'ambiente, compromettendo la fisiologia funzionale riproduttiva degli animali domestici e selvatici. Ciò ha un duplice risvolto, poiché costituisce da un lato una seria minaccia per la biodiversità e dall'altro determina, per la peculiarità della maggior parte degli interferenti endocrini di persistere nelle acque, nel suolo, nell'atmosfera, fenomeni di bioaccumulo e bioconcentrazione nei differenti substrati biologici facenti parte della catena alimentare. Ciò si ripercuote pesantemente sulla salute dell'uomo, contemporaneamente causa e bersaglio dell'inquinamento da interferenti endocrini, fautore e vittima di un'implacabile amplificazione dei danni addotti da una contaminazione esponenziale, tendente a sfuggire di mano. A latere dei già imponenti programmi di monitoraggio e prevenzione, l'unica speranza risiede nell'adozione di un piano informativo ubiquitario e trans generazionale, al pari di quanto, ubiquitaria e trans generazionale sia, come già osservato, la diffusione degli endocrine disruptors<sup>10</sup>.

**BIBLIOGRAFIA** - **1.** Gandolfi, F., Pocar, P., Brevini, T.A.L., Fischer, B. Impact of endocrine disrupters on ovarian function and embryonic development. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 189-201 (2002). **2.** Markey, C.M., Rubin, B.S., Soto, A.M., Sonnenschein, C. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental development biology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 235-244 (2003). **3.** Rhind, S.M. Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, actions and routes of exposure. *Domes. Anim. Endocrinol.* 23, 179-187 (2002). **4.** Guillette, L.J., Arnold, S.F., McLachlan, J.A. Ecoestrogens and embryos-is there a scientific basis for concern? *Anim. Reprod. Sci.* 42, 13-24 (1996). **5.** Zacharewski, T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays. *Environ. Health Perspect.* 106, 577-582 (1998). **6.** Safe, S.H. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.*, 24, 87-149 (1994). **7.** Florin, A., Mauduit, C., Benhamed, M. Perturbateurs endocriniens et pathologies de la reproduction. In : *Medicine et biologie de la reproduction*, 2<sup>e</sup> edition, Masson, Paris, pp.357-373 (2004). **8.** Trapp, M., Baukloh, V., Bohnet, H.G., Heeschen, W. Pollutants in human follicular fluid. *Fertil. Steril.*, 42, 146-148 (1984). **9.** Kogevinas, M. Human health effects of dioxins: cancer, reproductive and endocrine system effects. *Hum. Reprod. Update*, 7(3), 331-339 (2001). **10.** Vidaeff, A.C., Sever, L.E. In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence. *Reprod. Toxicol.* 20, 5-20 (2005). **11.** Burton, J.L., Wells, M. The effect of phytoestrogens on the female genital tract. *J. Clin. Pathol.* 55, 401-407, (2002). **12.** Jefferson, W.N. et al. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) $\alpha$  expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ER $\beta$ -mediated and nonestrogenic actions. *Biol. Reprod.* 67, 1285-1296 (2002).

## **DIARREA NEONATALE NEL VITELLO - DIAGNOSI, TERAPIA E PROFILASSI**

**Nicola Morandi, DVM**

Ospedale Veterinario Grandi Animali, Clinica dei Ruminanti e del Suino, Via dell'Università, 6 26900 Lodi

**RIASSUNTO** - La diarrea neonatale del vitello è una patologia a carattere multifattoriale, che si manifesta quando si altera l'equilibrio tra diversi fattori, ovvero fattori difensivi dell'animale (assunzione del colostro), enteropatogeni (*E.coli*, virus, protozoi) e fattori ambientali (igiene dell'allevamento e dell'abbeverata, management). La diarrea si manifesta come disturbo dell'equilibrio tra secrezione e assorbimento nel tratto intestinale, con conseguente perdita di liquidi ed elettroliti che genera uno stato di acidosi metabolica.

Occorre quindi valutare clinicamente la perdita di fluidi e elettroliti, nonché l'ipoglicemia e procedere ad un'adeguata terapia per via orale o parenterale, affiancata alla normale somministrazione del latte. Il tradizionale trattamento della diarrea con la sospensione del latte e la somministrazione di bevande dietetiche può causare un'ipoglicemia mortale.

A livello profilattico è fondamentale l'assunzione di colostro di qualità nelle prime 4 ore di vita del vitello (minimo 2 L); a questo si può affiancare la vaccinazione delle madri, eventualmente con ceppi stabulogeni, e un'adeguata gestione dell'allevamento.

**INTRODUZIONE** - La diarrea neonatale è una malattia acuta del vitello che si manifesta durante le prime 2-3 settimane di vita, provocata da un'infezione locale da parte di diversi germi patogeni intestinali. In particolare sono coinvolti alcuni ceppi patogeni di *Escherichia Coli*, rota- e coronavirus così come criptosporidi, spesso sotto forma di infezioni miste. I fattori predisponenti sono insufficiente assunzione di colostro, condizioni inadeguate di management che favoriscono le infezioni o anche fattori che diminuiscono la resistenza. La diarrea neonatale è la malattia dei vitelli più frequente e che provoca più perdite in tutto il mondo. La frequenza e la gravità della diarrea neonatale variano notevolmente da allevamento ad allevamento. Oltre ai decessi, le perdite economiche dipendono soprattutto dai costi necessari per il trattamento e per la profilassi della malattia.

**EZIOLOGIA** - Le cause principali di questa malattia sono le infezioni dovute ad un singolo agente patogeno, anche se spesso si hanno infezioni miste. Questi microrganismi sono molto diffusi ma di solito la malattia si manifesta con gravi perdite solo quando le condizioni di management sono insufficienti, oppure se le capacità immunitarie specifiche e aspecifiche vengono ridotte. D'importanza fondamentale sono le infezioni provocate dai seguenti patogeni:

- *Rotavirus bovino*: Virus privo di envelope con doppio filamento di Rna, di solito specie-specifico. Sono annoverati tra gli agenti virali più frequenti nelle diarree dei vitelli (superano di solito il 40% dei casi).

I Rotavirus sono diffusissimi nella popolazione bovina (sieroprevalenza fra il 97% ed il 100%). Posseggono una grande stabilità fisico-chimica e quindi possono sopravvivere nell'ambiente almeno 6 mesi nella forma infettante. L'insorgenza della malattia viene favorita dalla grande contagiosità della dose minima infettante necessaria, dal cortissimo tempo di incubazione (da 13 ore fino a 12 giorni) e dalla cospicua eliminazione degli agenti stessi attraverso le feci diarroiche. Di regola però vengono colpiti gli animali di età compresa fra i 5 ed i 14 giorni.

- *Coronavirus bovino*: Virus con envelope con singolo filamento di RNA. Viene considerato specie-specifico ed è diffuso in tutto il mondo. Questo agente viene anche collegato con malattie respiratorie e con la dissenteria invernale. Il Coronavirus è presente nel 3-20% dei vitelli con diarrea; in base però all'eliminazione del virus, che dura solo tre giorni, e alla conseguente eliminazione intermittente, bisogna aspettarsi dei falsi negativi.

- *Escherichia coli*: batterio Gram negativo, appartenente alla flora fisiologica della porzione distale dell'intestino tenue e dell'intestino crasso, era considerato fino agli anni sessanta la causa principale della diarrea dei vitelli (dissenteria da coli). In base alla sintomatologia clinica, ai fattori di adesione (responsabili del legame con l'enterocita) e alle tossine prodotte, vengono distinti nei seguenti gruppi:

- *E. coli enterotossici (ETEC)*: nelle prime settimane di vita dei vitelli è la causa batterica più importante di diarrea, con una prevalenza fra il 3% e il 54% (in media circa il 19%), soprattutto nell'ambito delle infezioni miste. Di importanza epidemiologica sono soprattutto quei ceppi che formano enterotossine stabili al calore (ST). Queste tossine causano una malattia simile al colera. Vitelli con un'età superiore alla settimana, possono espellere questi agenti senza mostrare segni clinici di diarrea. Questa resistenza relazionata all'età viene attribuita a una riduzione dei recettori intestinali per le fimbrie specifiche.

- *Escherichia coli produttori di tossina Shiga (STEC)*: a differenza degli ETEC specie-specifici, gli STEC bovini possono essere potenziali agenti di zoonosi. Gli *E. coli* con fattori tipici di STEC sono molto diffusi nei bovini.

- *Altri E. coli enteropatogeni*: gli *E. coli enteropatogeni* (EPEC), conosciuti in medicina umana (diarrea dei neonati) e in diverse specie animali (per es. i conigli), come una causa importante della diarrea, sembra che appaiano raramente nei vitelli e perciò non abbiano nessuna importanza come causa della diarrea neonatale. Lo stesso si può dire per gli *E. coli enteroinvasivi* e gli *E. coli (DAEC) adesivi*.

- *Funghi patogeni facoltativi*: i vitelli neonati si possono infettare tramite il colostro oppure tramite l'ambiente con le ife di funghi. Importante è la *Candida globata*. La comparsa di micosi gastrointestinali viene favorita da cambiamenti fisiologici della flora intestinale, dovuti ad una terapia antibiotica oppure ad una riduzione dell'immunità.

- *Criptosporidi*: protozoi, della sottoclasse dei coccidi, sono molto diffusi in tutto il mondo sia fra gli animali sia fra gli uomini. *Criptosporidium parvum* viene considerato fra gli agenti più frequenti della diarrea neonatale dei vitelli (prevalenza fino a oltre il 60%). La diarrea viene osservata, di solito, al più presto a partire dal quarto giorno di vita: vengono soprattutto colpiti i vitelli di 1-2 settimane di età, raramente quelli di età superiore alle 4 settimane. L'infezione avviene tramite le feci che contengono oocisti, quindi tramite stalle, oggetti o foraggi contaminati.

- *Giardia*: protozoi della classe Giardia, si tratta di parassiti diffusi in tutto il mondo nell'intestino tenue dell'uomo e di diverse specie animali. Anche nei bovini è stata accertata la presenza della specie *Giardia intestinalis* (sin *G. duodenalis*) nel 3-45% dei vitelli di età superiore alle 2 settimane. A quanto pare la maggior parte delle infezioni da Giardia nei vitelli ha un decorso asintomatico; talvolta possono però anche portare (specialmente in vitelli immunodepressi), a diarrea di grado leggero, talvolta intermittente.

**PATOGENESI** - Alla base dei processi patogenetici della malattia vi sono le perdite di liquido enterale e di elettroliti. La diarrea da *E. coli enterotossici* è causata quasi esclusivamente da processi secretori (*diarrea secretoria*). La conseguenza è un'aumentata secrezione di cloro, alla quale segue, per l'elettroneutralità, il sodio. In seguito al gradiente osmotico che si crea, viene richiamata acqua nel lume intestinale e, attraverso lo scambio bicarbonato-cloruro, anche bicarbonato.

A differenza della diarrea secretoria causata da *E. coli* enterotossici, la diarrea causata dagli altri agenti sopra citati, si basa anche sull'effetto osmotico delle componenti nutritive male assorbite (*diarrea osmotica*). L'infezione da diversi *agenti virali* e *Criptosporidium*, porta così alla distruzione degli enterociti e alla sostituzione delle alte cellule prismatiche con cellule delle cripte non mature che proliferano e portano ad una fusione dei villi e alla perdita dei microvilli. Nelle *infezioni da rotavirus*, le alterazioni si estendono in primo luogo alla metà superiore dei villi, a livello di digiuno, in parte anche nell'ileo. Al contrario, i *Coronavirus* colpiscono, oltre alle cellule epiteliali della parte media e distale dell'intestino tenue, tutte le regioni dell'intestino crasso; le alterazioni si possono rilevare non solo nell'epitelio dei villi e negli epitelii di superficie, bensì anche a livello delle cripte. Anche i *criptosporidi* causano delle marcate alterazioni della mucosa, soprattutto nella parte distale dell'intestino tenue, in parte anche nel cieco e nel colon. A causa di tali alterazioni avviene l'atrofia e la fusione dei villi ed il mutamento degli epitelii di superficie (cellule basse cilindriche oppure cuboidali, perdita di enterociti); con ciò vengono pregiudicate le funzioni digestive e di assorbimento.

I risultati di nuovi esperimenti dimostrano però che, per lo meno nella prima fase della diarrea neonatale, le perdite di liquidi e di elettroliti che si manifestano, vengono causate principalmente da processi secretori; anche quindi nel corso di un'infezione da rota- e coronavirus oppure nel corso di una grave infestazione da criptosporidi.

**SINTOMI E DECORSO** - Gli aspetti clinici della diarrea neonatale dipendono dal diverso grado di virulenza, dalla contemporanea presenza di più agenti eziologici, come pure dall'età e dallo stato immunitario dei vitelli colpiti.

Già all'inizio della malattia i pazienti appaiono deboli, la voglia di bere può essere già ridotta, tuttavia è raro che rifiutino completamente l'assunzione del latte. La sintomatologia principale deriva tuttavia dalle conseguenze della perdita di liquidi ed elettroliti dipendenti dalla diarrea: in seguito a disidratazione isotonica oppure leggermente ipotonica, il turgore della cute viene ridotto (a partire da un deficit di liquido corrispondente al 6% del p.v.), ne segue un infossamento dei bulbi (a partire da un deficit >8% del p.v.) e infine decubito permanente con estremità fredde e mucose pallide o cianotiche a causa dello shock ipovolemico (deficit >12% del p.v.). Un importante segno di acidosi è la respirazione frequente e profonda senza che sussista una malattia polmonare. La causa dell'alterato equilibrio acido-basico è la perdita enterale di bicarbonati (acidosi da sottrazione); con un'avanzata disidratazione (→ insufficienza circolatoria, diminuzione della filtrazione glomerulare, azotemia prerenale) appare inoltre un'acidosi da addizione conseguente alla diminuita eliminazione renale degli acidi e ad un'aumentata produzione di acidi organici (soprattutto acido lattico) provenienti dalla glicolisi anaerobica.

Informazioni diagnostiche circa il grado di disidratazione, risultano chiaramente dagli esami di laboratorio che mostrano un aumento dell'ematocrito, della concentrazione sierica dell'urea e della creatinina, come pure una densità delle urine >1012. Quest'ultima è un criterio particolarmente sensibile, dato che l'organismo, quando si presenta una diminuzione della volemia, tenta subito, concentrando l'urina, di risparmiare liquidi. La diarrea si arresta entro 3-5 giorni.

**DIAGNOSI** - La diarrea neonatale si può facilmente riconoscere sulla base della visita clinica; questi risultati non permettono tuttavia delle conclusioni sicure circa gli agenti eziologici implicati. Il tentativo di chiarimento delle cause ha senso solo quando riguarda casi di diarrea che compaiono in massa nell'allevamento. Per gli esami relativi agli *agenti virali* sono adatte la microscopia elettronica, tecniche immunologiche

(ELISA, IFT) come pure l'evidenziazione di frammenti virali di genoma tramite PCR oppure altre sonde di geni.

Per i ceppi di *E. coli enterotossici* può essere utilizzata sia la tecnica ELISA, che PCR. Il metodo standard per la *diagnostica dei criptosporidi* è la *dimostrazione* microscopica delle oocisti nelle feci, sia con un preparato a fresco, sia dopo avere colorato i campioni con rosso fenolo.

Relativamente alla diagnosi differenziale, va posta principalmente con la *Salmonellosi* che si manifesta come malattia a carattere generale, con *febbre* e *diarrea emorragica*. Ciò vale anche per le infezioni sostenute da *Clostridium perfringens*; al contrario l'agente della Diarrea Virale Bovina/MD è una causa poco probabile di malattia, vista la giovane età dei pazienti .

**PROGNOSI** - Con un'adeguata terapia, la diarrea neonatale non complicata di regola ha una prognosi favorevole con una percentuale di guarigione dell'80-90%. Tuttavia hanno un'influenza sfavorevole sul risultato terapeutico l'ipogammaglobulinemia, la prolungata incapacità a bere e la presenza di patologie concomitanti.

**TRATTAMENTO** - Il provvedimento più urgente da porre in atto è la compensazione delle perdite di liquidi e di elettroliti, causate dalla diarrea. Ciò è attuabile per via orale se i vitelli non hanno perso la capacità di bere volontariamente.

La *terapia reidratante orale* si basa sulla certezza che anche per le diarree provocate da infezioni, il meccanismo di trasporto del sodio insieme al glucosio nelle cellule epiteliali dell'intestino, di solito non viene pregiudicato. E' stato inoltre dimostrato che queste soluzioni vengono altamente assorbite senza peggiorare la diarrea. Soluzioni con un marcato effetto tampone possono essere ottenute con 4 g NaCl, 3 g KHCO<sub>3</sub>, 2g Na-propionato e 20 g di glucosio in un litro di acqua. Per prevenire la disidratazione, già ai primi segni di diarrea, bisogna somministrare ai vitelli, 3 volte al giorno, 1-2 litri di una tale soluzione oltre alla quantità normale di latte. L'ulteriore somministrazione di latte è necessaria per coprire il fabbisogno di sostanze nutritive e specialmente di energia del vitello. La terapia reidratante orale raggiunge il suo limite quando si tratta di compensare, oltre alle perdite in atto, un già considerevole e preesistente deficit. In tutti i vitelli disidratati o in stato di acidosi, non si può fare a meno di un trattamento adeguato infusionale.

Si ricorrere a *somministrazioni intravenose* di lunga durata. I quantitativi di soluzione necessaria arrivano fino a 10 lt in 24 ore. Il quantitativo di bicarbonato di sodio necessario (in mmoli) per compensare l'acidosi è espresso dalla seguente formula: deficit di basi (mmoli/l) x p.v. (kg) x 0,5. Il fabbisogno necessario di bicarbonato per compensare un deficit di basi già esistente, si muove quindi nel seguente ordine di grandezza: in un'acidosi leggera 14-21 g, acidosi media 35-42 g, acidosi forte 56-63 g di NaHCO<sub>3</sub>. Nella pratica si è affermata con successo la seguente soluzione a goccia continua di 10 litri (con questa si possono compensare la maggior parte degli stati di disidratazione e acidosi): 6 l NaCl 0.9%, 2 l NaHCO<sub>3</sub> 1,4 oppure 2,1%, 2 l di soluzione di glucosio al 10%. Un deficit marcato di potassio si deve temere solo se l'anoressia è persistente (>24 h) oppure se si smette di somministrare latte e si somministra esclusivamente una soluzione orale reidratante priva di potassio. Con un'ipoglicemia conseguente a debolezza del riflesso di suzione, bisogna somministrare una quantità maggiore di glucosio (complessivamente fino a 400 g nelle 24 ore, sotto forma di una soluzione al 10%) ed inoltre sarebbe bene somministrare in aggiunta un preparato di Vitamina E/selenio.

L'uso di *sostanze antimicrobiche* per il trattamento delle diarree neonatali deve essere valutato in senso critico. Un trattamento con antibiotici è giustificabile solo nei casi in cui si possa veramente provare che gli agenti batterici sono l'unica causa della malattia,

oppure se si presenta il pericolo (uno stato generale seriamente compromesso) di infezioni concomitanti, o infine se queste ultime già sussistono.

**PROFILASSI E CONTROLLO** - Controllo e, se necessario, correzione delle condizioni igieniche generali e dell'abbeveratoio (tipo di abbeveratoio, temperatura, tecnica dell'abbeverata, igiene).

La nascita del vitello dovrebbe avvenire in un ambiente il più pulito possibile. Prima di ogni parto bisogna pulire a fondo e disinfettare i box dei vitelli. Se esistono diversi scompartimenti nella stalla per i vitelli, questi ultimi dovrebbero funzionare con il metodo tutto pieno tutto vuoto. Spesso la situazione migliora in modo evidente se i vitelli, subito dopo la nascita, vengono alloggiati fuori dalla stalla in box per vitelli (i cosiddetti "igloo") con abbondante strame asciutto. I box devono essere riparati in estate dalle forti irradiazioni solari e in inverno dal vento e dalle precipitazioni. Per evitare una soppressione dell'immunità, bisogna somministrare ai vitelli sufficienti sostanze nutritive, vitamine e microelementi (soprattutto il ferro e il selenio).

Raccomandazioni circa la *somministrazione di colostro*: 1,5 l di colostro munto possibilmente dai quarti posteriori entro le prime tre ore post partum. Complessivamente 3-4 l di colostro (il primo) entro le prime 6-12 ore di vita. Si può controllare la qualità del primo colostro con un "colostrometro" (misura la correlazione fra immunoglobuline e densità); misurazione tramite densimetro o refrattometro. E' necessario che il contenuto di immunoglobuline nel colostro primario sia per lo meno di 50 g/l. Con i sostituti del colostro e con i preparati di immunoglobuline che si trovano sul mercato vengono immessi chiaramente molti meno anticorpi e cellule immunitarie, che non tramite un buon colostro; perciò l'uso di questi ultimi deve essere limitato ai casi in cui un tale colostro non sia disponibile.

Una doppia *vaccinazione delle madri*, una a 6-8 settimane dal parto, l'altra a 1-3 settimane prima del parto, ottiene un aumento e un prolungamento della secrezione anticorpale (escrezione colostrale di anticorpi specifici). I vaccini adoperati dovrebbero contenere gli agenti della diarrea che si riscontrano più spesso (Rota e Corona virus, *E. Coli* enterotossici).

## BIBLIOGRAFIA

1. Dirksen, G., Gründer, H., Stöber, M.: Medicina interna e chirurgia del bovino. Le Point Veterinarie Italie 561-572 (2004).
2. Chartier, C.: Contrôle de la cryptosporidiose des ruminants. Point Vét. Nr. 213 32-35 (2001).
3. Wendel, H., R. Sobotka & G. Rademacher: Untersuchungen zur klinischen Abschätzung des Azidosegrades bei Kälbern mit Neugeborenendurchfall. Tierärztl. Umschau 56 351-356 (2001)
4. Binding, U., G. Seemann & W. Klee: Untersuchungen zur Art und Korrektur der metabolischen Azidose bei jungen Kälbern mit Durchfall. Prakt. Tierarzt. 81 314 - 317 (2000).
5. Navarre, C.B., E.B. Belknap & S.E. Rowe: Differentiation of gastrointestinal diseases in calves. Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract. 16 37- 57 (2000).
6. Bostedt, H., H. Hermülheim, U. Bleul & B.R. Hecker: Untersuchungen zur Rekonvaleszenzphase bei Kälbern nach neonataler Diarrhoe. Prakt. Tierarzt. 81 301 - 312 (2000).
7. Berchtold, J.: Intravenous fluid therapy of calves. Vet. Clin. North. Am., Food Anim. Pract. 15 505- 531 (1999).



8. De Verdier Klingenberg, K.: Neonatal calf diarrhoea with special reference to rotavirus infections. Significance, epidemiology and aspects of prevention. Vet-med. Diss. (Doctoral thesis), Uppsala (1999).
9. Doll, K.: Orale Rehydratationstherapie bei Durchfallkälbern. *Klauentierpraxis* 7 123-127 (1999).
10. Kasari, T.R.: Metabolic acidosis in calves. *Vet. Clin. North. Am., Food Anim. Pract.* 15 473- 486 (1999).
11. O'Handley, R.M., C. Cockwill, T.A. McAllister, M. Jelinski, D.W. Morck & M.E. Olson: Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214 391-396 (1999).
12. China, B., V. Pirson & V. Mainil: Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. *Vet. Microbiol.* 63 249-259 (1998).
13. Gutzwiller, A.: Lactose digestion in calves affected with viral and cryptosporidial enteritis. 10th Internat. Conf. Product. Dis. Farm. Animals, Utrecht 154 (1998).
14. Liberg, P., & J. Carlsson: Colstrum in Swedish dairy cows: Quality and effects on passive immunity in the calves. 10th Internat. Conf. Product. Dis. Farm. Animals, Utrecht 51 (1998).
15. Doll, K., P. Weirather, & H.-M. Küchle: Kälberdurchfall als Bestandsproblem: Betriebsinterne Faktoren und häufige Behandlungsfehler. *Prakt. Tierarzt* 76 995-1004 (1995).
16. Garthwaite, B.D., J.K. Drackley, G.C. McCoy & E.H. Jaster: Whole milk and oral rehydration solution for calves with diarrhea of spontaneous origin. *J. Dairy Sci.* 77 835-843 (1994).